

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



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Celis Portilla, Cinthia  
Bach. Montenegro Valderrama, Christian Mark

ASESOR:

Dr. Capa Robles, Willian

ID ORCID: 0000-0003-3402-613X

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2024

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



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y aprobado por el asesor

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ch', is positioned above a horizontal line.

Dr. Capa Robles, Willian  
ID ORCID: 0000-0003-3402-613X

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2024

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



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

REVISADO Y APROBADO POR EL JURADO EVALUADOR

M. Sc. Diestra Balta Jesús Grabiel  
DNI: 70553964  
ID ORCID: 0000-0003-2462-2229

Dr. Capa Robles Willian Robert  
DNI: 32969285  
ID ORCID: 0000-0003-3402-613X

Mg. Lecca Zavaleta Victor Eduardo  
DNI: 42636735  
ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ  
2024

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el aula multimedia de la Facultad de Ciencias, y dando cumplimiento a la Resolución N° 285-2024-UNS-CFC, siendo las 17:00 h del día 15 de noviembre del 2024:


Se reunió el Jurado Evaluador presidido por M.Sc Jesús Diestra Balta, teniendo como miembros a Mg. Víctor Lecca Zavaleta (secretario), y Dr. Willian Capa Robles (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por los tesisistas Bach. Celis Portilla, Cinthia y Bach. Crhistian Mark Montenegro Valderrama, quienes expusieron el trabajo intitulado:

**“Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01”.**


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

El Jurado después 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 diecisiete (17) puntos, según el artículo 112° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 337-2024-CU-R-UNS).


Siendo las 18:00 h del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

  
.....  
Nombre: M Sc. Jesús Diestra Balta

Presidente

  
.....  
Nombre: Mg. Víctor Lecca Zavaleta

Secretario

  
.....  
Nombre: Dr. Willian Capa Robles  
Integrante

Distribución: Integrantes JE ( ), tesisistas ( ) y archivo FC ( ).

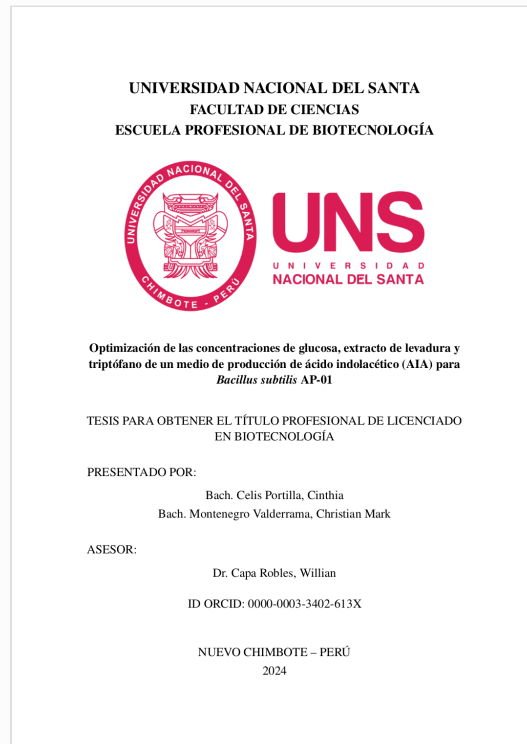


## Recibo digital

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: Cinthia CELIS PORTILLA  
Título del ejercicio: Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de...  
Título de la entrega: Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de...  
Nombre del archivo: Tesis\_AIA\_-\_Version\_Final.pdf  
Tamaño del archivo: 2.26M  
Total páginas: 90  
Total de palabras: 24,462  
Total de caracteres: 124,475  
Fecha de entrega: 03-ene.-2025 07:12p. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entrega... 2559638573



# Optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para Bacillus subtilis AP-01 Cinthia Celis y Mark Montenegro

## INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

11%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="http://repositorio.uns.edu.pe">repositorio.uns.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
4	Submitted to Universidad Nacional del Santa Trabajo del estudiante	1%
5	<a href="http://oa.upm.es">oa.upm.es</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="http://ilitia.cua.uam.mx:8080">ilitia.cua.uam.mx:8080</a> Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad Nacional de Trujillo Trabajo del estudiante	<1%
8	<a href="http://doi.org">doi.org</a> Fuente de Internet	<1%

## DEDICATORIA

*A Dios por guiarnos  
siempre en el camino  
correcto y nos de siempre  
salud y fortaleza en todo  
momento.*

*A nuestros padres por  
habernos apoyado en esta  
carrera académica, y que  
nuestros hermanos hayan  
sido nuestra inspiración  
para seguir en esta  
constante superación, día  
a día, incentivándonos a  
terminar y conseguir  
nuestros objetivos,  
logrando concluir hoy  
nuestra meta.*

*A nuestros maestros, cuya  
dedicación y enseñanzas  
han iluminado nuestro  
camino educativo, gracias  
por su paciencia y guía  
constante. Sin su apoyo y  
conocimiento, este logro  
no habría sido posible.*

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecemos profundamente a nuestro asesor, el Dr. William Capa Robles, Director de la EAP de Biotecnología. Su confianza en nosotros y su constante apoyo académico han sido pilares esenciales a lo largo de todo este proceso. Su valiosa orientación, sus conocimientos especializados que nos han guiado en cada etapa de nuestra investigación, permitiéndonos superar desafíos y alcanzar nuestros objetivos académicos.

Asimismo, extendemos nuestro reconocimiento a nuestros distinguidos profesores: el Dr. Ángel Castro, el Dr. Roberto Vega Paulino y el Mblgo. Eterio Alva Muñoz. Su compromiso con nuestra formación y su pasión por la enseñanza nos han proporcionado las sólidas bases académicas necesarias para desarrollarnos en esta carrera. A través de sus clases, mentorías y asesorías, hemos adquirido no solo conocimientos técnicos, sino también habilidades críticas y analíticas que han enriquecido nuestra experiencia educativa.

También queremos expresar nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional del Santa por brindarnos un entorno académico de excelencia, así como por proporcionar las instalaciones y recursos necesarios para llevar a cabo nuestra investigación. El apoyo institucional y el compromiso de la universidad con el desarrollo académico han sido fundamentales para el éxito de este trabajo.



# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA . . . . .	3
1.2 OBJETIVOS . . . . .	3
1.2.1 Objetivo Principal . . . . .	3
1.2.2 Objetivos Específicos . . . . .	3
1.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS . . . . .	4
1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA . . . . .	4
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes . . . . .	6
2.1.1 <i>Bacillus</i> como productor de AIA . . . . .	6
2.1.2 Estrategias de optimización . . . . .	7
2.1.3 Elección del tipo de nutriente . . . . .	10
2.1.3.1 Medio TGY (Tryptona, Glucosa y Extracto de Levadura)	10
2.1.3.2 Extracto de levadura . . . . .	11
2.1.3.3 Glucosa . . . . .	11
2.1.4 Producción de AIA en Perú . . . . .	11

2.2	Marco Conceptual . . . . .	12
2.2.1	Fitohormonas . . . . .	12
2.2.1.1	Auxinas . . . . .	14
2.2.1.1.1	Introducción al AIA y su importancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas . . . . .	14
2.2.1.1.2	Estructura química del AIA . . . . .	14
2.2.1.1.3	Biosíntesis del AIA en plantas y las diferentes rutas metabólicas involucradas . . . . .	15
2.2.1.1.4	Regulación espacio-temporal del AIA . . . . .	16
2.2.1.1.5	Mecanismos moleculares de acción del AIA y su interacción con otras hormonas . . . . .	16
2.2.1.1.6	Transporte de AIA . . . . .	16
2.2.1.1.7	Teoría del crecimiento ácido . . . . .	17
2.2.1.1.8	Biosíntesis de AIA en bacterias . . . . .	18
<b>III.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
3.1	Método . . . . .	21
3.1.1	Diseño de investigación . . . . .	21
3.1.2	Población y muestra . . . . .	22
3.1.3	Técnica e instrumento de recolección de datos . . . . .	23
3.1.3.1	Formulación del medio definido para <i>Bacillus subtilis</i> AP-01 . . . . .	23
3.1.3.2	Cuantificación de biomasa . . . . .	23
3.1.3.3	Cuantificación de glucosa . . . . .	23
3.1.3.4	Cuantificación de triptófano . . . . .	24
3.1.3.5	Cuantificación de ácido indolacético (AIA) . . . . .	24
3.1.4	Metodología para el Análisis Estadístico del Grupo Control y Experimental . . . . .	25
3.1.5	Análisis Estadístico del diseño Box-Behnken . . . . .	28
3.1.5.1	Diseño Experimental y Modelo de Regresión . . . . .	28
3.1.5.2	Análisis Estadístico y ANOVA . . . . .	28
3.1.5.3	Análisis de Residuos . . . . .	29
3.1.5.4	Diagramas de Pareto y Caja de Bigotes . . . . .	29
3.1.5.5	Optimización mediante Superficie de Respuesta (RSM) . . . . .	29
3.1.6	Modelo Logístico y Luedeking-Piret . . . . .	30
3.1.6.1	Modelo Logístico para Biomasa . . . . .	30
3.1.6.2	Modelo de Luedeking-Piret para Sustrato . . . . .	30
3.1.6.3	Modelo de Luedeking-Piret para Producto . . . . .	31

3.1.6.4	Ecuaciones Derivadas . . . . .	32
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
4.1	Resultados . . . . .	36
4.1.1	Cinética de producción de AIA por <i>Bacillus subtilis</i> AP-01 . . . . .	36
4.1.2	Análisis estadístico y optimización de la producción de ácido indolacético (AIA) . . . . .	39
4.1.2.1	Análisis estadísticos de la producción de AIA . . . . .	39
4.1.2.1.1	Diagrama de Caja y Bigotes . . . . .	39
4.1.2.1.2	Análisis de Pareto . . . . .	40
4.1.2.1.3	Análisis ANOVA . . . . .	42
4.1.2.1.4	Coefficientes de Regresión . . . . .	43
4.1.2.1.5	Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) . . . . .	47
4.1.2.1.6	Optimización de AIA . . . . .	49
4.2	Discusión . . . . .	52
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>57</b>
5.1	Conclusiones . . . . .	57
5.2	Recomendaciones . . . . .	58
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Estructuras moleculares de fitohormonas responsables del crecimiento vegetal . . . . .</i>	13
Figura 2	<i>Estructura molecular del ácido indol acético (AIA) . . . . .</i>	15
Figura 3	<i>Modelo metabólico general de la conversión de triptófano en ácido indol acético (AIA) . . . . .</i>	20
Figura 4	<i>Cinética de producción de AIA por Bacillus subtilis AP-01 . . . . .</i>	37
Figura 5	<i>Diagrama de cajas y bigotes . . . . .</i>	40
Figura 6	<i>Diagrama de pareto para la producción de AIA (modelo completo) . . . . .</i>	41
Figura 7	<i>Diagrama de pareto para la producción de AIA (modelo simplificado) . . . . .</i>	42
Figura 8	<i>Análisis de superficie de respuesta . . . . .</i>	48
Figura 9	<i>Producción de AIA en diversos estudios comparativos . . . . .</i>	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Condiciones de fermentación y producción de AIA en Bacillus . . .</i>	7
Tabla 2	<i>Condiciones de fermentación y producción de AIA en hongos y bacterias . . . . .</i>	9
Tabla 3	<i>Rangos de variables en el estudio de optimización . . . . .</i>	22
Tabla 4	<i>Diseño experimental y respuestas de producción de AIA . . . . .</i>	22
Tabla 5	<i>Parámetros y fórmulas de la cinética de producción de AIA por Bacillus subtilis AP-01 . . . . .</i>	35
Tabla 6	<i>Parámetros del modelo Logístico y Luedeking-Piret . . . . .</i>	38
Tabla 7	<i>Diseño experimental, variables y respuestas de producción de AIA</i>	39
Tabla 8	<i>Análisis de varianza . . . . .</i>	43
Tabla 9	<i>Coefficientes del modelo . . . . .</i>	44
Tabla 10	<i>Niveles óptimos de las variables . . . . .</i>	45
Tabla 11	<i>Comparación de valores actuales y predichos de AIA . . . . .</i>	46
Tabla 12	<i>Contribución de los factores . . . . .</i>	47
Tabla 13	<i>Valores de deseabilidad . . . . .</i>	49
Tabla 14	<i>Análisis de varianza (ANOVA) . . . . .</i>	51
Tabla 15	<i>Pruebas post-hoc de Tukey HSD . . . . .</i>	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Medio definido con los requerimientos específicos para <i>Bacillus subtilis</i> AP-01 . . . . .	64
Anexo 2 Composición del medio TGY (triptona, glucosa y extracto de levadura)	65
Anexo 3 Composición del reactivo de Salkowski . . . . .	65
Anexo 4 Composición de la solución de cloruro de hierro (0.5M) . . . . .	65
Anexo 5 Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de biomasa	66
Anexo 6 Curva de calibrado de biomasa . . . . .	66
Anexo 7 Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de glucosa	67
Anexo 8 Curva de calibrado de glucosa . . . . .	67
Anexo 9 Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de ácido indolacético (AIA) . . . . .	68
Anexo 10 Curva de calibrado de AIA . . . . .	68
Anexo 11 Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de triptófano	69
Anexo 12 Curva de calibrado de triptófano . . . . .	69
Anexo 13 Datos de la cinética de producción de AIA por <i>Bacillus subtilis</i> AP-01	70
Anexo 14 Evaluación del perfil de deseabilidad del diseño Box-Behnken . . . .	71
Anexo 15 Evaluación del ajuste y análisis de residuos para la producción de AIA del diseño Box-Behnken . . . . .	72
Anexo 16 Evaluación estadística descriptiva de grupos experimentales . . . . .	75
Anexo 17 Evaluación de normalidad de grupos experimentales . . . . .	75
Anexo 18 Evaluación de homogeneidad de grupos experimentales . . . . .	75
Anexo 19 Histogramas de distribución normal de grupos experimentales . . . .	76
Anexo 20 Boleta de venta del bioproducto Biosplent . . . . .	77

## RESUMEN

Este estudio se enfocó en la optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano en un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01. Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken para evaluar el efecto de estas variables en la producción de AIA. Este diseño experimental consistió en 15 experimentos, con tres variables independientes (glucosa, extracto de levadura y triptófano) y tres niveles para cada una. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 100 mL con 50 mL de medio, a una temperatura de 30°C, pH inicial de 7 y agitación de 100 rpm durante 48 horas.

Para determinar la cinética del microorganismo, se preparó un inóculo a partir de colonias aisladas y se inoculó en el medio optimizado. Se realizaron muestreos a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 9, 26 y 48 horas) para cuantificar la biomasa, glucosa, triptófano y producción de AIA. La biomasa se cuantificó mediante el método de peso seco, la glucosa por el método DNS, el triptófano por el método Hopkins-Cole modificado y el AIA por el método de Salkowski. Los datos experimentales se ajustaron a modelos matemáticos, como el modelo logístico y el modelo de Luedeking-Piret, para determinar los parámetros cinéticos.

El análisis estadístico incluyó el uso de diagramas de Pareto, metodología de superficie de respuesta (MSR) y análisis de varianza (ANOVA) para identificar los efectos significativos de las variables y determinar las condiciones óptimas de producción de AIA. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas fueron: 3.559 g/L de glucosa, 0.150 g/L de extracto de levadura y 0.650 g/L de triptófano, lo que permitió alcanzar una producción de  $300.279 \pm 18.646$  mg/L de AIA. El análisis estadístico reveló que los efectos cuadráticos del extracto de levadura, glucosa y triptófano fueron los más significativos en la producción de AIA.

Palabras clave: *Optimización, Ácido indolacético (AIA), Bacillus subtilis, Diseño experimental Box-Behnken, Cinética microbiana, Parámetros cinéticos*

## ABSTRACT

This study focused on the optimization of glucose, yeast extract, and tryptophan concentrations in an indole acetic acid (IAA) production medium for *Bacillus subtilis* AP-01. A Box-Behnken experimental design was used to evaluate the effect of these variables on IAA production. The experimental design consisted of 15 experiments, with three independent variables (glucose, yeast extract, and tryptophan) and three levels for each. The experiments were carried out in 100 mL flasks with 50 mL of medium, at a temperature of 30°C, initial pH of 7, and agitation of 100 rpm for 48 hours.

To determine the kinetics of the microorganism, an inoculum was prepared from isolated colonies and inoculated into the optimized medium. Samples were taken at different time points (0, 2, 4, 6, 9, 26 and 48 hours) to quantify biomass, glucose, tryptophan, and IAA production. Biomass was quantified by the dry weight method, glucose by the DNS method, tryptophan by the modified Hopkins-Cole method, and IAA by the Salkowski method. The experimental data were fitted to mathematical models, such as the logistic model and the Luedeking-Piret model, to determine the kinetic parameters.

The statistical analysis included the use of Pareto diagrams, response surface methodology (RSM), and analysis of variance (ANOVA) to identify the significant effects of the variables and determine the optimal conditions for IAA production. The results showed that the optimal conditions were: 3.559 g/L of glucose, 0.150 g/L of yeast extract, and 0.650 g/L of tryptophan, which allowed a production of  $300.279 \pm 18.646$  mg/L of IAA. The statistical analysis revealed that the quadratic effects of yeast extract, glucose, and tryptophan were the most significant in IAA production.

**Keywords:** *Optimization, Indole acetic acid (IAA) Bacillus subtilis, Box-Behnken experimental design, Microbial kinetics, Kinetic parameters*



## I. INTRODUCCIÓN

Desde la era de Darwin se ha revelado la importancia de las hormonas vegetales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En el siglo XX, estas hormonas motivaron una intensa investigación debido a su impacto en la productividad de los cultivos, actuando principalmente a nivel celular y alterando los patrones de crecimiento de las plantas. Darwin estudió la hormona auxina, la primera fitohormona descubierta, crucial para el desarrollo vegetal y utilizada en la agronomía por sus numerosas ventajas. Hoy, se reconocen siete tipos de fitohormonas esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wagi y Ahmed, 2019).

Sin embargo, a pesar de los avances en el entendimiento de las fitohormonas, la producción eficiente y sostenible de estos compuestos sigue siendo un desafío significativo. La creciente demanda global de alimentos, junto con la necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos que impactan negativamente el medio ambiente, subraya la urgencia de desarrollar alternativas biotecnológicas efectivas. En este contexto, la optimización de la producción de ácido indolacético (AIA), una auxina fundamental, se convierte en una prioridad para mejorar el rendimiento y la salud de los cultivos de manera sostenible.

El ácido indolacético (AIA), una auxina, es fundamental para la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, influyendo en la elongación y división celular, diferenciación de tejidos, formación de raíces y desarrollo de frutos (Bunsangiam et al., 2021). El AIA se sintetiza en las partes aéreas de las plantas y se transporta a las raíces, mejorando el desarrollo radicular y la nutrición de la planta, lo que resulta en un mejor crecimiento y rendimiento. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) pueden sintetizar AIA, destacando su importancia para el desarrollo vegetal.

*Bacillus subtilis*, una bacteria Gram-positiva, es conocida por producir AIA, lo que la convierte en un candidato prometedor para biofertilizantes (Chagas et al., 2015). La optimización de la producción de AIA por *B. subtilis* depende de la composición del medio de cultivo, donde la glucosa, el extracto de levadura y el triptófano son cruciales (Castillo et al., 2022a). La glucosa actúa como fuente de carbono y energía, el extracto de levadura proporciona nutrientes esenciales y factores de crecimiento, y el triptófano es el precursor directo en la ruta biosintética del AIA (Bunsangiam et al., 2021; Castillo et al., 2021).

Diversos estudios han demostrado que la optimización de los componentes del medio de cultivo puede llevar a mejoras significativas en la producción de metabolitos secundarios por microorganismos. Özdal et al. (2016) informaron que la manipulación de las concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo permitió aumentar la producción de AIA en *Bacillus cereus*. Nutaratat et al. (2015) mostraron que la suplementación con

triptófano aumentó la síntesis de AIA en levaduras rojas. Wagi y Ahmed (2019) señalaron el impacto de diversos factores, como la fuente de carbono, los medios y la concentración de triptófano en la síntesis de auxinas bacterianas. Estos hallazgos subrayan la importancia de diseñar medios de cultivo específicos para maximizar la producción de compuestos de interés biotecnológico.

En el presente estudio, se propone optimizar las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano en un medio de cultivo diseñado para *Bacillus subtilis* AP-01. Este enfoque busca incrementar la producción de AIA y contribuir al desarrollo de biofertilizantes más eficientes y sostenibles. La metodología empleada incluye diseños experimentales como el Box-Behnken y análisis de superficie de respuesta para identificar las condiciones óptimas de cultivo, permitiendo evaluar la interacción entre los diferentes componentes del medio y su impacto en la producción de AIA (Myo et al., 2019).

La optimización de la producción de AIA mediante el uso de *B. subtilis* AP-01 tiene implicaciones significativas para la biotecnología vegetal. En un contexto donde la demanda global de alimentos sigue en aumento, las soluciones biotecnológicas que mejoren el rendimiento y la salud de los cultivos se tornan esenciales. La producción microbiana de AIA no solo ofrece una alternativa sostenible a los fertilizantes químicos y reguladores de crecimiento, sino que también puede mejorar la resistencia de las plantas a condiciones de estrés abiótico, como sequías o suelos pobres en nutrientes.

La investigación en la producción de AIA por microorganismos no es nueva, pero la optimización específica de medios de cultivo para cepas particulares como *B. subtilis* AP-01 es un área que aún requiere exploración. La identificación de las concentraciones óptimas de glucosa, extracto de levadura y triptófano puede proporcionar una hoja de ruta para la producción eficiente de AIA a gran escala. Este estudio también puede servir como un modelo para la optimización de la producción de otros metabolitos secundarios de interés agrícola, ampliando el alcance de la biotecnología microbiana en la agricultura (Castillo et al., 2021, 2022a, 2022b).

Así, la optimización de la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 representa una convergencia de la biotecnología y la agricultura sostenible. La metodología empleada en este estudio incluye el uso de diseños experimentales como el Box-Behnken, que permite la evaluación de la interacción entre los diferentes componentes del medio de cultivo y su impacto en la producción de AIA. El análisis de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es una técnica estadística útil para la optimización de procesos, que ayuda a identificar las condiciones óptimas para maximizar la producción de AIA (Myo et al., 2019).

La implementación de biofertilizantes basados en la producción optimizada de AIA por *B. subtilis* AP-01 podría tener un impacto significativo en la agricultura moderna. Además de mejorar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos, estos biofertilizantes podrían reducir la dependencia de fertilizantes químicos, disminuyendo así el impacto ambiental negativo asociado con su uso. La producción sostenible de alimentos es un desafío global, y las soluciones biotecnológicas como la optimización de la producción de AIA representan un paso importante hacia la agricultura sostenible.

## 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las concentraciones óptimas de glucosa, extracto de levadura y triptófano de un medio de producción de ácido indolacético (AIA) para *Bacillus subtilis* AP-01?

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Principal

Optimizar la producción de ácido indolacético (AIA) por *Bacillus subtilis* AP-01, definido por las concentraciones de glucosa (3.559 g/L), extracto de levadura (0.150 g/L) y triptófano (0.650 g/L), en base a medios de cultivo definidos y complejos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la cinética de producción de AIA, el crecimiento de *Bacillus subtilis* AP-01 y el consumo de triptófano, y cuantificar la eficiencia de la producción de AIA mediante la determinación de parámetros cinéticos clave ( $\mu_{max}$ ,  $q_p$ ,  $q_s$ ,  $Q_x$ ,  $Q_p$ ,  $Q_s$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ), en condiciones estándar (30°C, pH 7, 100 RPM) durante 48 horas, en un medio de cultivo con las concentraciones de glucosa (3.559 g/L), extracto de levadura (0.150 g/L) y triptófano (0.650 g/L) a partir del análisis de los datos cinéticos generados.
- Maximizar la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR), utilizando un diseño experimental Box-Behnken.
- Validar estadísticamente la mejora en la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 con un diseño Box-Behnken, con los rendimientos de producción reportados en la literatura científica para *Bacillus* en medios definidos y complejos.

### 1.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La optimización de las concentraciones de glucosa (3.559 g/L), extracto de levadura (0.15 g/L) y triptófano (0.65 g/L) de un medio de producción para *Bacillus subtilis* AP-01, mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con diseño Box-Behnken, resultará en un incremento significativo y estadísticamente superior en la producción de ácido indolacético (AIA) en comparación con la literatura científica.

### 1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Los avances en biotecnología agrícola han demostrado ser fundamentales para enfrentar los desafíos actuales en la producción de alimentos a nivel mundial. La optimización de métodos para la producción de fitohormonas naturales ofrece una alternativa sostenible a los agroquímicos sintéticos, promoviendo prácticas agrícolas más ecológicas y eficientes (Bunsangiam et al., 2021). En este contexto, nuestra investigación se centra en el ácido indolacético (AIA), una fitohormona esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas.

El uso futuro de fitohormonas como agroquímicos potenciales (biofertilizantes) de manera exógena, mediante pulverización foliar, pre-siembra de semillas y encapsulación, contribuirá al crecimiento, optimización del rendimiento y tolerancia al estrés en condiciones adversas, como salinidad y escasez de nutrientes (Ali et al., 2024). Esto se traducirá en una mayor productividad agrícola y mejorará la seguridad alimentaria, que actualmente se ve amenazada por la creciente demanda de alimentos derivada del aumento poblacional en áreas rurales y urbanas de América Latina y el Caribe (FAO et al., 2023).

Adicionalmente, la aplicación de AIA en la agricultura intensiva ayudará a reducir costos ambientales y económicos, beneficiando a pequeños y medianos agricultores. Esto es particularmente relevante en el contexto de la crisis mundial de escasez y el incremento global de precios de fertilizantes y agroquímicos, que han provocado la degradación de suelos (acidificación, erosión, etc.) en cultivos comerciales importantes, como lo demuestran estudios sobre la papa (*Solanum tuberosum*) en Perú (Huayhuacuri et al., 2020).

De esta manera, nuestra investigación contribuye a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas, en particular a los objetivos de “Hambre Cero” (ODS 2) y “Acción por el Clima” (ODS 13) (Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), 2022).

Este estudio aborda la necesidad de profundizar en la comprensión de los procesos que facilitan la producción eficiente del ácido indolacético (AIA) por microorganismos como *Bacillus subtilis*. La producción microbiana de AIA ofrece una alternativa sostenible a las fitohormonas sintéticas, potenciando prácticas agrícolas más ecológicas (Bunsangiam et al., 2021). Sin embargo, existe un vacío en la literatura respecto a la optimización de los nutrientes del medio de cultivo que maximicen la producción de AIA. Se ha demostrado que la manipulación de factores nutricionales, como fuentes de carbono y nitrógeno, influye significativamente en la biosíntesis de metabolitos secundarios esenciales para la nutrición y crecimiento vegetal (Özidal et al., 2016).

Nuestra investigación se enfoca en optimizar los componentes del medio de cultivo—glucosa, extracto de levadura y triptófano—para maximizar la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01. Al identificar las concentraciones óptimas de estos nutrientes, buscamos aumentar la eficiencia en la producción de esta fitohormona esencial, lo cual puede traducirse en prácticas agrícolas más sostenibles y una mejor nutrición vegetal. Esto es fundamental para enfrentar los desafíos actuales en la seguridad alimentaria y promover una agricultura que satisfaga la creciente demanda de alimentos sin comprometer el medio ambiente.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

#### 2.1.1 *Bacillus* como productor de AIA

Las bacterias del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir la fitohormona ácido indolacético (AIA), la cual desempeña un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La producción de AIA por *Bacillus* ha sido ampliamente estudiada en el campo de la biotecnología vegetal, debido a su potencial aplicación en diversas áreas (Castillo et al., 2021, 2022a, 2022b; Khianggam et al., 2023; Özdal et al., 2016).

En el caso de *Bacillus subtilis*, los estudios se enfocaron en la optimización de la producción de AIA. Utilizaron un medio de cultivo NB modificado, suplementado con glucosa (5 g/L) y triptófano (0.5 g/L). Los experimentos se llevaron a cabo tanto en matraces como en un biorreactor con control de pH. Bajo estas condiciones, lograron obtener producciones de AIA de 95 mg/L y 230 mg/L, respectivamente (Castillo et al., 2021, 2022a, 2022b).

Respecto a *Bacillus aryabhatai*, Khianggam et al. (2023) estudiaron la cepa MG9. Cultivaron esta bacteria en medio NB con triptófano (1 g/L) durante 48 horas, manteniendo un pH controlado a 6. Bajo estas condiciones, la cepa MG9 produjo 195.55 mg/L de AIA.

Por otro lado, Özdal et al. (2016) realizaron investigaciones con *Bacillus cereus*. En su estudio, encontraron que esta bacteria producía 46.25 mg/L de AIA cuando se cultivaba en medio LB suplementado con triptófano (1 g/L), sin ningún tipo de optimización. Posteriormente, al utilizar un medio LB con glucosa (10 g/L) y triptófano (5 g/L), y aplicar la inmovilización de las células, lograron aumentar la producción de AIA a 300 mg/L.

Diferentes cepas de *Bacillus* se mencionan en la Tabla 1, estos se han estudiado, destacando los principales nutrientes y condiciones de fermentación que permitieron obtener las mayores producciones de AIA, así como las estrategias de optimización empleadas para maximizar dichos rendimientos.

**Tabla 1***Condiciones de fermentación y producción de AIA en Bacillus*

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones Fermentación	de Producción de AIA	Tipo de optimización	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	Medio M9 modificado - Glucosa (5 g/L) - Triptófano (0.5 g/L)	Matraces - Tiempo: 24 horas - Agitación: 220 rpm	95 mg/L	Análisis computacional de flujo metabólico	Castillo et al., 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	Medio M9 modificado - Glucosa (5 g/L) - Triptófano (0.5 g/L)	Biorreactor - Tiempo: 48 horas - Agitación: 250 rpm pH: controlado	230 mg/L	Análisis computacional de flujo metabólico	Castillo et al., 2022a, 2022b
<i>Bacillus aryabhatai</i> MG9	Medio NB - Triptófano (1 g/L)	Matraces - Tiempo: 48 horas - Agitación: 150 rpm pH: 6	195.55 mg/L	Optimización de tiempo de incubación, pH y concentración de triptófano	Khianngam et al., 2023
<i>Bacillus cereus</i>	Medio LB - Triptófano (1 g/L)	Matraces: 250 ml / 50 ml de medio - Tiempo: 3 días - Temperatura: 30°C - Agitación: 150 rpm pH: 7.2	46.25 mg/L	Sin optimizar	Özdal et al., 2016
<i>Bacillus cereus</i>	Glucosa (10 g/L) - Triptófano (1 g/L) - Tris Buffer	Matraces - Tiempo: 18 horas - Temperatura: 35°C - Agitación: 150 rpm pH: 8.0	300 mg/L	Inmovilización de células en perlas de gel de alginato de calcio	Özdal et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> TIB6	Caldo nutritivo - Glucosa (10 g/L) - Peptona (5 g/L) - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.3 g/L) - MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.5 g/L) - NaCl (3 g/L) - Sucrosa y extracto de levadura (optimizado)	Matraces - Temperatura: 37°C - Agitación: 200 rpm - L-triptófano: 0.088% - Extracto de levadura: 0.82% - Ratio de inoculación: 1.65%	120,846 mg/L	Optimización de fuentes de carbono y nitrógeno, diseño Plackett-Burman, Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)	Dat et al., 2015
<i>Bacillus velezensis</i> MOST-IAA	Medio optimizado: - D(+) Manosa (4.41 g/L) - Manitol (8.66 g/L) - Triptófano (0.93 g/L) - Nitrato de potasio (5.88 g/L) - Cloruro de amonio (1.29 g/L)	Matraces - Temperatura: 28.5 °C - pH inicial: 7.69 - Agitación: 150 rpm (implícito)	56.60 mg/L	Diseño Plackett-Burman y Diseño Box-Behnken (RSM)	Abo-Elsoud et al., 2023

*Nota.* Esta tabla presenta las condiciones de cultivo y producción de ácido indolacético (AIA) por diferentes especies de *Bacillus*, bajo diversas condiciones experimentales y tipos de optimización.

### 2.1.2 Estrategias de optimización

Las estrategias de optimización para mejorar la producción ácido indolacético (AIA), han sido estudiadas entre las cuales caben destacar: OFAT (Un factor a la vez),

Plackett-Burman, Box-Behnken y escalamiento en biorreactor (Bunsangiam et al., 2021, Nutaratat et al., 2015, Myo et al., 2019).

*Rhodospiridiobolus fauriei* DMKU-CP293 es una de las cepas destacadas en la producción de AIA. Bunsangiam et al. (2021) reportaron que esta bacteria fue capaz de producir 2870.15 mg/L de AIA en un biorreactor de 2 L, optimizando con OFAT las condiciones de fermentación, y los componentes del medio como glicerol (45 g/L), licor de maíz (20 g/L) y triptófano (5.5 g/L). Además, al escalar el proceso a un biorreactor de 15 L y posteriormente a uno de 100 L, lograron producciones de 3468.17 mg/L y 3569.32 mg/L, respectivamente.

Por otro lado, *Rhodospiridium paludigenum* DMKU-RP301 también ha demostrado ser un productor eficiente de AIA. Nutaratat et al. (2015) obtuvieron 1623.9 mg/L de AIA en matraces utilizando un medio con sacarosa (90 g/L), extracto de levadura (9 g/L) y triptófano (4.5 g/L), aplicando un diseño experimental de Plackett-Burman y Box-Behnken para optimizar las condiciones de cultivo. Al escalar el proceso a un biorreactor de 2 L, la producción se incrementó a 1627.1 mg/L.

En el caso de *Streptomyces fradiae* NKZ-259, Myo et al. (2019) reportaron una producción de 20.46 mg/L de AIA en un medio Gauze's No.1 con almidón (15 g/L) y KNO<sub>3</sub> (3 g/L), sin optimización. Posteriormente, al utilizar un diseño experimental de Plackett-Burman y Box-Behnken, lograron aumentar la producción a 52.058 mg/L y 82.363 mg/L, respectivamente.

Diferentes cepas de microorganismos se detallan en la Tabla 2, anteriormente descritas, se destacan con sus principales nutrientes y condiciones de fermentación que les permitieron obtener las mayores producciones de AIA, así como las estrategias de optimización empleadas para maximizar dichos rendimientos.



**Tabla 2***Condiciones de fermentación y producción de AIA en hongos y bacterias*

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones Fermentación	de Producción de AIA	Tipo de optimización	Referencia
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-CP293	Caldo YPD - Triptófano (1 g/L)	Matraces: 250 ml / 50 ml de medio - Tiempo: 7 días - Agitación: 170 rpm - Temperatura: 30°C	1061.97 mg/L	Sin optimización	Bunsangiam et al., 2021
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-CP293	Glicerol (45 g/L) - Licor de maíz (20 g/L) - Triptófano (5.5 g/L) - Extracto de levadura (10.5 g/L)	Biorreactor: 2L - Tiempo: 5 días - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 34°C	2870.15 mg/L	OFAT (Optimización de un factor a la vez)	Bunsangiam et al., 2021
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-CP293	Glicerol (45 g/L) - Licor de maíz (20 g/L) - Triptófano (5.5 g/L) - Extracto de levadura (10.5 g/L)	Biorreactor: 15L - Tiempo: 5 días - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 34°C	3468.17 mg/L	Escalamiento	Bunsangiam et al., 2021
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-CP293	Glicerol (45 g/L) - Licor de maíz (20 g/L) - Triptófano (5.5 g/L) - Extracto de levadura (10.5 g/L)	Biorreactor: 100L - Tiempo: 5 días - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 34°C	3569.32 mg/L	Escalamiento	Bunsangiam et al., 2021
<i>Rhodospiridium paludigenum</i> DMKU-RP301	Caldo YPD - Triptófano (1 g/L)	Matraces: 250 ml / 50 ml de medio - Tiempo: 7 días - pH: 6 - Agitación: 170 rpm - Temperatura: 30°C	321.7 mg/L	Sin optimización	Nutaratat et al., 2015
<i>Rhodospiridium paludigenum</i> DMKU-RP301	Sacarosa (90 g/L) - Extracto de levadura (9 g/L) - Triptófano (4.5 g/L)	Matraces: 250 ml / 50 ml de medio - Tiempo: 7 días - pH: 7.2 - Agitación: 100 rpm - Temperatura: 30°C	1623.9 mg/L	Plackett-Burman y Box-Behnken	Nutaratat et al., 2015
<i>Rhodospiridium paludigenum</i> DMKU-RP301	Sacarosa (90 g/L) - Extracto de levadura (9 g/L) - Triptófano (4.5 g/L)	Matraces: 250 ml / 50 ml de medio - Tiempo: 7 días - pH: 7.2 - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 30°C	1627.1 mg/L	Escalamiento	Nutaratat et al., 2015
<i>Streptomyces fradiae</i> NKZ-259	Medio Gause's No.1 - Triptófano (2 g/L)	Matraces - Tiempo: 7 días - pH: 6.5 - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 28°C	20.46 mg/L	Sin optimización	Myo et al., 2019
<i>Streptomyces fradiae</i> NKZ-259	Almidón (20 g/L) - KNO <sub>3</sub> (1.5 g/L) - Triptófano (3 g/L)	Matraces - Tiempo: 7 días - pH: 6.5 - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 28°C	52.058 mg/L	Plackett-Burman	Myo et al., 2019
<i>Streptomyces fradiae</i> NKZ-259	Almidón (20 g/L) - KNO <sub>3</sub> (3 g/L) - Triptófano (2 g/L)	Matraces - Tiempo: 7 días - pH: 6.5 - Agitación: 200 rpm - Temperatura: 28°C	82.363 mg/L	Box-Behnken	Myo et al., 2019

*Nota.* Esta tabla presenta las condiciones de cultivo y producción de ácido indolacético (AIA) por diferentes especies de microorganismos, bajo diversas condiciones experimentales y tipos de optimización.

### 2.1.3 Elección del tipo de nutriente

La elección del tipo de nutriente es un punto clave en la formulación en las estrategias de optimización para la mejora en la producción de ácido indolacético (AIA). Según Nutaratat et al. (2017) lograron 754.4 mg/L de AIA utilizando extracto de levadura y triptófano, optimizando el proceso para alcanzar 3804.2 mg/L. Busangiam et al. (2021) confirmaron esta eficacia con una producción de 846.25 mg/L. En cuanto a la glucosa, Castillo-Alfonso et al. (2021) reportaron una producción de 0.803 g AIA \* g Trp-1, siendo superada por el propionato de sodio con 0.975 g AIA \* g Trp-1.

#### 2.1.3.1 Medio TGY (Tryptona, Glucosa y Extracto de Levadura)

Los distintos medios de cultivo para la producción de ácido indol-3-acético (AIA) varían en su eficacia, dependiendo de su composición y capacidad de optimización. El caldo de agar nutritivo, compuesto por peptona, extracto de levadura, NaCl y agar, permite una producción de AIA que varía entre 0,76 µg/ml y 13,5 µg/ml (Kumari et al., 2018). Por otro lado, el caldo YEMB (Yeast Extract-Mannitol Broth), que contiene manitol, extracto de levadura y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , destaca por su versatilidad en la variación de fuentes de carbono y nitrógeno, alcanzando mayores niveles de AIA debido a la posibilidad de ajustar las concentraciones de L-triptófano (Suliasih y Widawati, 2020).

El medio JNFb<sup>-</sup> es uno de los más efectivos, logrando hasta 137,81 µg/ml de AIA con triptófano y 100,26 µg/ml sin él, mediante la optimización de variables como el pH y la temperatura. El medio Aleksandrov también es destacado, con producciones que oscilan entre 8,56 µg/ml y 24,22 µg/ml, superando a opciones menos eficientes como el caldo de agar nutritivo y el medio Pikovskaya, que produce entre 0,10 µg/ml y 12,7 µg/ml (Vishwakarma et al., 2017).

En comparación, el medio TGY (Tryptona-Glucosa-Extracto de Levadura) está compuesto por triptona, glucosa y extracto de levadura, proporcionando una base nutritiva efectiva para el crecimiento general de bacterias. Específicamente, el medio TGY contiene aproximadamente 10 g/L de triptona, 5 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura. Aunque TGY es adecuado para cultivos generales debido a su composición equilibrada que suministra fuentes esenciales de nitrógeno y carbono, ofrece menos flexibilidad y eficiencia en la producción de AIA en comparación con medios más especializados como YEMB o JNFb<sup>-</sup>. Esto se debe a que TGY no permite una variación tan amplia de nutrientes específicos ni la optimización de componentes clave como el triptófano, lo que limita su capacidad para maximizar la síntesis de AIA. No obstante, los medios ya mencionados no incluyen variación de L-triptófano. Es así que modificamos

el medio TGY para incluir triptófano, evaluando cada uno de sus componentes y cómo influyen en la producción de AIA mediante el diseño Plackett-Burman. Esta modificación permitió identificar los factores más significativos que afectan la producción de AIA, dando inicio a la optimización mediante estudios de variables.

### **2.1.3.2 Extracto de levadura**

Diversos estudios han resaltado la eficacia del extracto de levadura en la producción de AIA. Por ejemplo, Bunsangiam et al. (2021) lograron producir  $846.25 \pm 77.24$  mg/L de AIA utilizando este sustrato, el cual es más económico que el extracto de carne. Asimismo, Nutaratat et al. (2015) obtuvieron 754.4 mg/L de AIA en un medio modificado con 0.1% p/v de triptófano y extracto de levadura, siendo este más productivo que otras fuentes de nitrógeno. Estos investigadores optimizaron aún más la producción, obteniendo concentraciones óptimas de 1.3% de extracto de levadura y 1.1% de triptófano, pH inicial de 5.8, temperatura de 30°C y agitación de 200 rpm, lo que resultó en productividades experimentales y predichas de 3804.2 y 4334.2 mg/L de AIA, respectivamente.

### **2.1.3.3 Glucosa**

La glucosa también ha sido estudiada como sustrato en la producción de AIA. Baliyan et al. (2021) optimizó la producción de AIA utilizando glucosa, sacarosa, manitol y maltosa a concentraciones de 0.5 g/L, 1 g/L y 1.5 g/L. Por otro lado, se evaluaron diferentes sustratos, incluyendo glucosa, para determinar su capacidad de producir AIA en presencia de triptófano como inductor. Observaron que la glucosa produjo la mayor cantidad de biomasa, pero el propionato de sodio fue el sustrato más eficiente para la producción de AIA, con una producción de  $0.975 \text{ g AIA} \cdot \text{g Trp}^{-1}$ , en comparación con  $0.803 \text{ g AIA} \cdot \text{g Trp}^{-1}$  cuando se utilizó glucosa (Castillo et al., 2021, 2022a, 2022b).

### **2.1.4 Producción de AIA en Perú**

En Perú, los estudios sobre la optimización de los componentes de los medios de cultivo para la producción de ácido indolacético (AIA) aún son escasos. La mayoría de las investigaciones se han basado en el uso de medios de cultivo ya descritos en la literatura, sin abordar a fondo el metabolismo del microorganismo productor.

Por ejemplo, Raa (2018) utilizó un medio de cultivo a base de caldo de triptona de soja (TSB) para producir AIA en un biorreactor APPLIKON a pH 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 rpm, obteniendo una concentración de 36.386 µg/ml de AIA después de 72 horas de fermentación.

Por otro lado, Salvatierra (2022) empleó un medio de cultivo a base de caldo nutritivo (NB) suplementado con 1 mg/ml de triptófano, en un biorreactor Bioflo – Celligen 115, a pH 7 y temperatura óptima de 30°C, logrando una producción de 0.75 mg/L de AIA en 18 horas de fermentación.

Estos estudios muestran que, si bien se han utilizado medios de cultivo convencionales para la producción de AIA, aún existe un gran potencial de mejora a través de la optimización de los componentes del medio y las condiciones de cultivo, lo cual permitiría aumentar significativamente los rendimientos de este importante metabolito.

## **2.2 Marco Conceptual**

### **2.2.1 Fitohormonas**

Las fitohormonas, también conocidas como hormonas vegetales, son compuestos orgánicos que actúan en pequeñas concentraciones y regulan diversos procesos de crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés en las plantas, a diferencia de las hormonas animales, las fitohormonas no se producen en glándulas específicas, sino que pueden sintetizarse en diferentes partes de la planta y moverse hacia donde se necesitan (Guillory y Bonhomme, 2021).

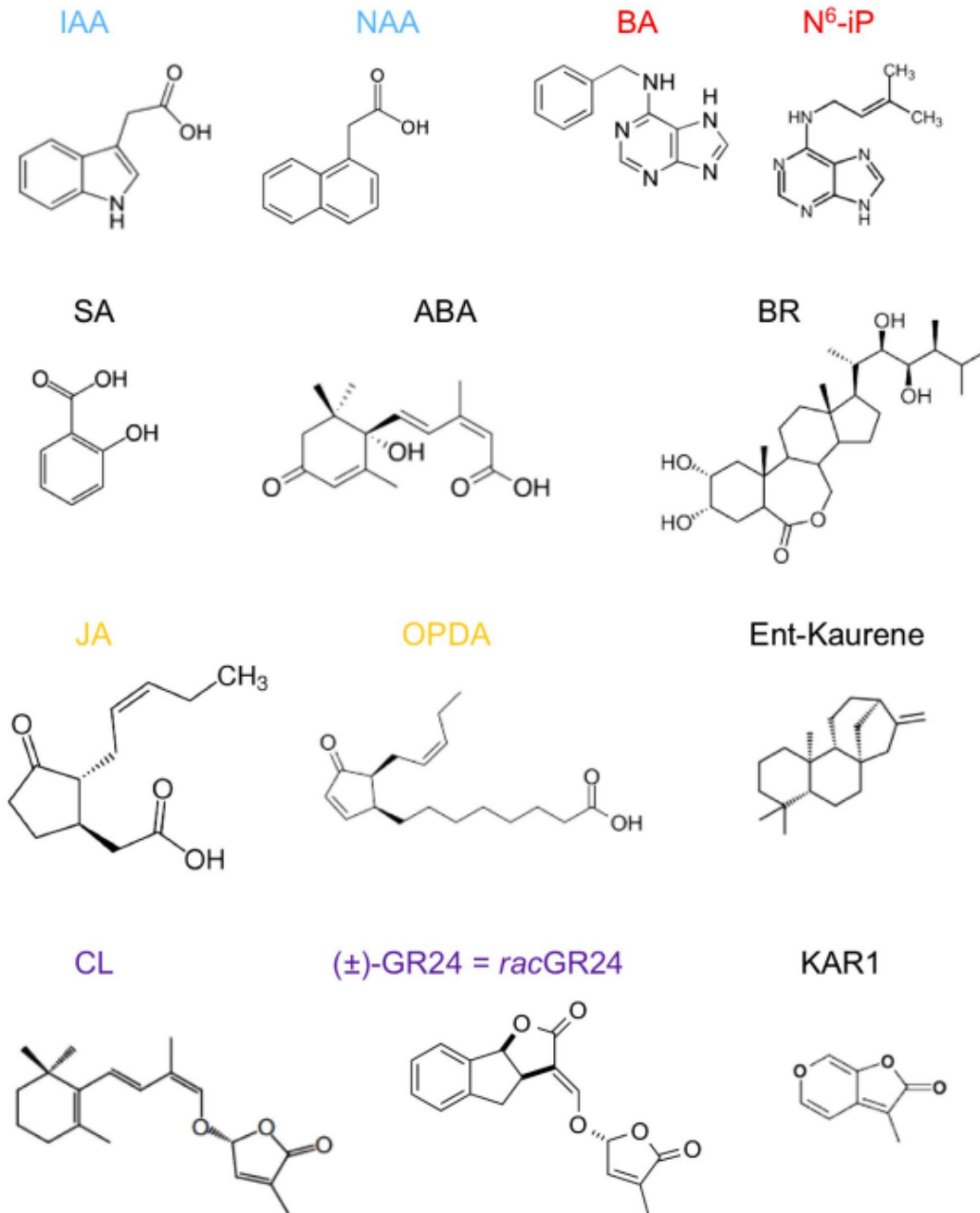
Guillory y Bonhomme (2021) mencionan que existen nueve grupos clásicos de fitohormonas, que incluyen auxinas (AUXs), citoquininas (CKs), giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA), etileno (ETH), brassinosteroides (BRs), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y estrigolactonas (SLs). Además, consideran que algunas sustancias comúnmente denominadas hormonas vegetales son incorrectamente clasificadas como tales. Entre estas se encuentran las poliaminas, las señales lipídicas intracelulares, los péptidos de señalización distintos de los CLE (CLAVATA3/ESR), algunos ARN mensajeros de señalización y los nucleótidos de monofosfato cíclico. Guillory y Bonhomme (2021) también discuten la posible existencia de una décima clase de fitohormonas, referida como el ligando KAI2 (KL), el cual es considerado un candidato debido a su papel en la señalización en *Physcomitrium patens*, un musgo modelo. Asimismo, se mencionan los péptidos de señalización CLE como una clase adicional relevante.

La representación cada molécula principal por cada grupo, se detalla en la Figura 1, para las auxinas, el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido 1-naftalenoacético (NAA), ambas en azul; en citoquininas, la adenina bencílica (BA) y la N6-(2-isopentenil)-adenina (N6-iP), en rojo; los jasmonatos incluyen el ácido jasmónico (JA) y el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA), representados en amarillo; las estrigolactonas, en morado, incluyen el carlactone

(CL); otros compuestos importantes son el ácido salicílico (SA), el ácido abscísico (ABA), los brassinosteroides (BR), y el Karrikin 1 (KAR1) o Karrikinolide.

**Figura 1**

*Estructuras moleculares de fitohormonas responsables del crecimiento vegetal*



*Nota.* La imagen muestra las estructuras moleculares de las principales fitohormonas responsables del desarrollo vegetal. Tomado de Guillory y Bonhomme (2021), p. 2.

### **2.2.1.1 Auxinas**

Las auxinas son una clase de moléculas pequeñas con la capacidad de inducir respuestas de crecimiento en las plantas. El término 'auxina' deriva de la palabra griega 'auxein' que significa 'crecer'. Las auxinas fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas y estudiadas. Como un importante grupo de fitohormonas, las auxinas están implicadas en la mayoría de los cambios cuantitativos de crecimiento que ocurren durante el ciclo de vida de una planta (Keswani et al., 2020).

#### **2.2.1.1.1 Introducción al AIA y su importancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas**

A inicios del siglo XIX, el botánico alemán Julian von Sachs propuso la existencia de una sustancia interna que regulaba el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta sustancia llamada auxina, se desplazaba a través de la planta en respuesta a factores externos, como la gravedad. Años más tarde, Charles Darwin y su hijo Francis demostraron que el ápice del coleóptilo de las gramíneas era el responsable de que las plantas se curvaron hacia la luz. Esta curvatura era producida por una señal interna, que se cree que era la auxina. Salkowski (1885) descubrió el ácido indolacético (AIA). En 1926, Fritz Went demostró que la auxina era una sustancia química. Tras años de investigación, se identificó químicamente la auxina como ácido indolacético (AIA) (Enders y Strader, 2015; Keswani et al., 2020).

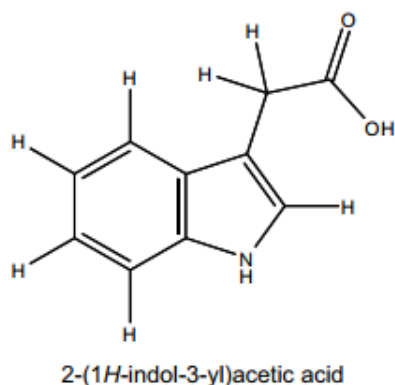
El ácido indol-3-acético (AIA) es la hormona vegetal más común de la clase de las auxinas y regula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Juega un papel clave en la fisiología vegetal y está involucrado en la división celular, el alargamiento, la diferenciación, el desarrollo del fruto y la respuesta fototrópica. El AIA no solo es producido por las plantas, sino también por microorganismos, incluyendo bacterias, actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras (Keswani et al., 2020).

#### **2.2.1.1.2 Estructura química del AIA**

El ácido indol acético (AIA) estructuralmente es un ácido carboxilo ( $C_{10}HNO_2$ , teniendo un peso molecular = 175 g/mol). En la Figura 2, se observa que el grupo carboxilo está unido a través de un grupo metileno a la posición C-3 de un anillo de indol (Ljung, 2013).

## Figura 2

Estructura molecular del ácido indol acético (AIA)



Nota. La imagen muestra la estructura molecular del AIA. Tomado de Ljung (2013), p. 2.

### 2.2.1.1.3 Biosíntesis del AIA en plantas y las diferentes rutas metabólicas involucradas

El AIA se produce a través de diferentes rutas metabólicas en las plantas, y cada una de ellas se nombra según el principal metabolito intermedio generado a partir del triptófano (Trp). La primera ruta metabólica es la vía del indol-3-acetaldoxime (IAOx), que se produce a partir de la conversión de Trp en IAOx, y luego en indol-3-acetonitrilo (IAN), que se hidroliza a IAA. La segunda ruta es la vía del indol-3-acetamida (IAM), que se produce a partir de la conversión de Trp en IAM, que se hidroliza a AIA. La tercera ruta es la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), que se produce a partir de la conversión de Trp en IPyA, que se convierte en AIA a través de la actividad de dos clases de enzimas: las triptófano-piruvato aminotransferasas (TAA1/TAR2) y las flavin monooxigenasas (YUCCA). Además, se ha demostrado que la producción de AIA puede ser estimulada por la activación transcripcional de los genes YUCCA8 y YUCCA9 a través de la exógena de metil jasmonato (MeJA) o la producción endógena de ácido jasmónico (JA), una fitohormona implicada en la regulación de la respuesta de defensa frente a patógenos necrotrofos e insectos herbívoros. La interacción entre el AIA y el JA actúa como un mecanismo interruptor 'encendido-apagado' en el balance entre crecimiento y defensa. Además, se menciona una cuarta ruta metabólica, la vía de la triptamina (TAM), que se cree que participa en la conversión de Trp a AIA, pero su operatividad en las plantas aún no está clara (Pérez, 2017).

#### **2.2.1.1.4 Regulación espacio-temporal del AIA**

El AIA es una hormona vegetal esencial para el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas, y su regulación espacio-temporal es crucial para su correcta función. La producción de AIA en las plantas está regulada por diferentes factores, como la luz, la temperatura y la presencia de otros estímulos ambientales. Además, el AIA puede actuar en diferentes tejidos y órganos de las plantas, y su función puede variar dependiendo del contexto fisiológico y ambiental. En cuanto al papel del AIA en la respuesta de las plantas a diferentes estímulos, se ha demostrado que el AIA está involucrado en la respuesta de las plantas a diferentes factores de estrés, como la sequía, la salinidad y la presencia de patógenos. Además, el AIA también está involucrado en la respuesta de las plantas a diferentes factores de crecimiento, como la luz y la temperatura (Pérez, 2017).

#### **2.2.1.1.5 Mecanismos moleculares de acción del AIA y su interacción con otras hormonas**

El AIA actúa a través de diferentes mecanismos moleculares en las plantas, incluyendo la regulación de la expresión génica, la modificación de la actividad enzimática y la regulación de la división celular. La regulación de la expresión génica es uno de los mecanismos moleculares de acción del AIA. El AIA puede regular la expresión de genes específicos en las plantas, lo que a su vez puede afectar la síntesis de proteínas y la actividad enzimática. Además, el AIA puede regular la actividad enzimática directamente, lo que puede afectar la producción de metabolitos específicos en las plantas. Otro mecanismo molecular de acción del AIA es la regulación de la división celular. El AIA puede estimular o inhibir la división celular en diferentes tejidos de las plantas, lo que puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas. El AIA también interactúa con otras hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA), para coordinar la respuesta de las plantas a diferentes estímulos ambientales. Por ejemplo, se ha demostrado que la interacción entre el AIA y el ET es esencial para la regulación de la división celular en las plantas, mientras que la interacción entre el AIA y el JA actúa como un mecanismo interruptor 'encendido-apagado' en el balance entre crecimiento y defensa (Pérez, 2017).

#### **2.2.1.1.6 Transporte de AIA**

El AIA se produce principalmente en el ápice del brote y se transporta de manera direccionada hacia las raíces. El transporte polar de auxinas juega un papel crucial en el mantenimiento de los gradientes y la distribución de auxinas en la planta. El



movimiento del ácido indol-3-acético (AIA) de célula a célula en las plantas se basa en sus características químicas. El AIA es un ácido orgánico débil compuesto por un anillo de indol unido a una cadena lateral que tiene un grupo carboxilo en el extremo. El modelo quimiosmótico explica que, debido al gradiente de protones generado por las bombas de protones en la membrana plasmática, el grupo carboxilo del AIA se protona en el ambiente ácido del apoplasto ( $\text{pH} \approx 5.5$ ), lo que hace que la molécula sea menos polar y pueda difundir pasivamente a través de la membrana. Sin embargo, en el citosol, donde el pH es menos ácido ( $\text{pH} \approx 7$ ), la molécula de AIA existe en su forma desprotonada y cargada negativamente, lo que evita su difusión libre a través de la membrana plasmática. Como resultado, la forma hidrofílica queda atrapada dentro de la célula y necesita la ayuda de transportadores o transportadores de flujo específicos para escapar (Ljung, 2013). Las proteínas PIN y los transportadores ABCB son responsables de la salida de auxinas de las células, mientras que las proteínas AUX1/LAX median la entrada de auxinas a las células. La distribución de auxinas se modifica dinámicamente en respuesta a señales de desarrollo y ambientales. (Pérez, 2017).

#### **2.2.1.1.7 Teoría del crecimiento ácido**

La teoría del crecimiento ácido, explica el proceso mediante el cual la auxina, una hormona vegetal, promueve la elongación de las células del tallo y del coleóptilo. Según esta teoría, la auxina provoca el aflojamiento de las paredes celulares al promover la ruptura de los enlaces resistentes en dichas paredes. Se cree que este aflojamiento de las paredes está mediado por la liberación de iones de hidrógeno, que acidifican la pared celular y estimulan los procesos de aflojamiento. La evidencia que respalda esta teoría incluye experimentos que muestran que los tejidos tratados con auxina excretan protones, que los buffers ácidos pueden inducir la elongación celular y que la fusicoccina, una toxina fúngica que promueve la acidificación de la pared celular, también provoca una rápida elongación. (Rayle y Cleland, 1992).

Las auxinas afectan el desdoblamiento de la pared celular y la expansión al desencadenar un ablandamiento de las uniones cruzadas entre celulosa y xiloglucano en la pared celular, lo que implica la modificación y remodelamiento de los componentes de la pared celular. Este proceso es mediado por las proteínas expansinas, que rompen los enlaces del polímero de xiloglucano, y por las enzimas Xyloglucan endotransglucosilasas/hidrolasas (XTHs), que catalizan la hidrólisis de los enlaces entre celulosa y xiloglucano. La percepción de auxinas por el receptor de auxinas Auxin Binding Protein 1 (ABP1) activa una ATPasa de protones en la membrana plasmática, lo que induce la extrusión de  $\text{H}^+$  y la acidificación del espacio extracelular. Esta acidificación activa las proteínas de la pared celular, como

las expansinas y las XTHs, y permite la absorción de agua a través de canales de entrada de K<sup>+</sup>, lo que aumenta la turgencia celular y promueve la expansión celular. (Pérez, 2017).

Se ha demostrado que la actividad de XET se correlaciona positivamente con la tasa de crecimiento celular. Esto se debe a que la degradación reversible de la pared celular por parte de XET permite la expansión celular. Además, XTH también puede catalizar la integración de nuevos xiloglucanos sintetizados en la pared celular a través de la actividad de XET. Por lo tanto, la expresión diferencial de los genes XTH en respuesta a auxinas proporciona evidencia empírica que respalda la teoría del crecimiento ácido inducido por auxinas. (Rose et al., 2002).

#### **2.2.1.1.8 Biosíntesis de AIA en bacterias**

Existen diferentes tipos de bacterias capaces de sintetizar AIA, tales como las rizosféricas, endófitas y cianobacterias. La interacción de estos microorganismos con las plantas puede ser beneficiosa, ya que, el AIA actúa como una molécula señal recíproca en la interacción entre la planta hospedadora y el microorganismo aliado, manteniendo una relación simbiótica (Ljung, 2013).

Independientemente de la especie, la producción de AIA por parte de las bacterias rizosféricas puede tener un efecto positivo o negativo en la planta, dado que la raíz es muy sensible a concentraciones del mismo. Para evitar efectos negativos, se requieren pequeñas cantidades de AIA, obteniendo así el resultado deseado. Por el contrario, una elevada concentración puede inhibir el crecimiento de la planta. Es importante tener en cuenta que la planta puede tener una actividad natural o conjugada de esta auxina en cantidades variables, y la entrada de AIA de origen bacteriano puede desencadenar un mecanismo de regulación que convierte el exceso de AIA en conjugados. Sin embargo, cuando ciertos microorganismos rizosféricos o endófitos superan el umbral controlable de la planta, está ya no puede responder favorablemente y puede desarrollar tumores, como es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (Spaepen et al., 2007).

Además, es importante mencionar que el AIA producido por las bacterias no solo afecta a las plantas, sino también a las propias bacterias, actuando como una molécula señal que desencadena la expresión de genes involucrados en la adhesión, adaptación y virulencia. Esto favorece la colonización de las plantas por parte de las bacterias (Spaepen et al., 2007).

En cuanto a las vías de síntesis de AIA en bacterias, existen numerosas vías capaces de producirlo, al igual que en las plantas. La biosíntesis bacteriana de AIA puede ser triptófano dependiente o triptófano independiente. Garcia et al. (2019) mencionan que

existían seis vías en bacterias para la biosíntesis de AIA, de las cuales cinco utilizan triptófano como precursor. Se han identificado dos vías principales con triptófano como precursor, estas son la vía del indol-3-piruvato (lpyA) y la vía indol-3-acetamida (IAM), así como tres vías secundarias: vía de la triptamina (TAM), vía del indol-3-acetonitrilo (IAN) y la vía side chain oxidasa (TSQ). La vía independiente del triptófano es poco frecuente tanto en bacterias como en plantas, aunque existen evidencias de su existencia.

Sin embargo con el descubrimiento por guía computacional y validación experimental, se suma una ruta mas en el modelo metabólico general de la conversión de triptófano en AIA (esta es vía de la biosíntesis de auxina dependiente del triptófano (TDA)), es así que se tiene que las enzimas que catalizan los pasos individuales están escritas encima de las flechas de colores y los nombres de los ligandos y productos debajo de su estructura molecular (Figura 3). Las siete vías encontradas para producir IAA a partir de triptófano están codificadas por colores de la siguiente manera: negro, vía del indol piruvato (IPA); verde, vía de la triptamina (Tryp); magenta, vía de la biosíntesis de auxina dependiente del triptófano (TDA), rojo, vía de la indol-3-acetamida de 2 pasos (IAP-2); púrpura, vía de la indol-3-acetamida en 3 pasos (IAP-3), amarillo, vía de la indol-3-acetamida en 4 pasos (IAP-4); azul, vía de la indol-acetaldoxima/indol-3-acetonitrilo (NIT). Las vías IAP-3 e IAP-4 comparten el uso de nitrilo hidratasa y las vías IAP-2, IAP-3 e IAP-4 comparten el uso de la indolacetamida hidrolasa (Garcia et al., 2019).



### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 Método

El presente trabajo se enmarca dentro de una investigación de tipo cuantitativa y experimental, llevada a cabo en el Laboratorio de Investigación de la E.A.P. de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa. Su propósito es optimizar la producción de ácido indolacético (AIA) mediante el uso de la cepa *Bacillus subtilis* AP-01 a través de un diseño experimental Box-Behnken. En este diseño, se optimizan tres variables principales: las concentraciones de glucosa, triptófano y extracto de levadura en el medio de cultivo. A continuación, se detallan los componentes clave de la metodología, así como el procedimiento utilizado.

El método utilizado en esta investigación fue experimental, lo que implica la manipulación controlada de las condiciones del experimento. En este caso, las concentraciones de glucosa, triptófano y extracto de levadura fueron manipuladas como variables independientes. Este enfoque permite observar los efectos de estas variables sobre la producción de AIA, que es la variable dependiente, así como sobre el crecimiento de la biomasa. Se realizaron 15 experimentos basados en el diseño experimental Box-Behnken, en los cuales se varió de manera sistemática la concentración de las tres variables independientes para evaluar su impacto en la producción de AIA y en el consumo de sustratos.

##### 3.1.1 Diseño de investigación

El diseño experimental aplicado fue el Box-Behnken, una técnica estadística que permite la optimización de múltiples variables con un número reducido de experimentos. Este diseño fue elegido por su capacidad para explorar eficazmente el espacio de las variables sin necesidad de realizar un número excesivo de experimentos. Se llevaron a cabo 15 experimentos con tres réplicas para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados. Cada experimento involucró diferentes combinaciones de las concentraciones de glucosa, triptófano y extracto de levadura. Estas combinaciones se establecieron mediante un análisis estadístico previo que aseguraba una distribución equitativa de los valores dentro del diseño experimental. Las tablas 3 y 4 muestran los factores del diseño experimental.

**Tabla 3***Rangos de variables en el estudio de optimización*

Variables	Rangos		
	-1.000	0.000	1.000
Glucosa (g/L)	1.000	3.500	5.500
Extracto de Levadura (g/L)	0.030	0.200	0.300
Triptófano (g/L)	0.400	0.650	0.900

*Nota.* La tabla presenta los rangos de las variables utilizadas en el diseño experimental para la optimización de la producción de AIA.

**Tabla 4***Diseño experimental y respuestas de producción de AIA*

Exp.	Código			Valores reales			Respuestas
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Glucosa g/L	Extracto de levadura g/L	Triptófano g/L	AIA (mg/L)
1	-1	-1	0	1.000	0.030	0.650	-
2	1	-1	0	5.500	0.030	0.650	-
3	-1	1	0	1.000	0.300	0.650	-
4	1	1	0	5.500	0.300	0.650	-
5	-1	0	-1	1.000	0.200	0.400	-
6	1	0	-1	5.500	0.200	0.400	-
7	-1	0	1	1.000	0.200	0.900	-
8	1	0	1	5.500	0.200	0.900	-
9	0	-1	-1	3.500	0.030	0.400	-
10	0	1	-1	3.500	0.300	0.400	-
11	0	-1	1	3.500	0.030	0.900	-
12	0	1	1	3.500	0.300	0.900	-
13	0	0	0	3.500	0.200	0.650	-
14	0	0	0	3.500	0.200	0.650	-
15	0	0	0	3.500	0.200	0.650	-

*Nota.* La tabla muestra los códigos de las variables experimentales (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) junto con sus valores reales en diferentes concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano, así como las respuestas de la producción de ácido indolacético (AIA) en mg/L.

### 3.1.2 Población y muestra

La población de estudio en este experimento fue la cepa *Bacillus subtilis* AP-01, conocida por su capacidad de producir ácido indolacético (AIA). Para cada uno de los 15 cultivos

experimentales, se prepararon matraces de 100 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo con distintas concentraciones de glucosa, triptófano y extracto de levadura. Las muestras se recolectaron en distintos intervalos de tiempo para realizar análisis detallados sobre la producción de AIA, el consumo de sustratos y el crecimiento de biomasa.

### **3.1.3 Técnica e instrumento de recolección de datos**

Para la recolección de datos, se emplearon métodos específicos para la formulación del medio definido para *Bacillus subtilis* AP-01, además cuantificar las variables dependientes, como biomasa, triptófano, glucosa y ácido indolacético (AIA).

#### **3.1.3.1 Formulación del medio definido para *Bacillus subtilis* AP-01**

Se diseñó un medio definido con los requerimientos específicos del microorganismo, como se detalla en el Anexo 1. Este medio estará limitado por la disponibilidad de nitrógeno proporcionado por el triptófano (80% de N.) y el extracto de levadura (20% de N). En dicho medio se espera obtener una biomasa teórica de 1.12 g/L.

#### **3.1.3.2 Cuantificación de biomasa**

La biomasa se cuantificó por el método de peso seco. Para ello, se utilizaron capachos hechos de papel de aluminio previamente rotulados. Primero, se dejaron secar a 105°C por 24 horas en la estufa. Luego, se pesaron en una balanza analítica con la ayuda de una campana de extracción, y se devolvieron a la estufa hasta su uso. Una vez finalizada la fermentación, para un cultivo se tomó D.O. de 1.5 inicial, luego se vertió en tubos Falcon 5 ml y se separó la biomasa mediante centrifugación del caldo (5000 rpm por 15 min). Se descartó el sobrenadante y se añadió agua destilada, se agitó y se volvió a centrifugar nuevamente. Posteriormente, se diluyó de 1 en 2 por 5 veces. Este procedimiento se repitió 3 veces en total. Al final, la biomasa se añadió a los capachos previamente pesados, y se colocó en la estufa a 105°C por 24 horas. Después, se pesó el capacho con la biomasa y se calculó la diferencia para determinar el peso seco de la biomasa. Dependiendo del volumen de caldo utilizado, se calculó la concentración de la biomasa (Anexo 5).

#### **3.1.3.3 Cuantificación de glucosa**

Se determinó el contenido de glucosa utilizando el método DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico). Dicho método consta de mezclar 250 uL de cada muestra diluida, con 250 uL de reactivo de DNS, luego se somete a shock térmico, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño

de agua y hielo por 5 min. Se construyeron las muestras adicionando 2.5 mL de agua destilada estéril, se homogeniza en un vórtex y se dejaron en reposo por 15 min, y finalmente se leyó la absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 540 nm. Se prepara un stock madre de 0.1 gramos de glucosa en 100 ml de agua destilada (1 g/L) y se diluye como menciona el Anexo 7, luego se realiza el método DNS para cada muestra diluida.

#### **3.1.3.4 Cuantificación de triptófano**

El triptófano presente en el medio se cuantificó mediante el método Hopkins-Cole modificado. El método es una adaptación del método descrito por Hosokawa et al., 2023, para la cuantificación de triptófano, donde 2500 uL de cada muestra diluida se mezcla con los siguientes reactivos de forma ordenada: 450 µL de glutamato monosódico al 99% de pureza (400 g/L), 50 µL de ácido clorhídrico (HCl) al 10% de pureza, 50 µL de Hipoclorito de Sodio pentahidratado ( $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al 5% peso/volumen, posteriormente se mezcla, se lleva a refrigerar a 10°C por 10 minutos, y lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 525 nm.

Se prepara un stock madre de 0.01 gramos de triptófano en 100 ml de agua destilada (100 mg/L), luego se realizaron diluciones de 0 a 150 mg/L, como menciona en el Anexo 11, luego se realiza el método descrito por cada muestra diluida.

#### **3.1.3.5 Cuantificación de ácido indolacético (AIA)**

La producción de AIA se midió mediante el método de Salkowski descrito por Das et al. (2019), un ensayo espectrofotométrico que permite detectar los equivalentes de AIA en las muestras de cultivo. Se tomaron muestras del sobrenadante tras la centrifugación y se analizaron en el espectrofotómetro.

Este método usa el reactivo de Salkowski (Anexo 3), que se obtiene mezclando 1.5 partes de ácido sulfúrico puro ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) con 2.5 partes de agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ), y 0.075 partes de una solución de cloruro de hierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a 0.5M; después las muestras se leen en relación 1:2 en base al reactivo de Salkowski, mediante espectrofotómetro UV/VIS a 530 nm.

Para la curva de calibración, el método consta de mezclar 1 ml de cada muestra diluida, con 2 ml de reactivo de Salkowski. Se prepara un stock madre de 0.05 gramos de AIA sintético en 50 ml de etanol absoluto (99% p/v), obteniéndose 1000 mg/L, luego se adiciona 25 ml de agua destilada y se obtiene un stock de 500 mg/L, a partir de esto se realizan diluciones



como menciona en el Anexo 9, luego se realiza el método de Salkowski por cada muestra diluida.

### 3.1.4 Metodología para el Análisis Estadístico del Grupo Control y Experimental

Para comparar estadísticamente la producción de ácido indolacético (AIA) obtenida en nuestro estudio (considerado como el grupo experimental tras la optimización) con los datos de producción reportados en la literatura científica (considerados como grupos control), se empleó una metodología estadística rigurosa. Inicialmente, se verificó el cumplimiento del supuesto de normalidad, un requisito fundamental para la validez de las pruebas paramétricas como el ANOVA. La normalidad de los datos de producción de AIA para cada grupo se evaluó.

Es importante señalar que para determinar la prueba de normalidad adecuada, se consideró el tamaño de la muestra. Para muestras pequeñas ( $n < 50$ ), se empleó la **prueba de normalidad de Shapiro-Wilk**. Esta prueba contrasta la hipótesis nula ( $H_0$ ), que postula que los datos siguen una distribución normal, contra la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que sostiene que los datos no provienen de una distribución normal. El estadístico de prueba  $W$  se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

En esta ecuación,  $n$  representa el tamaño de la muestra,  $x_{(i)}$  denota los datos ordenados de menor a mayor,  $\bar{x}$  es la media aritmética de los datos, y  $a_i$  son un conjunto de coeficientes específicos para cada tamaño de muestra, derivados de las medias, varianzas y covarianzas de los estadísticos de orden de una muestra de una distribución normal. Un valor de  $W$  cercano a 1 indica una fuerte evidencia de normalidad en los datos. Se tomará la decisión de no rechazar la hipótesis nula (y, por lo tanto, aceptar la normalidad de los datos) si el valor  $p$  asociado a esta prueba es mayor que el nivel de significancia establecido ( $\alpha = 0.05$ ).

Para muestras más grandes ( $n > 50$ ), se utilizó la **prueba de Kolmogorov-Smirnov** para evaluar la normalidad. Esta prueba compara la función de distribución acumulada empírica de la muestra con la función de distribución acumulada de una distribución normal especificada. El estadístico de prueba  $D$  se define como la máxima diferencia absoluta entre estas dos funciones:

$$D = \sup_x |F_n(x) - F(x)| \quad (2)$$

Donde  $F_n(x)$  es la función de distribución acumulada empírica de la muestra y  $F(x)$  es la función de distribución acumulada teórica (en este caso, la normal). Al igual que con la prueba de Shapiro-Wilk, un valor  $p$  mayor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) indicará que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad.

A continuación, se evaluó la homogeneidad de las varianzas entre los grupos, otro supuesto crucial para la aplicación válida del ANOVA. Esto se realizó mediante la **prueba de homogeneidad de varianzas de Levene**. Esta prueba evalúa la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que las varianzas de todos los grupos son iguales, frente a la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) de que al menos una de las varianzas es diferente. El estadístico de Levene  $W$  se calculó como:

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i\cdot} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i\cdot})^2} \quad (3)$$

Aquí,  $N$  representa el número total de observaciones en todos los grupos,  $k$  es el número de grupos que se están comparando, y  $N_i$  es el tamaño de la muestra del grupo  $i$ . El término  $Z_{ij}$  se define como el valor absoluto de la diferencia entre cada observación  $X_{ij}$  y la mediana del grupo al que pertenece, denotada por  $\tilde{X}_i$ , es decir,  $Z_{ij} = |X_{ij} - \tilde{X}_i|$ .  $Z_{i\cdot}$  es la media de los valores  $Z_{ij}$  para el grupo  $i$ , y  $Z_{..}$  es la media global de todos los valores  $Z_{ij}$ . Si el valor  $p$  asociado a esta prueba es mayor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), se considerará que existe suficiente evidencia para no rechazar la hipótesis nula, lo que sugiere que las varianzas entre los grupos son homogéneas.

Una vez confirmados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se procedió con un **análisis de varianza de una vía (ANOVA)** para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de producción de AIA de los diferentes grupos. La hipótesis nula ( $H_0$ ) del ANOVA es que todas las medias de los grupos son iguales ( $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ ), mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) es que al menos una media de grupo es diferente. El estadístico  $F$  del ANOVA, que sigue una distribución F con  $k - 1$  grados de libertad en el numerador y  $N - k$  grados de libertad en el denominador, se calculó como:

$$F = \frac{CM_{\text{entre}}}{CM_{\text{dentro}}} \quad (4)$$

donde  $CM_{\text{entre}}$  representa la media cuadrática entre grupos, que cuantifica la variabilidad entre las medias de los diferentes grupos:

$$CM_{\text{entre}} = \frac{SC_{\text{entre}}}{k - 1} \quad (5)$$

y  $CM_{\text{dentro}}$  es la media cuadrática dentro de los grupos, que estima la variabilidad aleatoria dentro de cada grupo:

$$CM_{\text{dentro}} = \frac{SC_{\text{dentro}}}{N - k} \quad (6)$$

Aquí,  $SC_{\text{entre}}$  es la suma de cuadrados entre grupos:

$$SC_{\text{entre}} = \sum_{i=1}^k N_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 \quad (7)$$

donde  $\bar{X}_i$  es la media del grupo  $i$  y  $\bar{X}$  es la media global de todas las observaciones.  $SC_{\text{dentro}}$  es la suma de cuadrados dentro de los grupos:

$$SC_{\text{dentro}} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \quad (8)$$

Si el valor  $p$  asociado al estadístico  $F$  es menor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), se rechazará la hipótesis nula, concluyendo que existen diferencias significativas entre al menos dos de las medias de los grupos.

Finalmente, si el ANOVA revela diferencias significativas entre las medias de los grupos, se realizará una **prueba post hoc de Tukey HSD** (Honestly Significant Difference) para determinar qué pares específicos de medias son significativamente diferentes entre sí. Esta prueba es adecuada para realizar comparaciones pairwise entre todas las posibles combinaciones de grupos, controlando la tasa de error familiar. Para cada comparación entre dos grupos, la hipótesis nula es que las medias de los dos grupos son iguales. La prueba de Tukey calcula un estadístico  $q$  para cada par de medias:

$$q = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j|}{\sqrt{\frac{CM_{\text{dentro}}}{n_h}}} \quad (9)$$

donde  $|\bar{X}_i - \bar{X}_j|$  es el valor absoluto de la diferencia entre las medias de los grupos  $i$  y  $j$ , y  $CM_{\text{dentro}}$  es la media cuadrática dentro de los grupos obtenida del ANOVA. El término  $n_h$  representa el tamaño de muestra armónico si los tamaños de los grupos son desiguales, calculado como  $n_h = \frac{k}{\sum_{i=1}^k \frac{1}{n_i}}$ ; de lo contrario, se utiliza el tamaño de muestra común. Este

estadístico  $q$  se compara con un valor crítico de la distribución del rango estudentizado para el nivel de significancia deseado, el número de grupos y los grados de libertad del error del ANOVA. Un valor  $p$  ajustado menor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) indica una diferencia significativa entre las medias de los dos grupos comparados.

### 3.1.5 Análisis Estadístico del diseño Box-Behnken

En esta investigación se aplicó un diseño experimental Box-Behnken para optimizar la producción de ácido indolacético (AIA) por *Bacillus subtilis* AP-01, con el objetivo de contrastar la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:** La optimización de las concentraciones de glucosa (3.559 g/L), extracto de levadura (0.15 g/L) y triptófano (0.65 g/L) de un medio de producción para *Bacillus subtilis* AP-01, mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con diseño Box-Behnken, resultará en un incremento significativo y estadísticamente superior en la producción de ácido indolacético (AIA) en comparación con la literatura científica.

#### 3.1.5.1 Diseño Experimental y Modelo de Regresión

Para evaluar la hipótesis, se implementó un diseño experimental Box-Behnken, el cual permitió analizar el efecto de tres variables independientes: glucosa ( $X_1$ ), extracto de levadura ( $X_2$ ) y triptófano ( $X_3$ ) sobre la producción de AIA ( $Y$ ). Los datos obtenidos fueron ajustados a un modelo de regresión cuadrático, descrito por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (10)$$

donde  $\beta_0$  es el intercepto del modelo, los coeficientes  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  representan los efectos lineales de las variables glucosa, extracto de levadura y triptófano respectivamente, y los coeficientes  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  representan los efectos cuadráticos de estas mismas variables. Estos coeficientes se determinarán mediante el método de mínimos cuadrados ordinarios.

#### 3.1.5.2 Análisis Estadístico y ANOVA

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística de los efectos de las variables independientes (glucosa, extracto de levadura y triptófano) y sus interacciones en la producción de AIA. La hipótesis nula ( $H_0$ ) para cada factor será que el factor no tiene un efecto significativo sobre la producción de AIA, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) será que el factor sí influye de manera significativa. El estadístico  $F$  para cada factor se calculará utilizando la fórmula:

$$F = \frac{CM_{\text{factor}}}{CM_{\text{error}}} \quad (11)$$

donde  $CM_{\text{factor}}$  es la media de los cuadrados del factor, que mide la variabilidad atribuible a ese factor, y  $CM_{\text{error}}$  es la media de los cuadrados del error, que representa la variabilidad no explicada por el modelo. Un valor  $p$  asociado al estadístico  $F$  menor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) indicará que el efecto del factor es estadísticamente significativo, llevando al rechazo de la hipótesis nula.

### **3.1.5.3 Análisis de Residuos**

Para validar la adecuación del modelo de regresión cuadrático, se realizó un análisis exhaustivo de los residuos. Los residuos, definidos como la diferencia entre los valores observados y los valores predichos por el modelo, se analizaron para verificar el cumplimiento de los supuestos del modelo de regresión lineal, que incluyen la independencia, homocedasticidad y normalidad de los errores. La independencia se evaluó examinando la autocorrelación de los residuos. La homocedasticidad, o varianza constante de los errores, se verificaron mediante gráficos de residuos contra valores predichos. La normalidad de los residuos se evaluaron utilizando pruebas de normalidad formales y gráficos de probabilidad normal.

### **3.1.5.4 Diagramas de Pareto y Caja de Bigotes**

Se generaron diagramas de Pareto para visualizar la magnitud y significancia de los efectos de los diferentes factores (lineales y cuadráticos) en la producción de AIA. Estos diagramas mostraron los efectos estandarizados de cada término del modelo de regresión, permitiendo identificar los factores más influyentes. Adicionalmente, se crearon diagramas de caja y bigotes para examinar la distribución de la producción de AIA en diferentes niveles de los factores, proporcionando una representación visual de la variabilidad y la presencia de posibles valores atípicos.

### **3.1.5.5 Optimización mediante Superficie de Respuesta (RSM)**

Finalmente, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para identificar las condiciones óptimas de las variables independientes que maximicen la producción de AIA. Se generaron gráficos de superficie de respuesta para visualizar la relación entre las variables independientes y la respuesta (producción de AIA), permitiendo identificar el punto óptimo dentro del espacio experimental.

### 3.1.6 Modelo Logístico y Luedeking-Piret

En nuestro estudio, el crecimiento de la biomasa (*Bacillus subtilis* AP-01) se describe mediante el modelo logístico, mientras que el consumo del sustrato (Tryptófano) y la producción del producto (AIA) se modelan utilizando el modelo de Luedeking-Piret. Estas ecuaciones diferenciales proporcionan una descripción matemática de las tasas de cambio de las concentraciones de biomasa, sustrato y producto a lo largo del tiempo.

#### 3.1.6.1 Modelo Logístico para Biomasa

La ecuación diferencial que describe el crecimiento de la biomasa es:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (12)$$

donde:

- $X$  representa la concentración de biomasa en el tiempo  $t$  (g/L).
- $\mu$  es la tasa específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ). En nuestro estudio, este parámetro se identifica como  $\mu_m$ .
- $X_{max}$  es la concentración máxima de biomasa alcanzable (g/L), también conocida como capacidad de carga. En nuestro estudio, este parámetro se identifica como  $x_m$ .

Esta ecuación modela el crecimiento exponencial a bajas concentraciones de biomasa y se ralentiza a medida que la concentración se acerca a la capacidad de carga, debido a limitaciones de recursos o espacio.

#### 3.1.6.2 Modelo de Luedeking-Piret para Sustrato

El modelo de Luedeking-Piret para el consumo de sustrato establece que la tasa de consumo de sustrato es proporcional tanto a la tasa de crecimiento de la biomasa como a la concentración de biomasa presente:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{SX}^{-1} \frac{dX}{dt} - mX \quad (13)$$

donde:

- $S$  es la concentración de sustrato en el tiempo  $t$  (g/L).

- $Y_{SX}$  es el coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g biomasa/g sustrato). Su inverso,  $Y_{SX}^{-1}$ , representa la cantidad de sustrato consumido por unidad de biomasa producida. En nuestro estudio, este parámetro se identifica con  $p$ .
- $m$  es el coeficiente de mantenimiento, que representa la tasa de consumo de sustrato para fines no relacionados con el crecimiento, como el mantenimiento celular (g sustrato/g biomasa/h). En nuestro estudio, este parámetro se identifica con  $q$ .

Sustituyendo la ecuación del modelo logístico en la ecuación de Luedeking-Piret para el sustrato, obtenemos la tasa instantánea de consumo de sustrato:

$$\frac{dS}{dt} = -p \left( \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \right) - qX \quad (14)$$

Este modelo sugiere que el consumo de sustrato tiene dos componentes: uno ligado al crecimiento de la biomasa y otro asociado al mantenimiento celular.

### 3.1.6.3 Modelo de Luedeking-Piret para Producto

De manera similar, el modelo de Luedeking-Piret para la producción de producto relaciona la tasa de formación del producto con la tasa de crecimiento de la biomasa y la concentración de biomasa:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (15)$$

donde:

- $P$  es la concentración de producto en el tiempo  $t$  (mg/L).
- $Y_{PX}$  es el coeficiente de rendimiento de producto sobre biomasa (mg producto/g biomasa), que representa la cantidad de producto formado por unidad de biomasa producida. En nuestro estudio, este parámetro se identifica con  $\alpha$ .
- $\beta$  es el coeficiente de producción no asociado al crecimiento, que representa la tasa de formación del producto independiente del crecimiento celular (mg producto/g biomasa/h). En nuestro estudio, este parámetro se identifica con  $\beta$ .

Sustituyendo la ecuación del modelo logístico en la ecuación de Luedeking-Piret para el producto, obtenemos la tasa instantánea de formación del producto:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \left( \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \right) + \beta X \quad (16)$$

Este modelo indica que la producción del producto puede ocurrir tanto durante el crecimiento activo de la biomasa como en la fase estacionaria, dependiendo de los valores de  $\alpha$  y  $\beta$ .

#### 3.1.6.4 Ecuaciones Derivadas

A partir de las ecuaciones diferenciales, podemos derivar ecuaciones para las tasas específicas de consumo de sustrato ( $q_s$ ) y producción de producto ( $q_p$ ), así como para los rendimientos.

La tasa específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) se define como la tasa de consumo de sustrato por unidad de biomasa:

$$q_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (17)$$

Sustituyendo la ecuación de  $\frac{dS}{dt}$ :

$$q_s = -\frac{1}{X} \left( -p\mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) - qX \right) \quad (18)$$

Simplificando, obtenemos:

$$q_s = p\mu \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + q \quad (19)$$

En términos de los parámetros de nuestro estudio:

$$q_s = p \cdot um \cdot \left( 1 - \frac{X}{xm} \right) + q \quad (20)$$

Si consideramos el momento inicial donde  $X \approx x_0$  y el crecimiento es aproximadamente exponencial ( $\frac{X}{X_{max}} \approx 0$ ), podemos aproximar:

$$q_s \approx p \cdot um + q \quad (21)$$

Sin embargo, en la Tabla 5, se presenta una forma simplificada que considera principalmente el componente asociado al crecimiento:

$$q_s = um \cdot p \quad (22)$$

Esta simplificación se centra en la relación directa entre la tasa de crecimiento y el consumo de sustrato ligado al mismo.



La tasa específica de producción de producto ( $q_p$ ) se define como la tasa de producción de producto por unidad de biomasa:

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (23)$$

Sustituyendo la ecuación de  $\frac{dP}{dt}$ :

$$q_p = \frac{1}{X} \left( \alpha \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \beta X \right) \quad (24)$$

Simplificando, obtenemos:

$$q_p = \alpha \mu \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \beta \quad (25)$$

En términos de los parámetros de nuestro estudio:

$$q_p = \text{alfa} \cdot \text{um} \cdot \left( 1 - \frac{X}{x_{m}} \right) + \text{beta} \quad (26)$$

Similarmente, considerando el inicio del proceso, podemos aproximar:

$$q_p \approx \text{alfa} \cdot \text{um} + \text{beta} \quad (27)$$

Esta ecuación refleja que la producción de producto puede estar influenciada tanto por el crecimiento (término con  $\alpha$ ) como por procesos independientes del crecimiento (término con  $\beta$ ).

Los rendimientos se definen como la cantidad de un producto formado o sustrato consumido por unidad de otro componente. Por ejemplo, el rendimiento de biomasa sobre sustrato ( $Y_{x,s}$ ) se deriva de la relación en el modelo de Luedeking-Piret para el sustrato:

$$Y_{x,s} = - \left( \frac{dS}{dX} \right)^{-1} \approx \frac{1}{p} \quad (28)$$

Esta aproximación se basa en el componente de consumo de sustrato ligado al crecimiento.

El rendimiento de producto sobre sustrato ( $Y_{p,s}$ ) se puede derivar de la relación entre la producción de producto y el consumo de sustrato:

$$Y_{p,s} = \frac{dP}{dS} = \frac{\frac{dP}{dt}}{\frac{dS}{dt}} \approx \frac{\alpha}{p} \quad (29)$$

Esta aproximación considera los componentes de producción y consumo asociados al crecimiento.

Finalmente, el rendimiento de producto sobre biomasa ( $Y_{px}$ ) se deriva directamente del modelo de Luedeking-Piret para el producto:

$$Y_{px} = \frac{dP}{dX} \approx \alpha \quad (30)$$

Este parámetro cuantifica cuánto producto se forma por cada unidad de biomasa producida debido a los procesos ligados al crecimiento.

Las productividades volumétricas ( $Q_x$ ,  $Q_p$ ,  $Q_s$ ) representan las tasas de formación o consumo por unidad de volumen. Por ejemplo, la productividad volumétrica de biomasa ( $Q_x$ ) se define como la tasa de formación de biomasa por unidad de volumen:

$$Q_x = \frac{dX}{dt} \quad (31)$$

Considerando el inicio del proceso, donde el crecimiento es aproximadamente exponencial y  $X \approx x_0$ :

$$Q_x \approx \mu \cdot x_0 \quad (32)$$

En términos de los parámetros de nuestro estudio:

$$Q_x = um \cdot x_0 \quad (33)$$

Similarmente, la productividad volumétrica de producto ( $Q_p$ ) y el consumo volumétrico de sustrato ( $Q_s$ ) se pueden aproximar al inicio del proceso como:

$$Q_p = \frac{dP}{dt} \approx q_p \cdot x_0 = (\alpha \cdot um + \beta) \cdot x_0 \quad (34)$$

En la Tabla 5, usamos una simplificación:

$$Q_p = qp \cdot x_0 \quad (35)$$

$$Q_s = -\frac{dS}{dt} \approx q_s \cdot x_0 = (p \cdot um + q) \cdot x_0 \quad (36)$$

En la Tabla 5, usamos una simplificación:

$$Q_s = qs \cdot x_0 \quad (37)$$

**Tabla 5***Parámetros y fórmulas de la cinética de producción de AIA por Bacillus subtilis AP-01*

Parámetro	Descripción	Fórmula	Unidades
<b>Modelo Logístico (Biomasa)</b>			
xo	Concentración inicial de biomasa		g/L
xm	Concentración máxima de biomasa		g/L
um	Tasa máxima específica de crecimiento		h <sup>-1</sup>
<b>Modelo de Luedeking-Piret (Sustrato)</b>			
so	Concentración inicial de sustrato		g/L
p	Coficiente de rendimiento (crecimiento)		g/g
q	Coficiente de mantenimiento		g/g/h
<b>Modelo de Luedeking-Piret (Producto)</b>			
po	Concentración inicial de producto		mg/L
alfa	Coficiente de producción (crecimiento)		mg/g
beta	Coficiente de producción (no crecimiento)		mg/g/h
<b>Parámetros Derivados</b>			
qx	Tasa específica de crecimiento	$um$	h <sup>-1</sup>
qs	Tasa de consumo de sustrato específica	$um \cdot p$	h <sup>-1</sup>
qp	Tasa de producción específica	$um \cdot alfa + beta$	h <sup>-1</sup>
Qx	Productividad volumétrica de biomasa	$qx \cdot xo$	g/L/h
Qp	Productividad volumétrica de producto	$qp \cdot xo$	mg/L/h
Qs	Consumo volumétrico de sustrato	$qs \cdot xo$	g/L/h
Yxs	Rendimiento de biomasa sobre sustrato	$1/p$	g/g
Yps	Rendimiento de producto sobre sustrato	$alfa/p$	mg/g
Ypx	Rendimiento de producto sobre biomasa	$alfa$	mg/g

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Cinética de producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01

El crecimiento de *Bacillus subtilis* AP-01, una bacteria Gram-positiva formadora de esporas, bajo las condiciones experimentales optimizadas, se describió con precisión mediante el modelo logístico. La biomasa inicial ( $x_0$ ) fue de 0.0526 g/L, alcanzando una concentración máxima ( $x_m$ ) de 0.5421 g/L (valor real de  $0.566 \pm 0.09$  g/L) al final del período de cultivo de 48 horas. La tasa específica de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ) fue de 0.2931 1/h, lo que indica una rápida proliferación celular. La eficiencia en la conversión de nutrientes en masa celular se evidenció con un rendimiento de biomasa respecto al triptófano ( $Y_{x/s}$ ) de 0.9306 g biomasa/g triptófano. El ajuste del modelo logístico a los datos experimentales se confirmó con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9810 y un bajo error cuadrático medio (RMSE) de 0.0269 g/L.

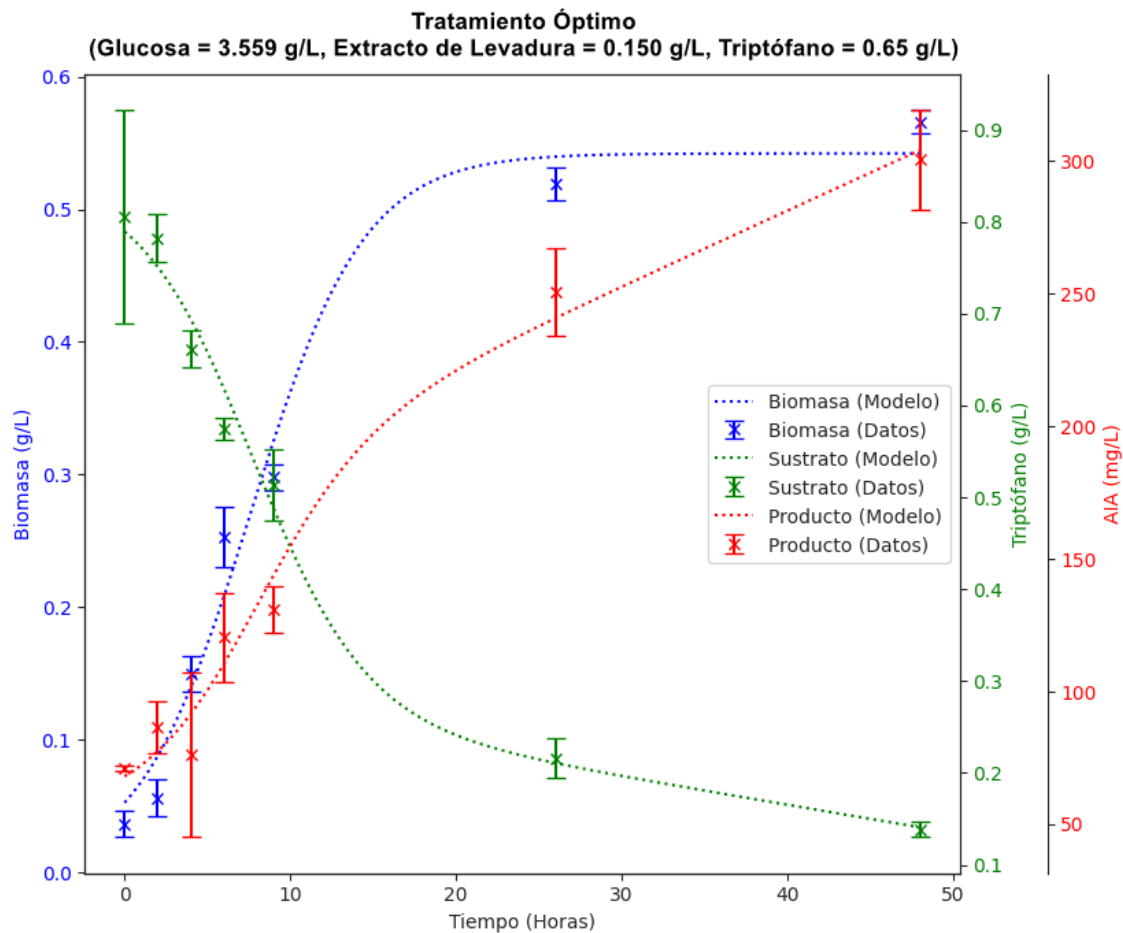
El consumo de triptófano por *Bacillus subtilis* AP-01 se evaluó mediante el modelo de Luedeking-Piret. La concentración inicial de triptófano ( $s_0$ ) fue de 0.7895 g/L. Durante las 48 horas de cultivo, la tasa específica de consumo de triptófano ( $q_s$ ) fue de 0.3150 g triptófano/g biomasa·h y la velocidad volumétrica de consumo ( $Q_s$ ) alcanzó 0.0166 g/L·h, reflejando una alta demanda metabólica. Se determinaron dos parámetros clave: la constante  $p$ , calculada como el inverso del rendimiento de biomasa sobre triptófano ( $p = 1/Y_{x/s} = 1.0746$  g triptófano/g biomasa), que indica la eficiencia en la conversión de triptófano a biomasa, y el parámetro  $q$  de 0.0056 1/h, que representa el consumo basal de triptófano independiente del crecimiento celular. Además, el rendimiento de AIA sobre triptófano ( $Y_{p/s}$ ) fue de 349.5643 mg AIA/g triptófano. Al finalizar el cultivo, la concentración de triptófano disminuyó a  $0.139 \pm 0.008$  g/L. El modelo de Luedeking-Piret ajustó óptimamente los datos de consumo de triptófano, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9881 y un error cuadrático medio (RMSE) de 0.0264 g/L, confirmando la eficiente utilización del triptófano.

La producción de ácido indolacético (AIA) por *Bacillus subtilis* AP-01 se modeló también mediante el modelo de Luedeking-Piret. La concentración inicial de AIA ( $p_0$ ) fue de 68.0868 mg/L, incrementando de manera constante hasta alcanzar un valor real de  $300.279 \pm 18.646$  mg/L tras 48 horas de cultivo. La producción de AIA presentó un componente asociado al crecimiento ( $\alpha$ ) de 248.5866 mg AIA/g biomasa y otro independiente del crecimiento ( $\beta$ ) de 5.2607 mg AIA/h. La velocidad específica de formación de AIA ( $q_p$ ) fue de 78.1207 mg/g·h, y la velocidad volumétrica de formación de AIA ( $Q_p$ ) fue de 4.1122

mg/L-h. El modelo mostró un buen ajuste a los datos de producción con un  $R^2$  de 0.9857 y un RMSE de 10.0552 mg/L.

#### Figura 4

Cinética de producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01



Nota. Se muestra la cinética de producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 bajo las condiciones óptimas indicadas. Condiciones iniciales: Glucosa = 3.559 g/L, Extracto de Levadura = 0.150 g/L, Triptófano = 0.65 g/L. Creado con Python v3.10.

**Tabla 6***Parámetros del modelo Logístico y Luedeking-Piret*

<b>Parámetro</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>Sustrato (Tryptófano) (g/L)</b>	<b>Producto (AIA) (mg/L)</b>
$x_0$	0.0526 (g/L)	-	-
$x_m$	0.5421 (g/L)	-	-
$\mu_m$	0.2931 (h <sup>-1</sup> )	-	-
$q_x$	0.2931 (h <sup>-1</sup> )	-	-
$Q_x$	0.0154 (g/L·h)	-	-
$s_0$	-	0.7895 (g/L)	-
$p$	-	1.0746 (g/g)	-
$q$	-	0.0056 (h <sup>-1</sup> )	-
$q_s$	-	0.3150 (g/g·h)	-
$Q_s$	-	0.0166 (g/L·h)	-
$Y_{xs}$	-	0.9306 (g/g)	-
$p_0$	-	-	68.0868 (mg/L)
$\alpha$	-	-	248.5866 (mg/g)
$\beta$	-	-	5.2607 (mg/g·h)
$q_p$	-	-	78.1207 (mg/g·h)
$Q_p$	-	-	4.1122 (mg/L·h)
$Y_{px}$	-	-	248.5866 (mg/g)
$Y_{ps}$	-	-	231.3228 (mg/g)
$R^2$	0.9810 (-)	0.9881 (-)	0.9857 (-)
RMSE	0.0269 (g/L)	0.0264 (g/L)	10.0552 (mg/L)

*Nota.* Se presentan los parámetros estimados para el modelo Logístico y Luedeking-Piret, con sus respectivas unidades. Las unidades corresponden a:  $x_0$ : concentración inicial de biomasa;  $x_m$ : concentración máxima de biomasa;  $\mu_m$ : tasa de crecimiento máximo;  $q_x$ : tasa específica de crecimiento;  $Q_x$ : tasa volumétrica de crecimiento;  $s_0$ : concentración inicial de sustrato;  $p$ : inverso del coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato (g/g), donde  $p = 1/Y_{xs}$ ;  $q$ : coeficiente de mantenimiento (h<sup>-1</sup>);  $q_s$ : tasa específica de consumo de sustrato;  $Q_s$ : tasa volumétrica de consumo de sustrato;  $Y_{xs}$ : coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato;  $p_0$ : concentración inicial de producto;  $\alpha$ : coeficiente asociado al crecimiento en la producción de producto;  $\beta$ : coeficiente no asociado al crecimiento en la producción de producto;  $q_p$ : tasa específica de producción de producto;  $Q_p$ : tasa volumétrica de producción de producto;  $Y_{px}$ : coeficiente de rendimiento producto/biomasa;  $Y_{ps}$ : coeficiente de rendimiento producto/sustrato;  $R^2$ : coeficiente de determinación; RMSE: raíz del error cuadrático medio. Creado con Python v3.10.

#### 4.1.2 Análisis estadístico y optimización de la producción de ácido indolacético (AIA)

Se realizó un diseño Box-Behnken con el fin de evaluar el efecto de las concentraciones de glucosa, triptófano y extracto de levadura en la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 (Tabla 7). Este diseño experimental permite obtener información sobre la influencia de las variables y su interacción con un número reducido de experimentos. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones iniciales no optimizadas, correspondientes al punto central del diseño, para posteriormente ajustar el modelo y determinar las condiciones óptimas.

**Tabla 7**

*Diseño experimental, variables y respuestas de producción de AIA*

Exp.	Nivel codificado			Nivel original			Respuestas
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Glucosa (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Triptófano (g/L)	AIA (mg/L)
1	-1	-1	0	1.000	0.030	0.650	166.594±33
2	1	-1	0	5.500	0.030	0.650	177.557±31
3	-1	1	0	1.000	0.300	0.650	127.261±35
4	1	1	0	5.500	0.300	0.650	147.573±34
5	-1	0	-1	1.000	0.200	0.400	188.883±50
6	1	0	-1	5.500	0.200	0.400	224.527±28
7	-1	0	1	1.000	0.200	0.900	190.238±33
8	1	0	1	5.500	0.200	0.900	226.483±29
9	0	-1	-1	3.500	0.030	0.400	195.550±32
10	0	1	-1	3.500	0.300	0.400	149.493±29
11	0	-1	1	3.500	0.030	0.900	187.683±34
12	0	1	1	3.500	0.300	0.900	148.621±30
13	0	0	0	3.500	0.200	0.650	278.951±35
14	0	0	0	3.500	0.200	0.650	297.238±41
15	0	0	0	3.500	0.200	0.650	280.896±51

*Nota.* El "Nivel codificado" representa la versión escalada de los factores ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ), mientras que el "Nivel original" muestra los valores reales de concentración.  $X_1$  corresponde a Glucosa,  $X_2$  a Extracto de levadura y  $X_3$  a Triptófano. Creado con Python v3.10

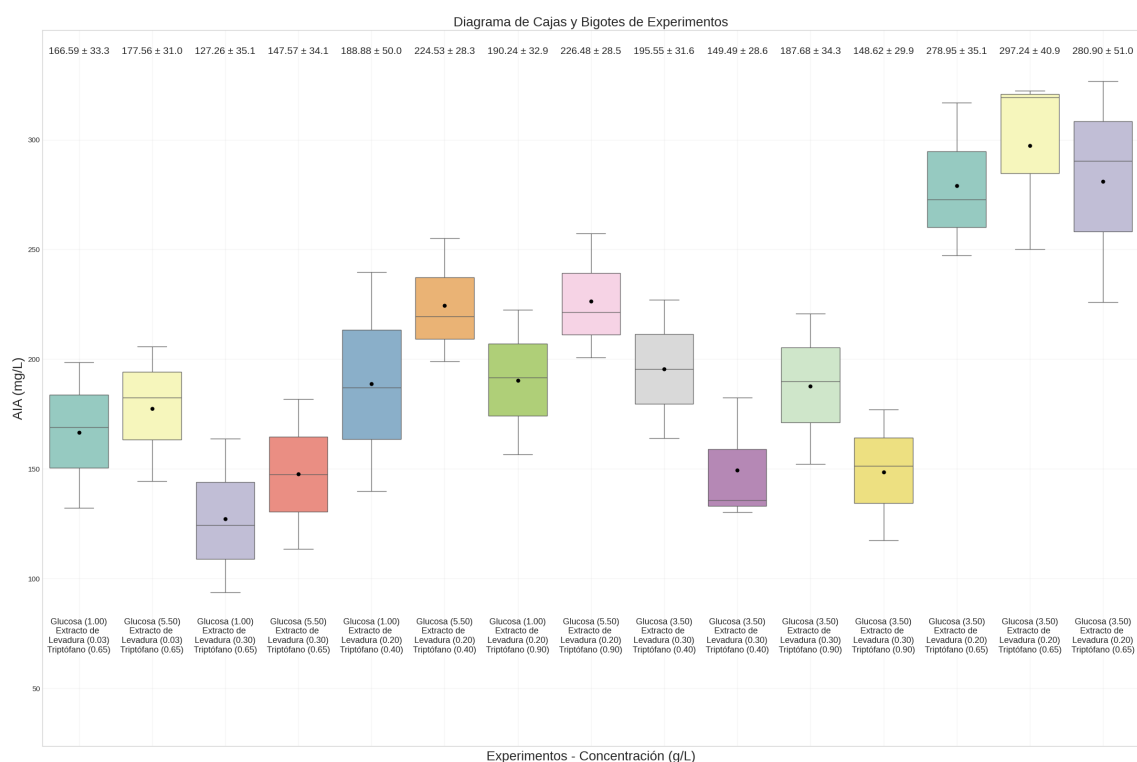
##### 4.1.2.1 Análisis estadísticos de la producción de AIA

###### 4.1.2.1.1 Diagrama de Caja y Bigotes

El diagrama de cajas y bigotes (Figura 5), presenta la concentración promedio y desviación estándar del modelo Box-Behnken de AIA (mg/L) con sus experimentos detallados en la

Tabla 7. El análisis reveló que la producción de AIA varió significativamente según las concentraciones de los componentes del medio. Con una concentración de glucosa de 1.00 g/L, la producción media osciló entre  $127.26 \pm 35.1$  mg/L (con 0.30 g/L de extracto de levadura y 0.65 g/L de triptófano) y  $188.88 \pm 50.0$  mg/L (con 0.20 g/L de extracto de levadura y 0.40 g/L de triptófano). Al aumentar la glucosa a 5.50 g/L, la producción media mostró un rango desde  $111.86 \pm 26.5$  mg/L (con 0.03 g/L de extracto de levadura y 0.65 g/L de triptófano) hasta  $226.48 \pm 28.5$  mg/L (con 0.20 g/L de extracto de levadura y 0.90 g/L de triptófano). Notablemente, una concentración de glucosa de 3.50 g/L tendió a favorecer una mayor producción, con valores que fueron desde  $148.62 \pm 29.9$  mg/L (con 0.20 g/L de extracto de levadura y 0.90 g/L de triptófano) hasta un máximo de  $297.24 \pm 40.9$  mg/L (con 0.30 g/L de extracto de levadura y 0.65 g/L de triptófano), demostrando la influencia combinada de las tres variables en la biosíntesis de AIA.

**Figura 5**  
Diagrama de cajas y bigotes



*Nota.* El diagrama de cajas muestra que la condición con Glucosa (3.50), Extracto de Levadura (0.20) y Triptófano (0.65) tiene la media más alta de AIA con 297.24 mg/L. Creado con Python v3.10

#### 4.1.2.1.2 Análisis de Pareto

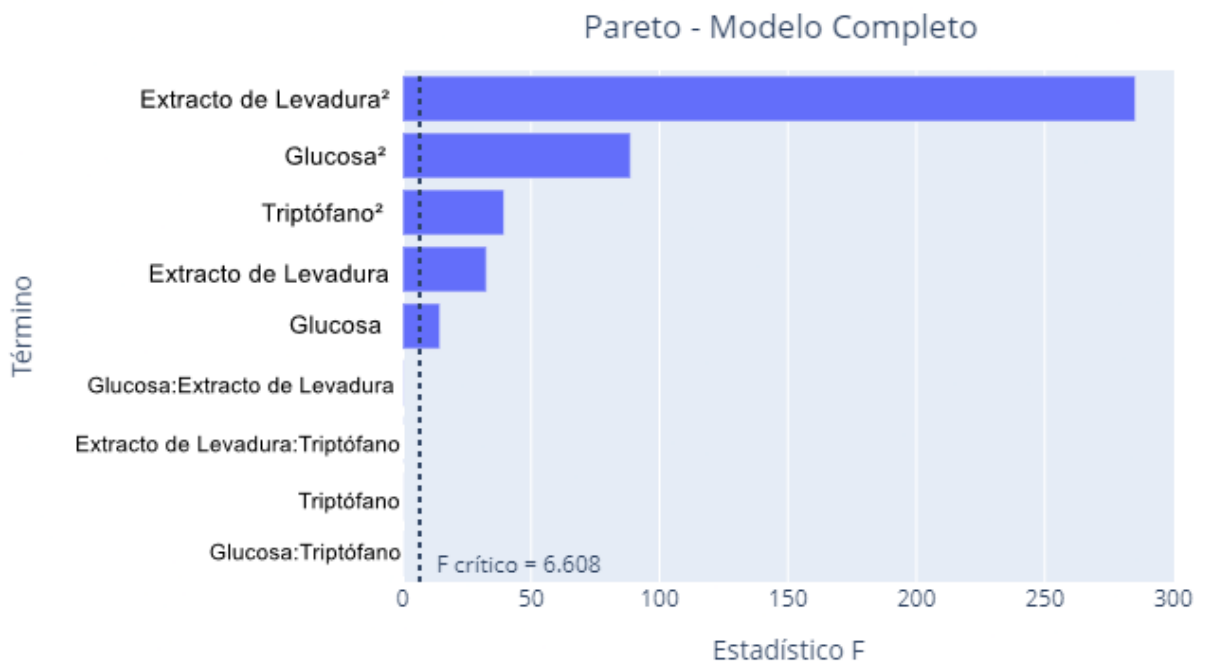
El Diagrama de Pareto presentado en la Figura 6, correspondiente al "Modelo Completo", representa la influencia inicial de todos los factores principales investigados (como el



Extracto de Levadura, la Glucosa y el Triptófano) y sus posibles interacciones combinadas sobre la producción de AIA. Cada barra visualiza un término, ya sea un factor individual o una interacción entre dos o más factores. Estos términos se ordenan de manera descendente según su valor del Estadístico F, derivado de un análisis de varianza (ANOVA), el cual cuantifica la contribución de cada término a la variabilidad observada en la producción. En esta etapa inicial, se consideran tanto los efectos individuales de cada factor como las interacciones entre ellos, presentando un panorama completo de todas las fuentes potenciales de variación antes de aplicar criterios de significancia estadística. La línea vertical punteada marca el umbral del Estadístico F crítico ( $F_{\text{crítico}} = 6.608$ ), el cual se utilizará posteriormente para discriminar entre los términos estadísticamente significativos y aquellos que no lo son.

**Figura 6**

*Diagrama de Pareto para la producción de AIA (modelo completo)*



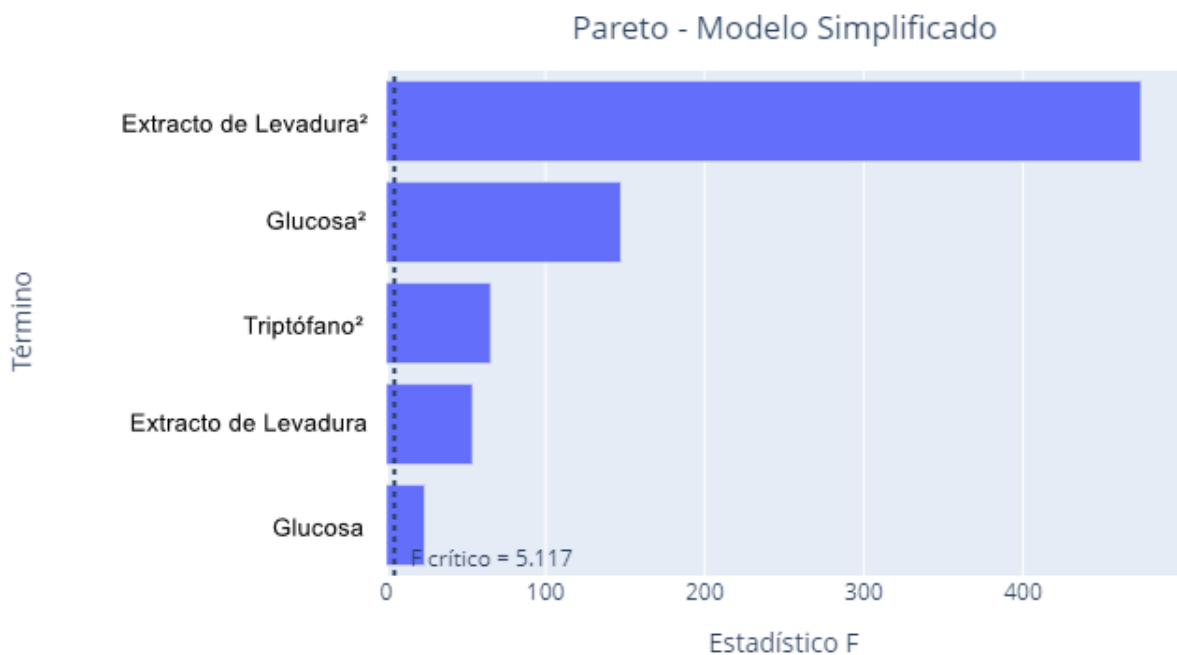
*Nota.* El gráfico de Pareto indica que el Extracto de Levadura<sup>2</sup> tiene el estadístico F más alto. El valor crítico de F es 6.608. Creado con Python v3.10

El Diagrama de Pareto de la Figura 7, denominado "Modelo Simplificado", es el resultado de la aplicación de criterios de significancia estadística al modelo completo. Tras analizar los resultados del ANOVA, se eliminaron del diagrama aquellos factores principales e interacciones cuyo Estadístico F no superó el umbral crítico establecido ( $F_{\text{crítico}} = 5.117$ ).

Este proceso de selección permite evidenciar con claridad los factores que demuestran tener la influencia más significativa y robusta sobre la producción de AIA. La exclusión de los términos estadísticamente no significativos enfoca la atención en los determinantes clave del proceso, resaltando la importancia de las variables cuadráticas del Extracto de Levadura, la Glucosa y el Triptófano, junto con los efectos lineales del Extracto de Levadura y la Glucosa. Esta representación simplificada facilita la identificación de las variables críticas para la optimización de la producción.

**Figura 7**

*Diagrama de Pareto para la producción de AIA (modelo simplificado)*



*Nota.* El gráfico de Pareto muestra que el Extracto de Levadura<sup>2</sup> tiene el estadístico F más alto. El valor crítico de F es 5.117. Creado con Python v3.10

#### 4.1.2.1.3 Análisis ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) detallado en la Tabla 8, demostró la significancia estadística del modelo ( $F = 153.176$ , Valor  $p < 0.0001$ ), donde el alto valor de F indica que la variabilidad explicada por el modelo es considerablemente mayor que la variabilidad residual, confirmando que el modelo elegido explica una parte significativa de la variabilidad en la producción de AIA. Entre los factores individuales, los términos cuadráticos del Extracto de Levadura ( $F = 474.353$ , Valor  $p < 0.0001$ ), Glucosa ( $F = 147.47$ , Valor  $p < 0.0001$ ) y Triptófano ( $F = 65.689$ , Valor  $p < 0.0001$ ) presentaron valores F elevados y valores p bajos, lo que indica una influencia altamente significativa en la

producción de AIA. De igual manera, los términos lineales del Extracto de Levadura ( $F = 54.188$ , Valor  $p < 0.0001$ ) y la Glucosa ( $F = 24.18$ , Valor  $p = 0.001$ ) también demostraron tener un efecto significativo en la producción, evidenciado por sus respectivos valores  $F$  y  $p$ . Es importante destacar que la falta de ajuste del modelo no fue significativa ( $F = 1.117$ , Valor  $p = 0.549$ ), donde el bajo valor de  $F$  y el alto valor  $p$  sugieren que la variabilidad no explicada por el modelo no es significativamente mayor que la variabilidad dentro de las observaciones, lo que indica que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos experimentales.

**Tabla 8**  
*Análisis de varianza*

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Valor p
Bloque	41534.565	1	41534.565	754.93	< 0.0001
Modelo	42137.008	5	8427.402	153.176	< 0.0001
Extracto de Levadura <sup>2</sup>	26097.837	1	26097.837	474.353	< 0.0001
Glucosa <sup>2</sup>	8113.457	1	8113.457	147.47	< 0.0001
Triptófano <sup>2</sup>	3614.053	1	3614.053	65.689	< 0.0001
Extracto de Levadura	2981.31	1	2981.31	54.188	< 0.0001
Glucosa	1330.351	1	1330.351	24.18	0.001
Residual	495.16	9	55.018		
Falta de Ajuste	394.283	7	56.326	1.117	0.549
Error Puro	100.876	2	50.438		
Total	38765.594	14			
Cor. Total	42632.168	14			

*Nota.*  $p < 0.0001$ : Probabilidad menor al 0.01% de que la hipótesis nula sea verdadera; intervalos de confianza al 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Creado con Python v3.10.

#### 4.1.2.1.4 Coeficientes de Regresión

El modelo que especifica la predicción matemática de la producción de AIA (mg/L), se hizo con los coeficientes de regresión descritos en la Tabla 9. Este modelo presenta un intercepto de 285.6950, lo que representa la producción de AIA cuando todos los demás factores son cero. Los coeficientes negativos para los términos cuadráticos del Extracto de Levadura<sup>2</sup> (-84.0724), Glucosa<sup>2</sup> (-46.8764) y Triptófano<sup>2</sup> (-31.2859) sugieren una relación curvilínea, indicando que existe una concentración óptima para cada uno de estos componentes, más allá de la cual un aumento en la concentración podría llevar a una disminución en la producción de AIA. El coeficiente del término lineal para el Extracto de Levadura es negativo (-19.3045), mientras que para la Glucosa es positivo (12.8955), indicando direcciones opuestas en su influencia lineal sobre la producción de AIA dentro del rango estudiado. Es importante destacar que todos los coeficientes del modelo son

estadísticamente significativos (Valor  $p < 0.0001$ ), y sus intervalos de confianza al 95% no incluyen el valor cero, lo que confirma su importancia en la predicción de la producción de AIA.

**Tabla 9**  
*Coefficientes del modelo*

	<b>Coef.</b>	<b>E.S.</b>	<b>t</b>	<b>Valor p</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Intercepto	285.6950	4.282	66.713	<0.0001	[276.007, 295.383]
Extracto de Levadura <sup>2</sup>	-84.0724	3.880	-21.780	<0.0001	[-92.805, -75.340]
Glucosa <sup>2</sup>	-46.8764	3.880	-12.144	<0.0001	[-55.609, -38.144]
Triptófano <sup>2</sup>	-31.2859	3.880	-8.105	<0.0001	[-40.018, -22.554]
Extracto de Levadura	-19.3045	2.622	-7.361	<0.0001	[-25.237, -13.372]
Glucosa	12.8955	2.622	4.917	<0.0001	[6.963, 18.828]

*Nota.* Coef. = coeficiente estimado; E.S. = error estándar; t = valor t; p = valor p. Intervalos de confianza al 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Creado con Python v3.10.

La fórmula del modelo matemático que describe la producción de AIA (mg/L) se obtuvo a partir de un análisis de regresión, cuyos coeficientes se presentan en la Tabla 9. La significancia global de este modelo fue confirmada por el análisis de varianza (ANOVA) detallado en la Tabla 8 ( $F = 153.176$ , Valor  $p < 0.0001$ ), lo que indica una fuerte relación entre las variables independientes y la producción de AIA. La fórmula del modelo matemático es el siguiente:

$$\text{AIA (mg/L)} = 285.695 + 12.895 \times \text{Glucosa} - 19.304 \times \text{Extracto de Levadura} \\ - 46.876 \times \text{Glucosa}^2 - 84.072 \times \text{Extracto de Levadura}^2 - 31.286 \times \text{Triptófano}^2$$

El intercepto de 285.695 representa la producción predicha cuando todas las variables codificadas son cero. Los coeficientes de los términos lineales (12.895 para Glucosa y -19.304 para Extracto de Levadura) y cuadráticos (-46.876 para Glucosa<sup>2</sup>, -84.072 para Extracto de Levadura<sup>2</sup> y -31.286 para Triptófano<sup>2</sup>) son todos estadísticamente significativos (Valor  $p < 0.0001$  en cada caso, ver Tabla 8), lo que indica su importancia en la predicción de la producción de AIA. Los términos cuadráticos negativos sugieren una relación no lineal, con un punto óptimo para cada variable.

Para calcular la producción de AIA (mg/L) utilizando el modelo de regresión, se sustituyen las variables codificadas por sus respectivos valores óptimos codificados, dados en la Tabla 10.

**Tabla 10***Niveles óptimos de las variables*

Variable	Nivel Original	Nivel Codificado
Glucosa	3.559	0.138
Extracto de Levadura	0.150	-0.115
Triptófano	0.650	0.000

*Nota.* El nivel original óptimo más alto es para la Glucosa: 3.559. Creado con Python v3.10

Reemplazamos los factores Glucosa con su valor codificado de 0.138, Extracto de Levadura con -0.115, y Triptófano con 0.000. Al realizar esta sustitución, obtenemos, que la producción máxima predicha por el modelo para la producción de AIA, es de 287.69 mg/L, como se menciona a continuación:

$$\begin{aligned} \text{AIA (mg/L)} &= 285.695 + 12.895 \times (0.138) - 19.304 \times (-0.115) \\ &\quad - 46.876 \times (0.138)^2 - 84.072 \times (-0.115)^2 - 31.286 \times (0)^2 \\ &= 285.695 + 1.77951 + 2.21996 - 0.892659024 - 1.1118486 - 0 \\ &= 289.69447 - 0.892659024 - 1.1118486 \\ &= 288.801810976 - 1.1118486 \\ &= 287.69 \end{aligned}$$

Para evaluar la capacidad predictiva del modelo, la Tabla 11 presenta una comparación entre los valores actuales de producción de AIA obtenidos experimentalmente y los valores predichos por el modelo de regresión para cada corrida del diseño experimental. El análisis de los residuos, que representan la diferencia entre los valores actuales y predichos, revela una dispersión relativamente pequeña, con valores que oscilan entre -9.389 mg/L y 11.543 mg/L. Esta cercanía entre los valores actuales y predichos sugiere que el modelo captura adecuadamente la relación entre las variables independientes y la respuesta.

**Tabla 11**

*Comparación de valores actuales y predichos de AIA*

Corrida	AIA (mg/L)		
	Actual	Predicho	Residual
1	166.594	161.155	5.439
2	177.557	186.946	-9.389
3	127.261	122.546	4.715
4	147.573	148.337	-0.764
5	188.883	194.637	-5.754
6	224.527	220.428	4.099
7	190.238	194.637	-4.399
8	226.483	220.428	6.055
9	195.55	189.641	5.909
10	149.493	151.032	-1.539
11	187.683	189.641	-1.958
12	148.621	151.032	-2.411
13	278.951	285.695	-6.744
14	297.238	285.695	11.543
15	280.896	285.695	-4.799

*Nota.* La corrida 14 presenta el valor actual más alto de AIA con 297.238 mg/L. Creado con Python v3.10.

Adicionalmente, la Tabla 12 muestra la contribución porcentual de cada factor al modelo. Se observa que el término cuadrático del Extracto de Levadura<sup>2</sup> es el factor que más contribuye a la variabilidad en la producción de AIA, representando un 61.216% de la contribución total. Le siguen en importancia los términos cuadráticos de Glucosa<sup>2</sup> (19.031%) y Triptófano<sup>2</sup> (8.477%), así como los términos lineales de Extracto de Levadura (6.993%) y Glucosa (3.121%). Esta información destaca la influencia predominante del Extracto de Levadura, especialmente su efecto no lineal, en la determinación de la producción de AIA bajo las condiciones estudiadas.

**Tabla 12***Contribución de los factores*

<b>Factor</b>	<b>Contribución (%)</b>
Extracto de Levadura <sup>2</sup>	61.216
Glucosa <sup>2</sup>	19.031
Triptofano <sup>2</sup>	8.477
Extracto de Levadura	6.993
Glucosa	3.121

*Nota.* La mayor contribución a la variabilidad es del Extracto de Levadura<sup>2</sup> con un 61.216%. Creado con Python v3.10.

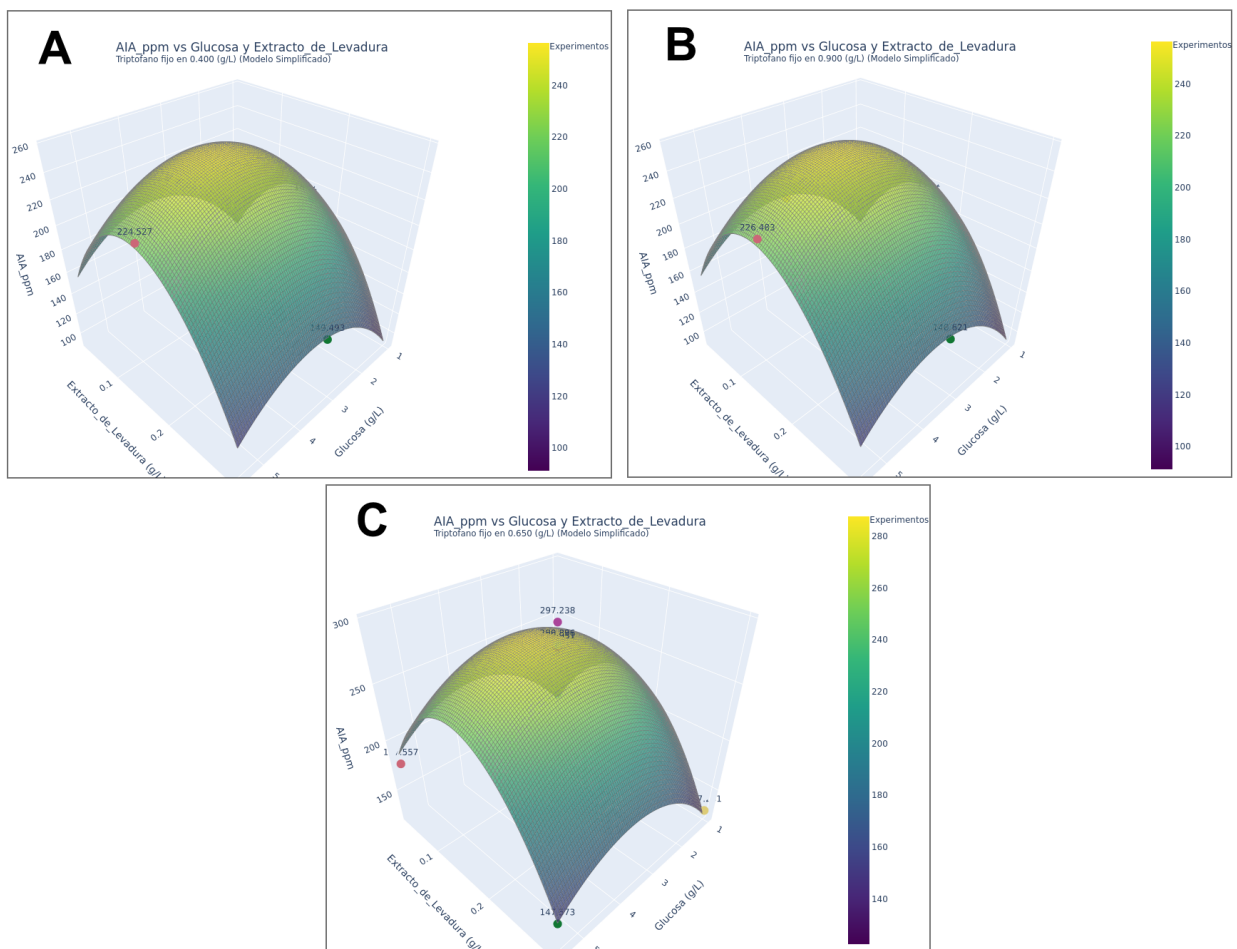
#### **4.1.2.1.5 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)**

La investigación se inició con un análisis de Pareto para identificar los factores (glucosa, extracto de levadura y triptófano) con mayor influencia en la producción de AIA. Tras esta identificación inicial, se implementó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con el objetivo de modelar y optimizar la relación entre las concentraciones de estos factores significativos y la producción de AIA. Como paso inicial dentro de la MSR, la evolución temporal de la producción de AIA fue visualizada (Figura 5), proporcionando un contexto para el desarrollo del modelo. Para evaluar la significancia estadística del modelo de regresión múltiple resultante de la MSR, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), cuyos resultados se presentan detalladamente en la Tabla 8. Este análisis ANOVA confirmó la alta significancia global del modelo (Valor  $p < 0.0001$ ), indicando su capacidad para explicar una proporción sustancial de la variabilidad observada en la producción de AIA. Específicamente, el ANOVA (Tabla 8) reveló que los términos cuadráticos del extracto de levadura, la glucosa y el triptófano, junto con los términos lineales del extracto de levadura y la glucosa, ejercían una influencia estadísticamente significativa en la producción de AIA (Valor  $p < 0.05$ ). La solidez del modelo se vio reforzada por la ausencia de una falta de ajuste significativa (Valor  $p = 0.549$ , Tabla 8), sugiriendo una adecuada representación de la relación entre las variables. Posteriormente, se analizaron los coeficientes de regresión, presentados en la Tabla 9, los cuales cuantifican la magnitud y dirección de la influencia de cada término en el modelo de MSR. Para evaluar la capacidad predictiva del modelo, se llevó a cabo una comparación entre los valores de AIA observados experimentalmente y aquellos predichos por el modelo, cuyos resultados se muestran en la Tabla 11, evidenciando una buena correlación. Finalmente,

para determinar la importancia relativa de cada factor en la variabilidad de la producción de AIA, se analizó la contribución de los factores, revelando que el término cuadrático del extracto de levadura presentaba la mayor contribución (Tabla 12).

Para visualizar la interacción de los factores y su efecto en la producción de AIA, la Figura 8 presenta el Análisis de Superficie de Respuesta, generado con el diseño Box-Behnken. Cada gráfica muestra cómo varía la producción de AIA al modificar la glucosa y el extracto de levadura, manteniendo fijo el triptófano en uno de los tres niveles del diseño (0.4 g/L, 0.65 g/L y 0.9 g/L). Esto facilita comprender la interacción entre los tres factores e identificar las condiciones óptimas para cada nivel de triptófano.

**Figura 8**  
*Análisis de superficie de respuesta*



*Nota.* Gráficos de superficie de respuesta del efecto de los niveles de triptófano en la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01. A) Tryptófano a 0.4 g/L B) Tryptófano a 0.9 g/L C) Tryptófano a 0.65 g/L. Creado con Python v3.10.



**Tabla 13***Valores de deseabilidad*

<b>Variabes independientes</b>	<b>Valores mínimos</b>	<b>Valores críticos</b>	<b>Valores máximos</b>
Glucosa (g/L)	1.0000	3.559	5.5000
Extracto de Levadura (g/L)	0.0300	0.150	0.3000
Triptófano (g/L)	0.4000	0.650	0.9000

*Nota.* Los valores críticos de deseabilidad muestran que la Glucosa tiene el valor más alto con 3.559 g/L.

Creado con Python v3.10

#### **4.1.2.1.6 Optimización de AIA**

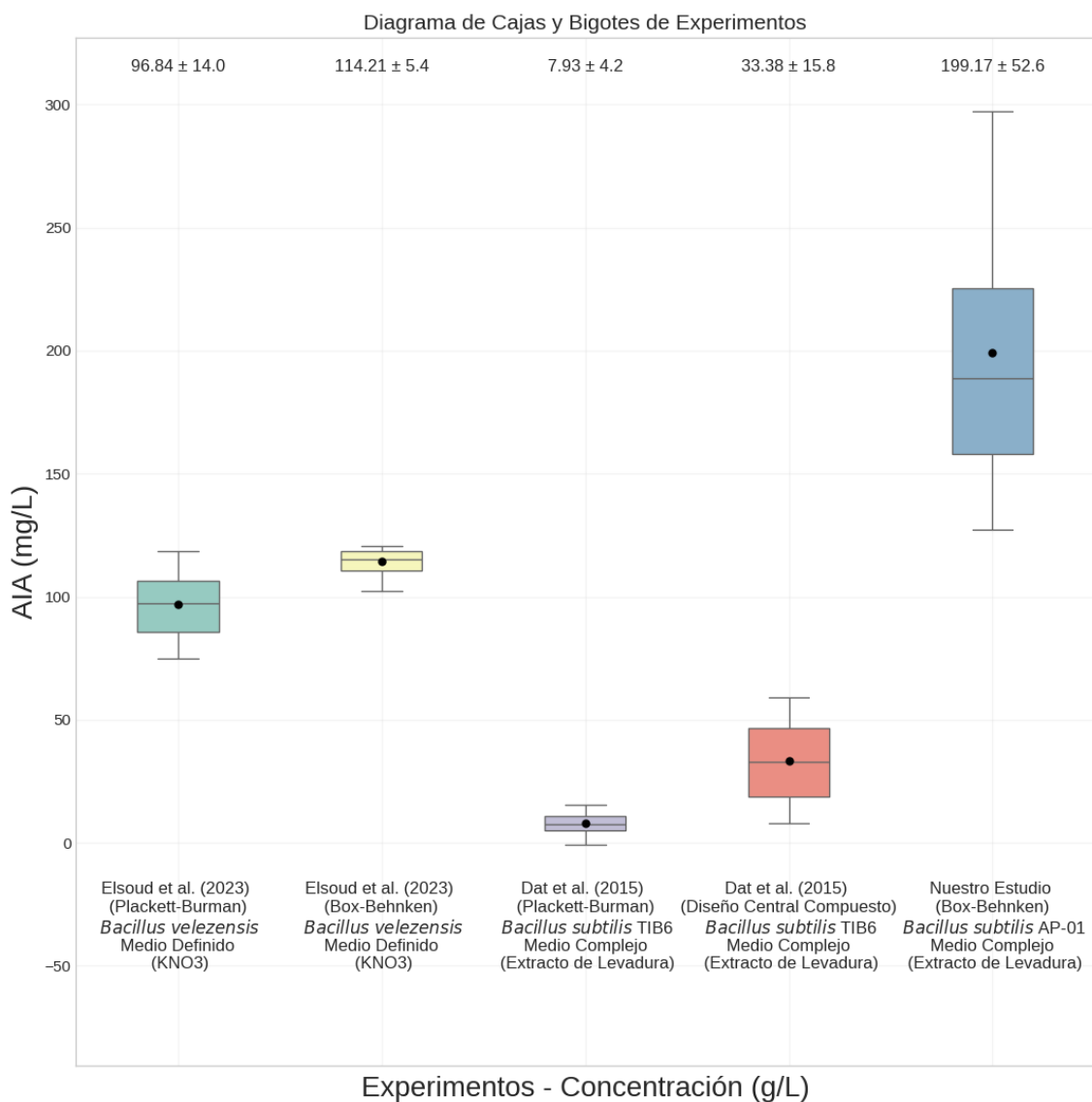
Se analizaron diversos estudios comparativos de producción de AIA, meticulosamente diferenciados por la composición cuantitativa de sus medios de cultivo, los microorganismos empleados y las metodologías de optimización implementadas. Los estudios de Abo-El-soud et al. (2023) se centraron en *Bacillus velezensis* cultivado en un medio definido. La optimización se abordó en dos fases, comenzando con un diseño Plackett-Burman que evaluó la influencia del triptófano, variando su concentración desde 0 g/L hasta 2 g/L, el nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) con un rango de 0 g/L a 1 g/L, y la D(+) manosa, también explorada entre 0 g/L y 1 g/L. Posteriormente, para refinar las concentraciones óptimas, se aplicó un diseño Box-Behnken, estableciendo niveles precisos de D(+) manosa en 4.41 g/L, manitol en 8.66 g/L, triptófano en 0.93 g/L, nitrato de potasio en 5.88 g/L y cloruro de amonio en 1.29 g/L. En contraste, los estudios de Dat et al. (2015) y Nuestro estudio se llevaron a cabo con *Bacillus subtilis* en medios complejos. Dat et al. (2015) emplearon inicialmente un diseño Plackett-Burman para discernir los factores significativos, examinando el efecto del L-triptófano, utilizando concentraciones que iban desde 0.01% hasta 0.1%, el extracto de levadura, variando su proporción de 0.1% a 1%, y la proporción de inóculo, explorada entre 1% y 3%. La optimización posterior se realizó mediante un Diseño Central Compuesto, donde se ajustó la concentración de L-triptófano al 0.088% y la de extracto de levadura al 0.82%. Nuestro estudio, también basado en un medio complejo, implementó un tratamiento óptimo específico, con una formulación cuantitativa precisa de glucosa en 3.559 g/L, extracto de levadura en 0.150 g/L y triptófano en 0.65 g/L.

Analizamos la producción de AIA, los estudios de Abo-El-soud et al. (2023) en medio definido demostraron una producción media de  $96.84 \pm 14.0$  mg/L tras la etapa inicial de cribado de factores con el diseño Plackett-Burman. La subsecuente optimización con el

diseño Box-Behnken logró elevar significativamente la producción media a  $114.21 \pm 5.4$  mg/L. El estudio inicial de Dat et al. (2015) en medio complejo, antes de la optimización con Diseño Central Compuesto, mostró una producción media de AIA de  $7.93 \pm 4.2$  mg/L con el diseño Plackett-Burman. Tras la implementación del Diseño Central Compuesto, la producción media se incrementó notablemente a  $33.38 \pm 15.8$  mg/L. Sin embargo, nuestro estudio, también utilizando un medio complejo, presentó la producción media más alta entre los estudios comparados, alcanzando un valor de  $199.17 \pm 52.6$  mg/L, los resultados comparativos de los estudios, se muestran en el diagrama de caja y bigotes (Figura 9).

### Figura 9

Producción de AIA en diversos estudios comparativos



Nota. Se presenta la producción de ácido indolacético (AIA) en diferentes estudios, mostrando la variación según el diseño experimental y el medio de cultivo utilizado. Las líneas sobre cada caja representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la producción.

El análisis de varianza (ANOVA) presentado en la Tabla 14 demostró una diferencia estadísticamente significativa en la producción de ácido indolacético (AIA) entre los diferentes grupos de estudio (Suma de Cuadrados = 480424.3686, Grados de libertad = 4.0,  $F = 275.1558$ , Valor  $p < 0.0001$ ). Este resultado robusto, con un valor  $F$  considerablemente alto y un valor  $p$  inferior al nivel de significancia establecido, indica que existe una variación sustancial en la producción de AIA que puede atribuirse a las diferencias en las metodologías y condiciones de cultivo empleadas entre nuestro estudio y los referenciados en la literatura. La alta suma de cuadrados entre los grupos subraya la magnitud de estas diferencias, justificando la realización de análisis post-hoc para identificar las comparaciones específicas responsables de esta variabilidad.

**Tabla 14**  
*Análisis de varianza (ANOVA)*

	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
Grupo	480424.3686	4.0	275.1558	<0.0001
Residual	57181.7882	131.0	-	-

*Nota.*  $p < 0.0001$ : Probabilidad menor al 0.01% de que la hipótesis nula sea verdadera; intervalos de confianza al 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Creado con Python v3.10.

Para determinar específicamente dónde se encuentran estas diferencias significativas, se aplicó la prueba post-hoc de Tukey HSD (Tabla 15). Los resultados revelaron que la producción de AIA en nuestro estudio fue significativamente mayor (Valor  $p < 0.0001$ ) en comparación con los estudios de Dat et al. (2015), mostrando una diferencia de medias de 191.2392 mg/L (IC 95%: [172.6284, 209.8499]) para el diseño Plackett-Burman (PB) y de 165.7861 mg/L (IC 95%: [149.1569, 182.4153]) para el Diseño Central Compuesto (DCC). De manera similar, la producción en nuestro estudio superó significativamente (Valor  $p < 0.0001$ ) a la obtenida por Elsoud et al. (2023) en ambas etapas de optimización, con una diferencia de medias de 102.3282 mg/L (IC 95%: [79.9455, 124.7109]) para el diseño Plackett-Burman (PB) y de 84.9594 mg/L (IC 95%: [65.2196, 104.6991]) para el diseño Box-Behnken (BB). Estas comparaciones directas, donde los intervalos de confianza al 95% no incluyen el valor cero, proporcionan evidencia cuantitativa sólida de la superioridad de la producción de AIA lograda en nuestro estudio.

**Tabla 15***Pruebas post-hoc de Tukey HSD*

Grupo 1	Grupo 2	D.M	Valor p	I.C	Rechazo
Dat et al. (2015) (PB)	Nuestro Estudio	191.2392	<0.0001	[172.6284, 209.8499]	Si
Dat et al. (2015) (DCC)	Nuestro Estudio	165.7861	<0.0001	[149.1569, 182.4153]	Si
Elsoud et al. (2023) (PB)	Nuestro Estudio	102.3282	<0.0001	[79.9455, 124.7109]	Si
Elsoud et al. (2023) (BB)	Nuestro Estudio	84.9594	<0.0001	[65.2196, 104.6991]	Si

*Nota.* D.M: Diferencia de medias,  $p < 0.0001$ : Probabilidad menor al 0.01% si la hipótesis nula es verdadera. I.C: Intervalo de Confianza al 95%. Creado con Python v3.10.

En conclusión, los resultados del análisis estadístico, respaldados por el ANOVA y las pruebas post-hoc de Tukey HSD, demuestran de manera inequívoca que la optimización de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano mediante la Metodología de Superficie de Respuesta con diseño Box-Behnken en nuestro estudio resultó en un incremento significativo y estadísticamente superior en la producción de ácido indolacético (AIA) en comparación con la literatura científica. Las diferencias sustanciales y significativas observadas en las comparaciones directas con estudios previos confirman la efectividad de la estrategia de optimización implementada y respaldan la hipótesis central de esta investigación.

## 4.2 Discusión

La investigación sobre la producción de ácido indolacético (AIA) por *Bacillus* revela una clara dicotomía en la influencia de los nutrientes, marcada por la distinción fundamental entre medios definidos y complejos. En medios definidos, caracterizados por una composición química conocida y controlada al detalle, las respuestas metabólicas de *Bacillus* tienden a ser más directas y predecibles, lo que facilita la elucidación de relaciones causa-efecto específicas. El estudio seminal de Abo-Elsoud et al. (2023) en *Bacillus velezensis* ilustra paradigmáticamente este punto: el valor F excepcionalmente alto de 908.2608 (con una significancia estadística de  $p < 0.0001$ ) asociado al Nitrato de Potasio ( $KNO_3$ ), no solo subraya su impacto lineal y altamente significativo en la producción de AIA, sino que sugiere un papel casi dominante de este nutriente en la ruta biosintética bajo estas condiciones controladas. Este resultado implica que, en un entorno con recursos limitados y bien definidos, la disponibilidad de nitrógeno, proporcionada por el  $KNO_3$ , se convierte en un factor limitante clave que regula directamente la capacidad de la bacteria para sintetizar AIA.

De manera análoga, los hallazgos de Castillo et al. (2022) en *Bacillus subtilis* revelan la sensibilidad del metabolismo bacteriano a la fuente de carbono en medios definidos. Observaron que la glucosa, típicamente una fuente de carbono de fácil asimilación, favorece primariamente el crecimiento de la biomasa (evidenciado por una tasa de crecimiento relativamente alta de  $\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que el propionato, una fuente de carbono menos común, desencadena una reorientación metabólica que deriva en un rendimiento significativamente superior de AIA ( $Y_{p/s} = 0.975 \text{ g AIA/g Trp}^{-1}$  con propionato versus  $0.803 \text{ g AIA/g Trp}^{-1}$  con glucosa). Esta diferencia sugiere que el propionato podría canalizar el flujo de carbono hacia rutas metabólicas específicas que favorecen la síntesis de AIA, posiblemente a través de la modulación de la disponibilidad de precursores clave o la activación de enzimas específicas involucradas en la biosíntesis de esta fitohormona. La investigación en *Streptomyces fradiae* llevada a cabo por Myo et al. (2019), también en un contexto de medio definido, aunque con un enfoque en un género bacteriano diferente, complementa esta perspectiva al identificar almidón soluble (valor F de 7.13) y  $\text{KNO}_3$  (valor F de 7.69) como factores influyentes en la producción de AIA, aunque con una magnitud del efecto menor en comparación con el impacto del  $\text{KNO}_3$  en *Bacillus*, lo que podría reflejar diferencias en las vías metabólicas o en la regulación de la producción de AIA entre estos géneros bacterianos.

Continuando con el análisis comparativo con medios definidos, es esencial contrastar los resultados de nuestra tesis con los de Castillo et al. (2022) en la producción de AIA utilizando glucosa como fuente de carbono. En nuestra investigación, al emplear glucosa y triptófano, alcanzamos una producción de 300.279 mg/L de AIA a las 48 horas, con una velocidad específica de formación de AIA ( $q_p$ ) de 78.1207 mg/g·h y un rendimiento de AIA sobre el sustrato ( $Y_{p/s}$ ) de 231.3228 mg AIA/g triptófano. Además, logramos un rendimiento de AIA sobre la biomasa ( $Y_{p/x}$ ) de 248.5866 mg AIA/g biomasa. En contraste, Castillo et al. (2022) reportaron una producción de 230 mg IAA/L a las 48 horas, con una velocidad específica de producción de IAA ( $q_{p,IAA}$ ) de 1.33 mmol/(gDW·h), equivalente a aproximadamente 232.95 mg/g·h considerando un peso molecular del AIA de 175.15 g/mol. Su rendimiento de IAA sobre el sustrato ( $Y_p/(s + Trp)$ ) fue de 0.446 g IAA/g (o 446 mg IAA/g) y el rendimiento de biomasa sobre el sustrato ( $Y_x/s$ ) fue de 0.324 g biomasa/g. Estos datos indican que, aunque Castillo et al. (2022) lograron una velocidad específica de producción ligeramente superior, nuestra investigación alcanzó una mayor concentración final de AIA y una mejor conversión del triptófano en AIA.

Un aspecto crucial a resaltar es la producción de biomasa. En nuestra investigación, la concentración máxima de biomasa ( $x_m$ ) fue de 0.5421 g/L, comparada con los 0.34 g/L obtenidos por Castillo et al. (2022) bajo condiciones similares de glucosa. Esta diferencia

significativa sugiere que nuestra estrategia, que incluye la adición de extracto de levadura en el medio optimizado, no solo favorece un mayor crecimiento bacteriano, sino que también contribuye a una mayor acumulación de AIA. Aunque la velocidad específica de producción de AIA fue ligeramente menor en nuestro estudio (78.1207 mg/g·h frente a 232.95 mg/g·h de Castillo et al. (2022)), la mayor cantidad de biomasa generada (0.5421 g/L frente a 0.34 g/L) resultó en una producción final superior de AIA (300.279 mg/L frente a 230 mg/L). Este equilibrio entre el crecimiento celular y la producción de AIA es fundamental para el diseño de procesos biotecnológicos, ya que una alta biomasa puede mejorar la escalabilidad y robustez del proceso, manteniendo una producción eficiente del producto deseado.

La transición hacia medios complejos, caracterizados por una riqueza nutricional y una intrincada red de interacciones entre sus componentes, introduce una dinámica multifactorial mucho más intrincada en la regulación de la producción de AIA por *Bacillus*. Nuestro propio estudio, al investigar la producción de AIA en un medio complejo enriquecido con extracto de levadura, reveló la predominancia de efectos no lineales, donde la respuesta de la bacteria a un nutriente ya no es directa y predecible, sino que se ve modulada por la presencia y concentración de otros componentes del medio. La optimización, utilizando RSM, determinó concentraciones óptimas de 0.356% de Glucosa, 0.015% de Extracto de Levadura y 0.065% de Triptófano. Si bien se observó un efecto lineal positivo inicial de la glucosa (+12.895), lo que indica que aumentos modestos en la concentración de este azúcar simple pueden favorecer la producción de AIA al proporcionar una fuente de energía fácilmente disponible, este efecto fue rápidamente contrarrestado por un efecto lineal negativo del Extracto de Levadura (-19.304). Esta observación sugiere que, aunque el extracto de levadura aporta una amplia gama de nutrientes esenciales, una concentración excesiva podría desencadenar mecanismos regulatorios o metabólicos que inhiben la síntesis de AIA, posiblemente debido a la acumulación de subproductos metabólicos o a la alteración del equilibrio osmótico del medio. Aún más significativo fue la identificación de efectos cuadráticos negativos sustanciales para el Extracto de Levadura (-84.072, con un valor F de 474.353 que denota su alta significancia estadística), la Glucosa (-46.876) y el Triptófano (-31.286). Estos coeficientes cuadráticos negativos son indicativos de que, una vez superados ciertos umbrales de concentración para estos nutrientes, incrementos adicionales resultan paradójicamente contraproducentes para la producción de AIA. Este fenómeno complejo sugiere la existencia de interacciones metabólicas intrincadas, como la competencia por precursores metabólicos limitados, donde un exceso de un nutriente puede desviar recursos de la ruta de biosíntesis de AIA, o la inducción de mecanismos de retroalimentación negativa, donde la acumulación de un nutriente o sus metabolitos activa vías que inhiben

la producción de AIA. Estos hallazgos no son fenómenos aislados en nuestro estudio, sino que encuentran eco en investigaciones previas, como la realizada por Dat et al. (2015) en *Bacillus subtilis*, quienes también reportaron un efecto cuadrático negativo significativo para la concentración de Extracto de Levadura ( $-2.57B^2$ ); sin embargo, es importante notar que la concentración óptima de extracto de levadura reportada por Dat et al. (2015) (aproximadamente 0.82%) no coincide directamente con nuestro porcentaje óptimo de 0.015%, lo que podría reflejar diferencias específicas entre cepas o en la composición precisa de los medios complejos utilizados. Este paralelismo en la observación del efecto cuadrático negativo, a pesar de la diferencia en la concentración óptima, subraya la robustez de la respuesta metabólica de *Bacillus* en medios complejos y la existencia de un punto de equilibrio nutricional crítico, aunque este punto puede variar según las condiciones experimentales específicas. En el contexto de hongos, donde la complejidad metabólica es igualmente relevante, los estudios de Nutaratat et al. (2015) et al. en *Rhodosporidium paludigenum*, al emplear la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) en un medio complejo, lograron desarrollar un modelo con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9060, lo que resalta de manera convincente la importancia crítica de considerar las interacciones sinérgicas y antagónicas entre múltiples factores (como sacarosa, extracto de levadura, L-triptófano, pH y velocidad de agitación) para comprender y optimizar la variabilidad en la producción de AIA en estos microorganismos. De forma análoga, Bunsangiam et al. (2021) en su investigación con *Rhodosporidiobolus fluvialis* identificaron efectos cuadráticos negativos significativos para componentes del medio complejo como el CSL (valor F de 18.02) y el extracto de levadura de grado técnico (valor F de 40.04), lo que refuerza la noción de que la optimización en medios complejos requiere un ajuste preciso y meticuloso de las concentraciones de nutrientes para evitar efectos perjudiciales y maximizar la producción de AIA.

En conclusión, la optimización de la producción de AIA por microorganismos, incluyendo el género *Bacillus*, se presenta como un proceso dinámico y dependiente del contexto, donde la complejidad del medio de cultivo emerge como un factor determinante clave. En los medios definidos, caracterizados por su simplicidad y control, las relaciones entre nutrientes y la producción de AIA tienden a ser más directas y lineales, lo que facilita la identificación del impacto individual de nutrientes específicos, como se evidencia en los altos valores F asociados al  $KNO_3$  en los estudios con *Bacillus*. Sin embargo, al transitar hacia los medios complejos, la regulación de la biosíntesis de AIA se vuelve intrincada y multifactorial, con la predominancia de interacciones no lineales, tal como lo demuestran los significativos efectos cuadráticos negativos observados tanto en nuestro estudio como en el de Dat et al. (2015) con *Bacillus*, y de manera consistente en estudios con hongos.

La adopción de metodologías de vanguardia como la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), que permite modelar estas complejas interacciones y obtener altos valores de  $R^2$ , se revela como una herramienta esencial e indispensable para identificar las combinaciones óptimas de nutrientes que permiten equilibrar los efectos sinérgicos y antagonistas, maximizando así la producción de AIA. Mientras que en los medios definidos un enfoque más reduccionista puede ser suficiente, la optimización en medios complejos exige una estrategia multifactorial sofisticada, que considere la intrincada red de interacciones entre los componentes del medio para lograr una producción eficiente y sostenible de esta importante fitohormona.



## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- Se caracterizó la cinética de producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01, evidenciando una biomasa inicial ( $x_0$ ) de 0.0526 g/L que alcanzó una concentración máxima ( $x_m$ ) de 0.5421 g/L, con una tasa específica de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ) de 0.2931 h<sup>-1</sup> y una tasa volumétrica de crecimiento ( $Q_x$ ) de 0.0154 g/L·h. El consumo de triptófano, con una concentración inicial ( $s_0$ ) de 0.7895 g/L, presentó una tasa específica de consumo ( $q_s$ ) de 0.3150 g triptófano/g biomasa·h y una velocidad volumétrica de consumo ( $Q_s$ ) de 0.0166 g/L·h, con un rendimiento de biomasa respecto al triptófano ( $Y_{xs}$ ) de 0.9306 g biomasa/g triptófano. La producción de AIA, partiendo de una concentración inicial ( $p_0$ ) de 68.0868 mg/L, se ajustó al modelo de Luedeking-Piret con un componente asociado al crecimiento ( $\alpha$ ) de 248.5866 mg AIA/g biomasa y un componente no asociado al crecimiento ( $\beta$ ) de 5.2607 mg AIA/h, alcanzando una velocidad específica de formación de AIA ( $q_p$ ) de 78.1207 mg/g·h, una velocidad volumétrica de formación de AIA ( $Q_p$ ) de 4.1122 mg/L·h, un rendimiento de AIA sobre biomasa ( $Y_{px}$ ) de 248.5866 mg/g y un rendimiento de AIA sobre triptófano ( $Y_{ps}$ ) de 231.3228 mg/g. El modelo logró un buen ajuste con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9810 para la biomasa, 0.9881 para el sustrato y 0.9857 para el producto.
- Se maximizó la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño experimental Box-Behnken. El modelo resultante predijo una producción máxima de AIA de 287.69 mg/L, obtenida con concentraciones optimizadas de glucosa, extracto de levadura y triptófano de 3.559 g/L, 0.150 g/L y 0.650 g/L respectivamente, correspondientes a valores codificados de 0.138, -0.115 y 0.000. El análisis de varianza (ANOVA) del modelo demostró una significancia estadística alta (F = 153.176, Valor p < 0.0001).
- Se validó estadísticamente la mejora en la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01 utilizando un diseño Box-Behnken. El análisis de varianza (ANOVA) demostró una diferencia significativa en la producción de AIA entre los grupos de estudio (F = 275.1558, Valor p < 0.0001). La prueba post-hoc de Tukey HSD reveló que la producción media de AIA en este estudio (199.17 ± 52.6 mg/L) fue significativamente mayor en comparación con los estudios de Dat et al. (2015) (diferencia de medias de 191.2392 mg/L y 165.7861 mg/L, ambos con Valor p < 0.0001) y Elsoud et al. (2023) (diferencia de medias de 102.3282 mg/L y 84.9594

mg/L, ambos con Valor  $p < 0.0001$ ), confirmando la superioridad de la producción alcanzada.

## 5.2 Recomendaciones

- Se sugiere realizar un estudio exhaustivo comparando diversas fuentes de nitrógeno, tales como aminoácidos individuales (glutamato, aspartato, etc.), sales de amonio (sulfato de amonio, cloruro de amonio) y nitratos (nitrato de potasio), en medios químicamente definidos. El objetivo sería determinar la fuente y concentración óptimas que no solo maximicen la producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01, sino que también promuevan un crecimiento celular eficiente y una conversión óptima del triptófano, precursor clave de AIA. Se podrían emplear diseños experimentales factoriales para evaluar las interacciones entre la fuente de nitrógeno y otros componentes del medio, como la fuente de carbono y los micronutrientes.
- Dado que el extracto de levadura es una mezcla compleja de nutrientes, se propone un enfoque de fraccionamiento y análisis. Se podrían utilizar técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la ultrafiltración para separar el extracto de levadura en sus componentes principales (aminoácidos, péptidos, vitaminas del grupo B, nucleótidos, minerales). Posteriormente, se evaluaría el efecto individual y combinado de estas fracciones en la producción de AIA, permitiendo identificar aquellos componentes específicos que ejercen una influencia significativa (positiva o negativa) en la biosíntesis de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01. Esta información sería valiosa para el diseño de medios semi-definidos o para optimizar la composición de medios complejos.
- Profundizar en la comprensión de las interacciones entre estos tres componentes clave del medio complejo es fundamental. Se recomienda la utilización de diseños experimentales factoriales más amplios y detallados, que exploren un rango más amplio de concentraciones y combinaciones de glucosa, extracto de levadura y triptófano. El análisis de superficie de respuesta generado a partir de estos experimentos permitiría mapear con mayor precisión la relación entre las concentraciones de estos nutrientes y la producción de AIA, identificando las combinaciones óptimas y revelando posibles efectos sinérgicos o antagonicos. Adicionalmente, se podrían realizar estudios cinéticos para analizar cómo la disponibilidad de un nutriente influye en el consumo de los otros y en la tasa de producción de AIA.

- Extender la metodología de superficie de respuesta (MSR) a hongos productores de AIA representa una prometedora línea de investigación. Se propone aplicar diseños experimentales como Box-Behnken o Diseño Central Compuesto a diferentes especies fúngicas conocidas por su capacidad de producir AIA, tanto en medios químicamente definidos como en medios complejos. El objetivo sería determinar las condiciones de cultivo óptimas (temperatura, pH, aireación) y las concentraciones ideales de nutrientes específicos que maximicen la producción de AIA en estos microorganismos. La comparación de los resultados obtenidos entre diferentes especies de hongos podría revelar patrones comunes o específicos en sus requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.
- La fermentación en estado sólido (FES) ofrece una alternativa sostenible y económica a la fermentación sumergida. Se propone investigar la capacidad de diferentes especies de hongos para producir AIA utilizando diversos residuos agroindustriales como sustratos, tales como salvado de trigo, bagazo de caña, cáscaras de frutas o residuos de la industria cervecera. Se evaluarían diferentes parámetros de la FES, como el tipo y pretratamiento del sustrato, la humedad, la temperatura, la aireación y la suplementación con nutrientes adicionales, para optimizar la producción de AIA. Este enfoque podría no solo reducir los costos de producción, sino también contribuir a la valorización de residuos agroindustriales.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Elsooud, M. M., Hasan, S. F., & Elhateir, M. M. (2023). Optimization of Indole-3-acetic acid production by *Bacillus velezensis* isolated from *Pyrus* rhizosphere and its effect on plant growth. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *50*, 102714. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102714>
- Ali, J., Mukarram, M., Ojo, J., Dawam, N., Riyazuddin, R., Ghramh, H. A., Khan, K. A., Chen, R., Kurjak, D., & Bayram, A. (2024). Harnessing Phytohormones: Advancing Plant Growth and Defence Strategies for Sustainable Agriculture. *Physiologia Plantarum*, *176*(3), e14307. <https://doi.org/10.1111/ppl.14307>
- Baliyan, N., Dhiman, S., Dheeman, S., Kumar, S., & Maheshwari, D. K. (2021). Optimization of indole-3-acetic acid using response surface methodology and its effect on vegetative growth of chickpea. *Rhizosphere*, *17*, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100321>
- Bunsangiam, S., Thongpae, N., Limtong, S., & Srisuk, N. (2021). Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Scientific Reports*, *11*(1), 13094. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92305-w>
- Castillo, F., Viguera, J. G., Rosales, L. M., Monte, A. D., & Olivares, R. (2021). Propionate as the preferred carbon source to produce 3-indoleacetic acid in *B. subtilis*: comparative flux analysis using five carbon sources. *Molecular Omics*, *17*(4), 554-564. <https://doi.org/10.1039/d1mo00039j>
- Castillo, F., Viguera, J. G., Rosales, L. M., Monte, A. D., & Olivares, R. (2022a). Analysis of the Propionate Metabolism in *Bacillus subtilis* during 3-Indolacetic Production. *Microorganisms*, *10*(12), 2352. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122352>
- Castillo, F., Viguera, J. G., Rosales, L. M., Monte, A. D., & Olivares, R. (2022b). The robustness analysis of propionate metabolism in *Bacillus subtilis* during 3-indolacetic acid production. <https://doi.org/10.22541/au.165701522.24085759/v1>
- Chagas, A., Oliveira, A., Oliveira, L., dos Santos, G., Chagas, L., Lopes da Silva, A. L., & Costa, J. (2015). Production of indole-3-acetic acid by bacillus isolated from different soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *21*(2), 282-287. <https://www.agrojournal.org/21/02-08.pdf>.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). (2022). La sostenibilidad ambiental en la planificación del desarrollo en América Latina y el Caribe: reflexiones sobre la experiencia y los desafíos en la implementación de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/cb30a4de-7d87-4e79-8e7a-ad5279038718/content>.

- Das, S., Nurunnabi, T. R., Parveen, R., Mou, A. N., Islam, M. E., Islam, K. M. D., & Rahman, M. (2019). Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Bacteria from Rhizosphere Soil and their Effect on Seed Germination. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(03), 1237-1245. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.146>
- Dat, T. T. H., Cuc, N. T. K., & Cuong, P. V. (2015). OPTIMIZATION OF INDOLE-3-ACETIC ACID PRODUCTION BY BACILLUS SUBTILIS TIB6 USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *International Journal of Development Research*, 5(04), 4036-4042. <https://www.journalijdr.com/optimization-indole-3-acetic-acid-production-bacillus-subtilis-tib6-using-response-surface>.
- Enders, T. A., & Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, 102(2), 180-196. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>
- FAO, FIDA, OMS, PMA & UNICEF. (2023). *Versión resumida de El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2023*. FAO. Roma. <http://doi.org/10.4060/cc6550es>.
- Garcia, D. C., Cheng, X., Land, M. L., Standaert, R. F., MorrellFalvey, J. L., & Doktycz, M. J. (2019). Computationally Guided Discovery and Experimental Validation of Indole-3-acetic Acid Synthesis Pathways. *ACS Chem. Biol.*, 14(12), 2867-2875. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00725>
- Guillory, A., & Bonhomme, S. (2021). Phytohormone biosynthesis and signaling pathways of mosses. *Plant Molecular Biology*, 107(4-5), 245-277. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01172-6>
- Hosokawa, S., Morinishi, T., Ohara, K., Yamaguchi, K., Tada, S., & Tokuhara, Y. (2023). A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate. *PLOS ONE*, 18(1), e0279547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279547>
- Huayhuacuri, A., Alarcón, C., Gisela, M., Pacheco, Q., & Samuel, W. (2020). Uso de Agroquímicos en la Producción de Papa y su Impacto en el Suelo, en el Perú: Revisión Sistemática. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/61365>.
- Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., García, C., Mezaache, S., Glare, T. R., Borriss, R., Singh, S. P., Blázquez, M. A., & Sansinenea, E. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8549-8565. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10890-8>
- Khianggam, S., Meetum, P., Chiangmai, P. N., & Tanasupawat, S. (2023). Identification and Optimisation of Indole-3-Acetic Acid Production of Endophytic Bacteria and

- Their Effects on Plant Growth. *Tropical Life Sciences Research*, 34(1), 219-239. <https://doi.org/10.21315/tlsr2023.34.1.12>
- Kumari, S., Prabha, C., Singh, A., Kumari, S., & Kiran, S. (2018). Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production by Diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), Isolated from Rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 7(2), 20-27. <https://doi.org/10.18178/ijpmbs.7.2.20-27>
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development (Cambridge, England)*, 140(5), 943-950. <https://doi.org/10.1242/dev.086363>
- Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M., & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiology*, 19(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1528-1>
- Nutaratat, P., Amsri, W., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2015). Indole-3-acetic acid production by newly isolated red yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61(1), 1-9. <https://doi.org/10.2323/jgam.61.1>
- Özdal, M., Özdal, Ö. G., Sezen, A., & Algur, Ö. F. (2016). Biosynthesis Of Indole-3-Acetic Acid By *Bacillus cereus* Immobilized Cells. *Cumhuriyet Science Journal*, 37(3), 212. <https://doi.org/10.17776/csj.34085>
- Pérez, M. M. (2017). In-depth analysis of jasmonate-mediated indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis and its implication in plant development. <https://doi.org/10.20868/upm.thesis.47133>
- Raa, S. B. (2018). Caracterización y Conservación de Metabolitos del Cultivo de *Bacillus*.SP en Fermentación Batch con Capacidad Promotora de Crecimiento Vegetal y Biocontrol Frente *Rhizoctonia Solani*. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/8171>.
- Rayle, D. L., & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4), 1271-1274. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1271>
- Rose, J. K., Braam, J., Fry, S. C., & Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant & cell physiology*, 43(12), 1421-1435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf171>
- Salkowski, E. (1885). *Biological Chemistry*, 9(1), 23-33. <https://doi.org/doi:10.1515/bchm1.1885.9.1.23>

- Salvatierra, W. (2022). Influencia de la temperatura en la producción de ácido indolacético por *Bacillus subtilis* en un biorreactor automatizado Bioflo - Celligen 115. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/4759296>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Suliasih & Widawati, S. (2020). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 572(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/572/1/012025>
- Vishwakarma, D., Thakur, J., & Gupta, S. (2017). Study of production of indole acetic acid by soil and plant bacterial isolates on different media. ~ 639 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 639-641.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>

## VII.

## ANEXOS

## Anexo 1

Medio definido con los requerimientos específicos para *Bacillus subtilis* AP-01

Elemento	Nutriente	% E. la célula	% E. nutriente	Y x/s	So* (g/L)	So (g/L)
C	Glucosa C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	50.00	40.00	0.48	2.333	3.500
N	L-triptófano C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.00	13.72	1.37	0.817	1.37
P	Fosfato monosódico NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.00	25.82	8.61	0.130	0.125
K	Fosfato de potasio dibásico K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.00	44.90	14.97	0.075	0.074
Mg	Sulfato de magnesio MgSO <sub>4</sub>	0.50	20.19	40.39	0.028	0.042
S	Sulfato de magnesio MgSO <sub>4</sub>	0.55	26.64	48.44	0.023	0.035
Fe	Sulfato de hierro FeSO <sub>4</sub>	0.11	36.76	334.21	0.003	0.016
Ca	Cloruro de calcio CaCl <sub>2</sub>	0.51	11.36	71.51	0.016	0.015
Mn	Sulfato de Manganeseo MnSO <sub>4</sub>	0.01	36.18	6615.09	0.003	0.003
Na	Fosfato monosódico NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.75	33.82	51.10	0.022	0.033
Co	Cloruro de Cobalto CoCl <sub>2</sub>	0.05	45.39	907.79	0.001	0.001
Cu	Sulfato de Cobre III CuSO <sub>4</sub>	0.02	39.81	2654.27	0.001	0.001
Zn	Sulfato de Zinc ZnSO <sub>4</sub>	0.02	33.79	1689.35	0.001	0.001

*Nota.* Y x/s representa la relación de crecimiento celular, So\* es la concentración de nutrientes inicial ajustada y So es la concentración efectiva de nutrientes en el medio de cultivo.



## Anexo 2

### Composición del medio TGY (triptona, glucosa y extracto de levadura)

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Glucosa	1 g/L
Peptona de caseína	5 g/L
Extracto de levadura	2.5 g/L

## Anexo 3

### Composición del reactivo de Salkowski

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Ácido sulfúrico (98% p/v)	1.5 ml
Cloruro de hierro hexahidratado (0.5 M)	0.075 ml
Agua	2.5 ml

## Anexo 4

### Composición de la solución de cloruro de hierro (0.5M)

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Cloruro de hierro hexahidratado	1.35 g
Agua	10 ml

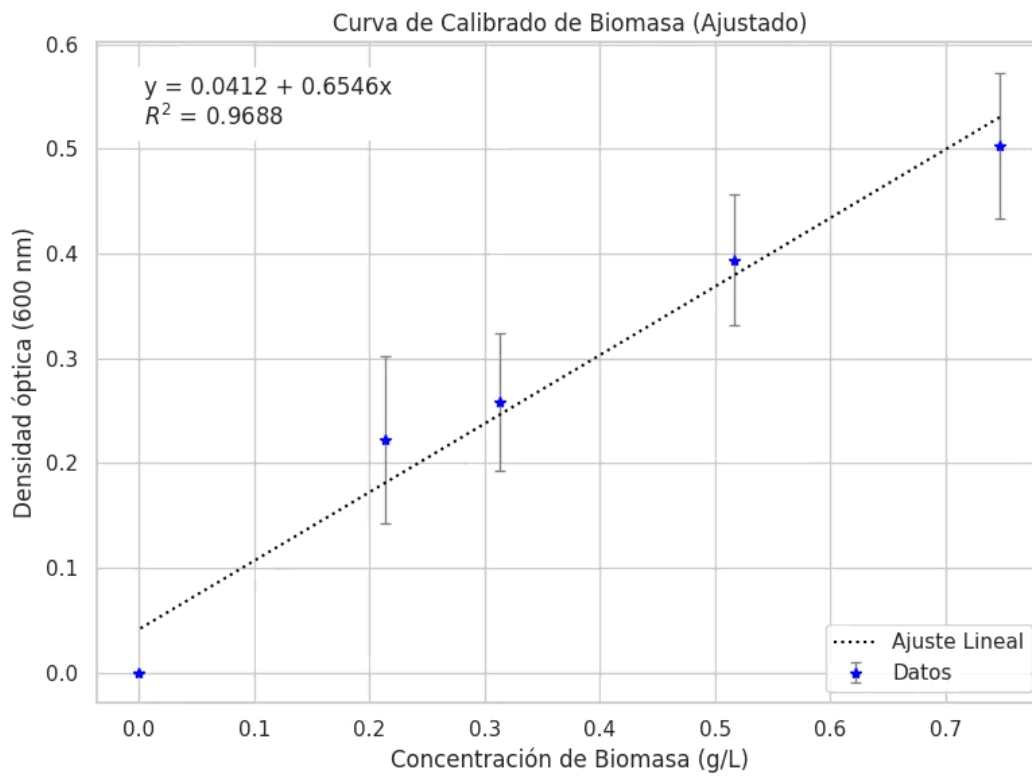
## Anexo 5

### Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de biomasa

Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso de Biomasa (g)	Biomasa (g/L)	Absorbancia Promedio (Abs)
0.2200	0.2787	0.0587	0.8810	0.649 ± 0.052
0.2300	0.2798	0.0498	0.7470	0.503 ± 0.070
0.2100	0.2444	0.0344	0.5160	0.394 ± 0.062
0.2400	0.2609	0.0209	0.3130	0.258 ± 0.066
0.2050	0.2192	0.0142	0.2130	0.222 ± 0.080
0.2500	0.2500	0.0000	0.0000	0.000 ± 0.000

## Anexo 6

### Curva de calibrado de biomasa



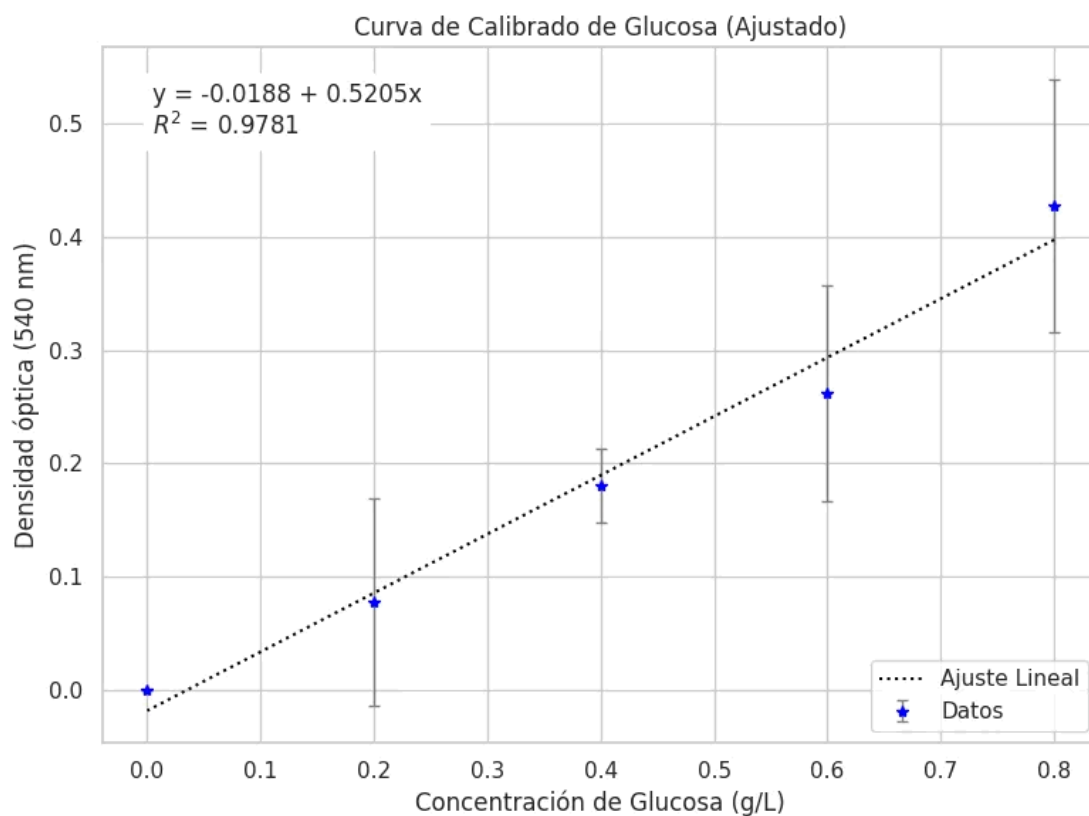
## Anexo 7

### Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de glucosa

Solución	H <sub>2</sub> O	Dimensión de Dilución	Concentración Predicha (g/L)	Absorbancia Real 1 (Abs)	Absorbancia Real 2 (Abs)	Absorbancia Real Promedio (Abs)	Desviación Estándar (Abs)
1.000	0.000	1.000	1.000	0.421	0.665	0.543	0.173
0.800	0.200	1.250	0.800	0.349	0.508	0.428	0.112
0.600	0.400	1.667	0.600	0.195	0.329	0.262	0.095
0.400	0.600	2.500	0.400	0.157	0.204	0.180	0.033
0.200	0.800	5.000	0.200	0.012	0.142	0.077	0.092
0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

## Anexo 8

### Curva de calibrado de glucosa



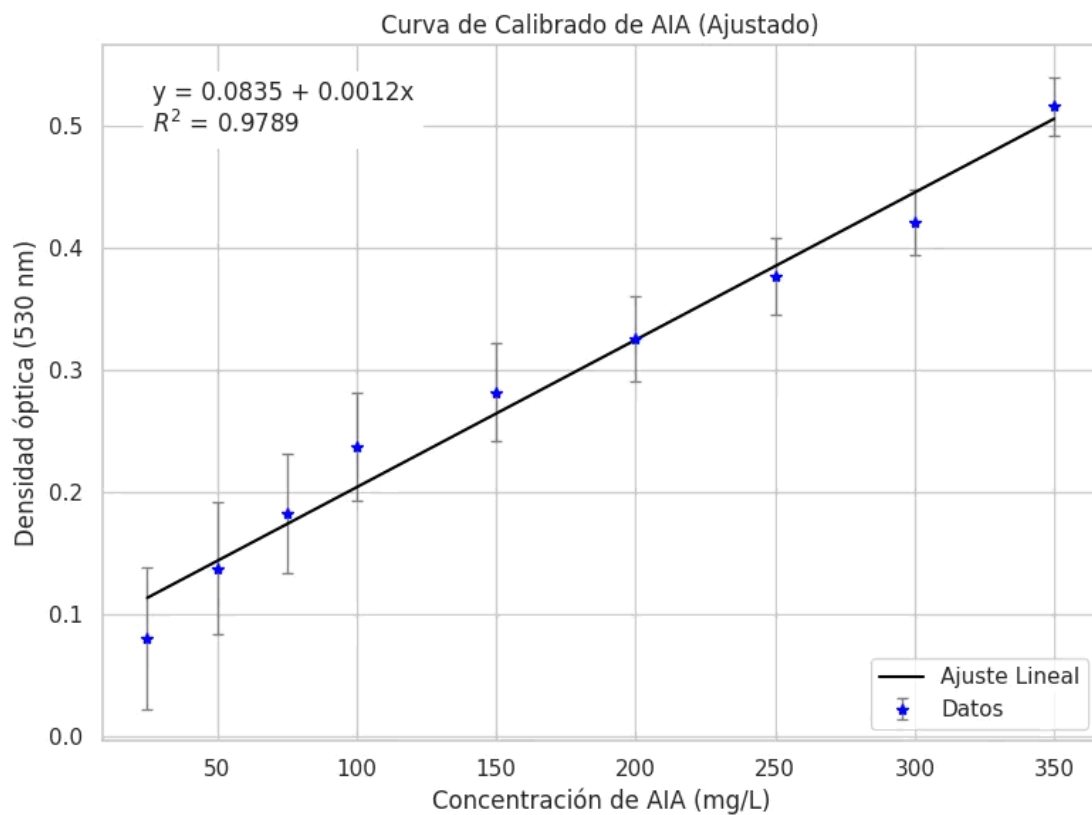
## Anexo 9

### Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de ácido indolacético (AIA)

Solución	H <sub>2</sub> O	Dimensión de Dilución	Concentración Predicha (mg/L)	Absorbancia Real 1 (Abs)	Absorbancia Real 2 (Abs)	Absorbancia Real Promedio (Abs)	Desviación Estándar (Abs)
1.000	0.000	1.000	500.000	0.855	0.835	0.845	0.014
0.900	0.100	1.111	450.000	0.749	0.725	0.737	0.017
0.800	0.200	1.250	400.000	0.637	0.607	0.622	0.021
0.700	0.300	1.429	350.000	0.533	0.499	0.516	0.024
0.600	0.400	1.667	300.000	0.440	0.402	0.421	0.027
0.500	0.500	2.000	250.000	0.399	0.355	0.377	0.031
0.400	0.600	2.500	200.000	0.351	0.301	0.326	0.035
0.300	0.700	3.333	150.000	0.310	0.254	0.282	0.040
0.200	0.800	5.000	100.000	0.268	0.206	0.237	0.044
0.150	0.850	6.667	75.000	0.218	0.148	0.183	0.049
0.100	0.900	10.000	50.000	0.176	0.100	0.138	0.054
0.050	0.950	20.000	25.000	0.122	0.040	0.081	0.058
0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

## Anexo 10

### Curva de calibrado de AIA



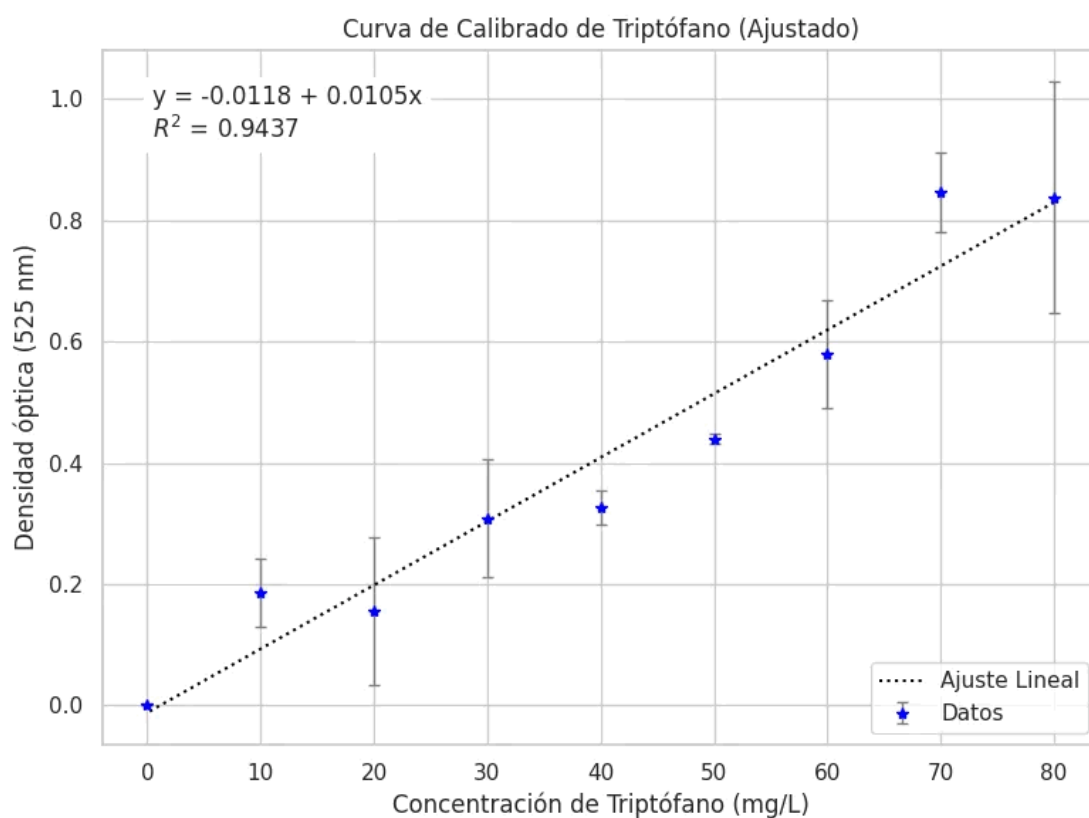
## Anexo 11

### Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de triptófano

Solución	H <sub>2</sub> O	Dimensión de Dilución	Concentración Predicha (mg/L)	Absorbancia Real 1 (Abs)	Absorbancia Real 2 (Abs)	Absorbancia Real Promedio (Abs)	Desviación Estándar (Abs)
1.000	0.000	1.000	150.000	1.715	2.524	2.120	0.572
0.800	0.200	1.250	120.000	1.089	1.297	1.193	0.147
0.667	0.333	1.500	100.000	0.941	1.488	1.214	0.387
0.600	0.400	1.667	90.000	0.552	0.960	0.756	0.288
0.533	0.467	1.875	80.000	0.703	0.973	0.838	0.191
0.467	0.533	2.143	70.000	0.801	0.893	0.847	0.065
0.400	0.600	2.500	60.000	0.516	0.642	0.579	0.089
0.333	0.667	3.000	50.000	0.434	0.446	0.440	0.008
0.267	0.733	3.750	40.000	0.306	0.345	0.326	0.028
0.200	0.800	5.000	30.000	0.240	0.378	0.309	0.098
0.133	0.867	7.500	20.000	0.070	0.243	0.156	0.122
0.067	0.933	15.000	10.000	0.147	0.226	0.186	0.056
0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

## Anexo 12

### Curva de calibrado de triptófano



### Anexo 13

#### Datos de la cinética de producción de AIA por *Bacillus subtilis* AP-01

##### Primera réplica

Tiempo (Horas)	Biomasa (g/L)	Triptófano (g/L)	AIA (mg/L)
0.000	0.030	0.875	70.942
2.000	0.052	0.753	95.262
4.000	0.135	0.657	85.928
6.000	0.228	0.567	108.719
9.000	0.308	0.547	121.440
26.000	0.508	0.241	268.111
48.000	0.575	0.148	318.861

##### Segunda réplica

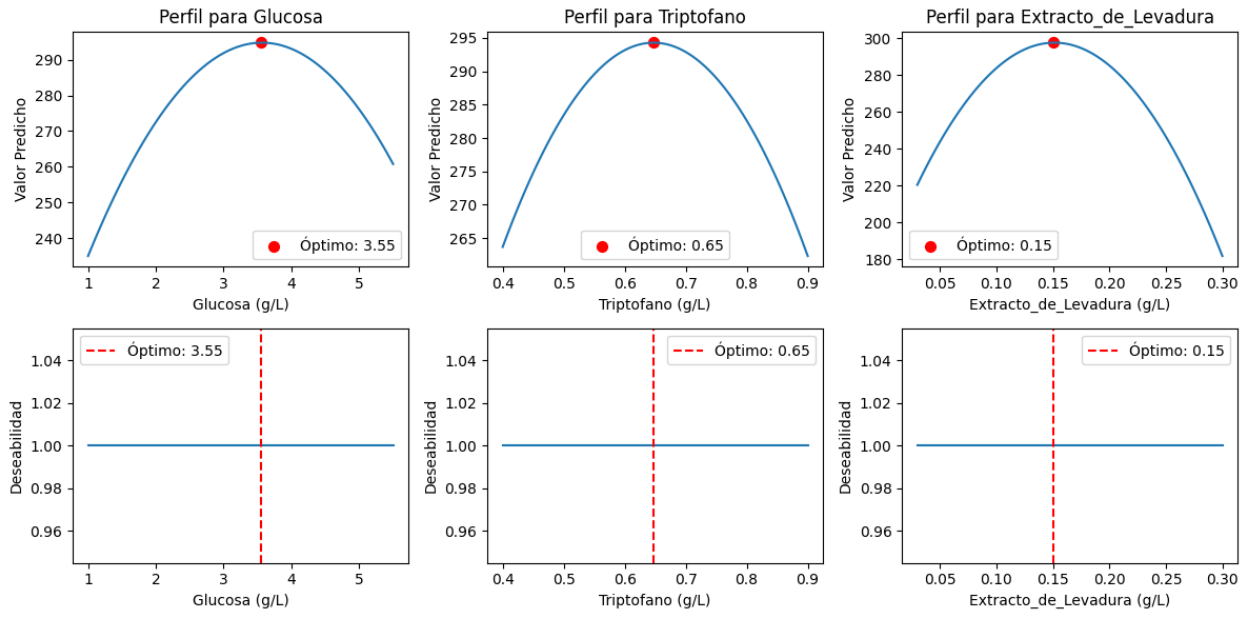
Tiempo (Horas)	Biomasa (g/L)	Triptófano (g/L)	AIA (mg/L)
0.000	0.048	0.869	72.260
2.000	0.072	0.800	76.215
4.000	0.162	0.643	101.456
6.000	0.272	0.589	139.486
9.000	0.288	0.471	132.117
26.000	0.532	0.200	234.940
48.000	0.558	0.135	300.406

##### Tercera réplica

Tiempo (Horas)	Biomasa (g/L)	Triptófano (g/L)	AIA (mg/L)
0.000	0.032	0.671	70.085
2.000	0.045	0.795	88.737
4.000	0.152	0.683	41.599
6.000	0.258	0.568	113.123
9.000	0.298	0.524	139.037
26.000	0.518	0.208	248.642
48.000	0.565	0.133	281.569

## Anexo 14

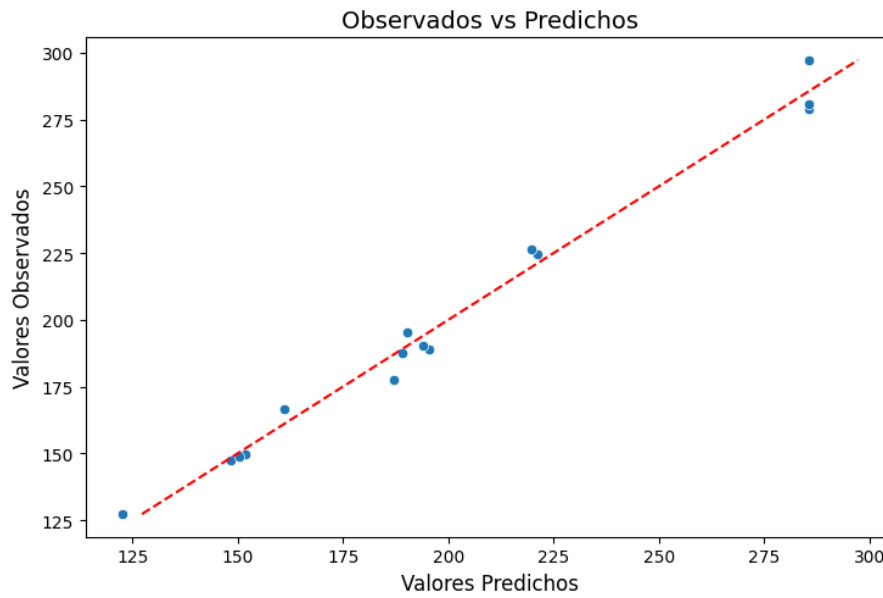
### Evaluación del perfil de deseabilidad del diseño Box-Behnken



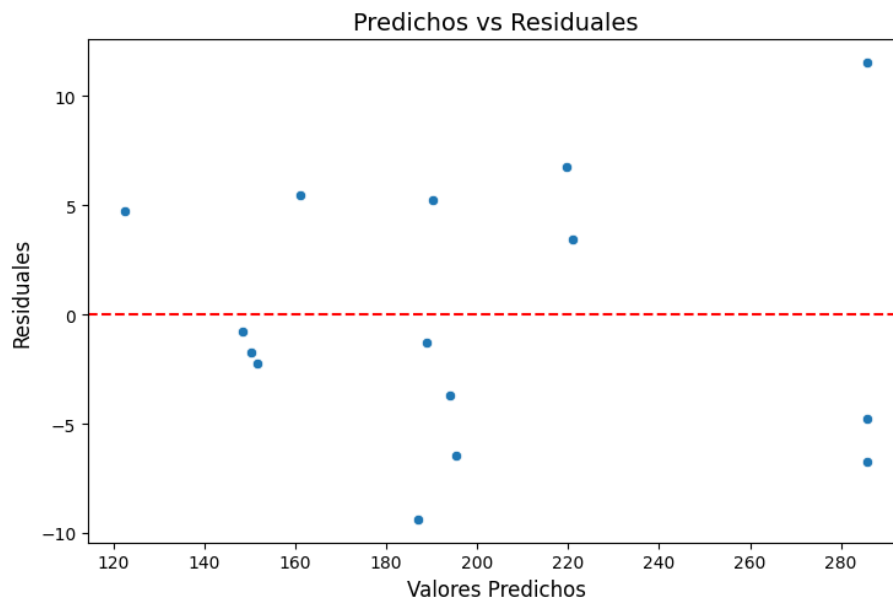
## Anexo 15

### Evaluación del ajuste y análisis de residuos para la producción de AIA del diseño Box-Behnken

#### Valores observados vs. predichos

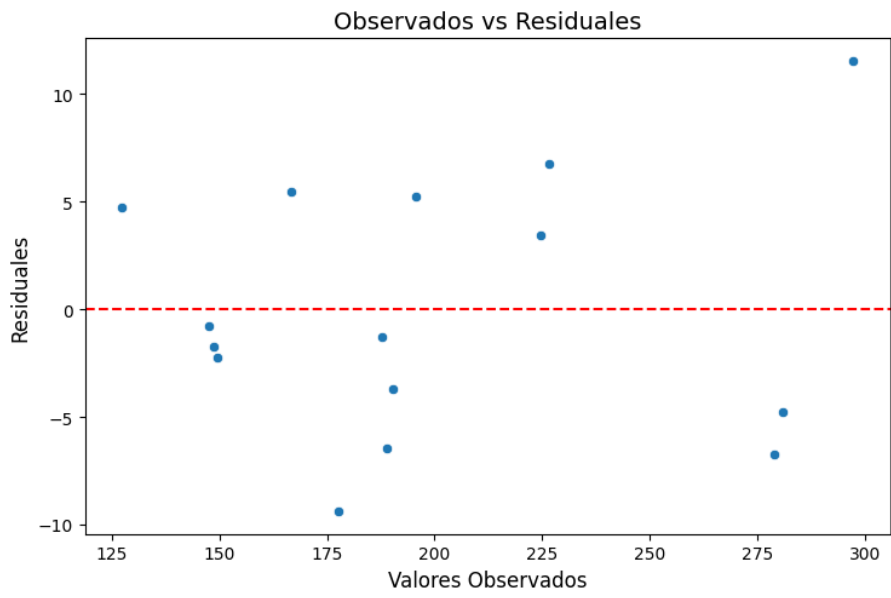


#### Valores predichos vs. residuales

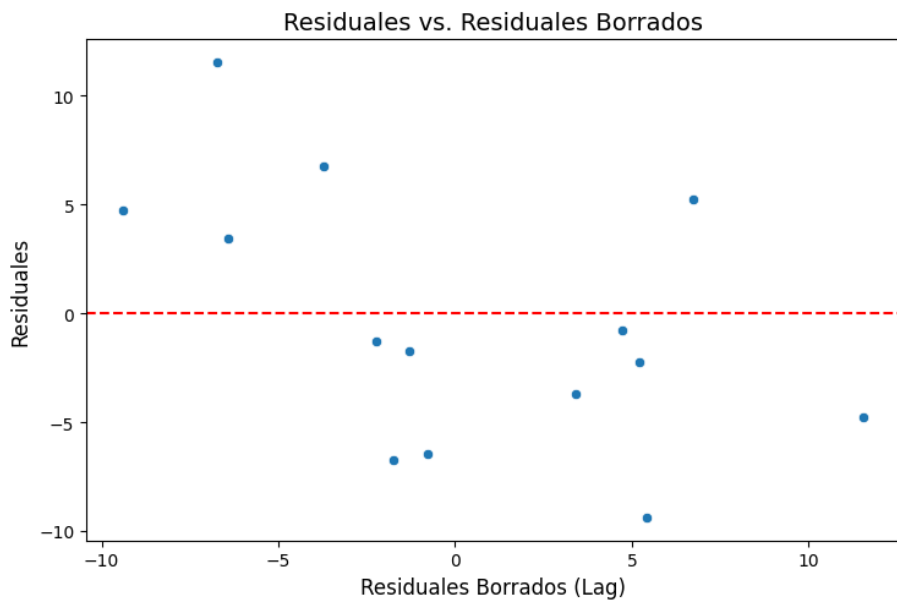




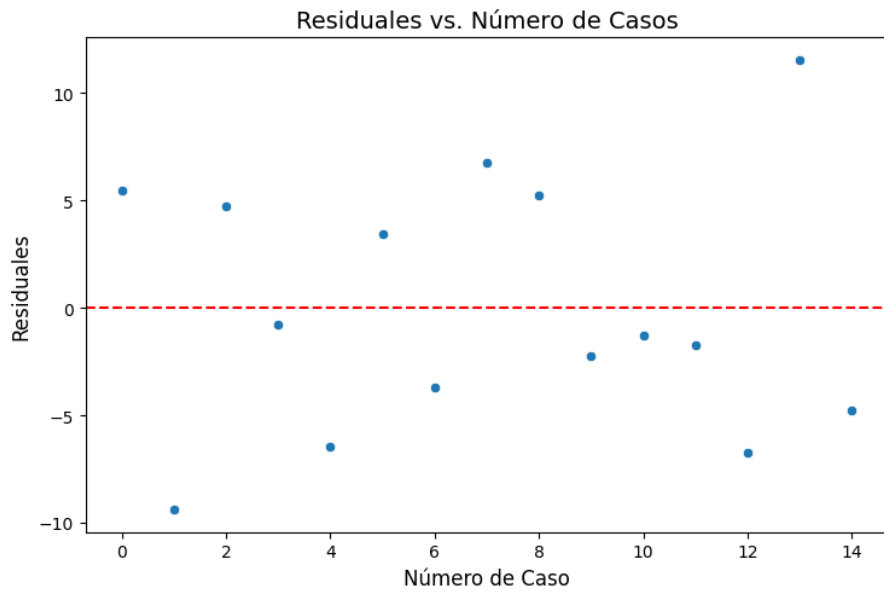
### Valores observados vs. residuales



### Valores residuales vs. residuales borrados



## Valores residuales vs. números de casos



## Anexo 16

### Evaluación estadística descriptiva de grupos experimentales

Grupo	Conteo	Media	D.E.	Min.	25%	50%	75%	Max.
Nuestro Estudio (Box-Behnken)	15.0	199.17	52.62	127.26	158.04	188.88	225.51	297.24
Elsoud et al. (2023) (Box-Behnken)	20.0	114.21	5.38	102.13	110.72	115.26	118.36	120.53
Elsoud et al. (2023) (Plackett-Burman)	12.0	96.84	14.00	74.94	85.88	97.46	106.60	118.43
Dat et al. (2015) (Diseño Central Compuesto)	62.0	33.38	15.81	7.85	18.77	32.72	46.72	58.94
Dat et al. (2015) (Plackett-Burman)	27.0	7.93	4.20	-0.96	5.02	7.59	10.96	15.32

## Anexo 17

### Evaluación de normalidad de grupos experimentales

Estudio (Diseño)	n	Estadístico	<i>p</i>	Conclusión
Elsoud et al. (2023) (Plackett-Burman)	12	$W = 0.9590$	0.7697	Normal
Elsoud et al. (2023) (Box-Behnken)	20	$W = 0.9212$	0.1044	Normal
Dat et al. (2015) (Plackett-Burman)	27	$W = 0.9715$	0.6424	Normal
Dat et al. (2015) (Diseño Central Compuesto)	62	$D = 0.1288$	0.2338	Normal
Nuestro Estudio (Box-Behnken)	15	$W = 0.9128$	0.1495	Normal

## Anexo 18

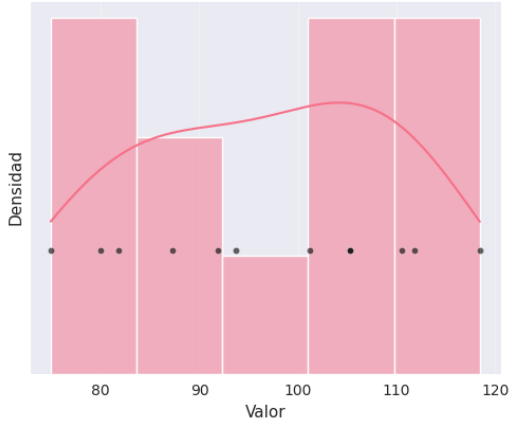
### Evaluación de homogeneidad de grupos experimentales

Estadístico	Valor
Estadístico de Levene	22.9138
<i>p</i>	<0.0001
Conclusión	Varianzas no homogéneas

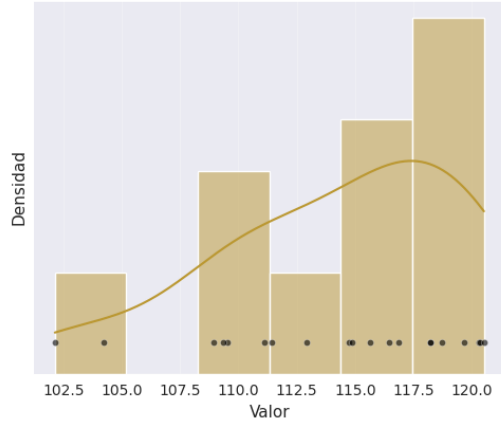
## Anexo 19

### Histogramas de distribución normal de grupos experimentales

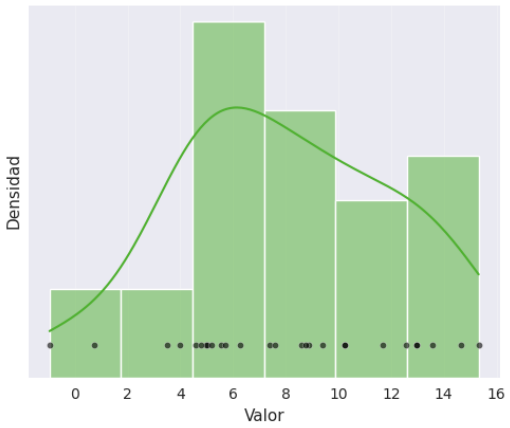
Distribución de Elsoud et al. (2023)  
(Plackett-Burman)



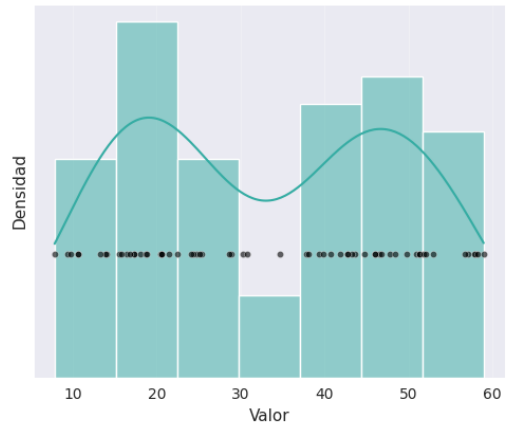
Distribución de Elsoud et al. (2023)  
(Box-Behnken)



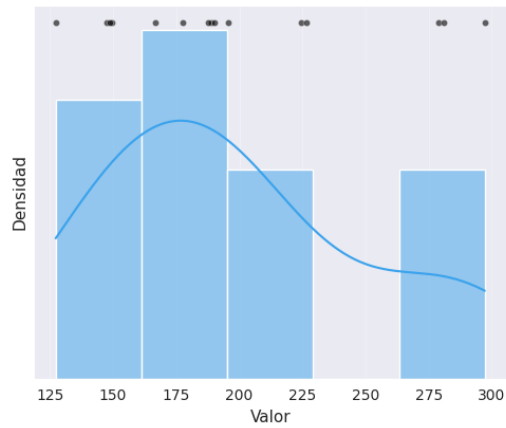
Distribución de Dat et al. (2015)  
(Plackett-Burman)



Distribución de Dat et al. (2015)  
(Diseño Central Compuesto)



Distribución de Nuestro Estudio  
(Box-Behnken)



## Anexo 20

### Boleta de venta del bioproducto Biosplent



SILVESTRE PERU S.A.C  
Calle Arica 242 Miraflores  
Lima 18 - Perú  
T. 617 3300  
www.silvestre.com.pe

**BOLETA DE VENTA  
ELECTRÓNICA**  
RUC: 20191503482  
B003-31

Señor(es)	: MONTENEGRO VALDERRAMA, CRHISTIAN MARK		
Dirección	: AV. JOSE PARDO 2332 , ANGASH - SANTA - CHIMBOTE		
DNI	: 77882108	Moneda	: SOL
Fecha de Emisión	: 02-01-2023	Tipo de Venta	: Crédito
Vendedor	: SILVESTRE , MISHKA	Forma de Pago	: Costado
N° OVC	:	N° Guía Remisión	: 0052-18

Item	Código	Descripción	UM	Cantidad	Precio Unitario	Valor Unitario	Descuento (Sin IGV)	Valor de Venta
1	10210810001803	BIO-SPLENT 70 WP BLS. X 1 KG. /	NIU	1.00	136.01	131.08	15.82	115.28
2	S12434	COBRO REEMBOLSO ENVÍO SECTOR 1 /	NIU	1.00	15.00	12.71	0.00	12.71



Total Descuentos:	SI	15.82
Total Valor de Venta - Operaciones Gravadas:	SI	127.97
IGV (18.00 %):	SI	23.03
Importe Total:	SI	151.00

Representación Impresa de la Boleta de Venta Electrónica

SON: CIENTO CINCUENTA Y UN Y 00/100 SOLES

Sírvase pagar con cheque NO NEGOCIABLE

El no pago de la obligación en la fecha de vencimiento generará intereses de financiamiento moratorio y compensatorio mas comisión de administración.