



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS POSGRADO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS

**“Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos por
Pseudomonas reptilivora B-6bs utilizando glucosa y glicerol como
fuentes de carbono en un biorreactor de tanque agitado”**

PRESENTA:

I.B.Q WENDOLYNE MONROY MARTÍNEZ

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química
como requisito parcial para obtener el grado de:**

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

MORELIA, MICHOACÁN DE OCAMPO, MÉXICO

Agosto, 2024



Asunto: Impresión de Tesis.

M.P.P. Venecia Azereet Medina Ortiz,
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle, que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR PSEUDOMONAS REPTILIVORA B-6bs UTILIZANDO GLUCOSA Y GLICEROL COMO FUENTES DE CARBONO EN UN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO", después de haber revisado el manuscrito que presentó la alumna **Wendolyne Monroy Martínez**, con matrícula **1400383E**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su Tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Director de Tesis: Dr. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Codirector: Dr. Juan Carlos González Hernández 08006687


Vocales:

Dr. José Apolinar Cortés 82033374

Dr. Rafael Huirache Acuña 11000201

Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez EXT19153

Atentamente,
Morelia, Michoacán a 08 de julio de 2024


Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga
Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.



MCCP./mcpa.



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Facultad de Ingeniería Química / Universidad San Nicolás de Hidalgo
Fomento a Nueva S/N - Cal. Ferrocarril del Oro / C. P. 58060 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443 327 3164
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

Dedicatoria

A mis padres, quienes a través de sus enseñanzas y apoyo me han motivado a seguir adelante y buscar la mejora continua, gracias por todo el amor incondicional y fuerzas que me han brindado.

A mis hermanos, Laura y Farah les agradezco todo el apoyo que me han brindado, gracias por sus enseñanzas y consejos. Gracias por su compañía en los momentos difíciles, por las risas y cariño incondicional.

A mis amigos, gracias por su apoyo y amistad, he aprendido mucho de ustedes y gracias a su compañía he logrado seguir adelante y ver las cosas desde otra perspectiva.

Agradecimientos

A la D.C. Ma. del Carmen y al D.C Juan Carlos por permitirme trabajar bajo su asesoría y brindarme sus conocimientos a lo largo de este trabajo, contribuyeron a mi desarrollo personal y académico.

A mi mesa sinodal, quienes a través de sus comentarios mejoraron mi trabajo de investigación y me brindaron su conocimiento.

A Itan, mi compañero de laboratorio, gracias por compartir tu conocimiento y experiencia conmigo, a mis asesoradas, quienes han contribuido en mi desarrollo personal y profesional.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Posgrado de Ingeniería Química y al Instituto Tecnológico de Morelia por darme la oportunidad de realizar mi posgrado.

A CONAHCYT, por la beca (CVU 1245311) otorgada durante el período septiembre 2022 a agosto 2024.

Se agradecen los donativos parciales del Tecnológico Nacional de México en la Convocatoria 2024 de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación. Proyecto: Evaluación de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Pseudomonas reptilivora* B6bs utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor (19544.24-P).

Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos por *Pseudomonas reptilivora* B-6bs utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono en un biorreactor de tanque agitado

Presenta: Wendolyne Monroy Martínez

Directores de tesis: D.C. Ma. del Carmen Chávez Parga, D.C. Juan Carlos González Hernández

Resumen

El uso de plásticos derivados del petróleo es una preocupante problemática ambiental debido a la contaminación que generan tanto en su producción como en su uso. Las investigaciones se han centrado en los polihidroxicanoatos (PHA), biopolímeros producidos por microorganismos a partir de distintas fuentes de carbono bajo condiciones de estrés, lo cual se considera una alternativa sostenible. Sin embargo, su producción a nivel industrial no se ha implementado puesto que su costo es hasta 10 veces mayor en comparación con los plásticos de origen petroquímico. El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto de las concentraciones de glucosa y glicerol, agitación y el volumen de aire por volumen de medio en la producción de PHA por *P. reptilivora*. Se emplearon dos diseños experimentales de superficie de respuesta *Box-Behnken*, uno para cada fuente de carbono, mediante el programa Statgraphics®, los factores a estudiar fueron [glucosa] estableciendo como límite inferior 20g/L y superior 80 g/L, [glicerol] 15 g/L y 5 g/L, agitación 450 rpm y 300 rpm y aireación 1.2 VVM y 0.4 VVM, respectivamente. Las variables de respuesta fueron la concentración de PHA (g/L), biomasa (g/L) y la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}). Las productividades máximas de PHA utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono fueron de $0.0370 \text{ g/L} \cdot h$ y $0.0539 \text{ g/L} \cdot h$, respectivamente. Mediante el análisis estadístico de resultados se establecieron las mejores condiciones para la producción de PHA, empleando glucosa como fuente de carbono fueron 35.16 g/L de glucosa, 449 rpm y 0.4 L/min de suministro de aire. Empleando glicerol como fuente de carbono fueron 13.48 g/L de glicerol, 390 rpm y 1.2 L/min de suministro de aire. Siguiendo las mejores condiciones proporcionadas por la MSR se obtuvieron producciones mayores de PHA, alcanzando un máximo de 1.75 g/L utilizando glucosa y 2.28 g/L empleando glicerol.

Palabras clave: fermentación, polihidroxicanoatos, glucosa, glicerol, biomasa, rendimiento.

Evaluation of polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas reptilivora* B-6bs using glucose and glycerol as carbon sources in a stirred tank bioreactor.

Presented by: Wendolyne Monroy Martínez

Thesis advisors: D.C. Ma. del Carmen Chávez Parga, D.C. Juan Carlos González Hernández

Abstract

The use of petroleum-derived plastics is a worrying environmental problem due to the pollution they generate both in their production and in their use. Research has focused on polyhydroxyalkanoates (PHA), biopolymers produced by microorganisms from different carbon sources under stress conditions, which is considered a sustainable alternative. However, their production at industrial level has not been implemented since their cost is up to 10 times higher compared to petrochemical plastics. The purpose of this research was to evaluate the effect of glucose and glycerol concentrations, agitation and the volume of air per volume of medium on the production of PHA by *P. reptilivora*. Two *Box-Behnken* response surface experimental designs were used, one for each carbon source, using Statgraphics ® software, the factors to be studied were [glucose] establishing as lower limit 20 g/L and upper limit 80 g/L, [glycerol] 15 g/L and 5 g/L, agitation 450 rpm and 300 rpm and aeration 1.2 VVM and 0.4 VVM, respectively. The response variables were PHA concentration (g/L), biomass (g/L) and specific growth rate (h⁻¹). The maximum PHA productivities using glucose and glycerol as carbon source were 0.0370 g/L·h and 0.0539 g/L·h, respectively. Through statistical analysis of the results, the best conditions for PHA production were established, using glucose as carbon source were 35.16 g/L of glucose, 449 rpm and 0.4 L/min of air supply. Using glycerol as carbon source were 13.48 g/L glycerol, 390 rpm and 1.2 L/min air supply. Following the best conditions provided by the MSR, higher PHA yields were obtained, reaching a maximum of 1.75 g/L using glucose and 2.28 g/L using glycerol.

Key words: fermentation, polyhydroxyalkanoates, glucose, glycerol, biomass, yield.

Contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen	iv
Abstract.....	v
Glosario	xiv
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Generalidades de los PHA	2
2.2 Aplicaciones de los PHA	4
2.3 Síntesis de PHA	6
2.4 <i>Pseudomonas reptilivora</i>	8
2.5 Rutas metabólicas implicadas en la producción de PHA.....	8
2.5.1 Ciclo de los PHA.....	9
2.5.2 Rutas metabólicas implicadas en la producción de PHA.....	10
2.6 Diseño de experimentos.....	11
2.5.1 Diseño experimental factorial	12
2.5.2 Metodología de superficie de respuesta (MSR).....	13
2.5 Antecedentes	16
2.6 Planteamiento del problema.....	17
2.7 Justificación	18
2.8 Hipótesis	18
2.9 Objetivos.....	18
2.9.1 Objetivo general	18
2.9.2 Objetivos específicos.....	18
3. Metodología	19
3.1 Estrategia experimental.....	19
3.2 Etapas de la estrategia metodológica	19
3.2.1 Diseño experimental para la obtención de PHA a nivel matraz.....	19
3.2.2 Preparación del pre - inóculo	21
3.2.3 Producción de PHA.....	21
3.2.4. Determinación de biomasa.....	22

3.2.5	Determinación de glicerol	23
3.2.6	Determinación de glucosa	23
3.2.7	Cuantificación de nitrógeno	24
3.2.8	Extracción de PHA.....	25
3.2.9	Determinación espectrofotométrica de PHA.....	25
3.2.10	Determinación cualitativa de PHA.....	25
3.2.11	Diseños experimentales para la obtención de PHA a nivel biorreactor	26
4.	RESULTADOS.....	29
4.1	Cinéticas de crecimiento microbiano utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.....	29
4.1.1	Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco	29
4.1.2	Consumo de glucosa y nitrógeno	34
4.1.3	Cuantificación de PHA por espectrofotometría a nivel matraz.....	36
4.2	Cinéticas de crecimiento microbiano utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.....	42
4.2.1	Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco	42
4.2.2	Consumo de glicerol y nitrógeno.....	47
4.2.3	Cuantificación de PHA por espectrofotometría a nivel matraz.....	48
4.3	Cinéticas de crecimiento microbiano a nivel biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbono.....	56
4.3.1	Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco	56
4.3.2	Consumo de glucosa.....	62
4.3.3	Cuantificación de PHA por espectrofotometría.....	63
4.4	Cinéticas de crecimiento microbiano a nivel biorreactor utilizando glicerol como fuente de carbono.....	71
4.4.1	Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco	71
4.4.2	Consumo de glicerol.....	77
4.4.3	Cuantificación de PHA por espectrofotometría.....	78
5.	CONCLUSIONES	86
6.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	87
7.	REFERENCIAS	88
8.	ANEXOS.....	97
	ANEXO 1	97
	ANEXO 2	100

ANEXO 3	102
---------------	-----

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los PHA (Tomado y modificado de Philip <i>et al.</i> , 2007). ... 2	2
Figura 2. Gránulo de PHA y proteínas asociadas (GAPs) en <i>P. putida</i> KT 2440 (Tomado y modificado de Mato <i>et al.</i> , 2020). 4	4
Figura 3. Metabolismo de los PHA y su conexión con las rutas metabólicas del metabolismo central (Tomado y modificado de Fernández-Escapa, 2012). 10	10
Figura 4. Rutas metabólicas para la producción de PHA (Tomado y modificado de Romero, 2022). 11	11
Figura 5. a) Superficie de respuesta descrita por modelo de primer orden, b), c) y d) descritas por modelo de segundo orden (Tomado y modificado de Gutiérrez-Pulido, 2012). 15	15
Figura 6. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6). 29	29
Figura 7. Biomasa cuantificada durante la fermentación mediante la técnica de peso seco utilizando glucosa a nivel matraz (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6). 31	31
Figura 8. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glucosa y nitrógeno sobre la producción de biomasa por <i>P. reptilivora</i> mediante el método de peso seco a nivel matraz. 32	32
Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de biomasa de <i>P. reptilivora</i> mediante el método de peso seco utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz. 33	33
Figura 10. Cuantificación del consumo de glucosa durante la fermentación mediante la técnica de DNS a nivel matraz ($\lambda=540\text{nm}$) (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6). .. 34	34
Figura 11. Cuantificación del consumo de nitrógeno durante la fermentación mediante la técnica de Berthelot a nivel matraz ($\lambda=640\text{nm}$) (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6). 35	35
Figura 12. Cuantificación espectrofotométrica del PHA producido durante la fermentación por la conversión a ácido crotónico utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=235\text{nm}$) (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6). 36	36
Figura 13. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glucosa y nitrógeno sobre la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> a nivel matraz. 38	38
Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz. 38	38
Figura 15. Prueba confirmatoria del T6 y variables cuantificadas durante la fermentación (■ PHA (g/L) ■ D.O ● Glucosa (g/L) ■ Biomasa (g/L)). 40	40
Figura 16. Cinética de crecimiento microbiano utilizando glicerol como fuente de carbono mediante la técnica de densidad óptica a nivel matraz ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, n=6) (◆ T1 ◀ T2 ● T3 ▼ T4 ■ T5 ▲ T6). 42	42
Figura 17. Biomasa cuantificada durante la fermentación mediante la técnica de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz (DE, n=6) (◆ T1 ◀ T2 ● T3 ▼ T4 ■ T5 ▲ T6). 43	43
Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glicerol y nitrógeno sobre la producción de biomasa por <i>P. reptilivora</i> mediante el método de peso seco a nivel matraz. 45	45

Figura 19. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de biomasa de <i>P. reptilivora</i> mediante el método de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	45
Figura 20. Cuantificación del consumo de glicerol durante la fermentación mediante la técnica de Malaprade a nivel matraz ($\lambda=414\text{nm}$) (DE, n=6) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).	47
Figura 21. Cuantificación del consumo de nitrógeno durante la fermentación mediante la técnica de Berthelot a nivel matraz ($\lambda=640\text{nm}$) (DE, n=6) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6)	48
Figura 22. Cuantificación espectrofotométrica del PHA producido durante la fermentación por la conversión a ácido crotonico utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=235\text{nm}$) (DE, n=6) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).	49
Figura 23. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glicerol y nitrógeno sobre la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> a nivel matraz.	51
Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	51
Figura 25. Prueba confirmatoria del T5 y variables cuantificadas durante la fermentación (■PHA (g/L) ■Biomasa (g/L) ●Glicerol (g/L) ■D. O).	53
Figura 26. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, n=15) (■ T1 ●T2 ▲T3 ▼T4 ♦T5 ◀T6 ▶T7 ●T8 ★T9 ◆T10 ●T11 + T12 XT13 *T14 -T15).	56
Figura 27. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de peso seco utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ●T2 ▲T3 ▼T4 ♦T5 ◀T6 ▶T7 ●T8 ★T9 ◆T10 ●T11 + T12 XT13 *T14 -T15).	57
Figura 28. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	59
Figura 29. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la velocidad específica de crecimiento.	60
Figura 30. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	61
Figura 31. Cuantificación del consumo de glucosa durante la fermentación mediante la técnica de glucosa oxidasa a nivel biorreactor ($\lambda=540\text{nm}$) (DE, n=15) (■ T1 ●T2 ▲T3 ▼T4 ♦T5 ◀T6 ▶T7 ●T8 ★T9 ◆T10 ●T11 + T12 XT13 *T14 -T15).	62
Figura 32. Cuantificación de PHA producidos por <i>P. reptilivora</i> mediante la técnica de conversión a ácido crotonico utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ●T2 ▲T3 ▼T4 ♦T5 ◀T6 ▶T7 ●T8 ★T9 ◆T10 ●T11 + T12 XT13 *T14 -T15).	63
Figura 33. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	65
Figura 34. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la producción de PHA.	66
Figura 35. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	67

Figura 36. Tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación y variables cuantificadas durante la fermentación (■D. O ■Biomasa (g/L) ■PHA (g/L) ●Glucosa (g/L)).	68
Figura 37. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6 ▶ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).	71
Figura 38. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6 ▶ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).	72
Figura 39. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	74
Figura 40. Diagrama de efectos principales para la concentración de glicerol, agitación y VVM sobre la velocidad específica de crecimiento.	75
Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	76
Figura 42. Cuantificación del consumo de glicerol durante la fermentación mediante la técnica de Malaprade-Hantzsch a nivel biorreactor ($\lambda=414\text{nm}$) (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6 ▶ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).	77
Figura 43. Cuantificación de PHA producidos por <i>P. reptilivora</i> mediante la técnica de conversión a ácido crotonico utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6 ▶ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).	78
Figura 44. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	80
Figura 45. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la producción de PHA.	80
Figura 46. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	81
Figura 47. Tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación y variables cuantificadas durante la fermentación (■D.O ■Biomasa (g/L) ■PHA (g/L) ●Glicerol (g/L))	83
Figura 48. Curva patrón para la cuantificación de glucosa mediante el método de DNS.	100
Figura 49. Curva patrón para la cuantificación de nitrógeno mediante la técnica de Berthelot.	100
Figura 50. Curva patrón para la cuantificación de PHA mediante la conversión a ácido crotonico.	101
Figura 51. Balance de masa del tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación utilizando glucosa como fuente de carbono; 35.16 g/L glucosa, 449 rpm y 0.4 L/min O ₂ .	102
Figura 52. Balance de masa del tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono; 14.86 g/L glicerol, 300 rpm y 0.4 L/min O ₂ .	103

Índice de tablas

Tabla 1. Sustituciones más comunes del grupo R (Tomado y modificado de Andler & Díaz, 2013).	2
Tabla 2. Características de los distintos tipos de PHA y microorganismos productores (Sehgal & Gupta, 2020; González <i>et al.</i> , 2013).	3
Tabla 3. Propiedades físicas del PP y PHB (Tomado y modificado de Delgado & Cordoba, 2015).	3
Tabla 4. PHA producidos a gran escala y compañías involucradas (Tomado y modificado de González <i>et al.</i> , 2013).	6
Tabla 5. Principales nutrientes limitantes para la producción de PHA en ciertos microorganismos (Tomado y modificado de Babel & Steinbüchel, 2001).	7
Tabla 6. Tipos de PHA sintetas y algunos microorganismos en los que se encuentran presentes (Tomado y modificado de Riaño, 2010).	8
Tabla 7. Diseño experimental de cribado 2 ² a nivel matraz elaborado con Statgraphics 18®.	20
Tabla 8. Relación C/N para cada uno de los tratamientos experimentales a nivel matraz utilizando glucosa como fuente de carbono.	21
Tabla 9. Relación C/N para cada uno de los tratamientos experimentales a nivel matraz utilizando glicerol como fuente de carbono.	21
Tabla 10. Diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken a nivel biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbón elaborado con Statgraphics 18®.	26
Tabla 11. Diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken a nivel biorreactor utilizando glicerol como fuente de carbón elaborado con Statgraphics 18®.	27
Tabla 12. Análisis de varianza para la producción de biomasa utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.	32
Tabla 13. Análisis de varianza para la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.	37
Tabla 14. Mejores condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono por <i>P. reptilivora</i> a nivel matraz.	39
Tabla 15. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glucosa como fuente de carbono.	41
Tabla 16. Parámetros cinéticos calculados para cada tratamiento experimental utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.	41
Tabla 17. Análisis de varianza para la producción de biomasa utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	44
Tabla 18. Análisis de varianza para la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	50
Tabla 19. Mejores condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	52
Tabla 20. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glicerol como fuente de carbono.	54
Tabla 21. Parámetros cinéticos calculados para cada tratamiento experimental utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.	55
Tabla 22. Análisis de varianza para la velocidad específica de crecimiento utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	58
Tabla 23. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar μ de <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	61
Tabla 24. Análisis de varianza para la producción de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	64
Tabla 25. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	67
Tabla 26. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	68

Tabla 27. Parámetros cinéticos para cada uno de los tratamientos experimentales de la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	70
Tabla 28. Análisis de varianza para la velocidad específica de crecimiento utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.	73
Tabla 29. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar μ de <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	76
Tabla 30. Análisis de varianza para la producción de PHA utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	79
Tabla 31. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.....	82
Tabla 32. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	83
Tabla 33. Parámetros cinéticos para cada uno de los tratamientos experimentales de la producción de PHA por <i>P. reptilivora</i> utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.	85

Glosario

D.E	Desviación estándar
D.O	Densidad óptica
h	horas
L	Litros
lcl	Longitud de cadena larga
mcl	Longitud de cadena media
Mg	Miligramos
MSR	Metodología de superficie de respuesta
nm	Nanómetros
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
rpm	Revoluciones por minuto
scl	Longitud de cadena corta
SM	Sales minerales
VVM	Volumen de aire
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa/sustrato
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto/sustrato
μ	Velocidad específica de crecimiento

1. Introducción

Los plásticos son un grupo de polímeros sintéticos cuyo uso se ha incrementado excesivamente con el paso del tiempo dado que poseen diversas propiedades, tales como resistencia, durabilidad, ligereza y costo de producción bajo, las cuales ofrecen beneficios tanto en la vida cotidiana como a nivel industrial (Shen *et al.*, 2020). El crecimiento poblacional y consumismo excesivo han llevado al incremento en el uso de plásticos y con ello, al aumento de la contaminación ambiental a causa de su producción y a la generación de residuos plásticos (Buteler, 2019; Aldana, 2022). De acuerdo con los datos del Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de Residuos en el 2020 en México se generaron 120,128 t/día de residuos sólidos urbanos, de los cuáles el 12.73% son plásticos, por ello es de suma importancia encontrar una alternativa viable al uso de plásticos.

Con el fin de solucionar esta problemática se han realizado investigaciones para encontrar una alternativa viable a los plásticos de uso convencional. Los polihidroxiclcanoatos (PHA) son biopolímeros con propiedades termoplásticas y biodegradables, los cuales son producidos a través de la fermentación de distintas fuentes de carbono por acción de diversos microorganismos cuando se encuentran bajo condiciones de estrés. La principal desventaja ante el uso de PHA es que presentan elevados costos de producción; el costo de producción de PHA es alrededor de US\$4000 – 15000 por tonelada y el costo para los plásticos derivados del petróleo es de US\$1000 – 1500 por tonelada (Kosseva & Rusbandi, 2018). Por lo que es necesario identificar a los microorganismos que bajo ciertas condiciones de fermentación permitan aumentar el rendimiento de la producción de estos biopolímeros a partir de fuentes de carbono viables y de bajo costo (Zambrano & Riera, 2021).

En este proyecto de investigación se llevó a cabo la evaluación de la producción de PHA por *Pseudomonas reptilivora* a partir de glucosa y glicerol en un biorreactor de tanque agitado para encontrar las condiciones de fermentación que permitan aumentar el rendimiento del proceso.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de los PHA

Los PHA son biopolímeros de ácidos hidroxialcanoicos que los microorganismos producen y acumulan en su interior bajo condiciones de estrés a partir de distintos sustratos, fundamentalmente azúcares (Alexander *et al.*, 2021). Los PHA son biodegradables, pueden ser mineralizados hasta CO₂ y H₂O por PHA despolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares (De Almeida *et al.*, 2004).

Se forman mediante la polimerización de ácidos hidroxialcanoicos por diversas enzimas intracelulares, las cuales condensan el grupo carboxilo de un monómero con el grupo hidroxilo del siguiente, formando un enlace éster (Figura 1). El valor de “n” depende del grupo R y de microorganismo en el que se lleva a cabo la fermentación para la producción del biopolímero, tomando valores entre 100 y 30000, en la Tabla 1 se muestran las sustituciones más frecuentes para R (Andler & Díaz, 2013).

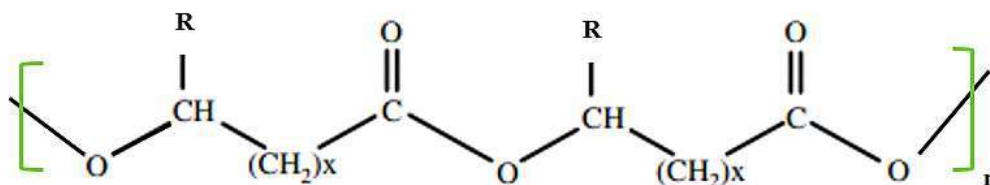


Figura 1. Estructura química de los PHA (Tomado y modificado de Philip *et al.*, 2007).

Tabla 1. Sustituciones más comunes del grupo R (Tomado y modificado de Andler & Díaz, 2013).

Grupo R	Polímero	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxibutirato)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxivalerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxihexanoato)	PHHx

Dependiendo la longitud de la cadena de carbonos, los PHA se pueden clasificar en tres grupos, PHA de longitud de cadena corta (scl), de longitud de cadena media (mcl) y de longitud de cadena larga (lcl) (Sehgal & Gupta, 2020). En la Tabla 2 se puede observar

ejemplos de microorganismos productores de cada tipo de PHA, así como características generales.

Tabla 2. Características de los distintos tipos de PHA y microorganismos productores (Sehgal & Gupta, 2020; González *et al.*, 2013).

PHA	No. Carbonos	Microorganismos	Características
Cadena corta (scl)	3 – 5	<i>C. necator</i> <i>Azohydromonas lata</i>	Termoplásticos Temperatura transición (T _g): -5 a 20°C Cristalinidad 60 – 80%
Cadena media (mcl)	6 – 14	<i>P. putida</i> <i>P. mendocina</i>	Elastómeros Amorfos a una T _g : -62 y - 26°C
Cadena larga (lcl)	<14	<i>Aureispira marina</i> <i>Shewanella oneidensis</i>	Mezcla de PHA de cadena corta y media.

Como se puede observar, los PHA presentan propiedades de gran interés por las posibles aplicaciones que esto presenta, en la Tabla 3 se presenta la comparación entre las propiedades del PHB y el polipropileno (PP), uno de los plásticos más empleado.

Tabla 3. Propiedades físicas del PP y PHB (Tomado y modificado de Delgado & Cordoba, 2015).

Propiedad	PP	PHB
Temperatura de Fusión (°C)	176	177
Temperatura de transición vítrea (°C)	-10	2
Cristalinidad (%)	50-70	60
Fuerza de tensión (MPa)	38	43
Extensión hasta quiebre (%)	400	5

Una vez sintetizados, los PHA se acumulan en el citoplasma en forma de inclusiones rodeadas por una capa lipídica y enzimas polimerasas y de polimerasas involucradas en el metabolismo del polímero denominadas GAP's (*Granule Associated Proteins*) como se aprecia en la Figura 2 (González *et al.*, 2013).

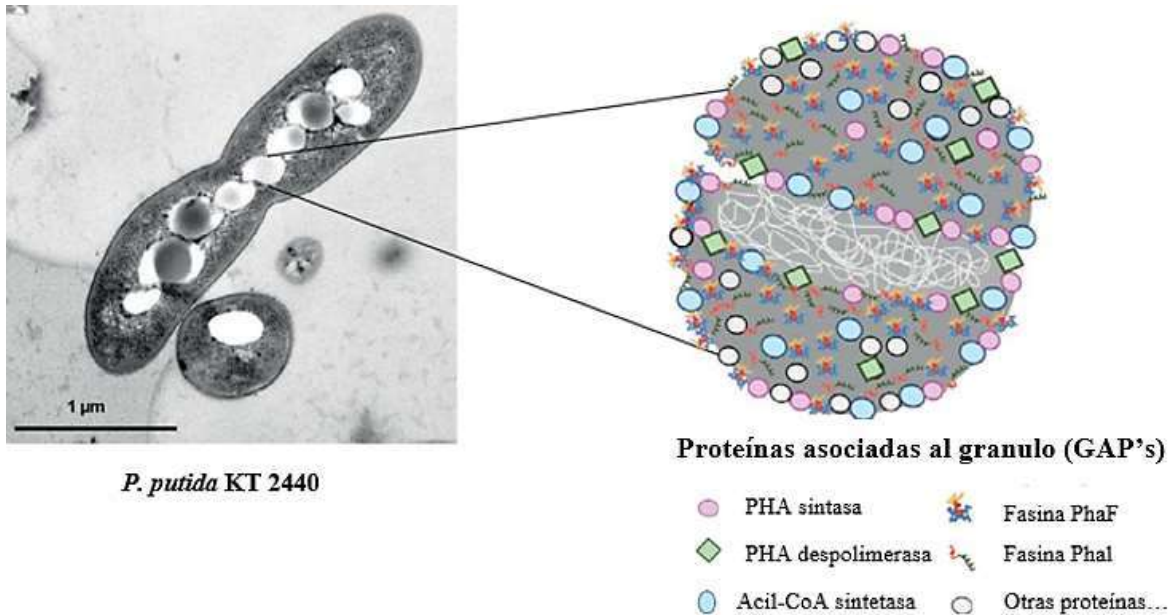


Figura 2. Gránulo de PHA y proteínas asociadas (GAPs) en *P. putida* KT 2440 (Tomado y modificado de Mato *et al.*, 2020).

La función de la capa lipídica es proporcionar estabilidad al gránulo al conferirle características hidrofóbicas puesto que se encuentra inmerso en el citoplasma celular de carácter hidrofílico. Las GAP's consisten en sintasas y despolimerasas involucradas en la polimerización del biopolímero; reguladores transcripcionales y fasinas que desempeñan una función estructural (De Eugenio, 2009).

2.2 Aplicaciones de los PHA

Gracias a las propiedades físicas de los PHA pueden tener diversas aplicaciones en industria médica, farmacéutica, de empaque, agrícola o alimentaria, así como ser empleados como materia prima para síntesis de químicos enantioméricamente puros o pinturas (Babel & Steinbüchel, 2001).

El copolímero elaborado a partir de los PHA de cadena corta 3HB y 3HV (poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)) tiene aplicaciones que van desde materiales de un solo

uso como botellas de champú, cubiertos, pañales hasta materiales biomédicos (Álvarez da Silva, 2016; Philip *et al.*, 2007).

Además, gracias a su alta resistencia al agua y baja difusividad de oxígeno los PHA- scl pueden usarse como látex acuoso para cubrir papel, cartón o material de empaque y así evitar el deterioro causado por la humedad. Las aplicaciones agrícolas de los PHA- scl van desde tubos de irrigación y macetas biodegradables hasta matrices para controlar la liberación de herbicidas, pesticidas y factores de crecimiento, es importante mencionar que estas aplicaciones no requieren un grado alto de pureza por lo que es más sencilla la extracción (Babel & Steinbüchel, 2001).

Las aplicaciones en el ámbito biomédico son gracias a que cuando los PHA se implantan en el organismo se hidrolizan en metabolitos biocompatibles y pueden ser reabsorbidos a velocidades bajas. Así, se han empleado como hilos para suturas, sistemas para liberar medicamentos, sustitutos pericárdicos, material osteosintético o fijación para estimular la formación de tejido óseo. Además, se ha propuesto emplearlos para la fabricación de jeringas y lubricantes de guantes (Babel & Steinbüchel, 2001).

La mayor parte de los monómeros de PHA presentan quiralidad y pueden emplearse como materia prima para la síntesis de otras moléculas como las β - lactamas. Además, al hidrolizar los PHA se obtienen monómeros que pueden constituir moléculas como β - hidroxiaácidos, β - hidroxialcanoles, β - aminoácidos, los cuales han cobrado interés gracias a sus propiedades, por ejemplo, los β - hidroxiaácidos son disolventes biodegradables que pueden sustituir a los disolventes comerciales (Muhammadi *et al.*, 2017).

Las investigaciones de los PHA- scl son más extensas gracias a que su desarrollo es mayor en comparación con los PHA- mcl y lcl. Los estudios realizados acerca de los PHA- mcl han demostrado que pueden usarse para fabricar adhesivos porque los adhesivos actuales son producidos a partir de materiales sintéticos no biodegradables como estireno. También pueden ser usados para la fabricación de hule biodegradable a partir de PHA- mcl insaturados unidos por enlaces entre ellos formados por medio de reacciones químicas con sulfuros o peróxidos, o radiación UV. Además, pueden ser empleados en la industria alimentaria como cubierta para productos lácteos como quesos presentando una alternativa ante el uso de

materiales como el acetato de polivinilo, látex o ácido dibutil maleico (Babel & Steinbüchel 2001).

Gracias a la versatilidad de las propiedades de los PHA pueden ser empleados en cualquier material biodegradable y por ello, las investigaciones para posibles aplicaciones siguen avanzando, siendo los más comunes los PHA-scl. En la Tabla 4 se muestran algunos de los PHA producidos a gran escala y las compañías involucradas.

Tabla 4. PHA producidos a gran escala y compañías involucradas (Tomado y modificado de González *et al.*, 2013).

PHA	PRODUCCIÓN (Ton/año)	APLICACIÓN	COMPAÑÍA	PAÍS
P3HBV	300	Material de empaque	ICI©	Inglaterra
P3HB	20-100	Material empaque, liberación fármacos	Chemical Linz©	Austria
P3HB	20-100	Material empaque, liberación fármacos	BTF©	Austria
Varios	50,000	Materia prima	ADM©	EUA
Varios	10,000	Materia prima	Meredian©	EUA
P3HB	10	Material empaque	Mitsubishi©	Japón
Varios	100	Materia prima	Biocycle©	Brasil
Varios	10,000	Materia prima	Bio on©	Italia
P3HBco4HB	10,000	Materia prima, material empaque	Tiajing Green Bioscience©	China

2.3 Síntesis de PHA

Las bacterias productoras de PHA se pueden clasificar en dos grupos con base en las condiciones requeridas para su producción; algunas requieren la limitación de algunos nutrientes esenciales y exceso de la fuente de carbono, mientras que otras no requieren limitación de nutrientes puesto que los acumulan durante la fase exponencial del crecimiento

(Banacore, 2014), en la Tabla 5 se muestran algunos de los principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA.

Tabla 5. Principales nutrientes limitantes para la producción de PHA en ciertos microorganismos (Tomado y modificado de Babel & Steinbüchel, 2001).

MICROORGANISMO	NUTRIENTE LIMITANTE
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno
<i>P. oleovorans</i>	Nitrógeno, Fósforo
<i>P. cepacia</i>	Nitrógeno
<i>Ralstonia eutropha</i>	Nitrógeno
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Nitrógeno, Fósforo
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno
<i>Rhizobium ORS571</i>	Oxígeno
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo
<i>Caulobacter crescentus</i>	Fósforo

La composición de los polímeros de PHA depende de la ruta metabólica en la que se obtuvieron y de la fuente de carbono empleada, las rutas metabólicas son: degradación de azúcares por la obtención de Acetil CoA, β - oxidación; degradación de ácidos grasos y biosíntesis de ácidos grasos (Riaño, 2010).

Las enzimas encargadas de la síntesis (sintasas) determinan si se tratará de un PHA de cadena corta o media, presentan especificidad hacia el sustrato, catalizan la conversión de los sustratos (R)-3hidroxiacil-CoA a PHA liberando la molécula de CoA, en general las sintasas se dividen en 4 tipos; las de tipo I actúan sobre tioésteres de CoA de 3 hidroxialcanoatos de cadena corta y se caracterizan por poseer solo una subunidad (PhaC), las de tipo II actúan sobre tioésteres 3 hidroxialcanoatos de cadena media principalmente ácidos grasos 3-hidroxil, poseen la subunidad PhaC, las PHA de tipo III y IV actúan sobre el mismo sustrato que las de tipo I, sin embargo, poseen dos subunidades (PhaC/PhaE) y (PhaC y PhaR)

respectivamente, en la Tabla 6 se pueden observar los tipos de sintasas y algunos microorganismos representantes (Riaño, 2010).

Tabla 6. Tipos de PHA sintasas y algunos microorganismos en los que se encuentran presentes (Tomado y modificado de Riaño, 2010).

CLASE	ESPECIES	SUBUNIDAD
I	<i>Raistonia eutropha</i>	I
II	<i>P. aeruginosa</i>	PhaC
III	<i>Allochromatium vinosum</i>	PhaC/PhaE
IV	<i>Bacillus megaterium</i>	PhaC/PhaR

2.4 *Pseudomonas reptilivora*

El género de *Pseudomonas* se encuentra integrado por bacterias móviles que poseen uno o más flagelos polares. Se caracterizan por sintetizar una capa externa de polisacáridos que les facilita la adhesión celular, creación de *biofilms* y sirve como protección ante los anticuerpo o fagocitosis. Algunas especies son aerobias, utilizan el oxígeno como aceptor de electrones y las anaerobias el nitrato. En los últimos años han cobrado interés debido a su amplia diversidad metabólica, pueden usar múltiples sustratos como fuente de carbono gracias a que poseen gran número de plásmidos inducibles a síntesis de las enzimas requeridas para catabolizar los compuestos (Romero *et al.*, 2008)

P. reptilivora pertenece al género de *Pseudomonas*, caracterizado por su diversidad fisiológica y genética, debido a esto se encuentra en diversos ambientes naturales en asociación con plantas y animales. Son bacilos gram negativos, aerobios estrictos, poseen uno o más flagelos polares, mide de 1.5 a 2 micras de diámetro (Yegin *et al.*, 2020).

2.5 Rutas metabólicas implicadas en la producción de PHA

Las rutas metabólicas a través de las cuales se producen los PHA varían de un género a otro y no solo involucra las enzimas involucradas en su síntesis y degradación, sino también conexiones con el metabolismo central y periférico.

2.5.1 Ciclo de los PHA

Las polimerasas de PHA son enzimas cuya función consiste en unir los monómeros de PHA (R)-3-hidroxiacil-CoA para formar el polímero insoluble liberando una molécula de CoA. Existen cuatro tipos de polimerasas, las cuales se clasifican de acuerdo en su estructura, subunidades que las forman y su especificidad, los tipos I, III y IV actúan sobre (R)-HA-CoA de 3 a 5 átomos de carbono como grupo acilo. Las de tipo II utilizan sustratos de 6 a 14 átomos de carbono (mcl) y se encuentran principalmente en bacterias del género *Pseudomonas*.

Las despolimerasas de PHA se encargan de escindir el biopolímero formado y pueden ser de dos clases, extracelulares cuando las bacterias no son productoras de PHA y utilizan los PHA de otros microorganismos cuando han presentado lisis. Las bacterias productoras de PHA poseen enzimas localizadas en el gránulo que se encargan de su degradación.

La síntesis y degradación es un ciclo continuo, en la membrana de las inclusiones de PHA se localiza una enzima denominada Acil-CoA sintetasa (ACS1), la cual convierte los productos liberados al despolimerizarse los gránulos en (R)-HA-CoA iniciando de nuevo el ciclo. Así, la función de las tres enzimas polimerasa, despolimerasa y ACS1 actúa como un ciclo amortiguador encargado de utilizar los intermediarios metabólicos en el metabolismo central o periférico o canalizarlos hacia el ciclo de PHA (Fernández-Escapa, 2012) (Figura 3)

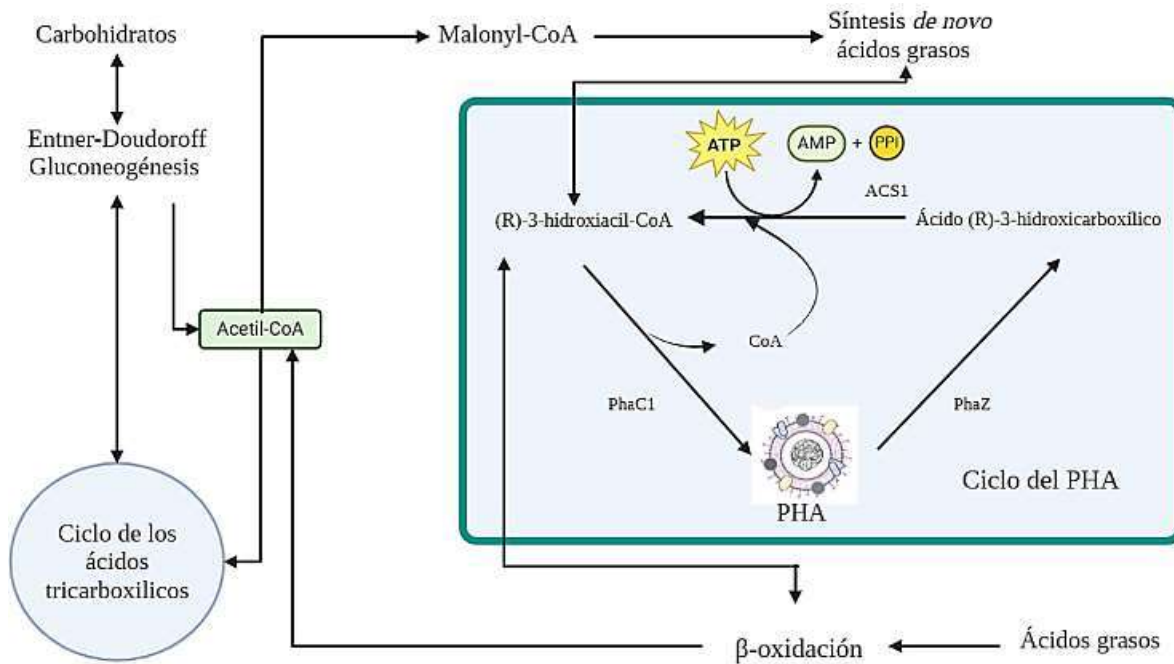


Figura 3. Metabolismo de los PHA y su conexión con las rutas metabólicas del metabolismo central (Tomado y modificado de Fernández-Escapa, 2012).

2.5.2 Rutas metabólicas implicadas en la producción de PHA

La producción de PHA está vinculada a tres rutas metabólicas, las cuales varían de una especie a otra y el tipo de sustrato a emplear. La ruta I utiliza azúcares, aminoácidos y lípidos para convertirlos en scl-PHA, la ruta II está conectada con el catabolismo de los ácidos grasos (β -oxidación), la ruta III se encuentra conectada con la síntesis de novo de ácidos grasos, ambas rutas producen mcl-PHA (Noorfarisya *et al.*, 2024).

La obtención de los monómeros bases para la síntesis de PHA en el género de *Pseudomonas* tiene lugar mediante las vías II y III. Los ácidos grasos se transforman en tioésteres de acil-CoA que mediante la ruta de β -oxidación se convierten en trans-2-enoil-CoA y (S)-3-hidroxiacil-CoA para formar 3-cetoacil-CoA, este es sustrato para una β -cetotiolasa y forma acetil-CoA y un acil-CoA (dos átomos de carbono menos que el acil-CoA del primer ciclo) esto se repite hasta que el acil-CoA se convierte por completo en acetil-CoA. Las enzimas encargadas de convertir los intermediarios del ciclo de β -oxidación en (R)-3-hidroxiacil-CoA son la enoil-CoA hidratasa (PhaJ) y la 3-cetoacil-CoA reductasa (FabG) (Figura 4) (Romero, 2022).

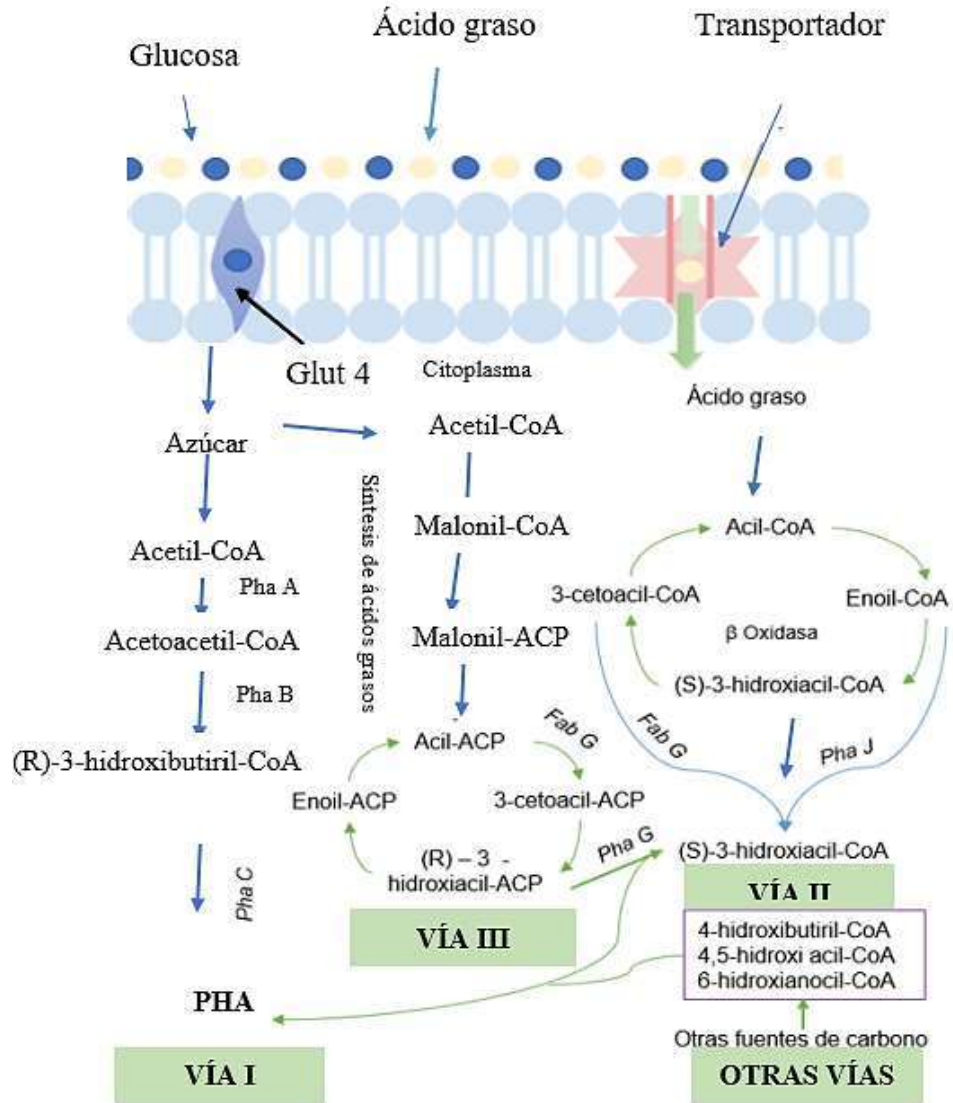


Figura 4. Rutas metabólicas para la producción de PHA (Tomado y modificado de Romero, 2022).

2.6 Diseño de experimentos

El diseño estadístico de experimentos permite realizar la investigación experimental de forma eficiente, brindando diversas estrategias para seleccionar, controlar y analizar un proceso (Domínguez & Tostado, 2016). A continuación, se brindan algunos conceptos básicos involucrados en el diseño de experimentos.

- Variables de respuesta: son las variables planteadas a través de las cuales se conoce el efecto que ejercen los factores a estudiar.

- Factores estudiados: son las variables de estudio en el diseño de experimentos, se interesa saber cómo influyen sobre las variables de respuesta.
- Niveles y tratamientos: los distintos valores que se le asignan a cada factor se denominan “niveles”. Así, a cada una de las distintas combinaciones de niveles se les conoce como “tratamientos”.
- Error experimental y aleatorio: el error aleatorio consiste en la variabilidad observada en la respuesta que no se puede explicar por los factores estudiados; se debe al efecto de los factores no estudiados en el diseño y al error experimental. El error experimental es aquella variabilidad causada por el experimentador y por los factores estudiados (Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5.1 Diseño experimental factorial

El objetivo de un diseño experimental factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre las variables de respuesta planteadas, cuando se tiene el mismo interés por todos los factores. Para ello es necesario elegir por lo menos dos niveles a cada uno de los factores. De esta forma, se obtiene una matriz experimental constituida por todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores. Por ejemplo, cuando el número de factores son dos ($k=2$), ambos con dos niveles, el diseño factorial es $2 \times 2 = 2^2$, lo cual brinda una matriz experimental de 4 tratamientos (Gutiérrez-Pulido, 2012).

Algunas de las ventajas del uso de un diseño experimental factorial son:

- Permiten estudiar el efecto individual de los factores planteados, así como su interacción.
- Es un tipo de diseño que permite formar diseños más complejos si se requiere un estudio más complejo, por ejemplo, en casos de que la respuesta no es lineal.
- Permite correr fracciones de diseños factoriales, lo cual es de gran utilidad al comienzo de una investigación, para así, descartar los factores que no son importantes y enfocarse en los que sí.

- La interpretación y cálculo de los efectos de los factores puede realizarse mediante aritmética elemental, sobre todo cuando solo se involucran dos niveles (Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5.2 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

- En ocasiones, al desarrollar un diseño experimental no se obtienen las mejoras deseadas y se desea continuar experimentando para lograr esos objetivos, en esas ocasiones, es necesario desplazar la región experimental planteada en otra dirección. La MSR es una metodología experimental que permite encontrar las condiciones óptimas de un proceso. Con la finalidad de comprender mejor la MSR, a continuación, se brindan algunos conceptos claves (Gutiérrez-Pulido, 2012).
- Región experimental y de operabilidad: la región experimental es un espacio delimitado por los rangos experimentales planteados para cada factor, en cambio, la región de operabilidad está establecida por las condiciones donde el equipo o el proceso puede ser operado. Esta última considera todas las combinaciones de los niveles de los factores planteados y siempre es igual o más grande que la región experimental. Es importante tener en cuenta dichas regiones, ya que puede ocurrir que el punto óptimo de interés se localice en cualquier región de operabilidad, dentro o fuera de la región experimental.
- Mejor tratamiento y punto óptimo: cuando se realiza un diseño más simple, por ejemplo, un diseño factorial, se obtiene el mejor tratamiento desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, el punto óptimo consiste en la mejor combinación posible en toda la región de operabilidad. Así, los resultados obtenidos del diseño factorial sirven para inferir hacia que zona se debe seguir explorando (Gutiérrez-Pulido, 2012).
- La MSR incluye tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y modelo dependen del tipo de comportamiento esperado en las variables de respuesta, así, el modelo y tipo de diseño pueden ser de primer (plano) o segundo orden (curvatura). El diseño se refiere al diseño de experimentos a seguir para ajustar a un modelo de regresión lineal múltiple y son comúnmente conocidos como diseños de

superficie de respuesta. El aspecto del modelo utiliza el análisis de regresión lineal múltiple (parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación). Finalmente, el aspecto de optimización consiste en técnicas matemáticas que sirven para explorar un modelo ajustado para así, obtener información sobre el punto óptimo (Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5.2.1 Modelos de la MSR

Las superficies de respuesta se caracterizan ajustando los datos experimentales a un modelo, los cuales son polinomios. Así, si se tienen k factores, el modelo de primer y segundo orden están dados por las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{Ec. 1})$$

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{<j=i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. 2})$$

En la Figura 5 Se observan los modelos de primer y segundo orden descritos por las ecuaciones, la Figura 5a caracteriza a un modelo de primer orden, cuya superficie es plana, en la Figura 5b, c y d se presentan modelos de segundo orden que corresponden a superficie de máximo (montaña), superficie con mínimo (valle) y superficie con punto silla (minimax), respectivamente. Para un número de factores, $k > 2$ el modelo de primer orden representa un hiperplano y el de segundo un hiperlipsoide o hiperboloide. Para más de dos factores la superficie debe de graficarse haciendo tres gráficas con dos factores cada vez, el tercero constante (Gutiérrez-Pulido, 2012).

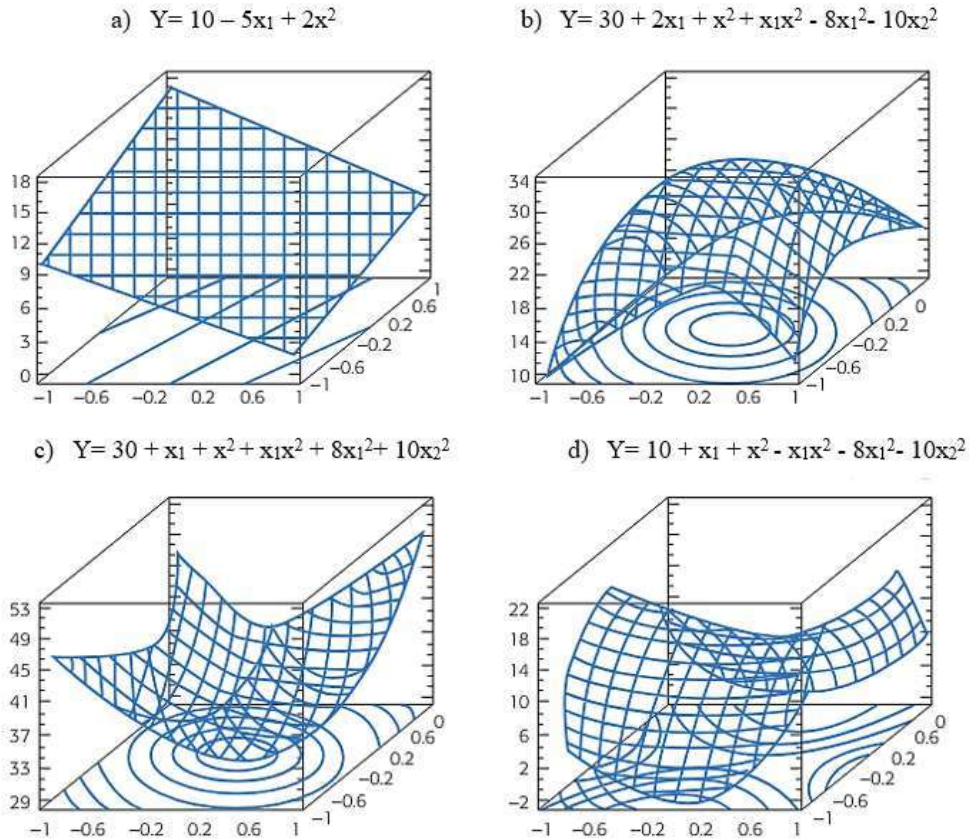


Figura 5. a) Superficie de respuesta descrita por modelo de primer orden, b), c) y d) descritas por modelo de segundo orden (Tomado y modificado de Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5.2.2 Modelos de optimización

Después de que el modelo ha sido ajustado y validado se debe de analizar la superficie brindada por el modelo para encontrar la combinación que, de un valor óptimo a la respuesta, para ello el modelo debe de explicar al menos el 70% del comportamiento de la respuesta (R_2^{aj}), sino la predicción no será certera. Existen tres técnicas de optimización y dependen del tipo de modelo ajustado:

- Escalamiento ascendente/descendente: se usa cuando se busca incrementar o disminuir la variable de respuesta. Se debe de usar cuando se cree que se está lejos de la condición óptima, con base en los resultados exploratorios.
- Análisis canónico: se aplica un diseño de segundo orden cuando se cree que el punto óptimo está cerca y dentro de la región experimental planteada.

Análisis de cordillera: Se usa cuando se desea encontrar el mejor punto dentro de la región experimental y predice la mejor respuesta sobre la región, se calcula el máximo o mínimo de la superficie utilizando esferas concéntricas al centro del diseño, se comienza con una esfera de radio casi cero, se va aumentando la esfera para incrementar la exploración. Así, el mejor punto es aquel sobre el que se predice el óptimo desempeño de la variable (Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5.2.3 Diseños de superficie de respuesta

Los diseños de superficie de respuesta brindan los tratamientos de la matriz experimental a través de los cuales se generen datos para ajustar un modelo que describa el comportamiento de la variable de respuesta, se clasifican con base en el grado del modelo. Debe de requerir el menor número de tratamientos por los gastos económicos que implican, además, de brindar una distribución de los puntos experimentales sobre la región planteada.

Los diseños de primer orden se utilizan cuando se supone solo son importantes los efectos principales, algunos ejemplos de diseños de primer orden son los diseños factoriales 2^k , diseños factoriales fraccionados 2^{k-p} , diseño de *Plackett-Burman* y el diseño simplex.

Los diseños de segundo orden estudian los efectos lineales y de interacción, cuadráticos o de curvatura pura y permiten ajustar un modelo de segundo orden. Se utilizan cuando se considera que el punto óptimo se encuentra en la región experimental, algunos de los más utilizados son el diseño *Box-Behnken* y el diseño central compuesto.

El diseño *Box-Behnken* se aplica cuando el número de factores es igual o mayor a tres, es un diseño rotatable, eficiente en cuanto al número de tratamientos. Al menos uno de los factores se fija en la mitad de los niveles fijados (Gutiérrez-Pulido, 2012).

2.5 Antecedentes

Vanegas & Ramírez en el 2016 evaluaron la producción de PHA por *P. fluorescens* a partir de distintas concentraciones de glucosa y melaza para determinar la fuente de carbono que favorecía el crecimiento microbiano y la temperatura óptima para su producción y encontraron que la melaza es un sustrato que además de favorecer el crecimiento, promovía la producción de PHA, sin embargo, concentraciones mayores a 10 g/L resultaban tóxicas

para el microorganismo, también encontraron que la temperatura óptima en la que aumentaba la producción de PHA era entre 26°C y 28°C.

En el 2017, Kang *et al.*, estudiaron la producción de PHA utilizando lodos de aceite de palma como fuente de carbono de bajo costo por *P. putida* S12 y encontraron que produce un rendimiento de 41% y que los PHA que produce son de cadena media (mcl).

En la investigación realizada por (Rebocho *et al.*, 2019) se evaluó la producción de PHA a partir de desechos de pulpa de manzana a partir de *P. citronellolis*, a nivel biorreactor y encontraron que el microorganismo alcanzó una productividad volumétrica de 0.025 g/L · h, además identificaron que el polímero estaba compuesto en su mayoría de 3-hidroxicanoato y 3-hidroxiheptanoato.

Kanavaki *et al.*, en el 2021 estudiaron la producción de PHA por *Pseudomonas* sp. Cepa phDV1 a partir de concentraciones de fenol de 200 y 600 mg/L y el efecto de este en la viabilidad celular, determinaron que a 600 mg/L se encontraba la mayor densidad celular pero el crecimiento era lento a causa de la toxicidad del fenol y que el mayor rendimiento en la producción de PHA se obtuvo bajo la misma concentración de fenol (600 mg/L), con un valor de 6.52 mg de PHA por gramo de células húmedas.

Además, se han realizado investigaciones acerca de la producción simultánea de metabolitos, en el 2022 Rodríguez *et al.*, estudiaron los parámetros de crecimiento microbiano involucrados en la producción simultánea de PHA y ramnolípidos a partir de *P. aeruginosa* ORA9 en un biorreactor, los resultados indicaron que el tiempo de cultivo es un factor importante para la producción de ambos compuestos y que la producción máxima de PHA fue durante la fase exponencial, con una acumulación de 22% (1.14 g/L) en la biomasa.

2.6 Planteamiento del problema

En los últimos años se han realizado investigaciones que buscan ~~para~~ aumentar el rendimiento de la producción de PHA obtenidos por fermentación de distintos sustratos por acción de diversos microorganismos, siendo los más utilizados *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, entre otros, sin embargo, no se ha planteado una metodología específica que permita aumentar el rendimiento y así, disminuir los costos de producción de estos biopolímeros. Por lo que es necesario encontrar las condiciones de

fermentación que permitan aumentar el rendimiento manteniendo la sostenibilidad del proceso.

2.7 Justificación

El desarrollo de esta investigación permitirá aumentar el conocimiento acerca de *P. reptilivora* que a pesar de poseer pocos estudios acerca de la producción de estos biopolímeros ha cobrado interés a causa de la gran variedad de antibióticos que produce, además de pertenecer al género de *Pseudomonas* cuyas especies han sido reportadas como productoras de PHA gracias a que poseen un sistema enzimático amplio y poseen la capacidad de utilizar gran variedad de fuentes de carbono. Además, al realizar este proyecto será posible elegir las concentraciones de glucosa y glicerol bajo las cuales la producción de PHA se maximiza y, en consecuencia, se podrá plantear una metodología que permita aumentar el rendimiento de la fermentación manteniendo la sostenibilidad del proceso.

2.8 Hipótesis

Cuando se aplique la combinación adecuada de agitación y aireación durante la fermentación de la fuente de carbono (glucosa y glicerol) llevada a cabo por *P. reptilivora* en un biorreactor de tanque agitado, se logrará el aumento en la producción de PHA, lo que tendrá como consecuencia el establecimiento de las mejores condiciones de fermentación y el aumento en la productividad de los mcl-PHA.

2.9 Objetivos

2.9.1 Objetivo general

Evaluar el efecto sobre la producción de PHA por *P. reptilivora* a partir de distintas concentraciones de glucosa y glicerol empleados como fuente de carbono en un biorreactor de tanque agitado.

2.9.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano en la producción de PHA manteniendo constante el valor de pH y temperatura de 30°C a nivel matraz.
- Realizar un diseño experimental de superficie de respuesta a partir de las mejores condiciones de fermentación establecidas en la producción a nivel matraz.

- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano en la producción de PHA manteniendo constante el valor de pH y temperatura de 30°C a nivel biorreactor.

3. Metodología

3.1 Estrategia experimental

1	• Elaboración de un diseño experimental para la producción de PHA
2	• Preparación del pre-inóculo
3	• Cultivo en matraces para la producción de PHA
4	• Cuantificación de biomasa por densidad óptica y peso seco (González, 2017).
5	• Determinación de glicerol en el medio (Kuhn <i>et al.</i> , 2015.)
6	• Determinación de glucosa en el medio (Gil <i>et al.</i> , 2006)
7	• Determinación de nitrógeno en el medio (Becerra, 2013)
8	• Extracción de PHA (Narayankumar <i>et al.</i> , 2019).
9	• Determinación de PHA por espectrofotometría y gravimetría (Slepechy & Law, 1960)
10	• Determinación cualitativa de PHA (Chávez & Alanis, 2018).
11	• Elaboración de un diseño experimental para la producción de PHA a nivel biorreactor

3.2 Etapas de la estrategia metodológica

3.2.1 Diseño experimental para la obtención de PHA a nivel matraz

Se realizaron dos diseños de cribado 2² a nivel matraz empleando el programa Statgraphics 18® para la producción de PHA, los cuales se componen de tres niveles estudiando el efecto de dos factores. Los factores por estudiar en los diseños experimentales son la concentración de glucosa/glicerol, estableciendo como límite superior 20g/L, límite inferior 10 g/L y punto intermedio 15 g/L, el siguiente factor es la concentración de sulfato de amonio, estableciendo como límite superior 1 g/L, límite inferior 0 g/L y punto intermedio 0.5 g/L. Las variables de respuesta son la concentración de PHA (g/L), biomasa (g/L), velocidad específica de crecimiento (h⁻¹), rendimiento biomasa/ sustrato (Y_{x/s}) (g/g) y rendimiento producto/sustrato (Y_{p/s}) (g/g) (Tabla 7).

Tabla 7. Diseño experimental de cribado 2² a nivel matraz elaborado con Statgraphics 18®.

VARIABLES DE ESTUDIO				
Variab	Límite superior		Límite inferior	
Sulfato de amonio (g/L)	1		0	
Glucosa/glicerol (g/L)	20		10	
MATRIZ EXPERIMENTAL				
Tratamiento experimental	Glicerol (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	Glucosa (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)
T1	15	0.5	15	0.5
T2	20	0	10	0
T3	20	1.0	10	1.0
T4	10	0	20	0
T5	10	1.0	15	0.5
T6	15	0.5	20	1.0
VARIABLES DE RESPUESTA				
Variable			Unidades	
PHA			g/L	
Biomasa			g/L	
μ			h ⁻¹	
$Y_{x/s}$			g/g	
$Y_{p/s}$			g/g	

A los resultados obtenidos de la determinación de PHA y biomasa, así como a la evaluación de la velocidad específica de crecimiento y rendimientos se les realizó un análisis estadístico, el cual consiste en la comparación de medias empleando un valor de significancia estadística del 99% y un análisis de varianza.

En las Tablas 8 y 9 se muestra la relación C/N que corresponde a cada uno de los tratamientos experimentales utilizando glucosa y glicerol, respectivamente.

Tabla 8. Relación C:N para cada uno de los tratamientos experimentales a nivel matraz utilizando glucosa como fuente de carbono.

Glucosa						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Relación C:N	6:0.1	4:0	4:0.2	8:0	6:0.1	8:0.2

Tabla 9. Relación C:N para cada uno de los tratamientos experimentales a nivel matraz utilizando glicerol como fuente de carbono.

Glicerol						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Relación C:N	6:0.1	8:0	8:0.2	4:0	4:0.2	6:0.1

3.2.2 Preparación del pre - inóculo

3.2.2.1 Microorganismo

Se utilizó la bacteria *P. reptilivora* (NRRL B-6BS) proveniente de la colección de cepas del Servicio de Investigación Agrícola (ARS NRRL) ubicado en Peoria Illinois en los Estados Unidos de Norte América.

3.2.2.2 Pre inóculo

La siembra fue en placa con agar de medio nutritivo a 30°C (Caldwell & Ryerson, 1940) a partir de la cepa conservada en glicerol o de placas anteriores. La composición del medio nutritivo es extracto de carne (3 g), peptona (5 g) y agar (15 g) por litro de agua destilada. Una vez que la bacteria creció se tomó una muestra y se inoculó en caldo nutritivo utilizando un *Shaker Labline Bath* ® durante 24 horas a 200 rpm y 30°C.

3.2.3 Producción de PHA

Se tomó una muestra del pre - inóculo y se ajustó a una absorbancia de 0.2 (600 nm) para después depositarse en matraces de 500 mL que contenían el medio específico previamente esterilizado para la producción de PHA, el cual se compone de los siguientes medios.

- Medio de sales minerales (SM): 1 g de Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), 1 g de Fosfato monopotásico (KH₂PO₄), 11.1 g de Fosfato disódico (Na₂HPO₄), 0.2 g de Sulfato de magnesio (MgSO₄) y 1 mL de solución de microelementos para 1 L de agua destilada.
- Solución de microelementos: 9.7 g de Cloruro de hierro (FeCl₃), 7.8 g Cloruro de calcio (CaCl₂), 0.156 g de Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), 0.119 g de Cloruro de cobalto (II) (CoCl₂), 0.118 g de Cloruro de níquel (NiCl₂), 0.062 g de Cloruro de cromo (II) (CrCl₂) en 1 L de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M.
- Concentración de glucosa/glicerol y sulfato de amonio establecida en el diseño experimental.

Se esterilizó en autoclave *All American 25X*® la solución de microelementos, el medio de sales minerales y la fuente de carbono planteada a 121°C durante 25 minutos.

Los matraces se colocaron en un *Shaker Labline Bath*® durante 60 h a 30°C y 200 rpm para realizar la fermentación, se realizaron mediciones para determinar la concentración de biomasa, PHA, glicerol, glucosa y nitrógeno cada seis horas hasta concluir el tiempo establecido de la fermentación.

3.2.4. Determinación de biomasa

La cuantificación de la concentración de biomasa por densidad óptica se realizó tomando una muestra 3 mL y midiendo directamente la absorbancia del medio en un espectrofotómetro *UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35*® a $\lambda = 600$ nm.

La cuantificación de biomasa por peso seco se realizó colocando 1 mL del medio de fermentación en un tubo *Eppendorf*® y centrifugando durante 5 min a 8,000 rpm (*Dynamica 14R*®), posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de agua destilada, se homogeneizó utilizando un vortex *Vortexer*® y se volvió a centrifugar durante 5 min a 8,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 2 veces. Después de los 3 lavados, se agregó 1 mL de agua destilada, se homogeneizó en el vortex y se transfirió a charolas de aluminio previamente pesadas y secadas (50°C durante 48 h). Finalmente, las charolas se colocaron en el horno *Arsa EK-36*® durante 48 h y se pesaron en balanza analítica *Boeco Germany*® para conocer el peso final (González, 2017).

3.2.5 Determinación de glicerol

La cuantificación de glicerol presente en el medio se realizó siguiendo el método basado en la reacción de *Malaprade - Hantzsch* adaptando la metodología propuesta por Kuhn *et al.*, 2015. El cual consiste en la oxidación del glicerol con metaperyodato de sodio para obtener formaldehído y ácido fórmico, después, el formaldehído reacciona con acetilacetona y acetato de amonio para formar un complejo denominado 3,5- diacetil- 1,4- dihidrolutidina (DDL) el cual es detectado espectrofotométricamente a $\lambda=414$ nm.

Los reactivos empleados fueron:

- Reactivo A: 18 g de metaperyodato de sodio en 1 L de ácido acético al 10%. Una vez disuelto se agregaron 77 g de acetato de amonio y se homogenizo.
- Reactivo B: 10mL de acetilacetona en 900 mL de alcohol isopropílico

Posteriormente se diluyeron las muestras con agua destilada en tubos Eppendorf ® y se tomaron 200 μ L, se depositaron en tubos de ensaye, se agregaron 1000 μ L de reactivo A, se agitaron y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se añadieron 2500 μ L del reactivo B, se agitaron y se colocaron en baño maría durante 20 minutos a 50 °C, posteriormente se colocaron en baño de hielo para detener la reacción. Finalmente se realizó la medición en un espectrofotómetro *UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35*® a $\lambda=414$ nm.

3.2.5.1 Elaboración de la curva patrón

Se prepararon 10 mL de una solución stock de glicerol (1 mg/L) y a partir de esta se realizaron diluciones para preparar concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 y 0.14 g/L. Posteriormente se siguió la metodología previamente planteada para leer su absorbancia a $\lambda=414$ nm (Anexo 2).

3.2.6 Determinación de glucosa

La cuantificación de glucosa presente en el medio se realizó siguiendo el método enzimático propuesto por Gil *et al.*, 2006, el cual consiste en la oxidación de la glucosa catalizado por la enzima glucosa oxidasa GO. Finalmente se realizó la medición en un espectrofotómetro *UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35* ® a $\lambda=540$ nm.

3.2.6.1 Elaboración de la curva patrón

Se prepararon 10 mL de una solución stock de glucosa (10 g/L) y a partir de esta se realizaron diluciones para preparar concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 y 0.1 g/L. Posteriormente se agregaron 100 μ L de reactivo DNS y se siguió la metodología previamente planteada para leer su absorbancia a $\lambda=540$ nm (Anexo 2).

3.2.7 Cuantificación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno presente en el medio se realizó siguiendo el método de *Berthelot* basado en la detección del indofenol formado al reaccionar amonio (NH_4), hipoclorito (ClO^-) y fenol ($\text{CH}_6\text{H}_6\text{O}$) con nitroferrocianuro de sodio como catalizador. La muestra se centrifugó a 8.500 rpm durante 15 min (*Dynamica 14R*®) y se tomaron 2.5 μ L, se agregaron 100 μ L de solución A, 100 μ L de solución B y 250 μ L de solución D, se agitó durante varios segundos y se dejaron incubar durante 1 h para llevar a cabo la reacción. Finalmente, se leyó su absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro *UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35*® (Becerra, 2013).

3.2.7.1 Elaboración de la curva patrón

Se preparó un stock de sulfato de amonio (10 mg/L) y se realizaron diluciones a partir de la solución stock de 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 mg/L. Posteriormente se añadieron 100 μ L de la solución A, 100 μ L de la solución B y 250 μ L de la solución D. Se agitaron los tubos y se dejaron incubando durante 1 h para que ocurra la reacción. Finalmente, se leyó la absorbancia a 640 nm en el espectrofotómetro UV-Vis (Anexo 2). Las soluciones mencionadas previamente tienen la siguiente composición:

- Solución A (Fenol 11.1%): 11.1 g de fenol en 100 mL de etanol al 90% (solo es estable durante 1 semana)
- Solución B (Nitroprusiato de sodio): 0.5 g de nitroprusiato de sodio en 100 mL de agua destilada (estable por un mes en un frasco ámbar)
- Solución C (Citrato alcalino): 200 g de citrato trisódico y 10 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 700 mL de agua destilada y aforar a 1 L.
- Solución D (Solución oxidante): tomar 10 mL de la solución C y añadir 5 mL de hipoclorito de sodio 5-6%.

3.2.8 Extracción de PHA

La extracción de PHA se realizó mediante la digestión con hipoclorito de sodio. Se tomaron 5 mL del medio de fermentación y se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min (*Dynamica 14R*®), se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 mL de hipoclorito de sodio para incubar durante 1 h a 50°C. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 12,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 mL de agua destilada, se homogeneizó y se centrifugó nuevamente, se retiró el sobrenadante y se repitieron los lavados con acetona y etanol. Posteriormente, se agregaron 10 mL de cloroformo y se dejó incubando 12 h a 50°C. El cloroformo se dejó evaporar a temperatura ambiente (Narayankumar *et al.*, 2019).

3.2.9 Determinación espectrofotométrica de PHA

Se siguió la metodología planteada por (Slepechy & Law, 1960) basada en el método espectrofotométrico basado en la adición de H₂SO₄ al PHA extraído para convertirlo en ácido crotonico. Se tomaron las muestras obtenidas en la extracción y se colocaron en tubos *Eppendorf*®, después se les añadieron 2 mL de H₂SO₄ (98%). Se colocaron en baño maría previamente calentado durante 10 min a 95°C para su digestión y después se tomaron 3 mL para leer su absorbancia 640 nm en un espectrofotómetro *UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35*® a 235 nm usando ácido sulfúrico como blanco. Finalmente se calculó la concentración mediante el uso de una curva patrón empleando 3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHVB).

3.2.9.1 Elaboración de la curva patrón

Para la elaboración de la curva de calibración se usó PHVB 12mol% (Poli (ácido 3-hidroxi-butirico-co-3-ácido hidroxi-valerico)) como estándar (1 g/L) y se obtuvieron concentraciones de 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.035, 0.04 y 0.05 g/L, se añadieron 2 mL de H₂SO₄ (98%) siguiendo la metodología previamente planteada y finalmente, se leyó su absorbancia a 235 nm (Anexo 2).

3.2.10 Determinación cualitativa de PHA

Se tomó una gota de muestra y se colocó en un portaobjetos, se fijó pasando por el mechero durante pocos segundos repetidas ocasiones. Después se añadieron 5 gotas de solución Negro Sudán (0.3% p/v) en etanol (70% v/v). Una vez que el etanol se evaporó se sumergió el portaobjetos en xileno durante 10 segundos, una vez que el xileno se evaporó se agregaron

unas gotas de safranina durante 10 segundos, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Una vez seco se agregó aceite de inmersión y se observó en el microscopio Zeigen® bajo la lente de 100X. Los gránulos de PHA se observaron cómo inclusiones oscuras en contraste con las células color rosa (Chávez & Alanis, 2018).

3.2.11 Diseños experimentales para la obtención de PHA a nivel biorreactor

Se realizaron dos diseños de superficie de respuesta Box-Behnken empleando el programa Statgraphics 18® para la producción de PHA, los cuales se componen de tres niveles estudiando el efecto de tres factores. Los factores de estudio en el diseño experimental son la concentración de glucosa estableciendo como límite inferior 20 g/L, límite superior 80 g/L y punto intermedio 50 g/L, la agitación, estableciendo como límite superior 450 rpm, inferior 300 rpm e intermedio 375 rpm y el volumen de aire por volumen de medio (VVM), estableciendo como límite superior 1.2, inferior 0.4 e intermedio 0.8. Para el diseño de superficie de respuesta empleando glicerol como fuente de carbono se estableció como límite inferior 5 g/L, límite superior 15 g/L y punto intermedio 10 g/L. Las variables de respuesta fueron la concentración de PHA (g/L), biomasa (g/L) y la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken a nivel biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbón elaborado con Statgraphics 18®.

VARIABLES DE ESTUDIO			
Variables	Límite superior		Límite inferior
Glucosa (g/L)	80		20
Agitación (rpm)	450		300
Aireación (VVM)	1.2		0.4
MATRIZ EXPERIMENTAL			
	Glucosa (g/L)	Agitación (rpm)	Aireación (VVM)
T1	80	375	1.2
T2	20	450	0.8
T3	50	300	0.4

T4	50	375	0.8
T5	20	300	0.8
T6	50	300	1.2
T7	80	375	0.4
T8	50	375	0.8
T9	80	450	0.8
T10	50	375	0.8
T11	20	375	0.4
T12	50	450	0.4
T13	20	375	1.2
T14	50	450	1.2
T15	80	300	0.8
VARIABLES DE RESPUESTA			
Variable			Unidades
PHA			g/L
Biomasa			g/L
μ			h^{-1}

Tabla 11. Diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken a nivel biorreactor utilizando glicerol como fuente de carbón elaborado con Statgraphics 18®.

VARIABLES DE ESTUDIO			
Variables	Límite superior	Límite inferior	
Glicerol (g/L)	15	5	
Agitación (rpm)	450	300	
Aireación (VVM)	1.2	0.4	
MATRIZ EXPERIMENTAL			
	Glucosa (g/L)	Agitación (rpm)	Aireación (VVM)
T1	10	375	0.8
T2	5	375	0.4

T3	15	375	1.2
T4	15	375	0.4
T5	10	300	0.4
T6	10	450	0.4
T7	5	300	0.8
T8	10	375	0.8
T9	10	375	0.8
T10	15	450	0.8
T11	5	375	1.2
T12	15	300	0.8
T13	10	450	1.2
T14	10	300	1.2
T15	5	450	0.8
VARIABLES DE RESPUESTA			
Variable			Unidades
PHA			g/L
Biomasa			g/L
μ			h^{-1}

A los resultados obtenidos de la determinación de PHA y biomasa, así como a la evaluación de la velocidad específica de crecimiento se les realizará un análisis estadístico, el cual consiste en la comparación de medias empleando un valor de significancia estadística del 95% y un análisis de varianza.

4. RESULTADOS

4.1 Cinéticas de crecimiento microbiano utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

4.1.1 Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco

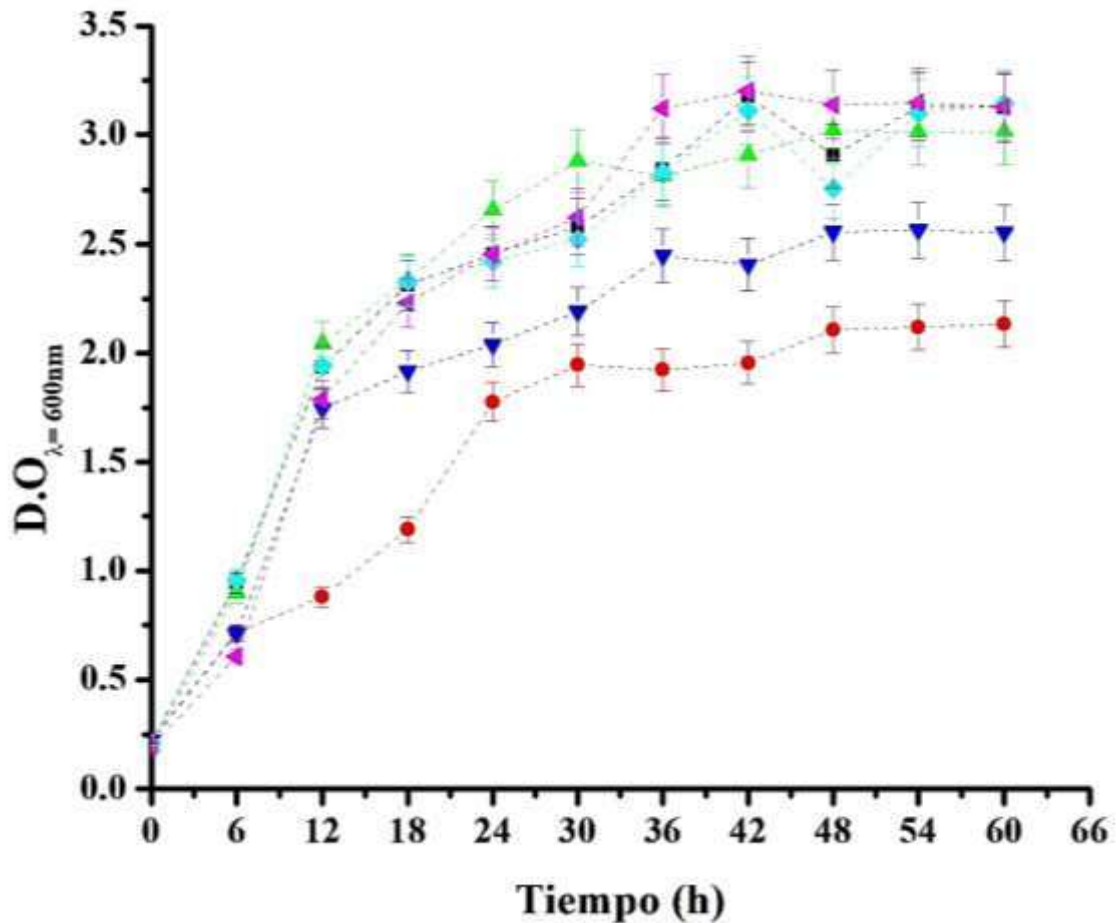


Figura 6. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, $n=6$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6).

En los resultados obtenidos por (Baeza, 2011) en la curva de crecimiento microbiano utilizando a la bacteria *Saccharomyces cerevisiae* la fase exponencial comenzó alrededor de las 16 h y terminó alrededor de las 24 h. Lo cual es parecido a los resultados mostrados en la Figura 6, la fase de crecimiento exponencial terminó alrededor de las 25 h en todos los tratamientos. Esto puede ser consecuencia de que hasta esta hora se contaba con las

condiciones adecuadas para promover el crecimiento de las bacterias, después de este periodo de tiempo las bacterias comenzaron a entrar en fase estacionaria.

Molina en el 2016 utilizó cepas productoras de PHA aisladas de lixiviados de almeja chocolata, reportaron valores máximos de densidad óptica de 1.8, valores pequeños de velocidad de crecimiento, además, las bacterias presentaron fases estacionarias prolongadas. El valor máximo de D.O mostrado en la Figura es de aproximadamente 3.25, lo cual muestra una multiplicación celular eficiente y posiblemente acumulación exitosa de PHA. Por lo que las condiciones del medio específico para la producción de PHA han logrado obtener valores satisfactorios de densidad celular.

En el 2018 Andler *et al.* utilizaron a la bacteria *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 para la producción de PHA a partir de gluconato, el valor máximo de D.O que obtuvieron fue de aproximadamente 2.5, fases de crecimiento exponencial desde las 10 h hasta las 35 h y fases estacionarias prolongadas. Esto concuerda con los resultados presentados en la Figura 6, a pesar de no poseer fases estacionarias prolongadas, se presentaron fases exponenciales pronunciadas, lo cual evidencia la exitosa multiplicación celular y/o acumulación de PHA.

En la Figura 7 se observan los resultados de biomasa obtenidos mediante la técnica de peso seco, se observa que la concentración máxima de biomasa se obtuvo en el tratamiento 3 correspondiente a una relación C:N 4:0.2 y que al disminuir dicha relación la biomasa obtenida aumentará.

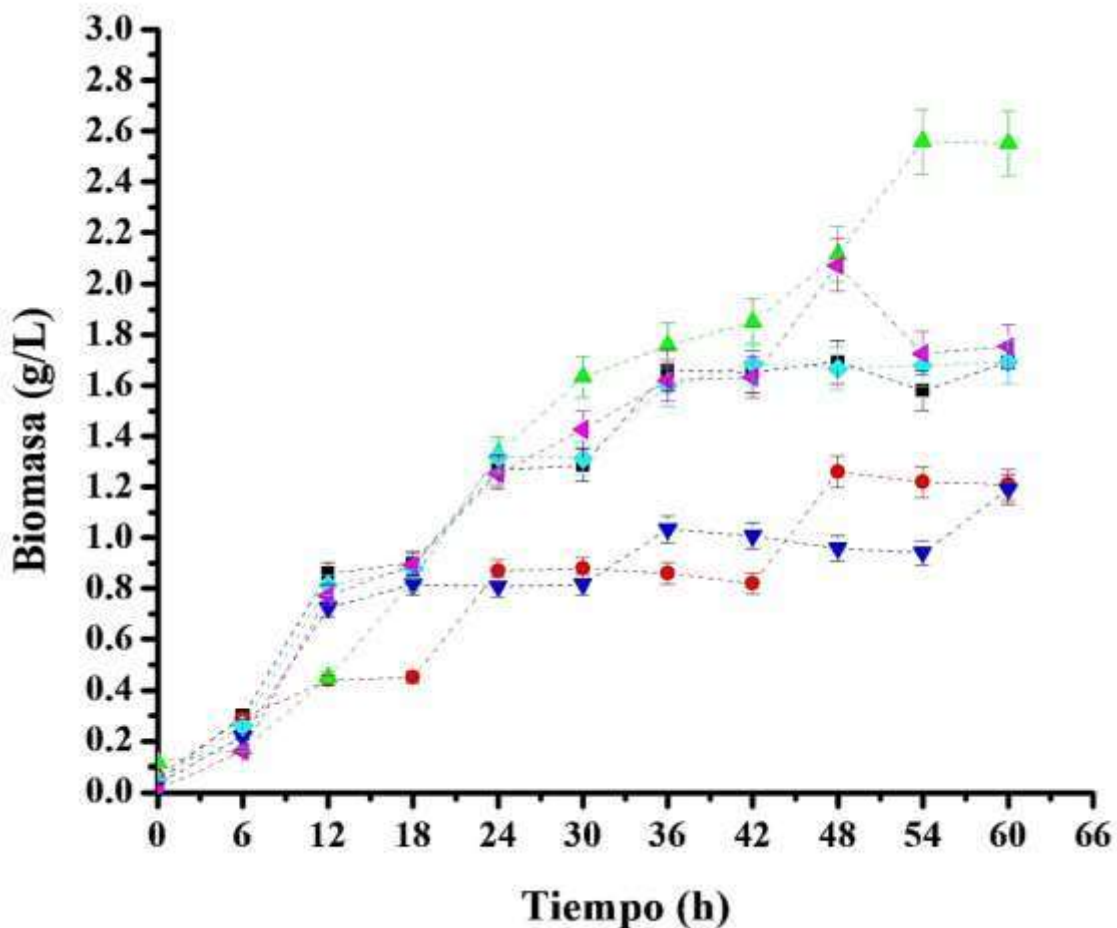


Figura 7. Biomasa cuantificada durante la fermentación mediante la técnica de peso seco utilizando glucosa a nivel matraz (DE, n=6) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6).

Abid *et al.*, 2016 obtuvieron el mayor valor de biomasa en *P. aeruginosa* al sexto día de fermentación utilizando aceite de soya al 2% (2.2g/L), además, encontraron que la biomasa aumentaba independientemente al valor del sustrato. Lo cual coincide con los resultados presentados en la Figura 7, el valor máximo de biomasa se obtuvo a las 60 h de fermentación punto en el cual el valor de sustrato era el menor. Esto indica que la biomasa siguió incrementando de manera independiente al sustrato, presentando una fase estacionaria breve a las 30 h para después seguir incrementando.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de biomasa por la técnica de peso seco, en la Tabla 12 se observa la evaluación de los factores seleccionados, los cuales resultaron estadísticamente significativos al poseer un valor *P* menor a 0.05 según ANOVA; [glucosa] 0.0012, [sulfato de amonio] 0.0002, interacción de los factores 0.0013.

Tabla 12. Análisis de varianza para la producción de biomasa utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glucosa]	0.166056	1	0.166056	856.84	0.0012
B: [Sulfato de amonio]	0.904021	1	0.904021	4664.67	0.0002
AB	0.151477	1	0.151477	781.61	0.0013
Error total	0.000387603	2	0.000193802		
Total (corr.)	1.22194	5			

Para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la variable de respuesta (biomasa), en la Figura 8 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales, la línea vertical representa el 95% de intervalos de confianza.

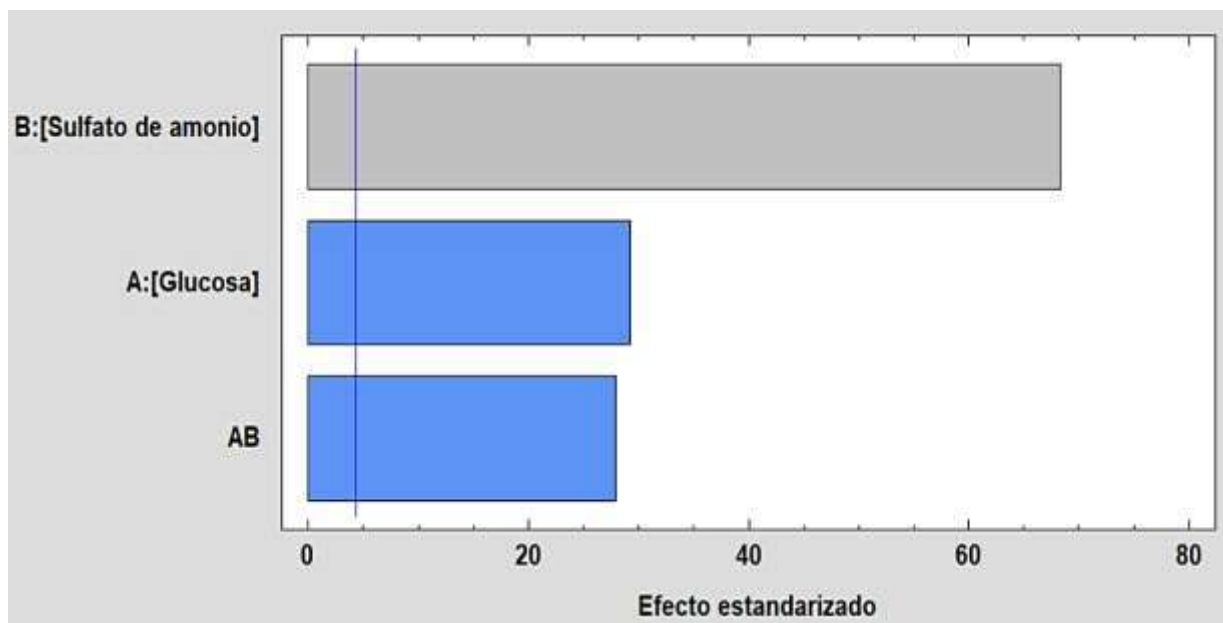


Figura 8. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glucosa y nitrógeno sobre la producción de biomasa por *P. reptilivora* mediante el método de peso seco a nivel matraz.

La interpretación del diagrama muestra que el factor concentración de la fuente de nitrógeno es más significativo que la concentración de la fuente de carbono, lo cual se puede atribuir a que la cantidad de nitrógeno proporcionada en el medio fue mucho menor comparada con la

de glucosa, el nitrógeno es un elemento vital para la síntesis de moléculas intracelulares necesarias en la multiplicación celular, por lo que, al suministrar mayor cantidad, se facilita la duplicación de las bacterias.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta, Figura 9.

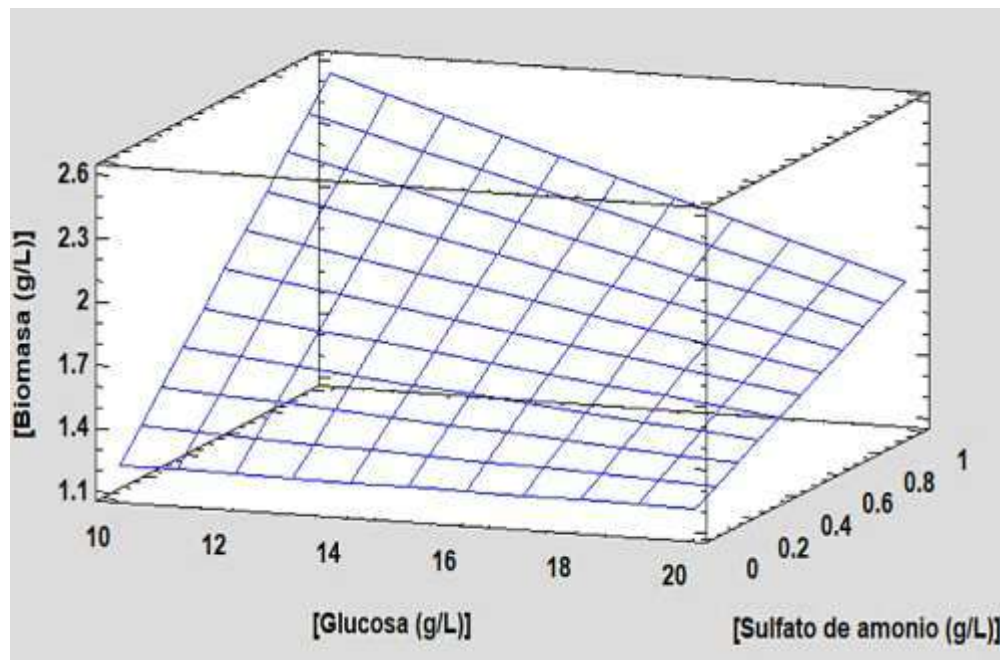


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de biomasa de *P. reptilivora* mediante el método de peso seco utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

El análisis ANOVA de la Figura 9 reporta valores de r^2 de 99.96 % de la variabilidad en biomasa total y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.01392. El proceso de producción de biomasa pudo ser ajustado a un modelo matemático para la predicción de un resultado (Ecuación 3).

$$\begin{aligned} \text{Biomasa} = & 1.23398 - (0.00183 * [\text{Glucosa}]) + (2.1184 \\ & * [\text{Sulfato de amonio}]) - (0.07784 \\ & * [\text{Glucosa}] * [\text{Sulfato de amonio}]) \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Como se observa en el diagrama de superficie de respuesta en la Figura 9, la concentración de biomasa aumenta al disminuir la concentración de la fuente de carbono y aumentar la

concentración de la fuente de nitrógeno. En los resultados reportados por (Rodríguez & Prieto, 2019) se obtuvo la mayor concentración de biomasa utilizando 10 g/L de octanoato sódico a las 33 h (11 g/L) utilizando a la bacteria *P. putida* KT2440.

4.1.2 Consumo de glucosa y nitrógeno

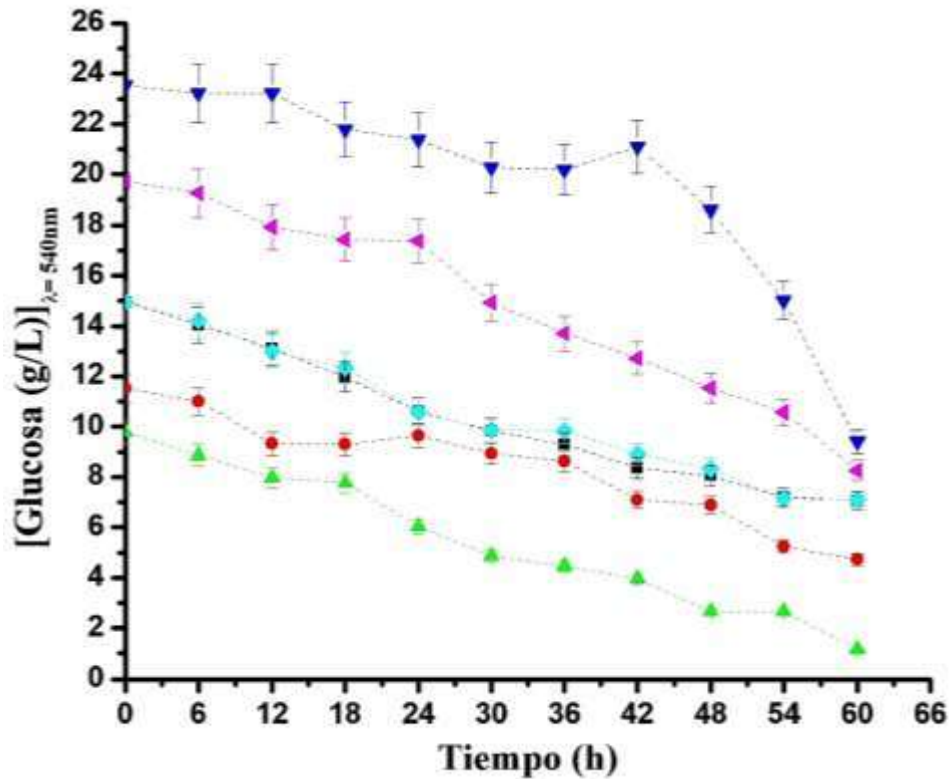


Figura 10. Cuantificación del consumo de glucosa durante la fermentación mediante la técnica de DNS a nivel matraz ($\lambda=540\text{nm}$) (DE, $n=6$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6).

En las Figuras 10 y 11 se muestra el consumo de glucosa y sustrato limitante (nitrógeno) respectivamente. La cantidad máxima de PHA fue obtenida en el tratamiento 6, el cual corresponde a una relación C:N de 8/0.2. Es importante mencionar que la cantidad máxima de biomasa y PHA se obtuvieron bajo la misma relación de carbono, atribuyéndolo a que, entre mayor cantidad de biomasa, mayor cantidad de PHA pueden ser obtenidos, al ser este un metabolito intracelular.

Zhuang *et al.* en el 2014 utilizaron a *E. coli* LZ01 para la producción de PHA a partir de glucosa, iniciaron la fermentación aportando 30 g/L de sustrato, lo que permitió el crecimiento celular y producción de PHA hasta un 7% en peso. El consumo de glucosa fue

lineal alcanzando valores de 2.5 g/L a las 70 h de fermentación. En la Figura 10 se puede observar que el valor mínimo de glucosa es a las 60 h, debe de tomarse en cuenta que la producción de PHA comienza en la fase estacionaria de la bacteria, punto en el que aún hay suficiente cantidad de sustrato para su producción, una vez alcanzadas las 60 h la fuente de carbono comienza a ser mínima por lo que los PHA podrían comenzar a consumirse representando una desventaja para el proceso que debe evitarse.

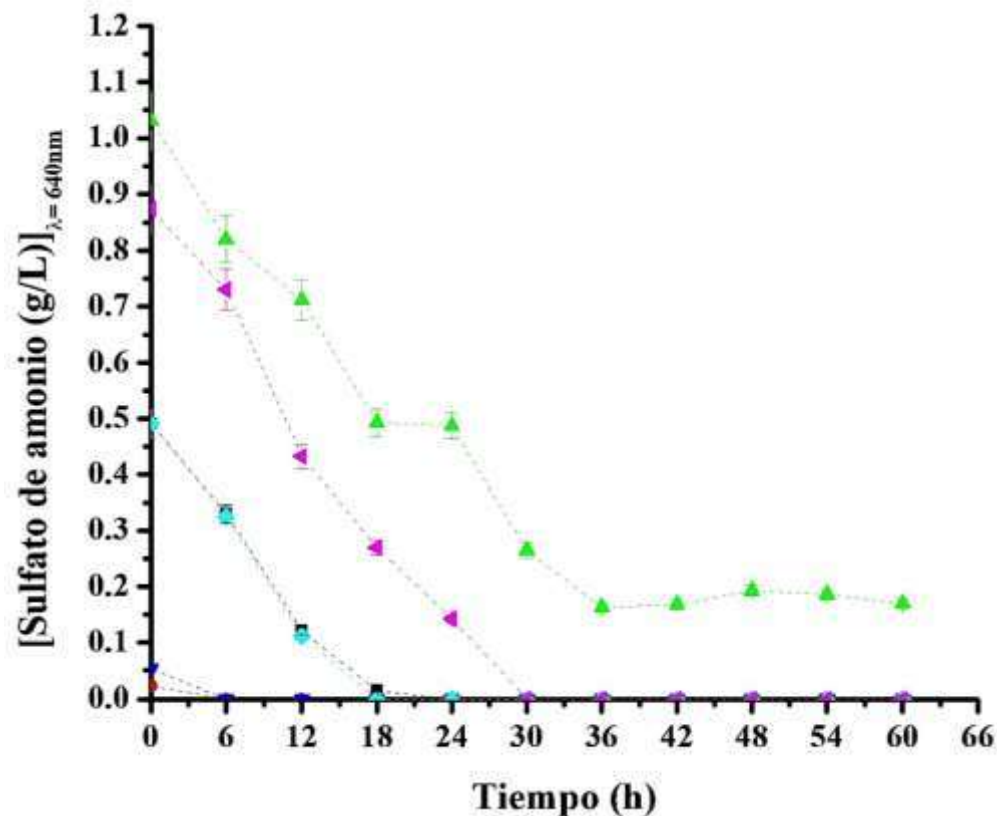


Figura 11. Cuantificación del consumo de nitrógeno durante la fermentación mediante la técnica de Berthelot a nivel matraz ($\lambda=640\text{nm}$) (DE, $n=6$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6).

En los resultados reportados por (Akram & Ithar, 2021) se observa la disminución lineal de glucosa alcanzando el mínimo a las 96 h de fermentación, la producción de PHA comenzó cuando el valor de sustrato aún era óptimo teniendo incrementos ligeros en la producción a las 96 h. Lo cual refuerza la idea de la importancia de la disponibilidad de sustrato para la producción adecuada de PHA.

4.1.3 Cuantificación de PHA por espectrofotometría a nivel matraz

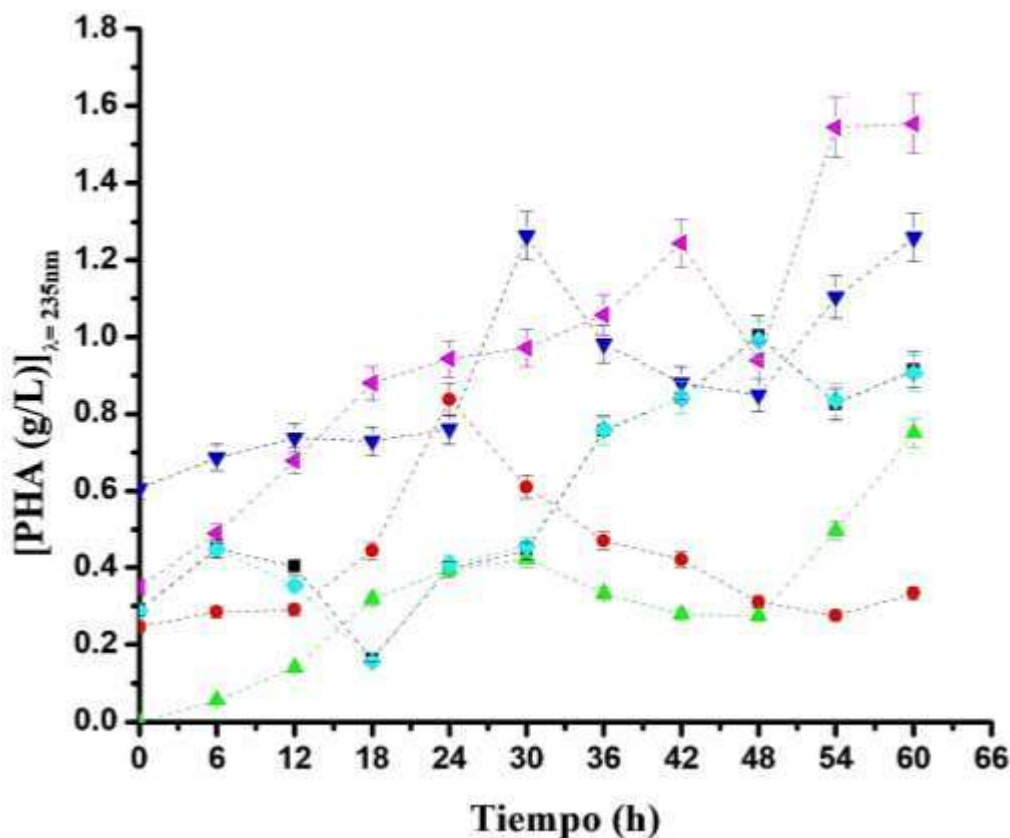


Figura 12. Cuantificación espectrofotométrica del PHA producido durante la fermentación por la conversión a ácido crotonico utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=235\text{nm}$) (DE, $n=6$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◆ T6).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de PHA son expresados en g/L de PHVB 12 mol%, el cual fue utilizado como solución estándar. Como se puede observar en la Figura 12 la concentración de PHA tiene una variación en los diferentes tratamientos experimentales, esto se debe a que la relación C/N empleada en cada tratamiento fue distinta. Los tratamientos con mayor concentración de PHA fueron el 6 y el 4.

Los resultados son similares a lo reportado por Abid *et al.*, 2016 cuyo máximo de producción de PHA fue de 0.9 g/L. Además, Jara & Tafur en el 2015 reportaron un máximo de producción de PHA (0.678 g/L) a los 3 días de fermentación utilizando a la bacteria *Azotobacter L3M07* a partir de glucosa como fuente de carbono, los resultados son similares a los presentados anteriormente, teniendo incluso una producción mayor.

En la Tabla 13 se observa el análisis de varianza para PHA evaluando los factores seleccionados, los cuales resultaron ser estadísticamente significativos con valores p menores a 0.05 de acuerdo con el ANOVA; [glucosa] 0.0005; [sulfato de amonio] 0.0037 e interacción de ambos 0.0318.

Tabla 13. Análisis de varianza para la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glucosa]	0.881139	1	0.881139	2186.63	0.0005
B: [Sulfato de amonio]	0.109197	1	0.109197	270.98	0.0037
AB	0.012078	1	0.012078	29.97	0.0318
Error total	0.000805932	2	0.000402966		
Total (corr.)	1.00322	5			

En la Figura 13 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales, la línea vertical representa el 95% de intervalos de confianza. Para el análisis del diagrama se puede observar que el efecto de la concentración de la fuente de carbono posee mayor significancia que la fuente de carbono y la interacción de ambos. Comprobando que el exceso en la fuente de carbono favorece la producción de PHA.

En la Figura 14 se muestra el gráfico de superficie de respuesta que se obtuvo al realizar el análisis estadístico del diseño experimental, como se observa la concentración de PHA fue mayor cuando la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno es la máxima.

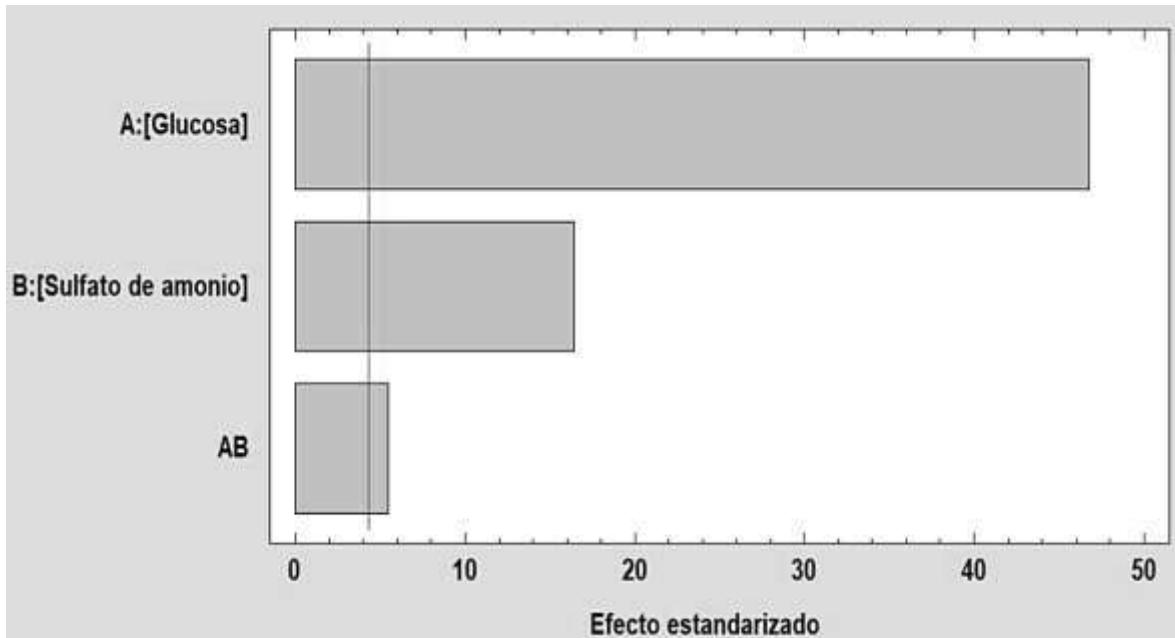


Figura 13. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glucosa y nitrógeno sobre la producción de PHA por *P. reptilivora* a nivel matraz.

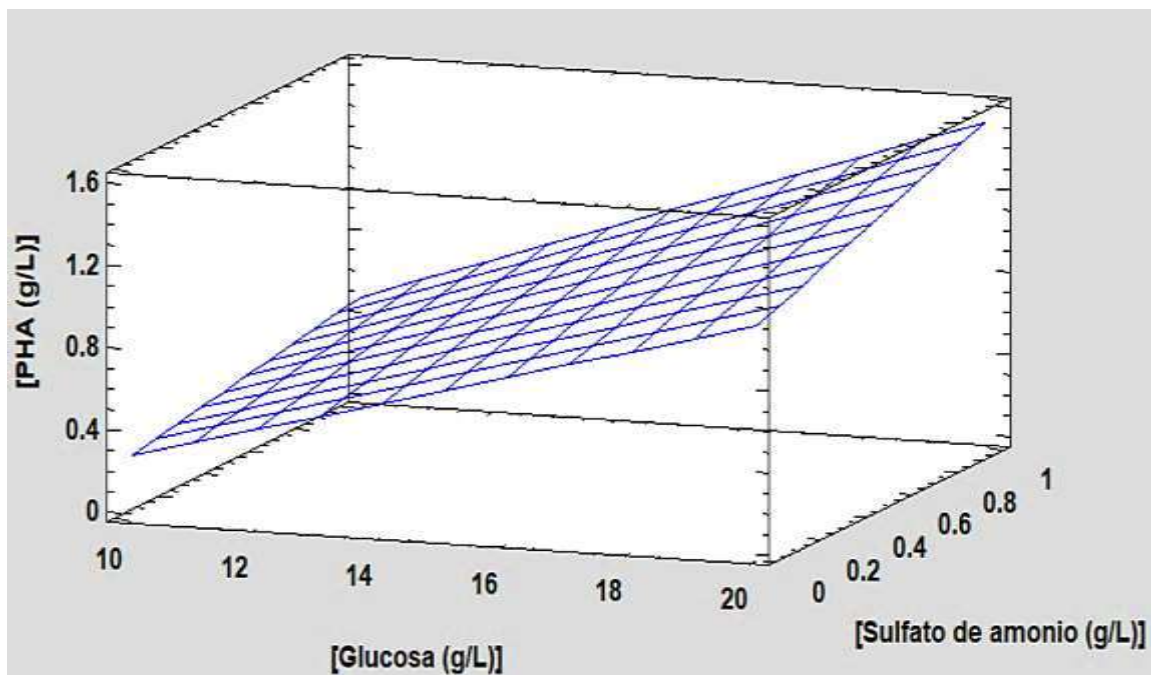


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

El análisis ANOVA correspondiente a la Figura 14 indica un valor de r^2 de 99.9197% en cuanto a variabilidad en PHA. El error estadístico muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.020074, la varianza tiene un valor superior al 75% por lo que el proceso de extracción puede ser ajustado a un modelo matemático para poder realizar la predicción bajo una ecuación matemática (Ecuación 4).

$$\begin{aligned}
 [\text{PHA}] = & -0.561572 + (0.082879 * [\text{Glucosa}]) + (0.00075 & \textbf{(Ecuación 4)} \\
 & * [\text{Sulfato de amonio}]) + (0.02198 * [\text{Glucosa}] \\
 & * [\text{Sulfato de amonio}])
 \end{aligned}$$

De acuerdo con la literatura consultada, la restricción en la fuente de nitrógeno aumenta la producción de PHA, en este caso, al tratarse de una bacteria sin estudios en la producción de estos metabolitos, las diferencias en la producción de PHA pueden deberse a diferencias en el metabolismo bacteriano con otras especies de *Pseudomonas*.

El valor óptimo de producción de PHA que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante el análisis estadístico mostradas en la Tabla 14 sería de 1.53636 g/L.

Tabla 14. Mejores condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono por *P. reptilivora* a nivel matraz.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glucosa (g/L)	10	20	20
Sulfato de amonio (g/L)	0	1	1

Se realizó una prueba confirmatoria del T6 que resulto presentar las mejores condiciones para la producción de PHA. En la Figura 15 se observan las variables cuantificadas por las distintas determinaciones. El valor máximo de PHA cuantificados fue de 1.514 g/L, muy similar al valor obtenido en el T6 de 1.5443 g/L.

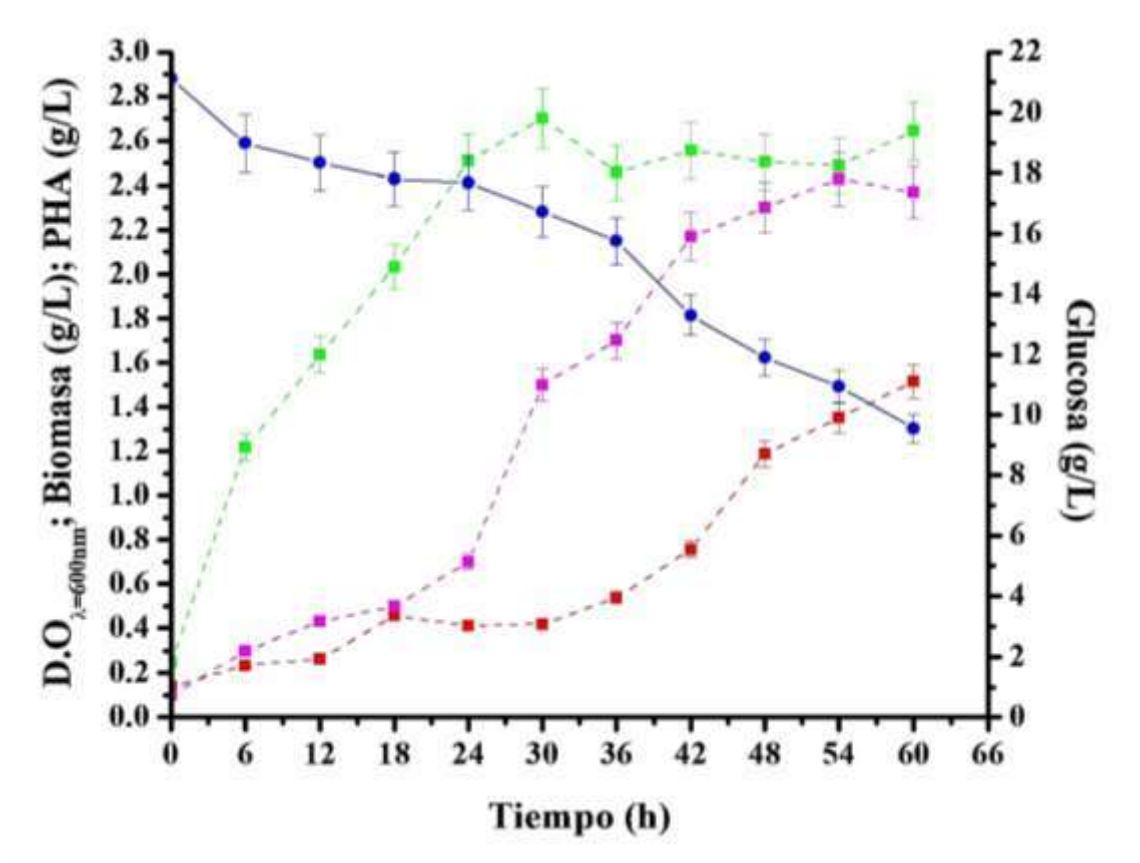


Figura 15. Prueba confirmatoria del T6 y variables cuantificadas durante la fermentación (■ PHA (g/L) ■ D.O. ● Glucosa (g/L) ■ Biomasa (g/L)).

En la Tabla 15 se observa un resumen de los distintos tratamientos experimentales y los valores obtenidos para cada una de las variables de respuesta involucradas.

Tabla 15. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glucosa como fuente de carbono.

VARIABLES DE ESTUDIO					
Variabes	Límite superior		Límite inferior		
Sulfato de amonio (g/L)	1		0		
Glucosa (g/L)	20		10		
MATRIZ EXPERIMENTAL					
Tratamiento experimental	Glucosa (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	PHA (g/L)	Biomasa (g/L)	μ (h⁻¹)
T1	15	0.5	0.8260	1.6933	0.0367
T2	10	0	0.2751	1.21	0.0416
T3	10	1.0	0.4957	2.55	0.0487
T4	20	0	1.1039	1.1917	0.0411
T5	15	0.5	0.8357	1.6933	0.036
T6	20	1.0	1.5443	1.7533	0.0545

Los resultados de los parámetros cinéticos de los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 16. $Y_{P/S}$ fue mayor para el tratamiento 6, comprobando que cuando la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno es mayor, se obtendrá mayor concentración de PHA.

Tabla 16. Parámetros cinéticos calculados para cada tratamiento experimental utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel matraz.

	μ (h⁻¹)	t_d (h)	δ (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Productividad (g/L * h)
T1	0.0367	18.8573	27.2053	0.2095	0.0691	0.0153
T2	0.0417	16.6380	24.0036	0.1690	0.0046	0.0051
T3	0.0487	14.2189	20.5136	0.2815	0.0694	0.0091
T4	0.0412	16.8356	24.2886	0.0984	0.0489	0.0204
T5	0.0361	19.2245	27.7350	0.2092	0.0704	0.0154
T6	0.0546	12.6973	18.3183	0.1517	0.1305	0.0285

4.2 Cinéticas de crecimiento microbiano utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

4.2.1 Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco

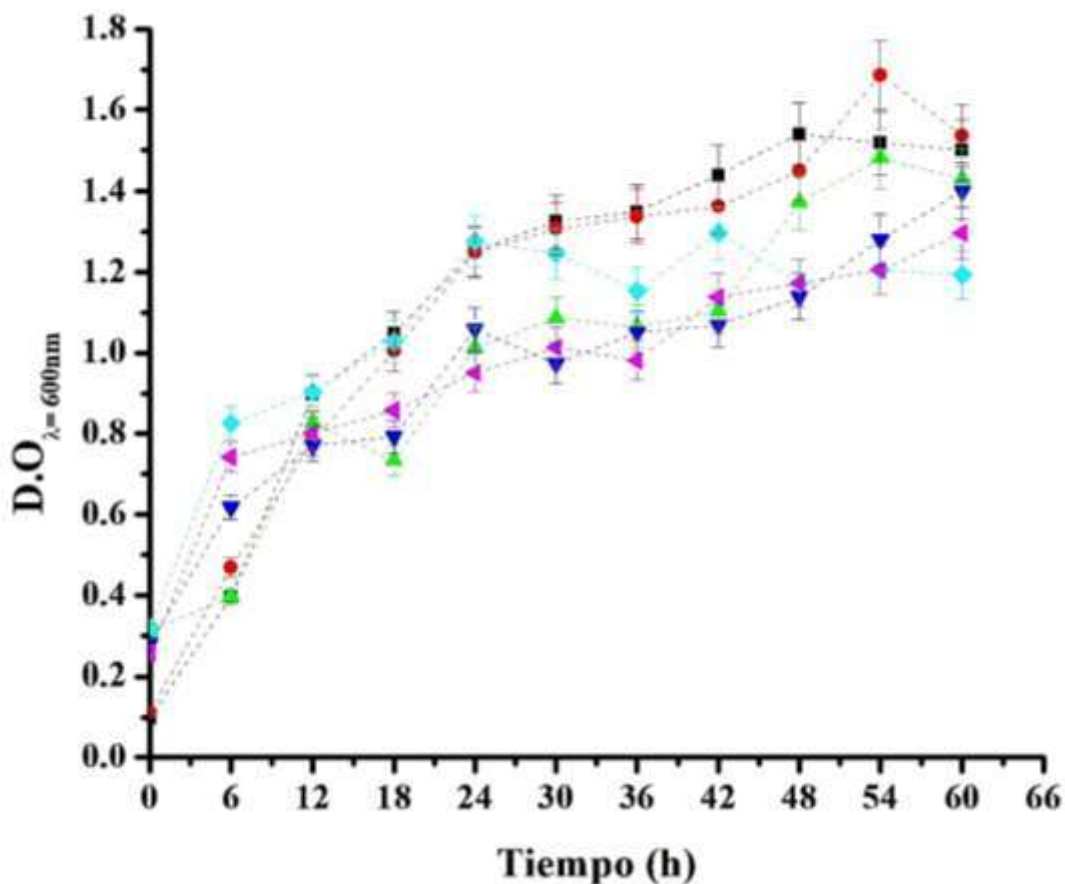


Figura 16. Cinética de crecimiento microbiano utilizando glicerol como fuente de carbono mediante la técnica de densidad óptica a nivel matraz ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, $n=6$) (◆T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).

En la Figura 16 se observan las curvas de crecimiento microbiano utilizando glicerol como fuente de carbono. En todos los tratamientos hubo ausencia de fase *lag* y fases de crecimiento exponencial prolongadas, en su mayoría hasta las 24 h, en los tratamientos la fase estacionaria se prolongó desde la hora 24 hasta la hora 60.

En los resultados reportados por Chobchuenchom & Tanadchangsaeng, 2019 se observan fases *lag* de hasta 10 h de duración y presencia de fases diaúxicas, lo que nos indica que *P. reptilivora* presentó una adaptación satisfactoria al medio de cultivo (nula fase *lag*) y ausencia del consumo de los PHA debido a que no se presentaron fases diaúxicas.

El valor máximo de D.O obtenido en las curvas de crecimiento microbiano fue de 1.68, lo cual resultó mayor a lo reportado por Lascu *et al.*, en el 2022, utilizaron glucosa y glicerol como fuente de carbono y reportaron comportamientos similares con ambos sustratos, además, alcanzaron una densidad óptica máxima de 1.45, lo que indica una proliferación celular eficiente en el medio específico para la producción de PHA.

Los resultados de biomasa mediante la técnica de peso seco se observan en la Figura 17.

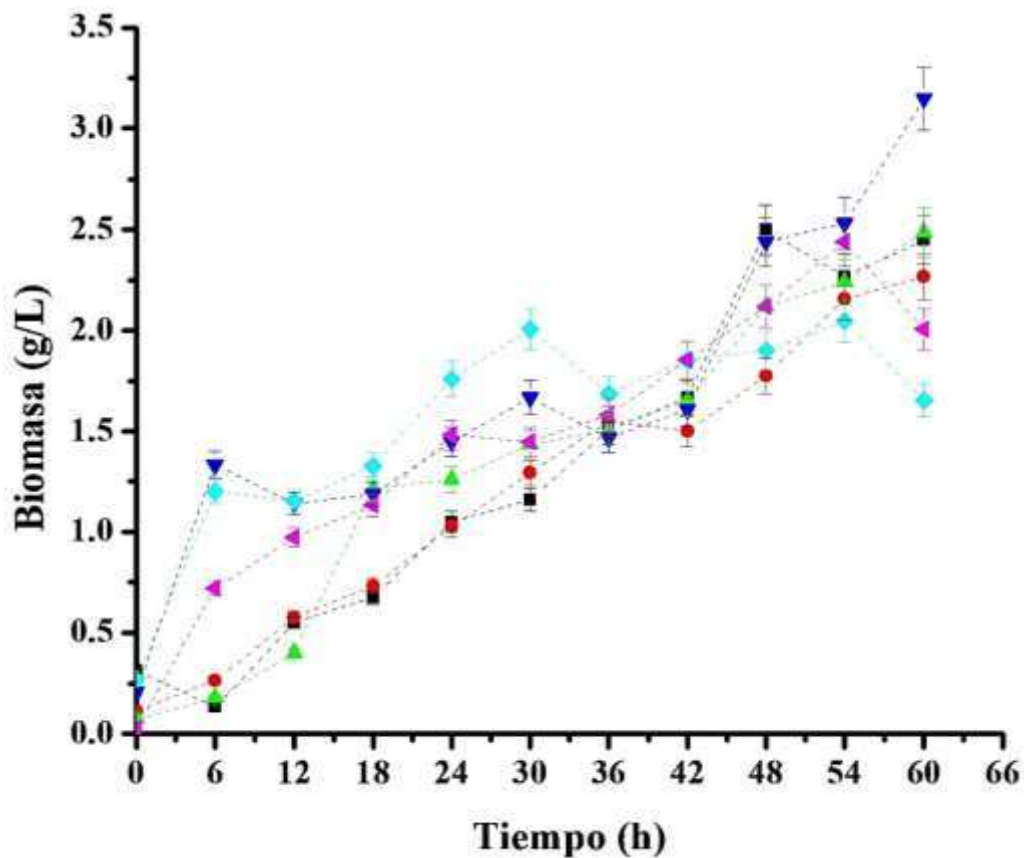


Figura 17. Biomasa cuantificada durante la fermentación mediante la técnica de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz (DE, n=6) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).

El valor máximo de biomasa fue de 3,1474 g/L, lo cual coincide con lo reportado por Mota *et al.*, en el 2019, estudiaron el efecto de la aplicación de distintas condiciones de presión sobre el crecimiento y producción de PHA por *P. denitrificans*, el valor máximo reportado bajo condiciones ambientales fue de 3.09 g/L a la hora 72 de fermentación. Por lo que se infiere que una vez alcanzado cierto tiempo de fermentación (aproximadamente 48 h) la

biomasa obtenida no experimenta aumentos significativos, desarrollándose manera independiente al sustrato empleado.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de biomasa por la técnica de peso seco, en la Tabla 17 se observa la evaluación de los factores seleccionados, los cuales no presentaron significancia estadística debido a que poseen un valor p mayor a 0.05 según ANOVA; [glicerol] 0.1167, [sulfato de amonio] 0.5429, interacción de los factores 0.4102.

Tabla 17. Análisis de varianza para la producción de biomasa utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glicerol]	0.274006	1	0.273006	7.10	0.1167
B: [Sulfato de amonio]	0.0203063	1	0.0203063	0.53	0.5429
AB	0.0410063	1	0.0410063	1.07	0.4102
Error total	0.0768687	2	0.0384344		
Total (corr.)	0.411187	5			

Para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la variable de respuesta (biomasa) en la Figura 18 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales, la línea vertical representa el 95% de intervalos de confianza.

El factor concentración de glicerol resultó ejercer mayor efecto sobre la biomasa cuantificada, al relacionarlo con el valor máximo de biomasa obtenido (3,1474 g/L) se puede inferir que para un mayor crecimiento de biomasa se debe de suministrar una concentración media de glicerol y mínima de nitrógeno. Esto puede deberse a que, en concentraciones mayores, el glicerol inhibe el crecimiento bacteriano, representando una desventaja para el proceso.

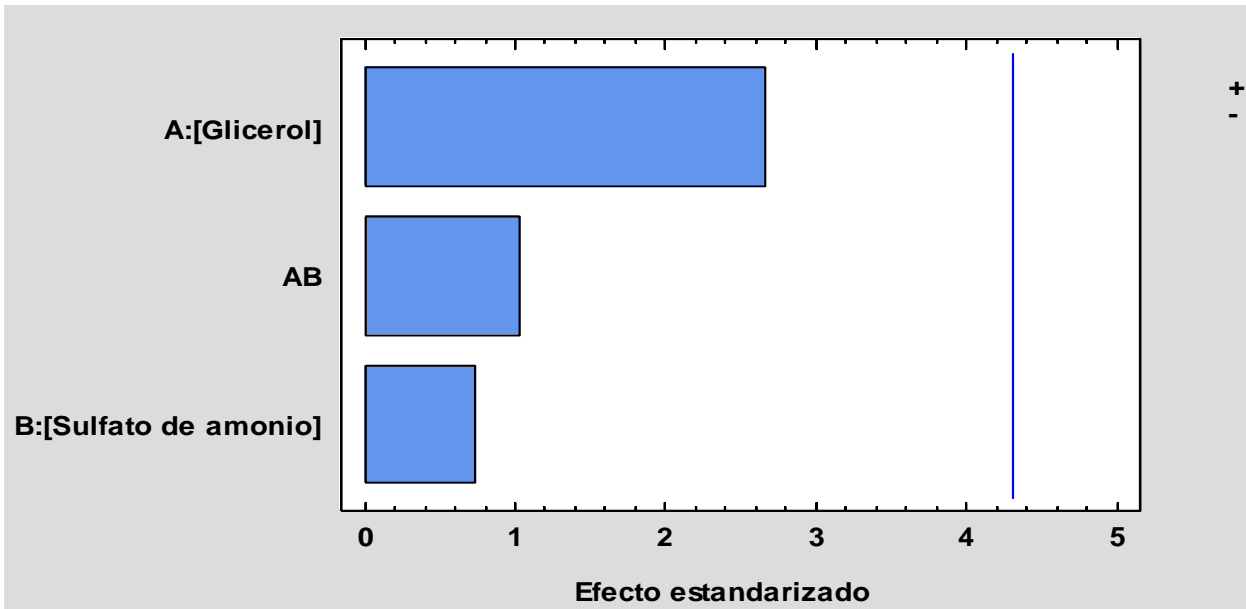


Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glicerol y nitrógeno sobre la producción de biomasa por *P. reptilivora* mediante el método de peso seco a nivel matraz.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta, Figura 19.

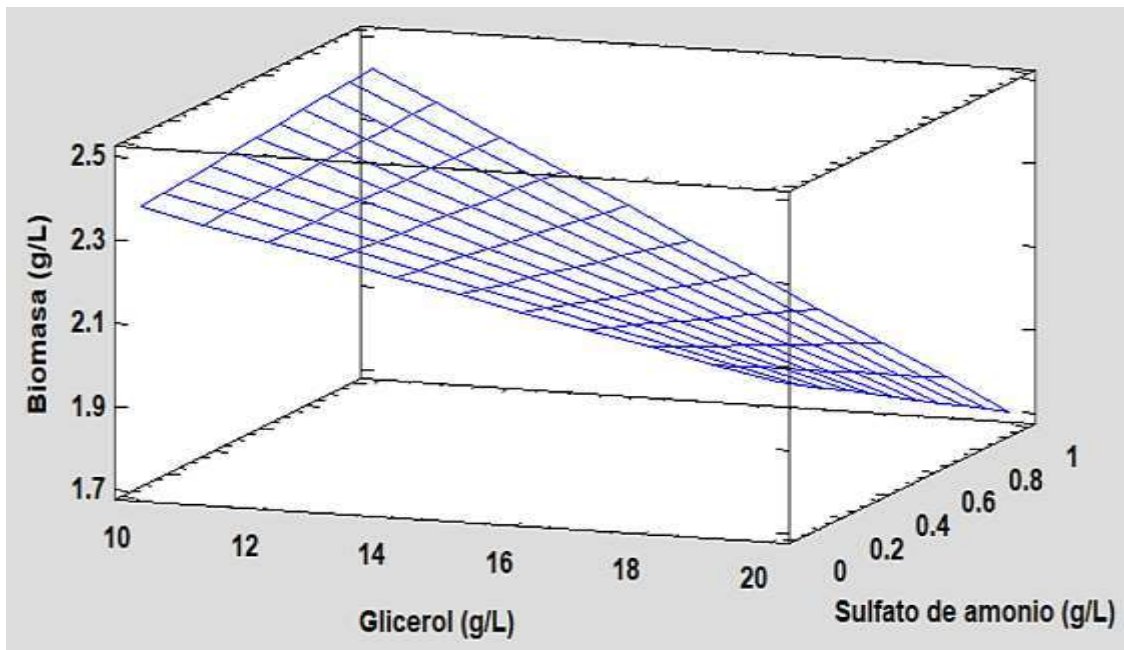


Figura 19. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de biomasa de *P. reptilivora* mediante el método de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

El análisis ANOVA de la Figura 19 reporta valores de r^2 de 81.30% de la variabilidad en biomasa total y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.1960. El proceso de producción de biomasa pudo ser ajustado a un modelo matemático para la predicción de un resultado (Ecuación 5).

$$\text{Biomasa} = 2.69375 - (0.032 * [\text{Glicerol}]) + (0.465 * [\text{Sulfato de amonio}]) - (0.0405 * [\text{Glucosa}] * [\text{Sulfato de amonio}]) \quad \text{(Ecuación 5)}$$

En la Figura 19, se puede apreciar que la concentración de biomasa aumenta al disminuir la concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno, lo cual concuerda con los resultados reportados por Markou *et al.*, 2019, demostraron que al aumentar la concentración de glicerol a 9 g/L la concentración de *A. platensis* era restringida, por lo que se infiere que el glicerol en concentraciones altas no ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento microbiano.

4.2.2 Consumo de glicerol y nitrógeno

En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados de consumo de glicerol y nitrógeno mediante las técnicas de *Malaprade-Hantzsch* e indofenol, respectivamente. La cantidad máxima de PHA obtenidos fue mayor para el T5 (C:N 10:1).

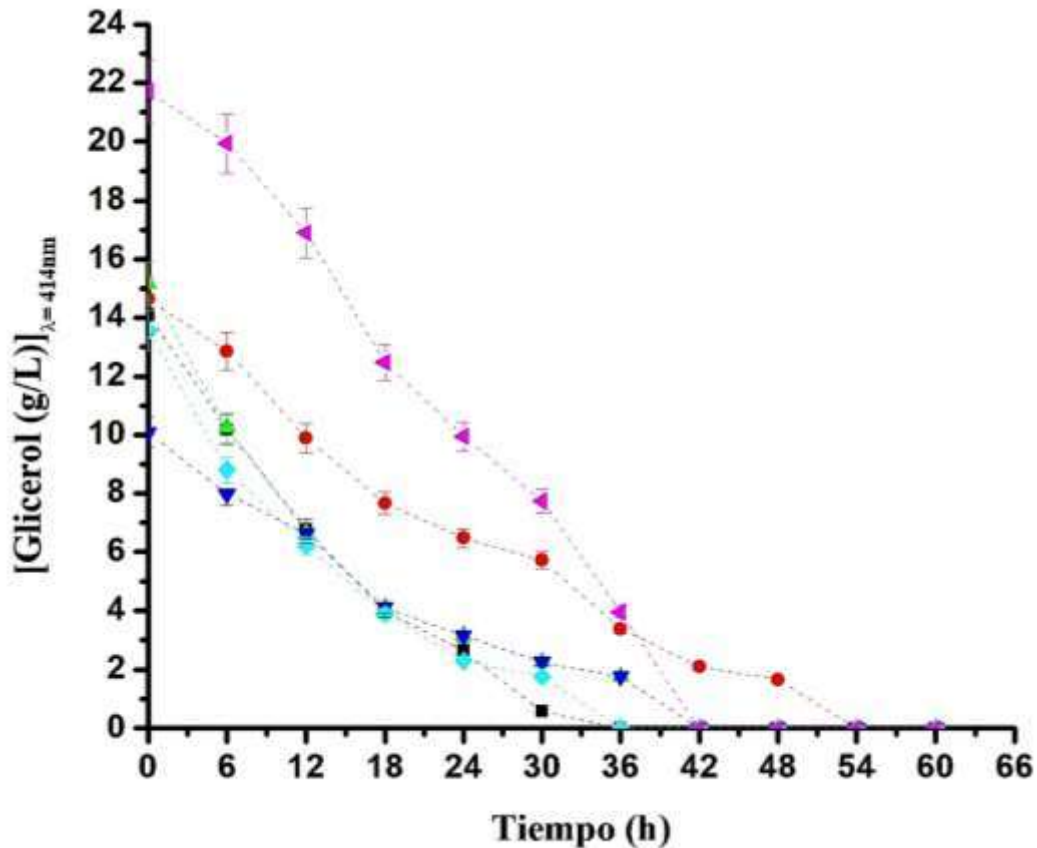


Figura 20. Cuantificación del consumo de glicerol durante la fermentación mediante la técnica de Malaprade a nivel matraz ($\lambda=414\text{nm}$) (DE, $n=6$) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).

Como se aprecia en la Figura 20 el glicerol presente en el medio de fermentación se agotó aproximadamente en la hora 48, lo cual puede relacionarse con la disminución en la concentración de PHA a partir de la misma hora. Esto se debe a que, al no haber sustrato disponible, la bacteria comienza a metabolizar los PHA almacenados para emplearlos como fuente de energía, lo cual representa una desventaja en la producción de PHA.

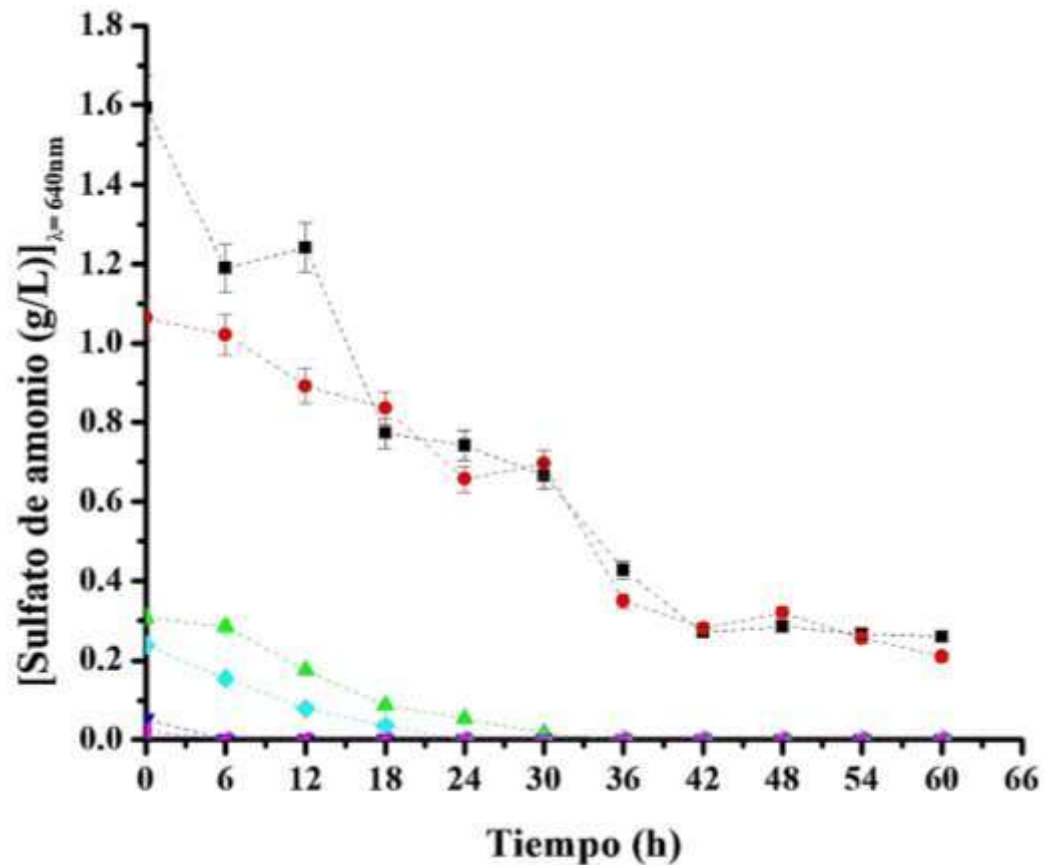


Figura 21. Cuantificación del consumo de nitrógeno durante la fermentación mediante la técnica de Berthelot a nivel matraz ($\lambda=640\text{nm}$) (DE, $n=6$) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6)

Es importante destacar que la producción máxima de PHA en el T5 fue aproximadamente después de la hora 24, lo cual coincide con el término de la fase exponencial, evidenciando que la producción de PHA en mayor proporción durante la fase estacionaria, período en el cual aún se cuenta con suficiente sustrato presente en el medio y es característico de la producción de metabolitos secundarios (Kumar *et al.*, 2021).

4.2.3 Cuantificación de PHA por espectrofotometría a nivel matraz

En la Figura 22 se observan los resultados de la cuantificación de PHA mediante el método de conversión a ácido crotónico. Los tratamientos en los que se obtuvieron mayor cantidad de PHA fueron el T5 y T6, los cuales corresponden a una relación C:N de 4:0.2 y 6:0.1. Lo cual evidencia, como se ha planteado anteriormente, que las concentraciones altas de glicerol (20 g/L) limitan no solo el crecimiento microbiano sino también la producción de PHA.

Es importante mencionar que la cantidad máxima de PHA producidos en cada uno de los tratamientos se obtuvo durante la fase estacionaria, mostrando que se trata de un metabolito secundario.

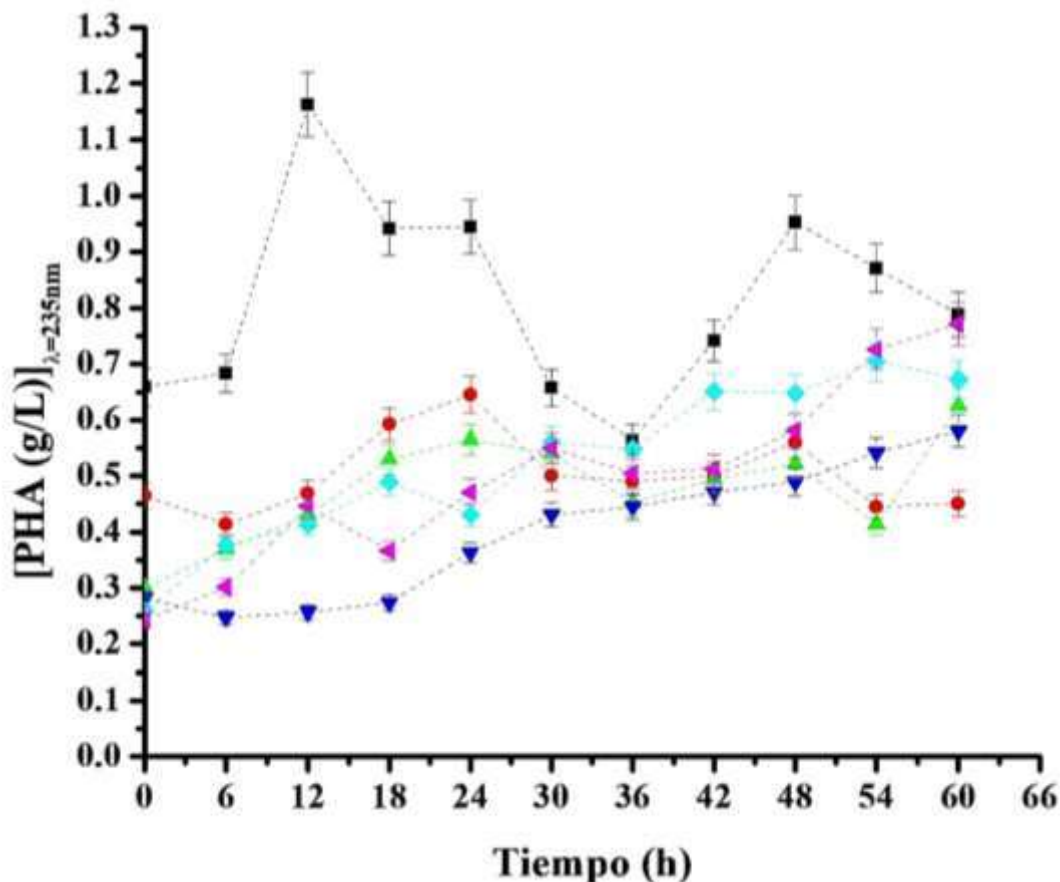


Figura 22. Cuantificación espectrofotométrica del PHA producido durante la fermentación por la conversión a ácido crotonico utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz ($\lambda=235\text{nm}$) (DE, n=6) (♦T1 ◀T2 ●T3 ▼T4 ■T5 ▲T6).

En el 2021, Xu *et al.*, encontraron que la adición de fuentes de carbono de origen lignocelulósico aumentaba la producción de PHA comparado con el uso de glicerol individual. Utilizaron a la bacteria *P. putida* KT2440 y obtuvieron una producción máxima de PHA de 1.5 g/L a la hora 70 de fermentación, esto refuerza la idea de que la producción máxima de PHA ocurre durante la fase estacionaria, en los resultados presentados anteriormente se observan concentraciones de PHA menores, esto puede deberse a diferencias en el metabolismo entre ambas cepas empleadas.

Se realizó el análisis estadístico de resultados, en la Tabla 18 se observa el análisis de varianza para PHA evaluando los factores seleccionados, los cuales no presentaron significancia estadística ya que poseen valores p mayores a 0.05 de acuerdo con el ANOVA; [glicerol] 0.3249; [sulfato de amonio] 0.4409 e interacción de ambos 0.1820

Tabla 18. Análisis de varianza para la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glicerol]	0.0278016	1	0.0278016	1.67	0.3249
B: [Sulfato de amonio]	0.0150983	1	0.0150983	0.91	0.4409
AB	0.0671525	1	0.0671525	4.04	0.1820
Error total	0.0332072	2	0.0166036		
Total (corr.)	0.14326	5			

Para complementar los resultados estadísticos, en la Figura 23 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales, la línea vertical representa el 95% de intervalos de confianza. Se puede observar que la interacción de ambos factores ejerce mayor efecto sobre la producción de PHA que los factores individuales.

En la Figura 24 se muestra el gráfico de superficie de respuesta que se obtuvo al realizar el análisis estadístico del diseño experimental. Se puede observar que para obtener una mayor concentración de PHA la concentración de glicerol debe de ser menor (10 g/L) y la de nitrógeno mayor (1 g/L). Como se ha mencionado anteriormente, de acuerdo con la literatura consultada el glicerol en concentraciones altas (lo cual varía de una especie a otra) puede restringir el crecimiento microbiano, si hay mayor número de células y se brindan las condiciones adecuadas para la producción de PHA, se obtendrá una mayor producción.

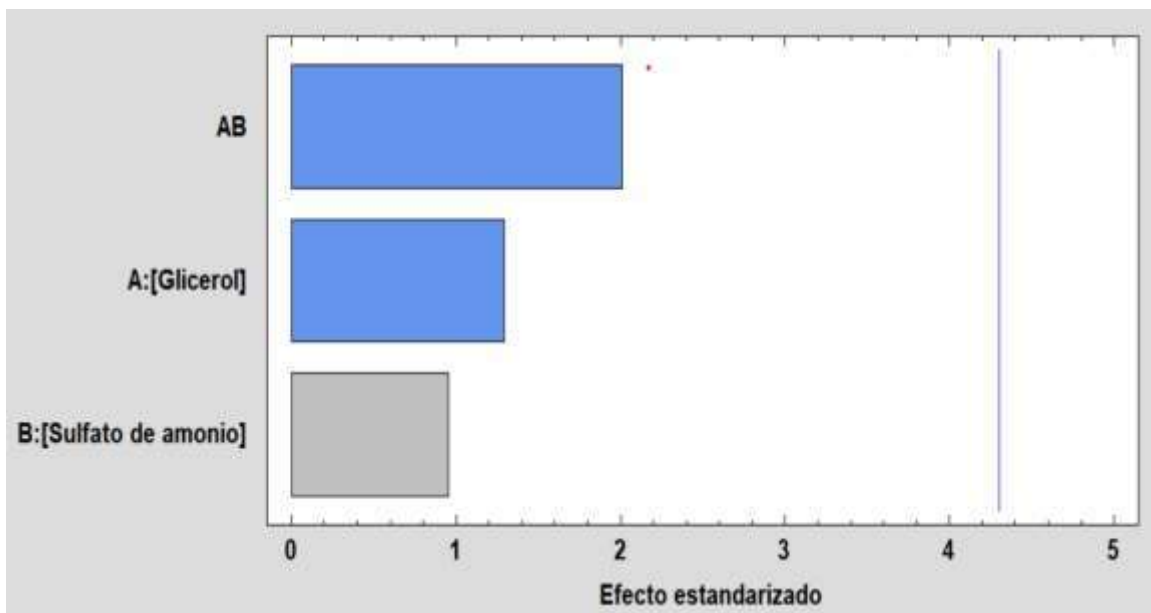


Figura 23. Diagrama de Pareto de efectos de la concentración de glicerol y nitrógeno sobre la producción de PHA por *P. reptilivora* a nivel matraz.

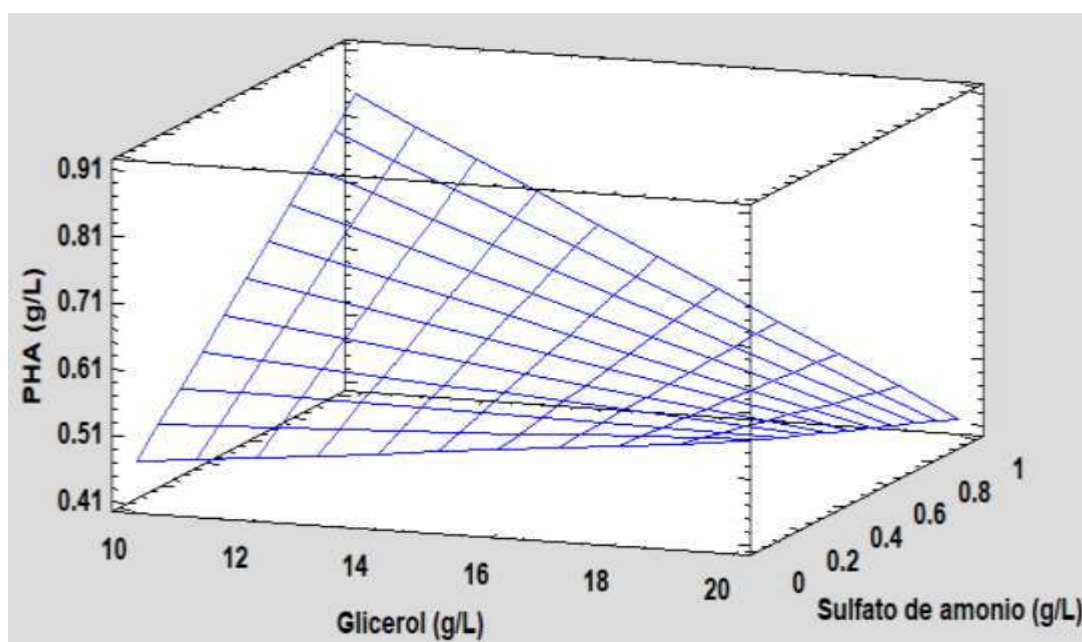


Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta para la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

El análisis ANOVA correspondiente a la Figura 24 indica un valor de r^2 de 76.8202 % en cuanto a variabilidad en PHA. El error estadístico muestra que la desviación estándar de los

residuos es de 0.1288, la varianza tiene un valor superior al 75% por lo que el proceso de extracción puede ser ajustado a un modelo matemático para poder realizar la predicción bajo una ecuación matemática (Ecuación 6).

$$\begin{aligned}
 [PHA] = & 0.374904 + (0.00924 * [Glicerol]) \\
 & + (0.900289 * [Sulfato\ de\ amonio]) \\
 & - (0.0518276 * [Glicerol] \\
 & * [Sulfato\ de\ amonio])
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 6}$$

El valor óptimo de producción de PHA que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante el análisis estadístico mostradas en la Tabla 19 sería de 0.8493 g/L.

Tabla 19. Mejores condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glicerol (g/L)	10	20	10
Sulfato de amonio (g/L)	0	1	1

Se realizó una prueba confirmatoria del T5 que resulto presentar las mejores condiciones para la producción de PHA. En la Figura 25 se observan las variables cuantificadas por las distintas determinaciones. El valor máximo de PHA cuantificados fue de 0.700g/L.

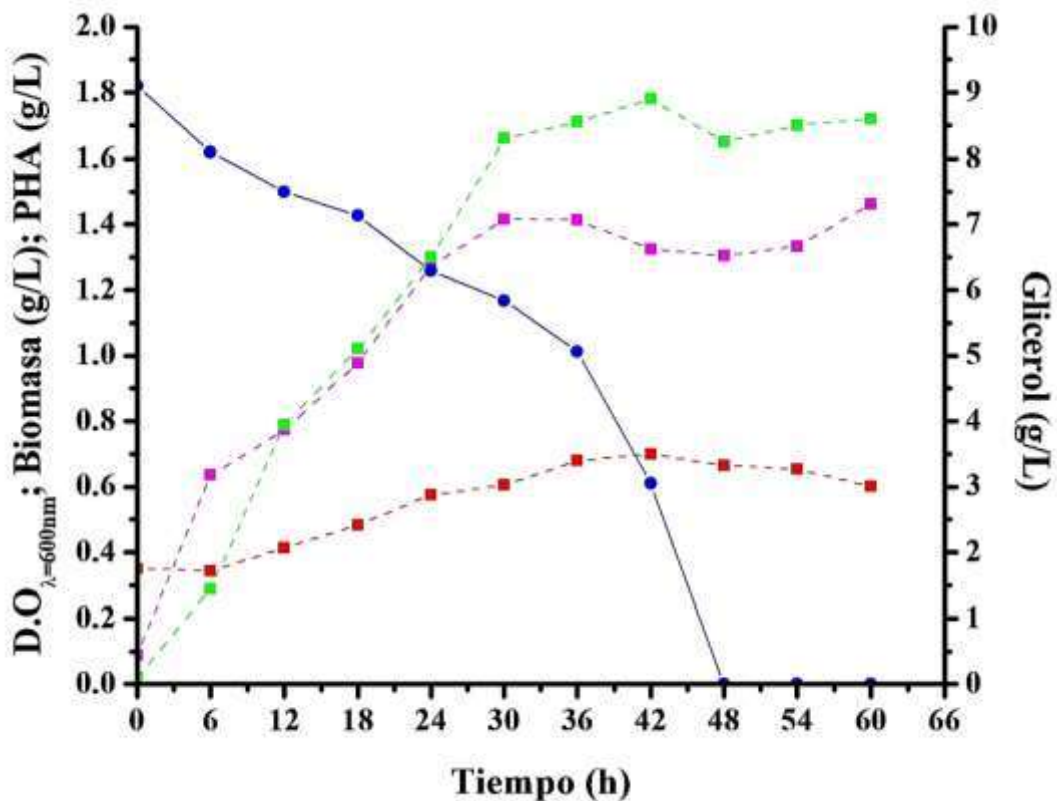


Figura 25. Prueba confirmatoria del T5 y variables cuantificadas durante la fermentación (■ PHA (g/L) ■ Biomasa (g/L) ● Glicerol (g/L) ■ D. O).

En la Tabla 20 se observa un resumen de los distintos tratamientos experimentales y los valores obtenidos para cada una de las variables de respuesta involucradas.

Tabla 20. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glicerol como fuente de carbono.

VARIABLES DE ESTUDIO					
VARIABLES	Límite superior		Límite inferior		
Sulfato de amonio (g/L)	1		0		
Glicerol (g/L)	20		10		
MATRIZ EXPERIMENTAL					
Tratamiento experimental	Glicerol (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)	PHA (g/L)	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)
T1	15	0.5	0.4139	2.12	0.0523
T2	20	0	0.5817	2.12	0.0670
T3	20	1.0	0.4454	1.775	0.0545
T4	10	0	0.4893	2.44	0.0739
T5	10	1	0.8713	2.5	0.0640
T6	15	0.5	0.648	1.9	0.0181

La concentración máxima de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono fue de 1.5443 g/L y utilizando glicerol fue de 0.7 g/L. Esto coincide con lo reportado por Ribeiro *et al.*, 2015. Utilizaron como fuente de carbono glucosa y glicerol, ambos a una concentración de 15 g/L, encontraron que la producción en biomasa y PHA fueron mayores utilizando glucosa, de acuerdo con lo reportado emplearon a la bacteria *C. necator*, la biomasa obtenida fue de 4.14 g/L utilizando glucosa y 2.96 g/L utilizando glicerol, la producción de PHA fue de 2.21 g/L utilizando glucosa y 1.89 g/L utilizando glicerol. Estas diferencias en la producción pueden deberse a diferencias no solo moleculares entre ambas fuentes de carbono sino también, al metabolismo propio de cada uno de estos, debido a que las unidades monoméricas

base para la síntesis de PHA se encuentran en competición tanto para la producción de PHA como para la β -oxidación y síntesis de novo de ácidos grasos (Romero, 2022).

Los resultados de los parámetros cinéticos de los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 21. El T6 presentó mayor rendimiento $Y_{P/S}$, en cambio, el T4 presentó mayor rendimiento $Y_{X/S}$.

Tabla 21. Parámetros cinéticos calculados para cada tratamiento experimental utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel matraz.

	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	δ (h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Productividad (g/L * h)
T1	0.0586	11.82	17.3645	0.1017	0.0305	0.0086
T2	0.0670	10.35	14.9247	0.0912	0.024	0.0121
T3	0.0544	12.72	18.3543	0.1470	0.000	0.0092
T4	0.0554	12.50	18.0454	0.2916	0.0296	0.0101
T5	0.0639	10.83	15.6278	0.1511	0.0091	0.0181
T6	0.0522	13.25	19.1230	0.1418	0.0214	0.0134

4.3 Cinéticas de crecimiento microbiano a nivel biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbono.

4.3.1 Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco

En las Figuras 26 y 27 se observan las cinéticas de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica y peso seco para cada uno de los tratamientos experimentales.

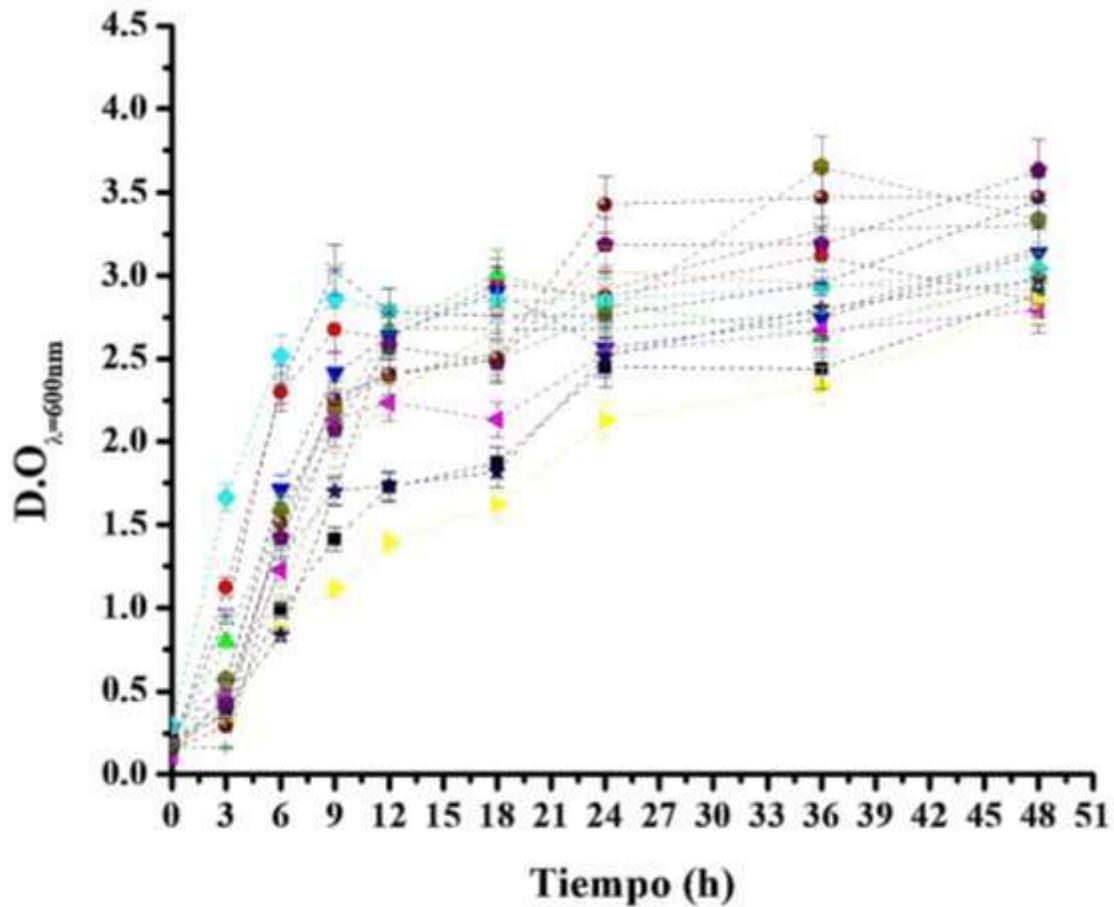


Figura 26. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, $n=15$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ▼ T6 ▼ T7 ▼ T8 ★ T9 ▼ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

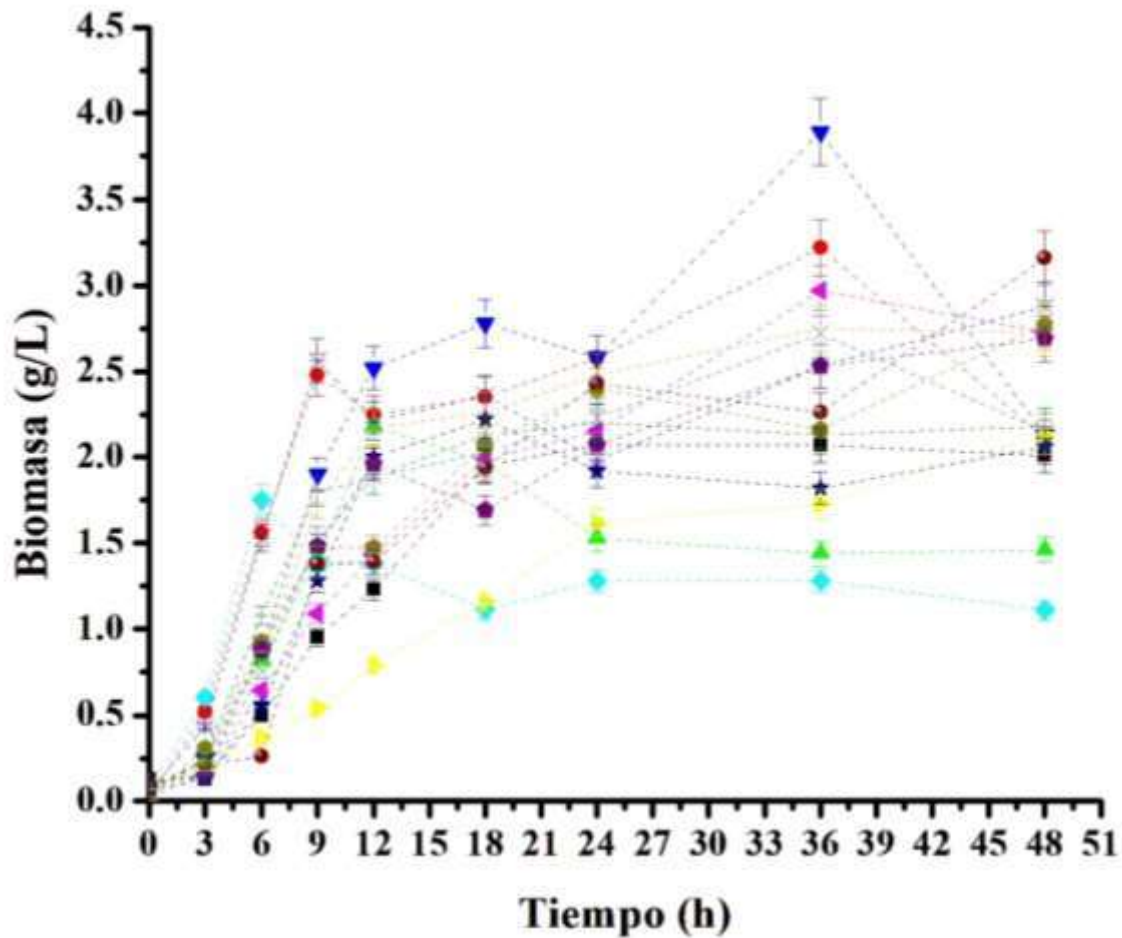


Figura 27. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de peso seco utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◀ T6 ▶ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

En la mayoría de los tratamientos experimentales la fase estacionaria comenzó entre la hora 9 y 18, además, la biomasa obtenida en la hora 48 fue muy similar en todos a pesar de que presentaban distintas relaciones C:N, esto nos indica que la biomasa incrementa de manera independiente al consumo de sustrato debido a que en la mayoría de los tratamientos la glucosa no se agotó. Singh *et al.*, 2021 utilizaron hidrolizado de glucosa y evaluaron la producción de biomasa y PHA de *Bacillus thuringiensis* a distintos tiempos de fermentación, la densidad óptica a partir de la hora 24 no presentaba aumentos significativos, lo cual coincide con los resultados reportados.

Los tratamientos en los que se obtuvieron las mayores densidades ópticas fueron los 8 y 10 con valores de 3.632 (2.77 g/L) y 3.653 (2.69 g/L), respectivamente, ambos tratamientos presentaban las mismas condiciones; 50 g/L de glucosa, 375 rpm y 0.8 VVM de aire. Es importante mencionar que la mayor cantidad de biomasa se presentó en el T11 (3.16 g/L), cuya cinética presentó una fase diaúxica debido al consumo de un sustrato distinto a la glucosa por lo que se infiere que dicha producción máxima no se atribuye a las condiciones de fermentación sino al cometabolismo de otro sustrato.

La velocidad específica de crecimiento fue mayor en el T11 (0.3391 h^{-1}) utilizando la cantidad mínima de glucosa (20 g/L), agitación media (375 rpm) y aireación mínima (0.4 VVM).

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de las velocidades específicas de crecimiento, en la Tabla 22 se observa el análisis de varianza de los factores seleccionados y sus interacciones.

Tabla 22. Análisis de varianza para la velocidad específica de crecimiento utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glucosa]	0.04075510	1	0.0407551	13.67	0.014
B: Agitación	0.00937080	1	0.0093708	3.14	0.1365
C: VVM	0.00000061	1	6.05E-07	0	0.9892
A²	0.00596444	1	0.00596444	2	0.2164
AB	0.00205209	1	0.00205209	0.69	0.4446
AC	0.00028900	1	0.000289	0.1	0.7681
B²	0.00307497	1	0.00307497	1.03	0.3565
BC	0.00297025	1	0.00297025	1	0.3641
C²	0.00109339	1	0.00109339	0.37	0.5713
Error total	0.01491170	5	0.00298234		
Total (corr.)	0.08131760	14	0.0407551		

El efecto de la concentración de glucosa presentó significancia estadística debido a que posee un valor p menor a 0.05 (0.0014), los demás factores, así como sus interacciones no presentaron significancia estadística.

Para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la variable de respuesta (velocidad específica de crecimiento), en la Figura 28 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales.

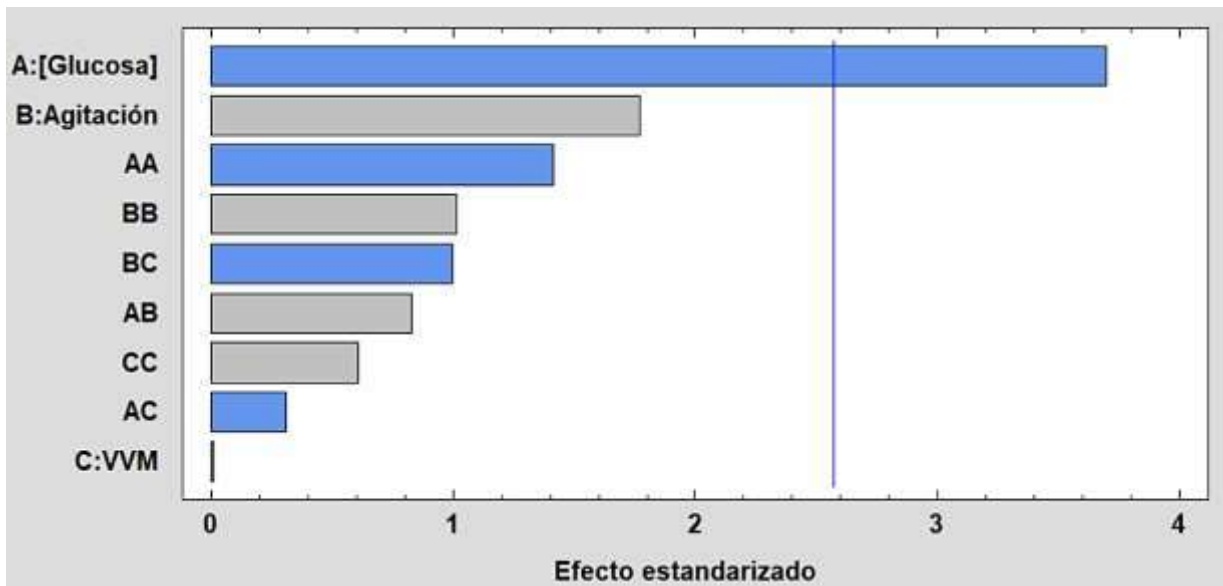


Figura 28. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Como se puede observar, la concentración de la glucosa ejerce mayor efecto sobre la velocidad específica de crecimiento, que los demás factores estudiados, la interacción de la glucosa con la agitación ejercen cierto efecto a pesar de no presentar significancia estadística, sin embargo, la variación en la aireación por sí sola, no afecta la velocidad, ejerce mayor efecto al interactuar con la agitación que con la concentración de la fuente de carbono. Esto puede deberse a que la cantidad de aire que ingresa a la célula, y, por tanto, interviene en el metabolismo no es igual a la cantidad de aire suministrado al medio ya que la agitación juega un papel muy importante en la transferencia de masa hacia el interior de la célula. Es importante mencionar que un exceso de agitación puede causar cizallamiento a las células, ocasionando el efecto contrario al que se busca.

En la Figura 29 se muestra el efecto principal de cada uno de los factores estudiados, en el eje “x” se representan los factores con los niveles planteados y en el eje “y” la media de la variable de respuesta observada (μ).

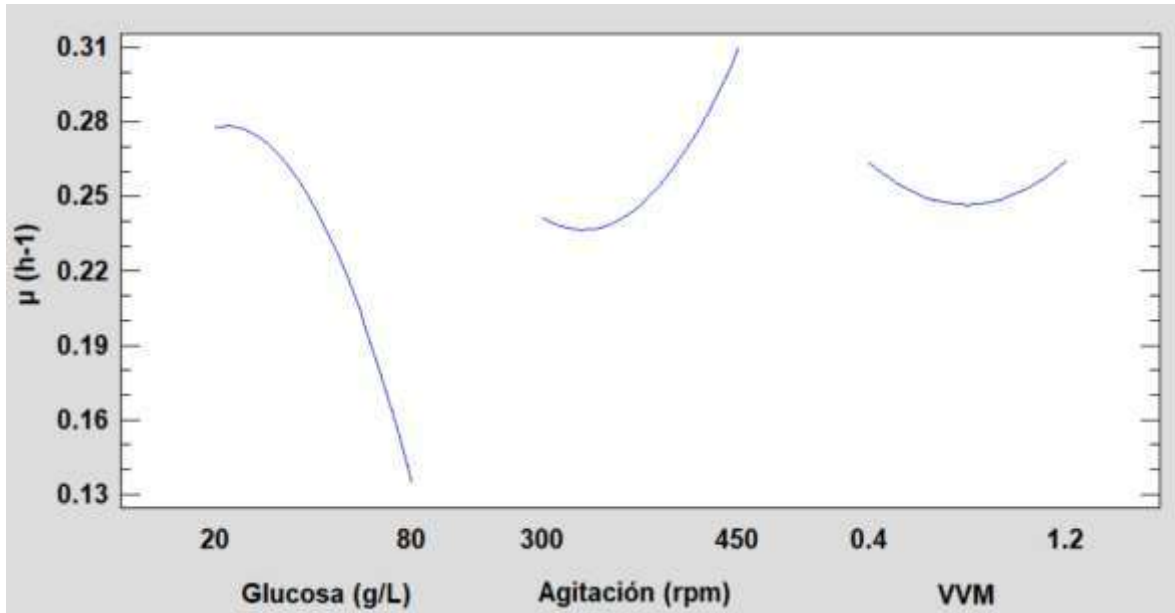


Figura 29. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la velocidad específica de crecimiento.

El diagrama nos muestra que la concentración de glucosa ejerce mayor efecto sobre μ , maximizándola al disminuir su concentración, al contrario de la agitación, la cual incrementa la velocidad específica al incrementar las revoluciones por minuto, sin embargo, la variación en la aireación durante la fermentación no ejerce ningún cambio sobre μ por si sola.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta para una aireación media de 0.8 VVM (Figura 30). La interpretación del diagrama sugiere que, para presentar una mayor velocidad de replicación durante la fermentación, se debe de utilizar el mínimo de glucosa (20 g/L) y el máximo de agitación 450 rpm.

El análisis ANOVA de la Figura 30 reporta valores de r^2 de 86.66 % de la variabilidad en μ y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.00546.

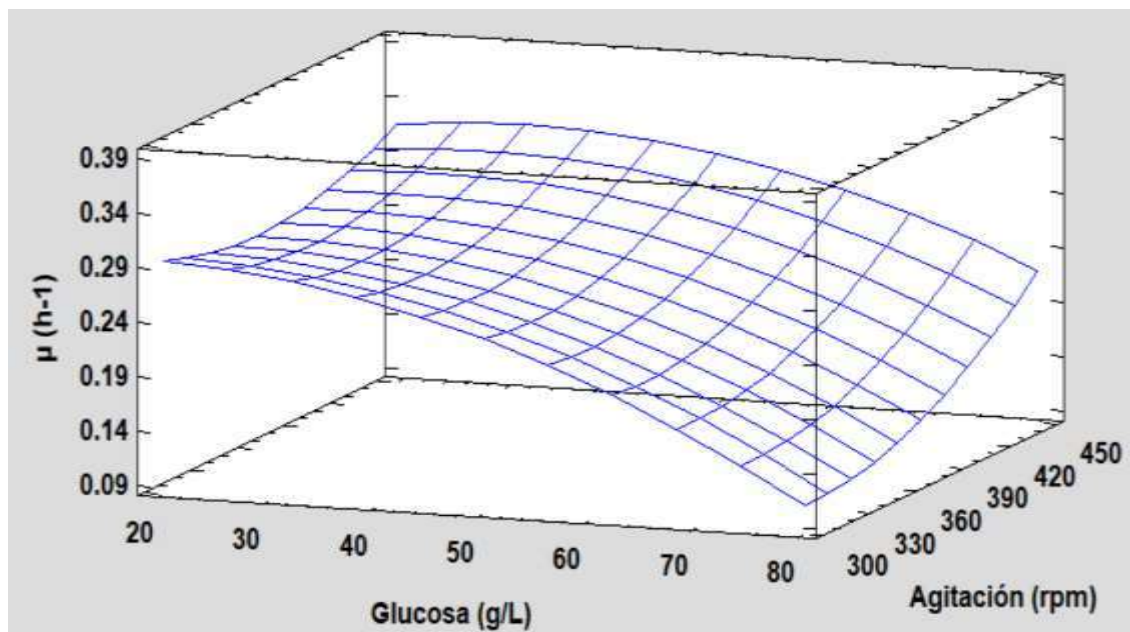


Figura 30. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Con base en todos los análisis previamente mencionados, se encontró el punto óptimo para maximizar la velocidad específica de crecimiento durante la fermentación, en la Tabla 23 se muestran las condiciones necesarias dentro de la región experimental. El valor óptimo de μ que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante la MSR sería de 0.3640 h^{-1}

Tabla 23. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar μ de *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glucosa (g/L)	20.0	80.0	35.1677
Agitación (rpm)	300.0	450.0	449.97
VVM	0.4	1.2	0.4

4.3.2 Consumo de glucosa

En la Figura 31 se observa el consumo de glucosa para cada uno de los distintos tratamientos durante la fermentación. El aporte de nitrógeno se mantuvo fijo con base en los resultados exploratorios del diseño factorial 2^2 (1 g/L).

El método de cuantificación empleado en el diseño factorial fue mediante la técnica de DNS, cuando se realizaron las pruebas a nivel biorreactor, hubo interferencias con otros azúcares reductores producidos por la bacteria por lo que tuvo que emplearse un método más específico, una técnica enzimática.

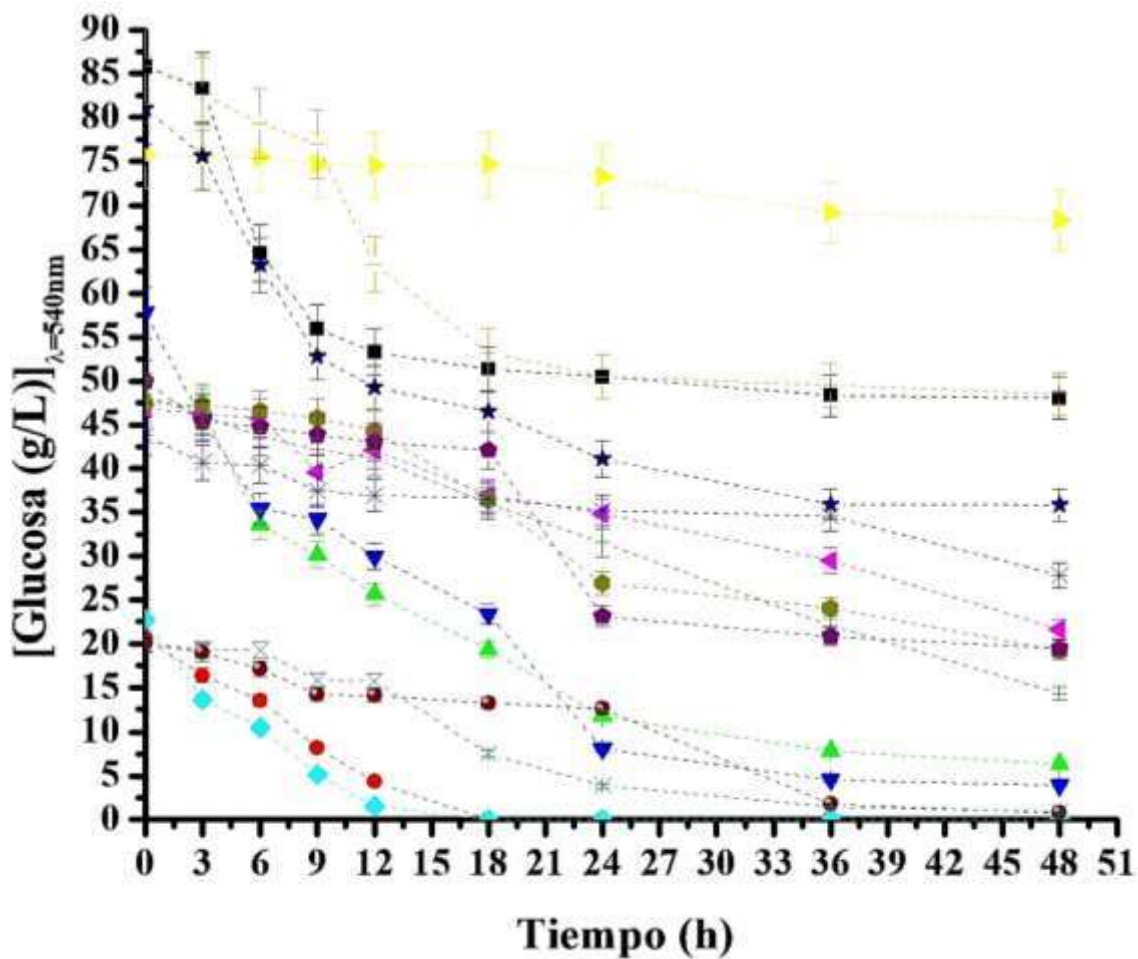


Figura 31. Cuantificación del consumo de glucosa durante la fermentación mediante la técnica de glucosa oxidasa a nivel biorreactor ($\lambda=540\text{nm}$) (DE, $n=15$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ▼ T6 ▼ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 * T13 - T15).

Los tratamientos en los que la fuente de carbono se agotó corresponden a los niveles mínimos, además, en las horas de fermentación en las que se agotó, se presentó una disminución en la concentración de los PHA obtenidos.

4.3.3 Cuantificación de PHA por espectrofotometría

En la Figura 32 se observan los resultados de la cuantificación de PHA para cada uno de los tratamientos.

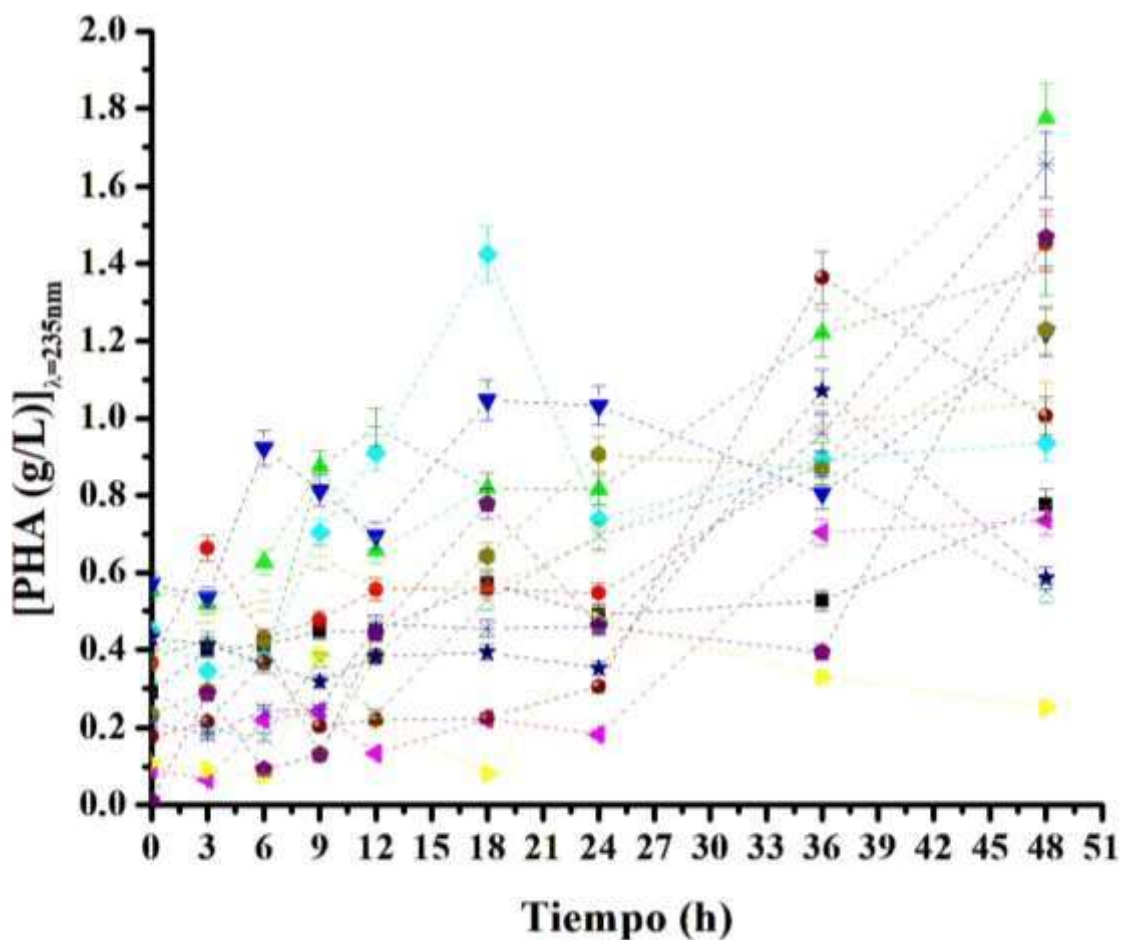


Figura 32. Cuantificación de PHA producidos por *P. reptilivora* mediante la técnica de conversión a ácido crotonico utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◆ T6 ▼ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

La cantidad máxima de PHA producidos fue en el T3 (1.774 g/L) utilizando 50 g/L de glucosa, agitación mínima (300 rpm) y aireación mínima (0.4). Los tratamientos en los que se aportó la mínima concentración de glucosa experimentaron disminución de PHA en las últimas horas de fermentación. Mohanrasu *et al.*, 2020 estudiaron la producción de PHA por *Bacillus megaterium* a partir de distintas fuentes de carbono, encontraron que la producción máxima era empleando 20 g/L de glucosa (2.74 g/L).

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de la producción de PHA, en la Tabla 24 se observa el análisis de varianza de los factores seleccionados y sus interacciones.

Tabla 24. Análisis de varianza para la producción de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor- <i>p</i>
A: [Glucosa]	0.207368	1	0.207368	6.4	0.0526
B: Agitación	0.0436601	1	0.0436601	1.35	0.2982
C: VVM	0.0614251	1	0.0614251	1.89	0.2271
A²	1.00529	1	1.00529	31.01	0.0026
AB	0.237169	1	0.237169	7.32	0.0425
AC	0.2401	1	0.2401	7.41	0.0417
B²	0.17864	1	0.17864	5.51	0.0658
BC	0.427062	1	0.427062	13.17	0.0151
C²	0.0703588	1	0.0703588	2.17	0.2007
Error total	0.162097	5	0.0324194		
Total (corr.)	2.6861	14			

El efecto de la interacción de los factores estudiados presentó significancia estadística debido a que poseen valores *p* menores a 0.05; A² (0.0026), BC (0.0151), AC (0.0417), AB (0.0425). El efecto de la concentración de glucosa, B², C², aireación y agitación no presentaron significancia estadística, los factores ejercieron efecto de mayor a menor importancia en el orden que fueron mencionados.

Para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la variable de respuesta (PHA), en la Figura 33 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales.

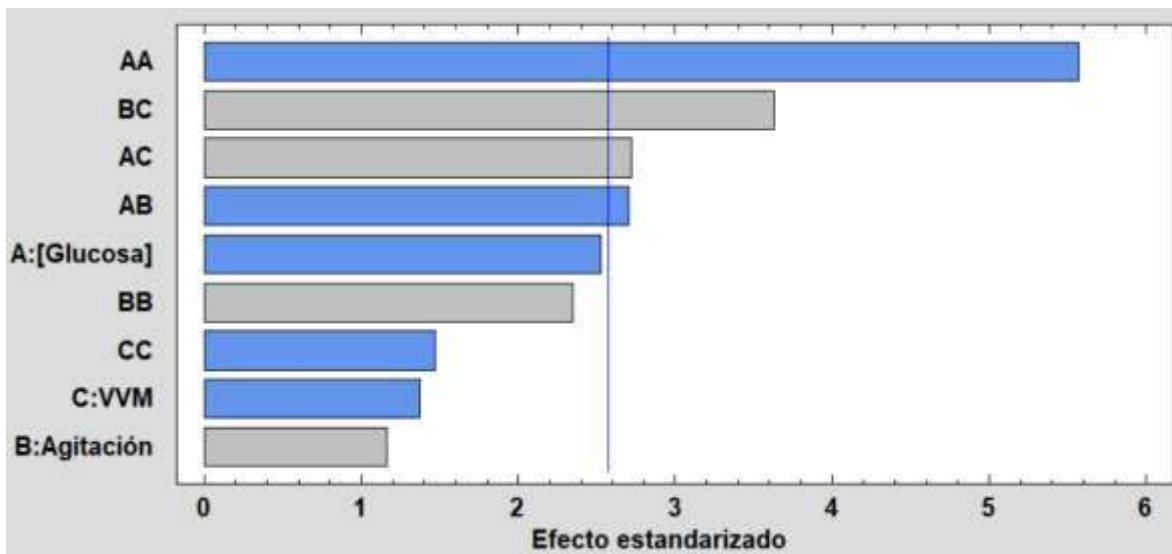


Figura 33. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

En la Figura 34 se muestra el efecto principal de cada uno de los factores estudiados, en el eje “x” se representan los factores con los niveles planteados y en el eje “y” la media de la variable de respuesta observada (μ).

El diagrama nos muestra que el factor concentración de glucosa en su nivel máximo (80 g/L) ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHA y que en su nivel medio aumenta el valor en la media de la producción, la agitación en su nivel bajo disminuye la producción y en su nivel alto la aumenta ligeramente, en cambio, la aireación en su nivel aumenta la producción de PHA y en su nivel alto la disminuye.

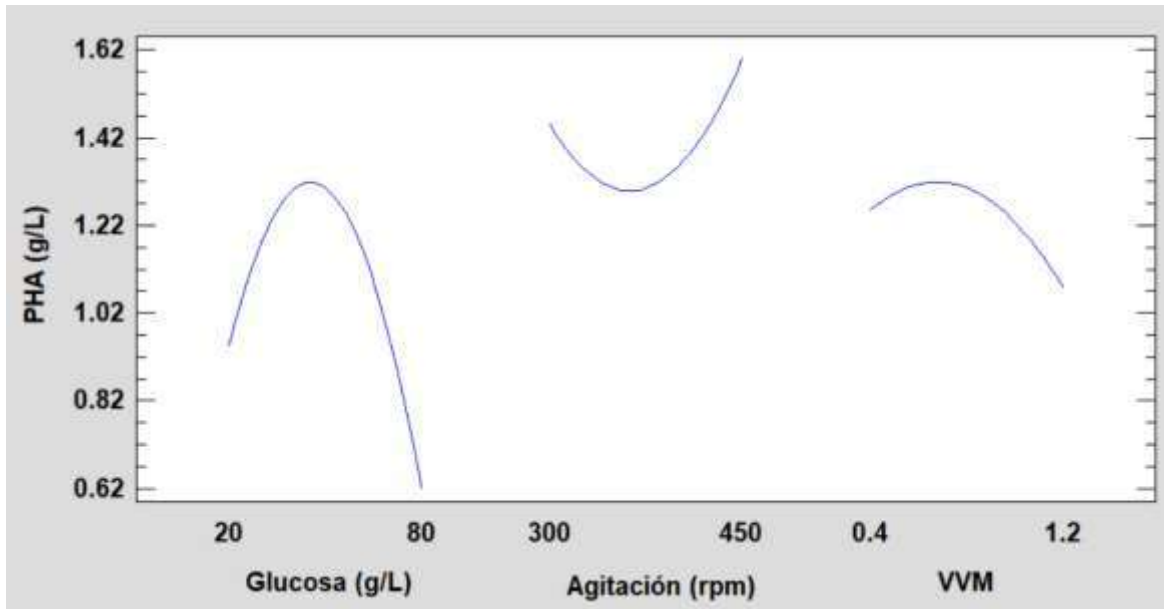


Figura 34. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la producción de PHA.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta para una aireación media de 0.8 VVM (Figura 35). La interpretación del diagrama sugiere que, para presentar una mayor producción de PHA se debe de suministrar una concentración media de glucosa y agitación máxima. Esto puede explicarse a que las concentraciones bajas de glucosa se utilizan principalmente en actividades metabólicas básicas requeridas para el adecuado funcionamiento celular y concentraciones más altas ejercen mayor presión osmótica a las células, lo cual afecta su proliferación, ocasionando menor producción de PHA (Luo *et al.*, 2002).

El análisis ANOVA de la Figura 35 reporta valores de r^2 de 93.96 % de la variabilidad en PHA y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.180054, la varianza tiene un valor superior al 75% por lo que el proceso de extracción puede ser ajustado a un modelo matemático para poder realizar la predicción bajo una ecuación matemática (Ecuación 7).

$$\begin{aligned}
 [PHA] = & 0.693191 + (0.0768602 * glucosa) - (0.031645 \\
 & * agitación) - (3.94385 * VVM) - (0.000579769 \\
 & * glucosa^2) - (0.000108222 * glucosa * agitación) \\
 & + (0.0204167 * glucosa * VVM) + (0.0000391037 \\
 & * agitación^2) + (0.0108917 * agitación * VVM) \\
 & - (0.86276 * VVM^2)
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 7}$$

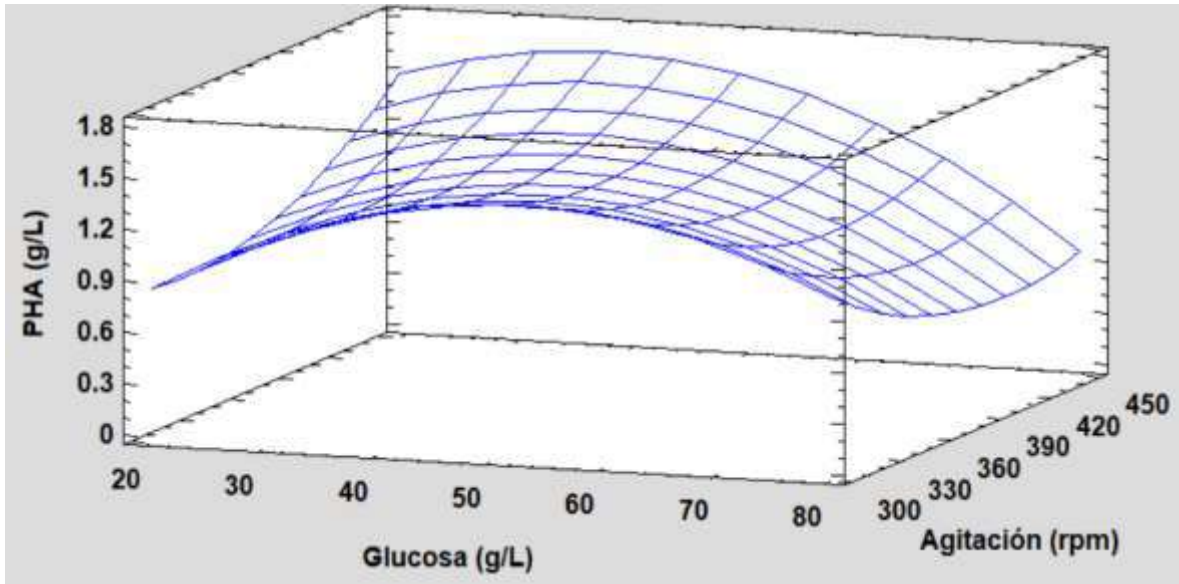


Figura 35. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Con base en todos los análisis previamente mencionados, se encontró el punto óptimo para maximizar la producción de PHA durante la fermentación, en la Tabla 25 se muestran las condiciones necesarias dentro de la región experimental. El valor óptimo de PHA que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante la MSR sería de 1.7404 g/L.

Tabla 25. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glucosa (g/L)	20.0	80.0	45.3303
Agitación (rpm)	300.0	450.0	300.0
VVM	0.4	1.2	0.4

Se realizó una prueba confirmatoria de las mejores condiciones para la producción de PHA. En la Figura 36 se observan las variables cuantificadas por las distintas determinaciones. El valor máximo de PHA cuantificados fue de 1.757 g/L, valor ligeramente mayor a la predicción de la MSR.

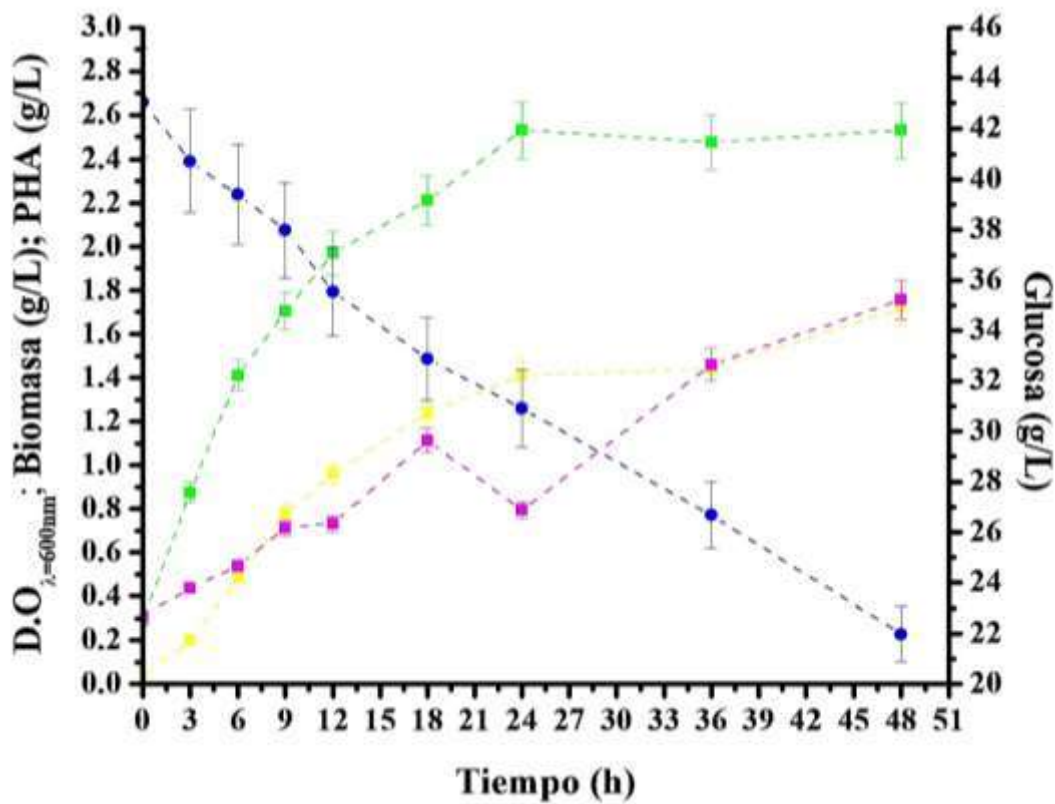


Figura 36. Tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación y variables cuantificadas durante la fermentación (■ D. O ■ Biomasa (g/L) ■ PHA (g/L) ● Glucosa (g/L)).

En la Tabla 26 se observa un resumen de los distintos tratamientos experimentales y los valores obtenidos para cada una de las variables de respuesta involucradas.

Tabla 26. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

VARIABLES DE ESTUDIO		
Variables	Límite superior	Límite inferior

Glucosa (g/L)	80	20				
Agitación (rpm)	300	450				
VVM	0.4	1.2				
MATRIZ EXPERIMENTAL						
Tratamiento experimental	Glucosa (g/L)	Agitación (rpm)	VVM	PHA (g/L)	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)
T1	80	375	1.2	0.776	2.008	0.0914
T2	20	450	0.8	1.452	2.108	0.3076
T3	50	300	0.4	1.774	1.458	0.2209
T4	50	375	0.8	1.221	2.125	0.2494
T5	20	300	0.8	0.935	1.108	0.2526
T6	50	300	1.2	0.735	2.733	0.3281
T7	80	375	0.4	0.251	2.133	0.16
T8	50	375	0.8	1.228	2.767	0.2749
T9	80	450	0.8	0.585	2.058	0.2635
T10	50	375	0.8	1.467	2.692	0.2159
T11	20	375	0.4	1.005	3.158	0.3391
T12	50	450	0.4	1.386	2.183	0.312
T13	20	375	1.2	0.55	2.15	0.3045
T14	50	450	1.2	1.654	2.875	0.3102
T15	80	300	0.8	1.042	2.725	0.1179

En la Tabla 27 se muestran los parámetros cinéticos calculados para cada uno de los tratamientos experimentales. El T11 fue el que presentó mayor velocidad específica de crecimiento, en cambio, el T3 fue el que presentó mayor productividad de PHA (0.0370 g/L * h). En el 2016 Singh *et al.*, reportaron productividades de 1.6 y 13.3 mg/L * h en la acumulación de biopolímeros PHB y P(3HB-co3HV), las cuáles son significativamente inferiores a la obtenida en el T3.

Tabla 27. Parámetros cinéticos para cada uno de los tratamientos experimentales de la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

	$\mu(\text{h}^{-1})$	T_d (h)	δ (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Productividad $\text{g/L} \cdot \text{h}$
T1	0.0914	7.5808	10.937	0.0496	0.0128	0.0162
T2	0.3076	2.2537	3.251	0.1011	0.0527	0.0303
T3	0.2209	3.1372	4.526	0.0344	0.0294	0.0370
T4	0.2495	2.7783	4.008	0.0385	0.0121	0.0254
T5	0.2526	2.7439	3.959	0.0458	0.0214	0.0195
T6	0.3281	2.1128	3.048	0.1071	0.0254	0.0153
T7	0.1600	4.3319	6.250	0.2737	0.0192	0.0052
T8	0.2749	2.5216	3.638	0.0968	0.0352	0.0256
T9	0.2635	2.6308	3.795	0.0441	0.0034	0.0122
T10	0.2159	3.2110	4.632	0.0850	0.0478	0.0306
T11	0.3391	2.0443	2.949	0.1589	0.0429	0.0209
T12	0.3120	2.2218	3.205	0.0624	0.0295	0.0289
T13	0.3045	2.2764	3.284	0.1072	0.0132	0.0115
T14	0.3102	2.2347	3.224	0.1768	0.0904	0.0345
T15	0.1179	5.8796	8.482	0.0713	0.0181	0.0217

4.4 Cinéticas de crecimiento microbiano a nivel biorreactor utilizando glicerol como fuente de carbono.

4.4.1 Crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco

En las Figuras 37 y 38 se observan las cinéticas de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica y peso seco para cada uno de los tratamientos experimentales.

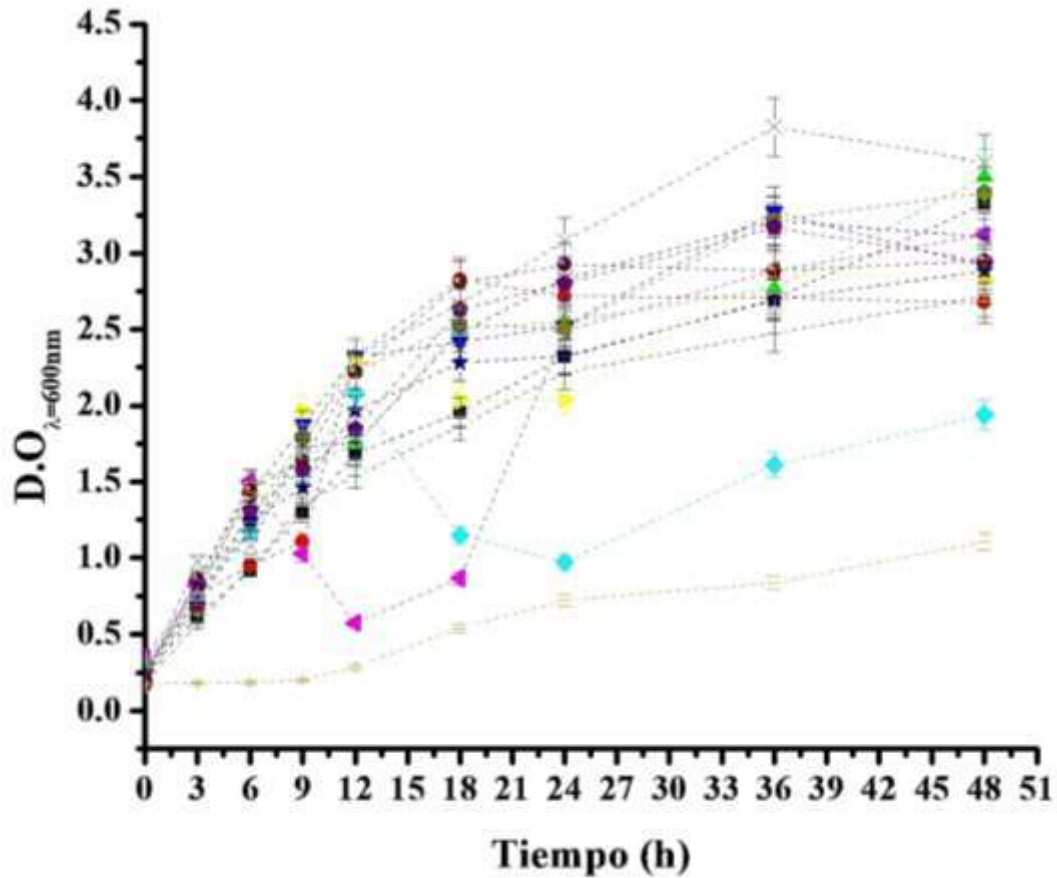


Figura 37. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de densidad óptica utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor ($\lambda=600\text{nm}$) (DE, $n=15$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ▲ T6 ▼ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 × T13 * T14 - T15).

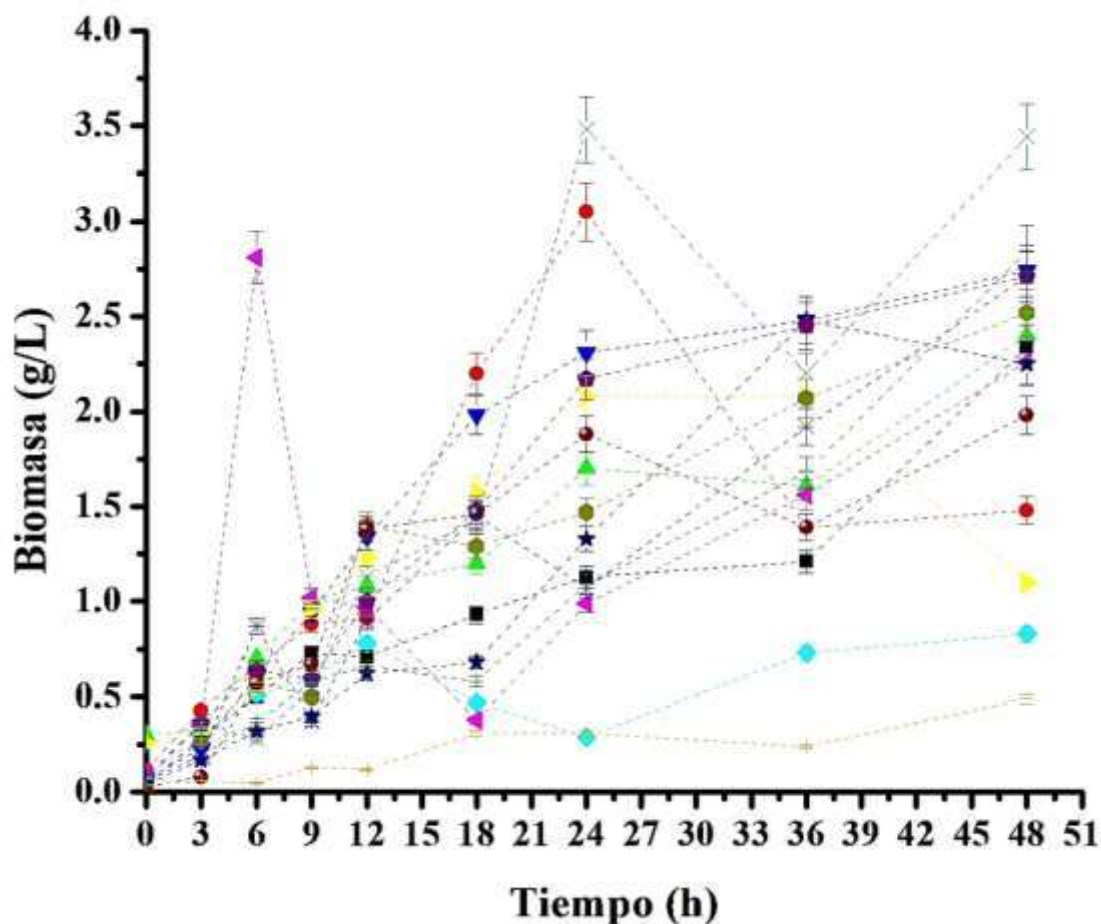


Figura 38. Cinética de crecimiento microbiano mediante la técnica de peso seco utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ▼ T6 ▼ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

Al relacionar los resultados de densidad óptica con la biomasa obtenida se observa que los tratamientos presentan nulas fases *lag*, prolongando sus fases exponenciales hasta las 24 y 36 h. La cantidad máxima de biomasa obtenida fue en el T13 (3.44 g/L) empleando 10 g/L de glicerol, 1.2 L/min de aire y 450 rpm, en el 2021 Mohd Zain *et al.*, encontraron las condiciones óptimas de fermentación para aumentar la producción de PHA y biomasa utilizando a la bacteria *Burkholderia cepacia* y glicerol como fuente de carbono y obtuvieron un valor máximo de biomasa de 5.63 g/L, sin embargo, esta fue obtenida a la hora 72 de fermentación. En el 2019, Gómez-Cardozo *et al.*, reportaron valores de peso seco celular de

hasta 1.9 g/L utilizando a la bacteria *Bacillus megaterium* en 39.9 h de fermentación. Con base en el tratamiento que presentó mayor cantidad de biomasa podemos inferir que una concentración media de glicerol, agitación y aireación máxima favorecen la producción de biomasa, al aumentar el transporte de masa del sustrato hacia el interior de la célula.

La mayor velocidad específica de crecimiento se obtuvo en el T3 (0.2511 h^{-1}) empleando 15 g/L de glicerol, 1.2 L/min de aire y 375 rpm de agitación. Borrero-de Acuña *et al.*, en el 2021 emplearon a la bacteria *P. putida* KT2440 para la producción de PHA empleando glicerol crudo como sustrato, durante las primeras 22 h de fermentación obtuvieron una velocidad específica de 0.21 h^{-1} , menor a la obtenida en el T3.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de las velocidades específicas de crecimiento, en la Tabla 28 se observa el análisis de varianza de los factores seleccionados y sus interacciones.

Tabla 28. Análisis de varianza para la velocidad específica de crecimiento utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glicerol]	0.00045905	1	0.000459045	0.33	0.5905
B: VVM	0.00028441	1	0.000284411	0.2	0.67
C: Agitación	0.00014878	1	0.000148781	0.11	0.7568
A²	0.00077052	1	0.000770519	0.55	0.4901
AB	0.002304	1	0.002304	1.66	0.2544
AC	0.00781456	1	0.00781456	5.62	0.0639
B²	0.0111	1	0.0111	7.98	0.0369
BC	0.00357006	1	0.00357006	2.57	0.17
C²	3.14E-09	1	3.14E-09	0	0.9989
Error total	0.00695255	5	0.00139051		
Total (corr.)	0.0339576	14			

El efecto de la fuente B² presentó significancia estadística debido a que posee un valor *p* menor a 0.05 (0.0369), los demás factores, así como sus interacciones no presentaron significancia estadística.

En la Figura 39 se ilustra el diagrama de Pareto de efectos principales para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la variable de respuesta (velocidad específica de crecimiento).

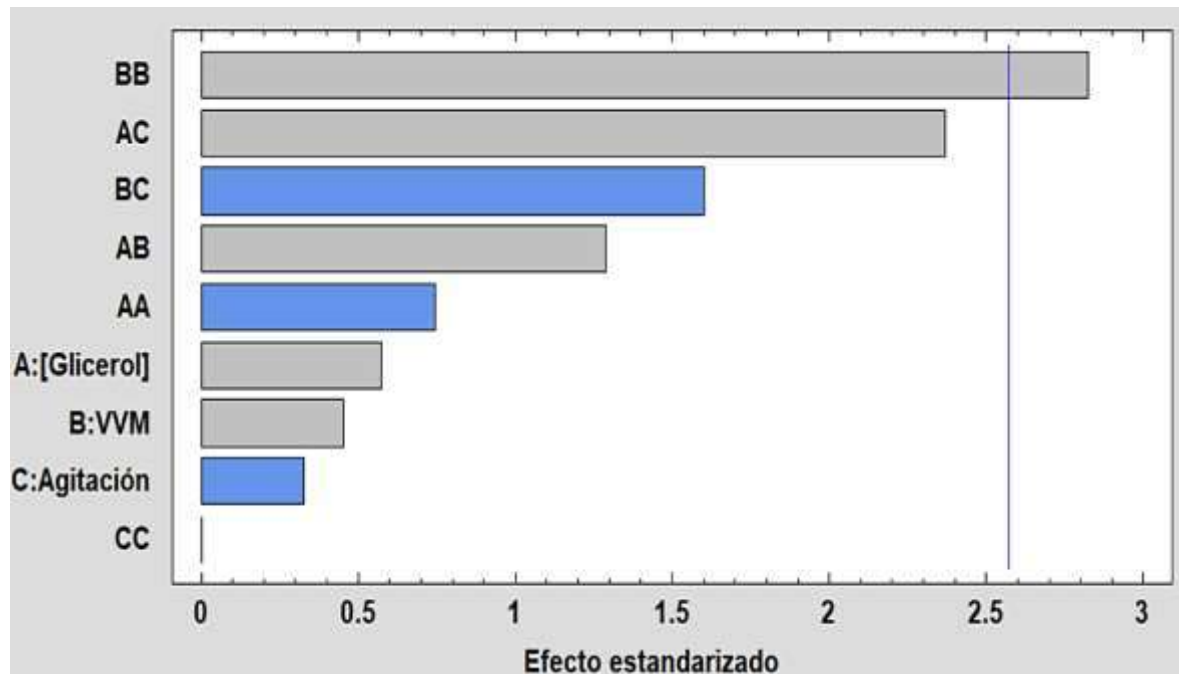


Figura 39. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

La interpretación del diagrama nos sugiere que la variación de los factores estudiados no ejerce un efecto significativo sobre la variable de respuesta, sin embargo, la interacción de estos posee mayor efecto, la interacción B² presentó significancia estadística al poseer un valor *p* menor a 0.05 (0.0369). Con esto se infiere que la interacción de la concentración de glicerol con el aire suministrado ejerce mayor efecto sobre la velocidad, esto puede ser explicado debido a que las rutas metabólicas preferentes para el consumo del glicerol en el género de *Pseudomonas* son aquellas dependientes de oxígeno (Silby *et al.*, 2011), debido a esto la velocidad aumenta al aumentar el aire suministrado, aumentando el aporte de oxígeno al medio y, por tanto, facilitando el metabolismo aerobio.

El efecto que ejerce cada uno de los factores estudiados sobre la media de la variable de respuesta se observa en la Figura 40.

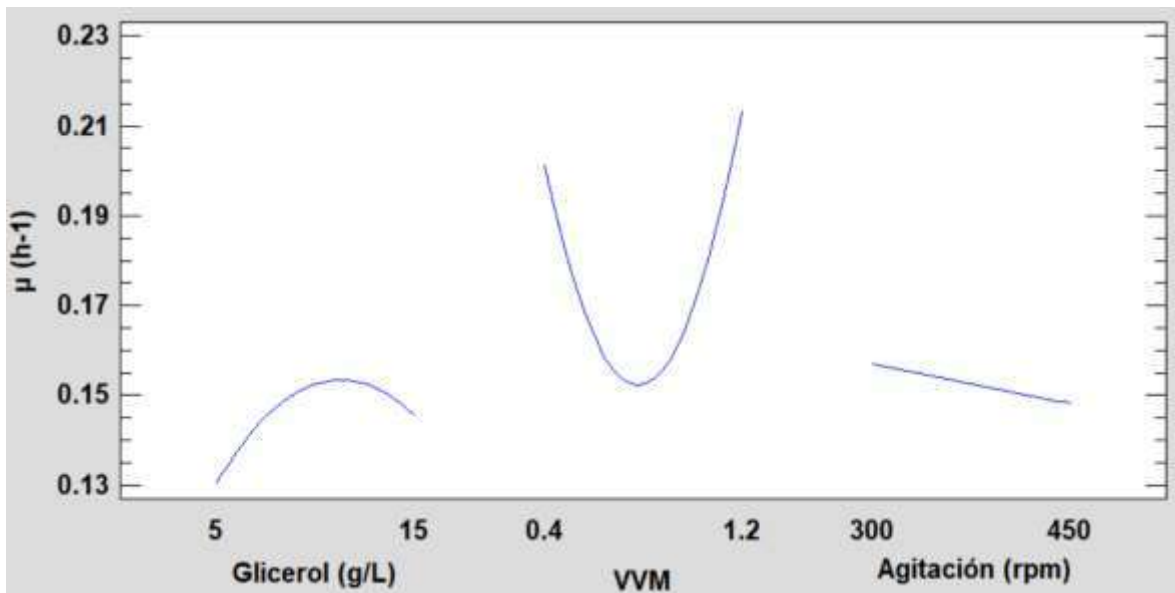


Figura 40. Diagrama de efectos principales para la concentración de glicerol, agitación y VVM sobre la velocidad específica de crecimiento.

La interpretación del diagrama nos sugiere que la concentración de glicerol en su nivel mínimo disminuye la velocidad específica, en su nivel máximo la aumenta ligeramente y en su nivel medio la maximiza. En cambio, la aireación aumenta la velocidad en su valor máximo y en el mínimo e intermedio la disminuye. Finalmente, la agitación, en su valor máximo la disminuye y en su valor mínimo la aumenta.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta para una agitación media de 375 rpm (Figura 41). La interpretación del diagrama sugiere que, para presentar una mayor velocidad de replicación durante la fermentación, se debe de utilizar el mínimo de glucosa (20 g/L) y el máximo de agitación 450 rpm.

El análisis ANOVA de la Figura 41 reporta valores de r^2 de 79.52 % de la variabilidad en μ y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.0372896.

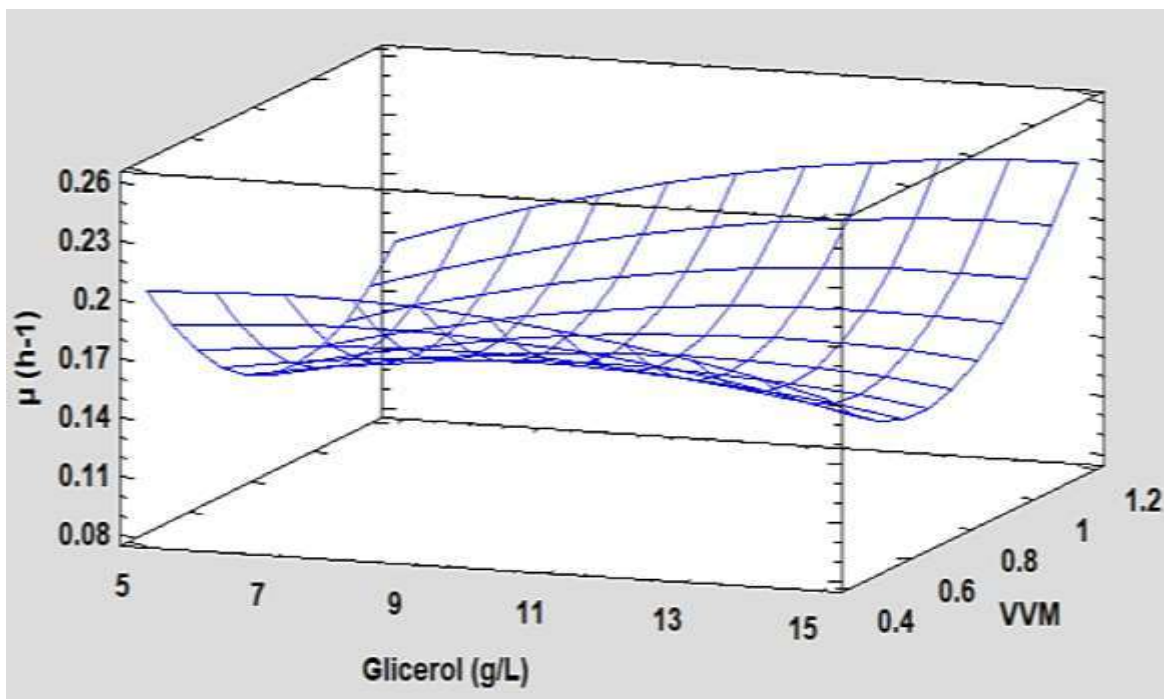


Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Con base en todos los análisis previamente mencionados, se encontró el punto óptimo para maximizar la velocidad específica de crecimiento durante la fermentación, en la Tabla 29 se muestran las condiciones necesarias dentro de la región experimental. El valor óptimo de μ que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante la MSR sería de 0.2502 h^{-1}

Tabla 29. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar μ de *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glicerol (g/L)	5	15	7.80349
Agitación (rpm)	300	450	300
Aireación (VVM)	0.4	1.2	1.2

4.4.2 Consumo de glicerol

El consumo de glicerol para cada tratamiento experimental durante la fermentación se observa en la Figura 42. El aporte de nitrógeno se mantuvo fijo con base en los resultados exploratorios del diseño factorial 2^2 (1 g/L).

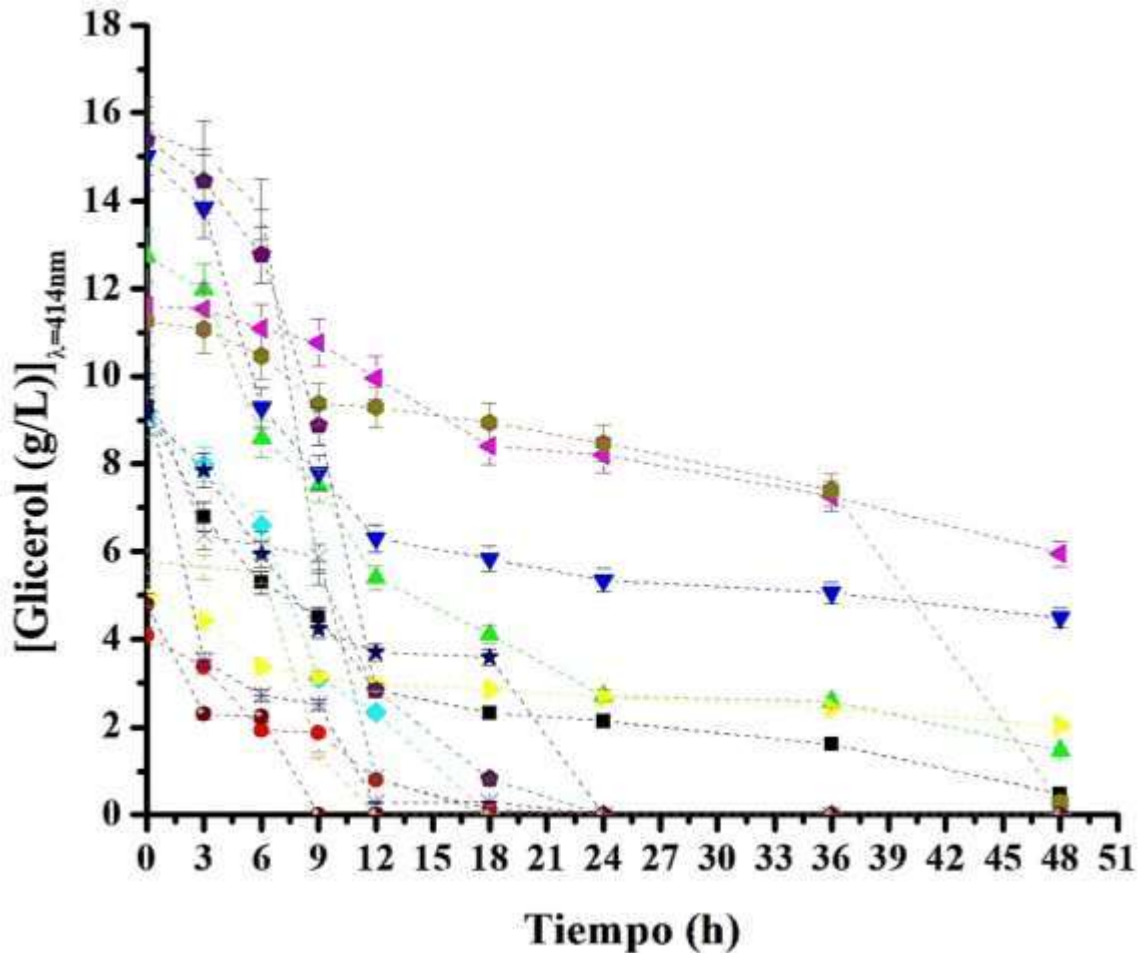


Figura 42. Cuantificación del consumo de glicerol durante la fermentación mediante la técnica de Malaprade-Hantzsch a nivel biorreactor ($\lambda=414\text{nm}$) (DE, $n=15$) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◆ T6 ► T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

Los tratamientos en los que la fuente de carbono se agotó corresponden a los niveles mínimos e intermedios, además, en las horas de fermentación en las que se agotó, se presentó una disminución en la concentración de los PHA obtenidos en las últimas horas de la fermentación.

4.4.3 Cuantificación de PHA por espectrofotometría

En la Figura 43 se observan los resultados de la cuantificación de PHA para cada uno de los tratamientos experimentales.

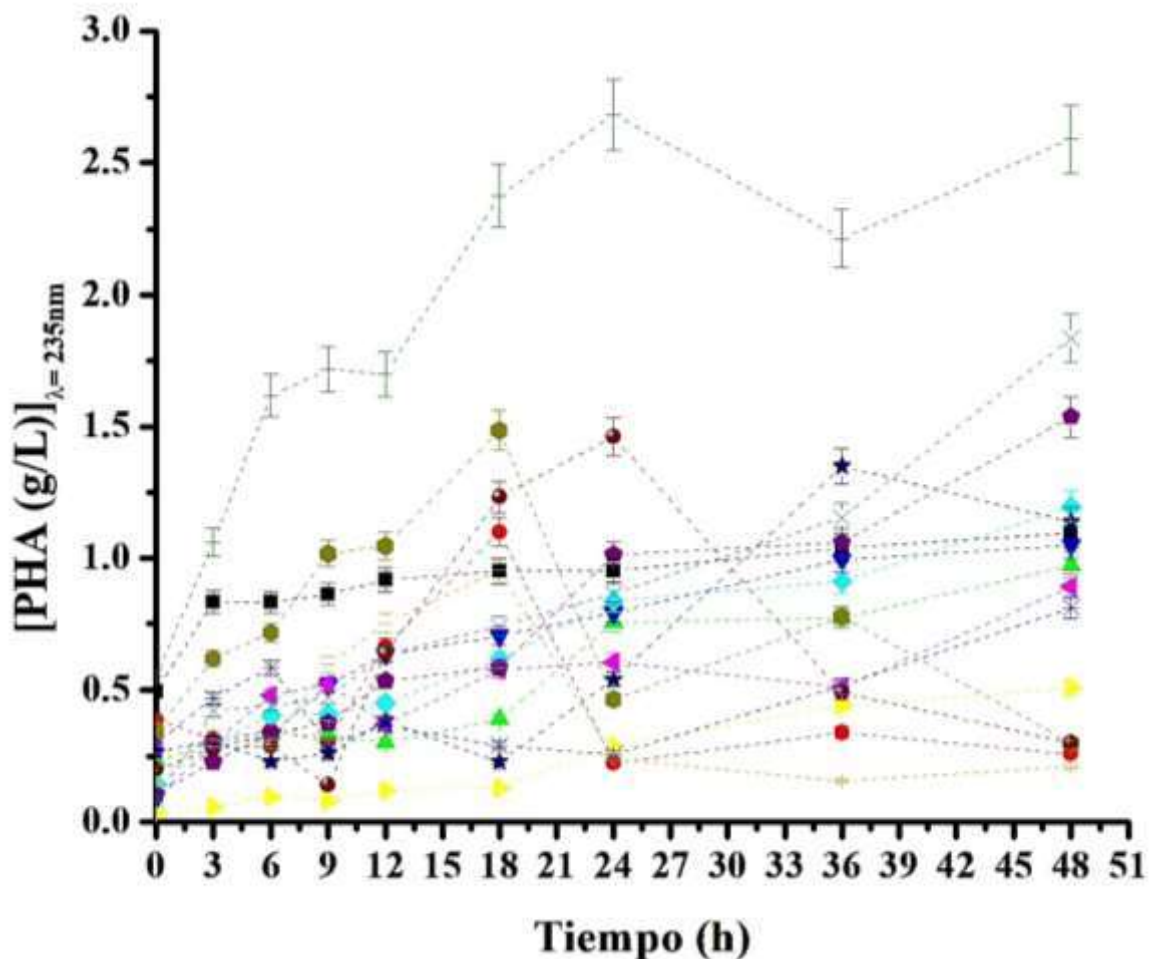


Figura 43. Cuantificación de PHA producidos por *P. reptilivora* mediante la técnica de conversión a ácido crotonico utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor (DE, n=15) (■ T1 ● T2 ▲ T3 ▼ T4 ◆ T5 ◆ T6 ▼ T7 ● T8 ★ T9 ◆ T10 ● T11 + T12 X T13 * T14 - T15).

La producción máxima de PHA se presentó en el T12 (2.589 g/L) empleando la cantidad máxima de glicerol, aireación media y agitación mínima. Licciardello *et al.*, 2019 reportan valores de producción de PHA de 2.93 g/L utilizando a la bacteria *P. mediterranea* y 1.8 g/L utilizando a *P. corrugata*, ambas producciones fueron a la hora 60 de fermentación.

En la Tabla 30 se observa el análisis estadístico de los resultados de la producción de PHA, el cual consiste en el análisis de varianza de los factores seleccionados y sus interacciones.

Tabla 30. Análisis de varianza para la producción de PHA utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: [Glicerol]	2.96096	1	2.96096	9.88	0.0256
B: VVM	0.0344531	1	0.0344531	0.11	0.7484
C: Agitación	0.0489845	1	0.0489845	0.16	0.7027
A²	0.0269917	1	0.0269917	0.09	0.7762
AB	0.003481	1	0.003481	0.01	0.9184
AC	0.143262	1	0.143262	0.48	0.5201
B²	0.0475652	1	0.0475652	0.16	0.7068
BC	0.440232	1	0.440232	1.47	0.2797
C²	0.756859	1	0.756859	2.52	0.1729
Error total	1.49876	5	0.299753		
Total (corr.)	6.01E+00	14			

El efecto de la concentración de glicerol presentó significancia debido a que posee valor p menor a 0.05 (0.0256), los demás efectos estudiados, así como sus interacciones no presentaron significancia estadística.

Para complementar los datos estadísticos estimados del efecto de los factores y su interacción sobre la media de la variable de respuesta (PHA), en la Figura 44 se muestra el diagrama de Pareto de efectos principales.

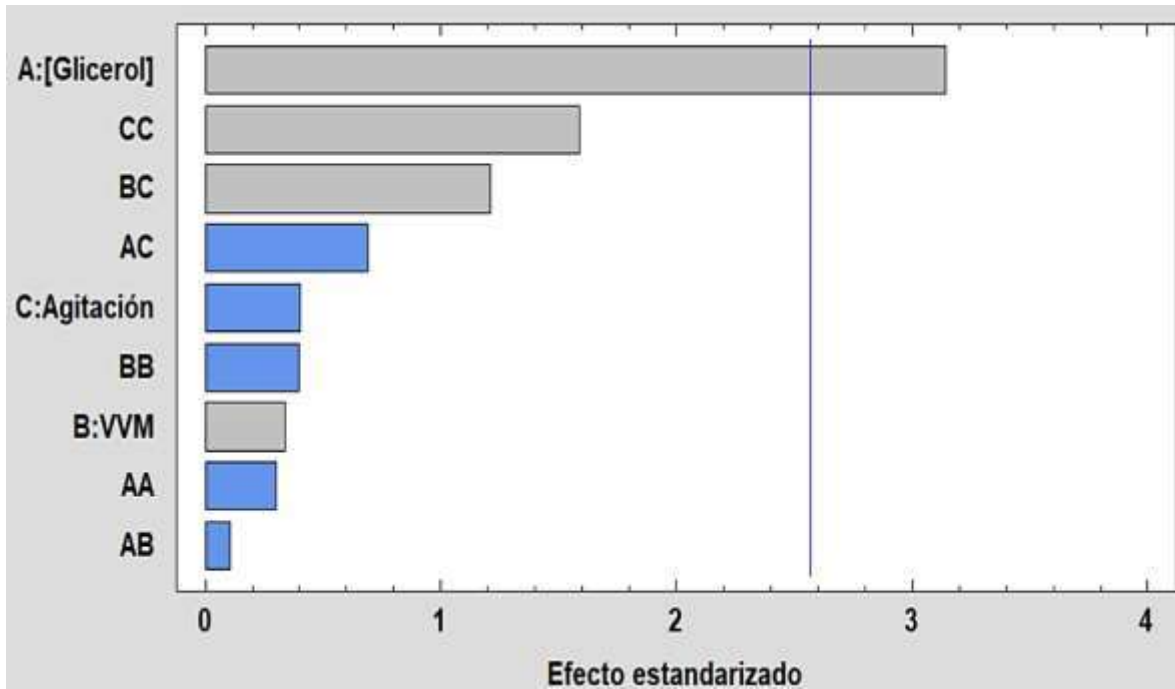


Figura 44. Diagrama de Pareto de efectos de los factores sobre la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

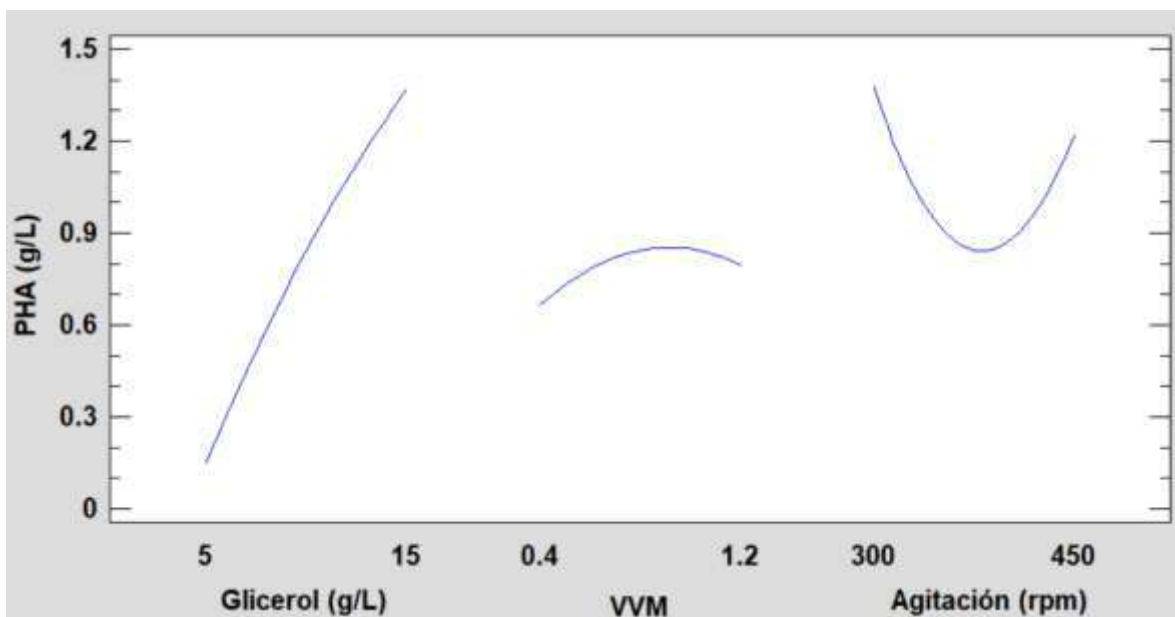


Figura 45. Diagrama de efectos principales para la concentración de glucosa, agitación y VVM sobre la producción de PHA.

En la Figura 45 se muestra el efecto principal de cada uno de los factores estudiados sobre la media de la concentración de PHA. El diagrama muestra que al aumentar la concentración de glicerol (15 g/L) aumenta la producción de PHA y que al emplear la concentración en su nivel mínimo (5 g/L) disminuye drásticamente la producción. La aireación en su nivel medio favorece la producción y en su nivel mínimo ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHA, la agitación en su nivel mínimo favorece la producción y en su nivel máximo y medio la disminuye,

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental se obtuvo el siguiente gráfico de superficie de respuesta para una agitación media de 375 rpm (Figura 46). La interpretación del diagrama sugiere que al aumentar la concentración de glicerol y disminuir la aireación se maximiza la producción de PHA, como se ha comentado anteriormente las concentraciones bajas de sustrato son destinadas principalmente a actividades metabólicas básicas, debido a esto es adecuado proporcionar una concentración mayor evitando causar exceso para evitar el aumento en la presión osmótica.

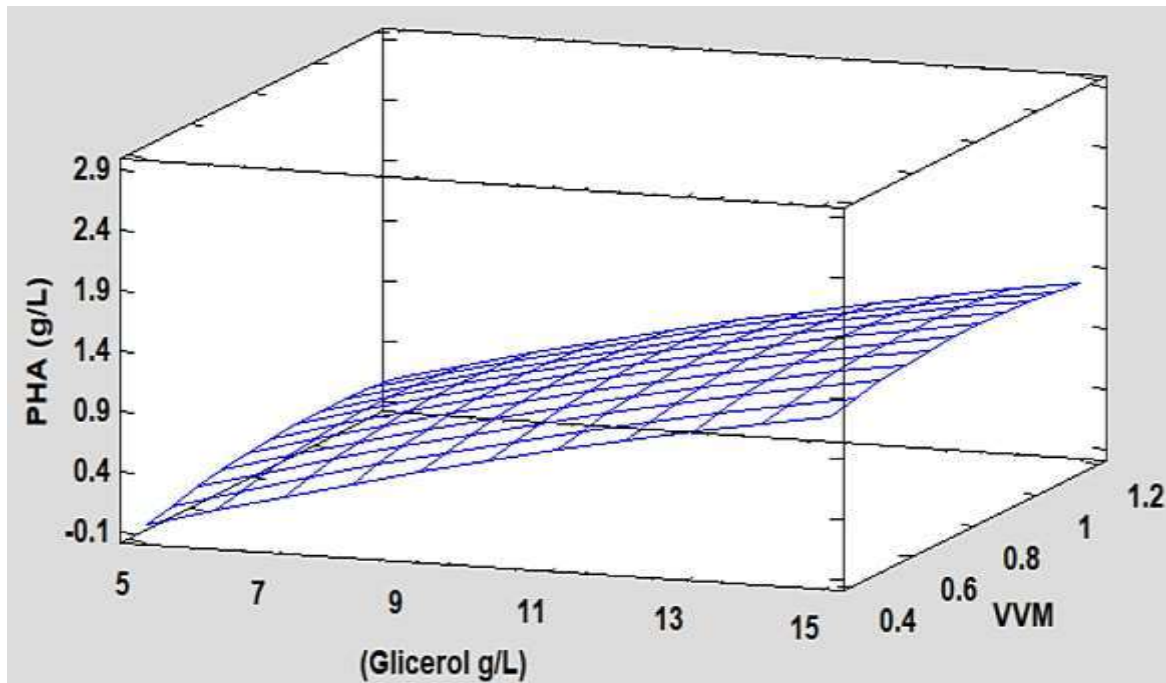


Figura 46. Gráfico de superficie de respuesta para la velocidad específica de crecimiento de *P. reptilivora* utilizando glucosa como fuente de carbono a nivel biorreactor.

El análisis ANOVA de la Figura 46 reporta valores de r^2 de 75.0774 % de la variabilidad en PHA y un error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es de 0.547497, la varianza tiene un valor superior al 75% por lo que el proceso de extracción puede ser ajustado a un modelo matemático para poder realizar la predicción bajo una ecuación matemática (Ecuación 8).

$$\begin{aligned}
 [PHA] = & 11.717 + (0.391125 * glicerol) - (2.70031 * VVM) \\
 & - (0.06521 * Agitación) - (0.00342 * glicerol^2) \\
 & - (0.01475 * glicerol * VVM) \\
 & - (0.0005 * glicerol * agitación) \qquad \qquad \qquad (Ecuación 8) \\
 & - (0.709375 * VVM^2) \\
 & + (0.0110583 * agitación * VVM) + (0.0000804889 \\
 & * agitación^2)
 \end{aligned}$$

Con base en todos los análisis previamente mencionados, se encontró el punto óptimo para maximizar la producción de PHA durante la fermentación, en la Tabla 31 se muestran las condiciones necesarias dentro de la región experimental. El valor óptimo de PHA que se obtendría al utilizar las condiciones obtenidas mediante la MSR sería de 2.2513 g/L.

Tabla 31. Condiciones óptimas de fermentación para maximizar la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Glicerol (g/L)	5.0	15.0	14.863
Agitación (rpm)	300.0	450.0	300.0
VVM	0.4	1.2	0.4

Se realizó una prueba confirmatoria de las mejores condiciones para la producción de PHA. En la Figura 47 se observan las variables cuantificadas por las distintas determinaciones. El

valor máximo de PHA cuantificados fue de 2.282 g/L, el cual fue ligeramente mayor que el cuantificado por la producción,

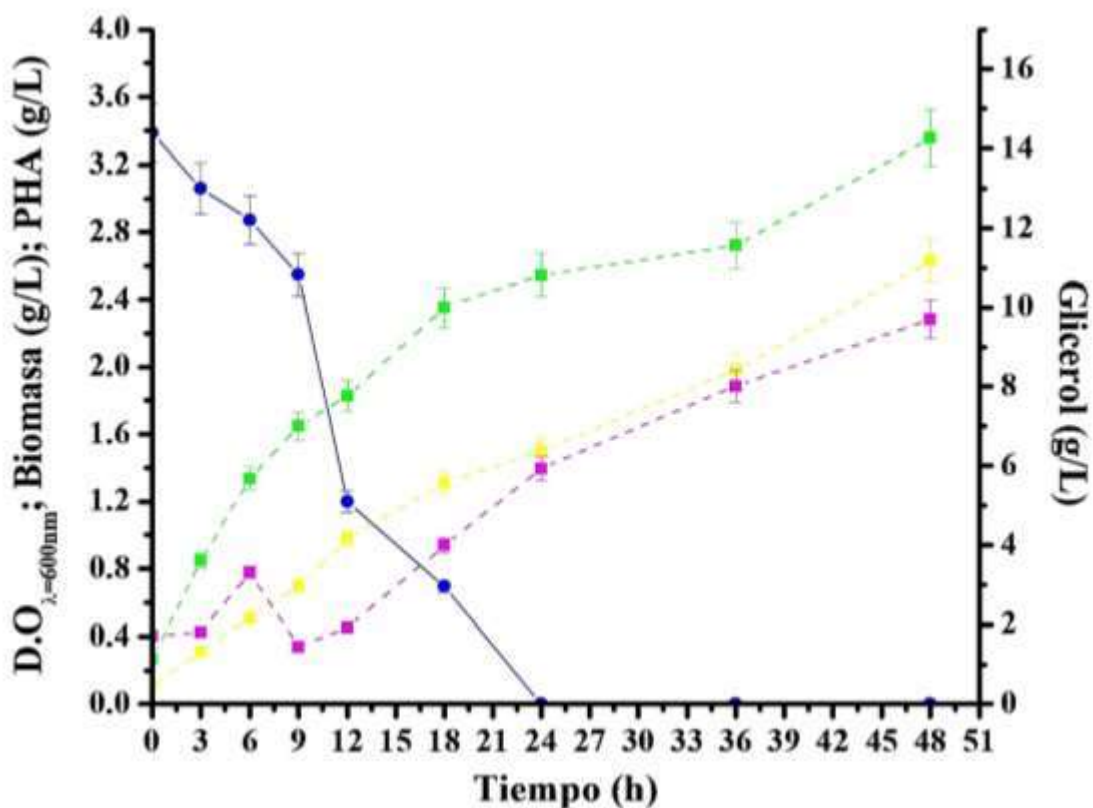


Figura 47. Tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación y variables cuantificadas durante la fermentación (■ D.O. ■ Biomasa (g/L) ■ PHA (g/L) ● Glicerol (g/L))

En la Tabla 32 se observa un resumen de los distintos tratamientos experimentales y los valores obtenidos para cada una de las variables de respuesta involucradas.

Tabla 32. Resumen de la matriz experimental realizada y resultados de las variables de respuesta utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

VARIABLES DE ESTUDIO		
Variables	Límite superior	Límite inferior
Glicerol (g/L)	15	5
Agitación (rpm)	300	450

VVM	0.4		1.2			
MATRIZ EXPERIMENTAL						
Tratamiento experimental	Glicerol (g/L)	Agitación (rpm)	Aireación (VVM)	PHA (g/L)	Biomasa (g/L)	μ (h⁻¹)
T1	10	0.8	375	1.096	2.34	0.1621
T2	5	0.4	375	0.259	1.48	0.1826
T3	15	1.2	375	0.972	2.4	0.2511
T4	15	0.4	375	1.048	2.74	0.1896
T5	10	0.4	300	1.195	0.83	0.1591
T6	10	0.4	450	0.892	2.26	0.2452
T7	5	0.8	300	0.507	1.1	0.2164
T8	10	0.8	375	0.299	2.52	0.172
T9	10	0.8	375	1.137	2.25	0.1233
T10	15	0.8	450	1.537	2.71	0.1481
T11	5	1.2	375	0.301	1.98	0.1481
T12	15	0.8	300	2.589	2.84	0.1033
T13	10	1.2	450	1.835	3.44	0.1958
T14	10	1.2	300	0.811	2.71	0.2292
T15	5	0.8	450	0.212	0.49	0.0844

En la Tabla 33 se muestran los parámetros cinéticos calculados para cada uno de los tratamientos experimentales. El mayor $Y_{X/S}$ se obtuvo en el T11 (0.4053), el mayor $Y_{P/S}$ se obtuvo en el T13 (0.1774) y la mayor productividad se obtuvo en el T12 con un valor de $0.0539 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, la cual es significativamente mayor a la reportada por Gómez – Cardozo *et al.*, 2020; $0.0295 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ empleando un biorreactor de 5 L y $0.0356 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ empleando un biorreactor de 14 L. Por su parte, Liu *et al.*, 2018 empleando a la especie *Pseudomonas mosselii* TO7 reportaron una productividad de $0.01316 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, la cual también es inferior a la obtenida en el T13.

Tabla 33. Parámetros cinéticos para cada uno de los tratamientos experimentales de la producción de PHA por *P. reptilivora* utilizando glicerol como fuente de carbono a nivel biorreactor.

	$\mu(\text{h}^{-1})$	T_d (h)	$\delta(\text{h})$	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Productividad $\text{g/L} \cdot \text{h}$
T1	0.1622	4.2736	6.1655	0.2599	0.0683	0.0228
T2	0.1826	3.7970	5.4778	0.3338	0	0.0054
T3	0.2511	2.7608	3.9830	0.1864	0.0659	0.0203
T4	0.1896	3.6557	5.2741	0.2542	0.0903	0.0218
T5	0.1591	4.3556	6.2838	0.0828	0.1162	0.0249
T6	0.2452	2.8265	4.0778	0.3818	0.1093	0.0186
T7	0.2164	3.2028	4.6207	0.2829	0.1587	0.0106
T8	0.1720	4.0303	5.8144	0.2275	0	0.0062
T9	0.1233	5.6205	8.1087	0.2417	0.0953	0.0237
T10	0.1481	4.6801	6.7520	0.1718	0.0931	0.0320
T11	0.1481	4.6801	6.7520	0.4053	0.0211	0.0063
T12	0.1033	6.7120	9.6834	0.1786	0.1308	0.0539
T13	0.1958	3.5399	5.1070	0.3419	0.1774	0.0382
T14	0.2292	3.0244	4.3633	0.2760	0.0532	0.0169
T15	0.0845	8.2047	11.8369	0.0779	0.0098	0.0044

5. CONCLUSIONES

- El establecimiento y desarrollo del diseño experimental de cribado 2^2 permitió obtener los PHA a través de fermentación y establecer los rangos de operación a implementar en la MSR. Las mejores condiciones a nivel matraz para la producción de PHA utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono fueron 20 g/L de glucosa, 10 g/L de glicerol y 1 g/L de sulfato de amonio para ambas.
- El establecimiento y desarrollo de la MSR *Box Behnken* permitió obtener los PHA a través de fermentación, así como evaluar el efecto de la concentración de glucosa y glicerol, agitación y aireación sobre la producción de los PHA a través del desarrollo de los tratamientos experimentales.
- Las productividades máximas de PHA utilizando glucosa y glicerol como fuente de carbono fueron de $0.0370 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ y $0.0539 \text{ g/L} \cdot \text{h}$, respectivamente. Al realizar el análisis estadístico de resultados se encontraron las mejores condiciones para la producción de PHA, las cuales empleando glucosa como fuente de carbono fueron 35.1677 g/L de glucosa, 449 rpm y 0.4 L/min de aire. Empleando glicerol como fuente de carbono fueron 13.485 g/L de glicerol, 390 rpm y 1.2 L/min de aire. Siguiendo las mejores condiciones proporcionadas por la MSR se obtuvieron producciones mayores de PHA a las obtenidas, alcanzando un máximo de 1.757 g/L utilizando glucosa como fuente de carbono y 2.282 g/L empleando glicerol como fuente de carbono.

6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Se recomienda buscar otra alternativa al método de extracción de PHA debido a los solventes que se emplean en el método planteado, además, al realizar la técnica hay posibilidad de pérdida en las muestras extraídas.

Sería conveniente utilizar un método de cuantificación que permita distinguir los tipos de mcl-PHA que están presentes en las muestras extraídas.

Dado que se confirmó que la bacteria puede producir los PHA, se recomienda utilizar otras fuentes de carbono, por ejemplo, residuos de biodiesel o algún desecho orgánico.

7. REFERENCIAS

- Abid, S., Raza, Z. A & Hussain, T. (2016). Production kinetics of polyhydroxyalkanoates by using *Pseudomonas aeruginosa* gamma ray mutant strain EBN-8 cultured on soybean oil. *3 Biotech.*, 6(2):142. DOI: <https://10.1007/s13205-016-0452-4>.
- Akram, R. Y. & Ithar, K. A. M. (2021). Study of the fermentation conditions of the *Bacillus Cereus* strain ARY73 to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) from glucose. *Journal of Ecological Engineering*. 22(8), 41-53. DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/140326>.
- Alexander, G. M., Realpe, D. M. & García, C. J. (2021). Obtención polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión. *Informador Técnico*, 86(1), 111 - 135. DOI: <https://doi.org/10.23850/22565035.3692>.
- Aldana, A. D. (2022). Contaminación por microplásticos. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 73(2), 6-7.
- Álvarez da Silva, L. (2016). *Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos* [Tesis de Grado, Universidad de Sevilla].
- Andler, R. & Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias Technological and market aspects of microbial bioplastics production. *Ingenerare*. 27(1), 27-29.
- Andler, R., Vivod, R., & Steinbüchel, A. (2018). Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1-6. DOI: <https://doi:10.1016/j.jbiosc.2018.08.015> .
- Babel W. & Steinbüchel A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in Biochemistry. *Engineering. Biotechnology*. 1, 342.
- Baeza, N. R. C. (2011). Obtención de Polihidroxialcanoatos (PHA) como subproducto de un sistema de tratamiento de biomasa adherida y su incidencia en la eliminación de compuestos disruptores endocrinos presentes en efluentes de la industria papelera [Tesis de Grado, Universidad de Concepción].

Banacore, A. (2014). Estudio de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono [Tesis de Grado, Universidad de la República de Uruguay].

Borrero-de Acuña, J. M., Rohde, M., Saldias, C., & Poblete-Castro, I. (2021). Fed-batch mcl-polyhydroxyalkanoates production in *Pseudomonas putida* KT2440 and Δ phaZ mutant on biodiesel-derived crude glycerol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 642023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.642023>

Brandl, H., & Gil, D. B. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxitirato. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(2), 10-18. ISSN: 0138-6204.

Becerra, J. M. L. (2013). Producción de un polímero tipo polihidroxicanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia].

Buteler, M. (2019). “El problema del plástico, ¿Qué es la contaminación por plástico y por qué nos afecta a todos?”. *Desde la Patagonia Difundiendo Saberes*, 16(28), 56-60. ISSN: 1668-8848.

Cardozo, J. R. G., Bucheli, R. V., Pareja, N. M., Villadiego, O. S. R., Londoño, G. A. C., & Martínez, A. L. M. (2020). Producción por lote alimentado y caracterización de polihidroxitirato por *Bacillus megaterium* LVN01 a partir de glicerol residual/Fed-batch production and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium* LVN01 from residual glycerol. *Dyna*, 87(214), 111. DOI: <https://10.15446/dyna.v87n214.83523>

Chandrika, S. P., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Hossain M. Z. & Qi, X. (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>.

Chávez, M. G. J. & Alanis, G. D. B. (2018). Producción de polihidroxicanoatos a partir de aceite de canola residual y *Cupriavidus necator* [Tesis de Grado, Instituto Tecnológico de Morelia].

Chobchuenchom, W., & Tanadchangsaeng, N. (2019). Production of medium chain length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* ATCC47054 using glycerol and sodium octanoate as substrates. *In Proceedings of the RSU International Research Conference*, Riga, Latvia (pp. 1-3).

De Almeida, A., Ruiz, J. A., López, N. I., & Pettinari, M. J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva*, 3(3), 122-133. ISSN 1666-7948.

De Eugenio, M. L. I. (2009). Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: Aplicaciones biotecnológicas [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].

Delgado, A. C. L. & Cordoba, A. M. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1), 83-101. DOI: <https://doi.org/10.23850/22565035.139>.

De Meneses, L., Pereira, J. R., Sevrin, C., Grandfils, C., Paiva, A., Reis, M. A., & Freitas, F. (2020). *Pseudomonas chlororaphis* as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. *New biotechnology*, 55, 84-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.002>

Domínguez, J. D., & Tostado, E. C. (2016). *Diseño de experimentos: estrategias y análisis en ciencias e ingenierías*. Alpha Editorial.

Escapa, I. F., García, J. L., Bühler, B., Blank, L. M., & Prieto, M. A. (2012). The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 14(4), 1049–1063. DOI: <https://10.1111/j.1462-2920.2011.02684.x>

Fernández Escapa, I. (2012). Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid].

Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5

dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50. ISSN 0138-6204.

González, F. T. (2017). Estudio de la dinámica poblacional de microorganismos silvestres degradadores y/o fermentadores de carbohidratos para la producción de bioetanol [Tesis doctoral, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco].

González, G. Y., Meza, C. J. C., González, R. O. & Córdova, L. J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115. ISSN 0188-4999.

Gutiérrez Pulido, H. (2012). Análisis y diseño de experimentos.

Jara, R. I. G. Y. & Tafur, G. J. (2015). Rendimiento de polihidroxicanoatos de *Azotobacter spp.* aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays L.* en Lambayaque, agosto-octubre, 2014 [Tesis de Grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo].

Kanavaki, I., Drakonaki, A., Geladas, E., Spyros, A., Xie, H. & Tsiotis, G. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Pseudomonas sp. phDVI* strain grown on phenol as carbon sources. *Microorganisms*, 9(8). DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636>.

Kang, D. K., Lee, C. R., Lee, S. H., Bae, J. H., Park, Y. K., Rhee, Y. H. & Sohn, J. H. (2017). Production of Polyhydroxyalkanoates from Sludge Palm Oil Using *Pseudomonas putida S12*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5). DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1612.12031>.

Kosseva, M. R. & Rusbandi, E. (2018). Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 107(A), 762-778. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>.

Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18(3), 252-255. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.005>.

Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhanian, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary

metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566. <http://doi:10.1016/j.biortech.2020.124>

Lascu, I.; Tánase, A.M.; Jablonski, P.; Chiciudean, I.; Preda, M.I.; Avramescu, S.; Irgum, K.; Stoica, I. (2022). Revealing the Phenotypic and Genomic Background for PHA Production from Rapeseed-Biodiesel Crude Glycerol Using *Photobacterium ganghwense* C2.2. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13754. <https://doi.org/10.3390/ijms23221375>

Licciardello, G., Catara, A. F., & Catara, V. (2019). Production of polyhydroxyalkanoates and extracellular products using *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*: A review. *Bioengineering*, 6(4), 105. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040105>

Luo, S., Grubb, D. T., & Netravali, A. N. (2002). The effect of molecular weight on the lamellar structure, thermal and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerates). *Polymer*, 43(15), 4159–4166. DOI: [https://doi:10.1016/s0032-3861\(02\)00242-2](https://doi:10.1016/s0032-3861(02)00242-2)

Markou, G.; Kougia, E.; Kefalogianni, I.; Tsagou, V.; Arapoglou, D.; Chatzipavlidis, I. (2019). Effect of Glycerol Concentration and Light Intensity on Growth and Biochemical Composition of *Arthrospira (Spirulina) Platensis*: A Study in Semi-Continuous Mode with Non-Aseptic Conditions. *Appl. Sci.* 9, 4703. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9214703> .

Mato, A., Blanco, F. G., Maestro, B., Sanz, J. M., Pérez-Gil, J., & Prieto, M. A. (2020). Dissecting the polyhydroxyalkanoate-binding domain of the phaf phasin: rational design of a minimized affinity TAG. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12). DOI: <https://doi:10.1128/aem.00570-20>.

Mohanrasu, K., Rao, R. G. R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Prakash, G. S., Song, D.-P., ... Arun, A. (2020). Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel*, 271, 117522. DOI: <https://doi:10.1016/j.fuel.2020.117522>

Mohd Zain, N. F., Paramasivam, M., Tan, J. S., Lim, V., & Lee, C. K. (2021). Response surface methodology optimization of polyhydroxyalkanoate production by *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol from palm oil-based biodiesel production. *Biotechnology Progress*, 37(1), e3077. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.3077>

Molina, V. J. P. (2016). *Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHAS)* [Tesis Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.]

Mota, M. J., Lopes, R. P., Simões, M. M. Q., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2019). Effect of High Pressure on *Paracoccus denitrificans* Growth and Polyhydroxyalkanoates Production from Glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI: <https://doi:10.1007/s12010-018-02949-0>

Mozejko, C. J., Szacherska, K. & Marciniak, P. (2019). *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and The Environment*, 27(6), 1151-1166. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>.

Muhammadi, S., Afzal, M. & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties, and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4): 56-77. DOI: <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>.

Narayankumar, S., Shaji, K. N. & Krishnaswamy, V. G. (2019). Polyhydroxybutyrate production by *Bacillus marcorestinctum* using a Cheaper substrate and its electrospinned blends with polymer. *BioRxiv The Preprint Server for Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1101/680124>.

Noorfarisya, I. J., Nurul, M.R., Peng, C., Rokiah, H., Mohamad, H., Mazlan, I., Seng, T., Takamitsu, A., Kumar, S. & Akihiko, K. (2022). Potential of polyhydroxialkanoate and nanocellulose from oil palm trunk as raw materials for additive manufacturing: A review. *Polymer Composites*; 0(0), 1-15. DOI: <https://10.1002/pc.27034>

Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process*. *Environmental & Clean Technology*, 82(3), 233-247. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.

Rebocho, A. T., Pereira, J. R., Freitas, F., Neves, L. A., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C. & Reis, M. A. (2019). Producción de polihidroxicanoatos de longitud de cadena media

por *Pseudomonas citronellolis* cultivada en desechos de pulpa de manzana. *Biotecnología Aplicada a los Alimentos*. 6 (1), 71-82. DOI: <https://doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

Riaño, J. Y. S. (2010). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa*, 5(2), 79-84. ISSN-e 1900-9380

Ribeiro, P. L. L., de Souza Silva, G., & Druzian, J. I. (2015). Evaluation of the effects of crude glycerol on the production and properties of novel polyhydroxyalkanoate copolymers containing high 11-hydroxyoctadecanoate by *Cupriavidus necator* IPT 029 and *Bacillus megaterium* IPT 429. *Polymers for Advanced Technologies*, 27(4), 542–549. DOI: <https://doi:10.1002/pat.3725>

Rodríguez, D. I. & Prieto, J. A. (2019). Producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de ácidos grasos en *Pseudomonas putida* KT2440: optimización del proceso y cambio de escala en biorreactor tipo tanque agitado [Tesis de Grado, Universidad Politécnica de Madrid].

Rodríguez, G. O., Ábalos, R. A. & Cabrera, G. J. G. (2022). Producción simultánea de ramnolípidos y polihidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* ORA9. *Revista Cubana de Química*, 34(3), 445-461. E-ISSN: 2224-5421.

Romero, S. E. G., Bustos, D. C. G., Marín, A. M. H., Rodríguez, C. Z. H., Casallas, M. L., & Vargas, P. C. M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76-84. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.398>

Schmaltz, E., Melvin, E., Diana, Z., Gunady, E., Rittschof, D., Somarelli, J., Virdin, J. & Dunphy-Daly, M. (2020). Plastic pollution solutions: emerging technologies to prevent and collect marine plastic pollution. *Environment International*, 144. ISSN: 0160 – 4120.

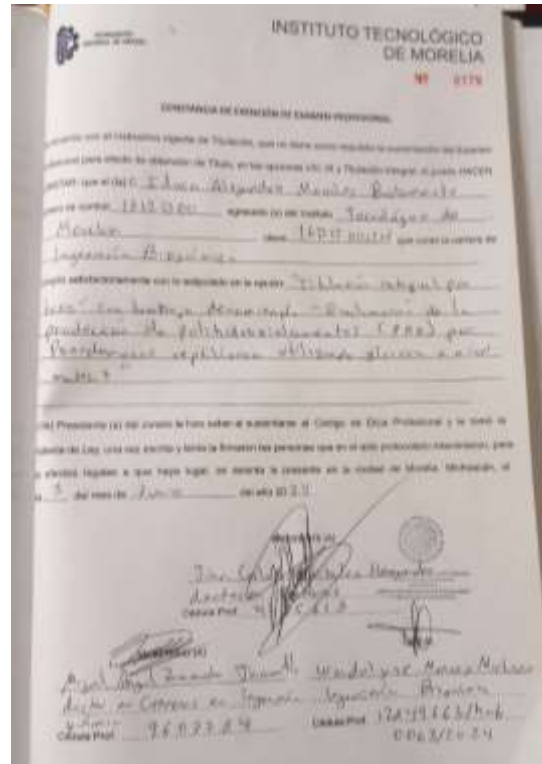
Sehgal, R. & Gupta, R. (2020). Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech*, 10(12):549. DOI: <https://10.1007/s13205-020-02550-5>.

- Shen, M., Song, B., Zeng, G., Zhang, Y., Huang, W., Wen, X. & Tang, W. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?. *Environmental Pollution*, 263(A). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469> .
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Singh, S., Sithole, B., Lekha, P., Permaul, K., & Govinden, R. (2021). Optimization of cultivation medium and cyclic fed-batch fermentation strategy for enhanced polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus thuringiensis* using a glucose-rich hydrolyzate. *Bioresources and Bioprocessing*, 8, 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00361-x>
- Slepecky, R. A., & Law, J. H. (1960). A Rapid Spectrophotometric Assay of Alpha, Beta-Unsaturated Acids and Beta-Hydroxy Acids. *Analytical Chemistry*, 32(12), 1697–1699. DOI: <https://10.1021/ac60168a046>.
- Vanegas, D. M, & Ramírez, M. E. (2016). Correlation of *Pseudomonas fluorescens* Growth in the Production of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates (PHA MCL) by Gompertz, Logistic and Baranyi Primary Models. *Información tecnológica*, 27(2), 87-96. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000200011>.
- Xu, Z., Pan, C., Li, X., Hao, N., Zhang, T., Gaffrey, M. J., ... & Yang, B. (2021). Enhancement of polyhydroxyalkanoate production by co-feeding lignin derivatives with glycerol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01861-2>.
- Yegin, S., Saha, B. C., Kennedy, G. J., Berhow, M. A., & Vermillion, K. (2020). Efficient bioconversion of waste bread into 2-keto-d-gluconic acid by *Pseudomonas reptilivora* NRRL B-6. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10, 545-553. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00656-7>
- Zambrano, C. H. & Riera, M. A. (2021). Desafío de los polihidroxicanoatos como solución al problema de los plásticos de un solo uso. *Publicaciones en Ciencias y Tecnología*, 15(1), 15-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.30750.25923> .

Zhuang, Q., Wang, Q., Liang, Q., & Qi, Q. (2014). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid β -oxidation cycle in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 24, 78–86. DOI: <https://10.1016/j.ymben.2014.05.004>

8. ANEXOS

ANEXO 1



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MORELIA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOQUÍMICA

TITULACIÓN INTEGRAL POR TESIS

**"Evaluación de la producción de polihidroxicarbonatos (PHA) por
Pseudomonas repressile utilizando glucosa a nivel matraz"**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero Bioquímico

PRESENTAN(TE):

EDWIN ALEJANDRO MORALES BUSTAMANTE

ASESOR:

D.C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

CO-ASESORA:

LB.Q. WENDOLYNE MONROY MARTÍNEZ

MORELIA, MICHOACÁN

ABRIL, 2024



EL GOBIERNO DEL ESTADO DE MICHOACÁN, A TRAVÉS DEL
INSTITUTO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN
OTORGAN LA PRESENTE:

CONSTANCIA

EDWIN ALEJANDRO MORALES BUSTAMANTE; WENDOLYNE MONROY-MARTÍNEZ

A: POR LA EXPOSICIÓN DE SU PONENCIA EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) UTILIZANDO GLUCOSA/SULFATO DE AMONIO A NIVEL
MATRAZ. EN EL ÁREA 1: CIENCIAS NATURALES Y DE MATERIALES DEL 12^o ENCUENTRO DE JÓVENES
INVESTIGADORES DEL ESTADO DE MICHOACÁN

TRABAJO ASESORADO POR: MA. DEL CARMEN CHÁVEZ-PARGA; JUAN CARLOS GONZÁLEZ-
HERNÁNDEZ

EN EL MARCO DE LAS ACTIVIDADES ACADÉMICAS DEL



y el



MORELIA, MICHOACÁN; A 6 DE OCTUBRE DE 2023

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA
DIRECTORA GENERAL DEL INSTITUTO DE CIENCIA,
TECNOLOGÍA E INNOVACION DEL ESTADO DE MICHOACÁN





Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo Facultad de Ingeniería Química



La División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Otorga el presente: **RECONOCIMIENTO**

**A: Wendolyne Monroy-Martínez, Ma. del Carmen Chávez-Parga,
Juan Carlos González-Hernández**

Por la presentación del trabajo: **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN
DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Pseudomonas reptilivora* B-6bs
UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO EN UN
BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO**

en la Modalidad de **Presentación Oral**

ID: 12

VI Coloquio Internacional en Ingeniería Química

“El impacto de la Inteligencia Artificial en el Desarrollo de la Ingeniería Química”

Morelia, Michoacán, México. 15 y 16 de julio de 2024.

Dr. Rafael Maya Yescas
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga
Presidenta del Comité Organizador



ANEXO 2

A continuación, se muestran las curvas patrón empleadas en las determinaciones espectrofotométricas, a lo largo de la experimentación se realizaron diversas curvas, debido a esto se añade una muestra representativa.

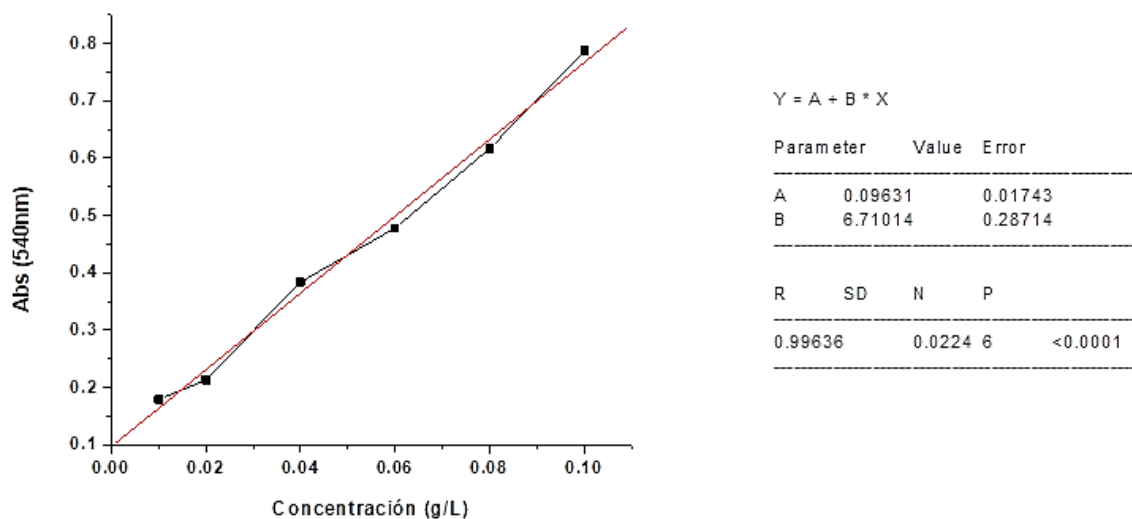


Figura 48. Curva patrón para la cuantificación de glucosa mediante el método de DNS.

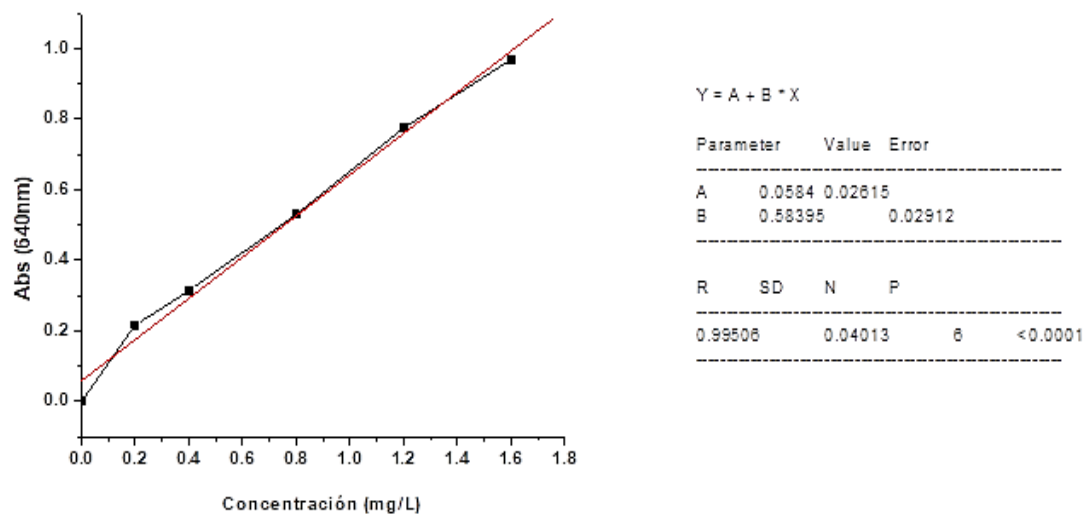


Figura 49. Curva patrón para la cuantificación de nitrógeno mediante la técnica de Berthelot.

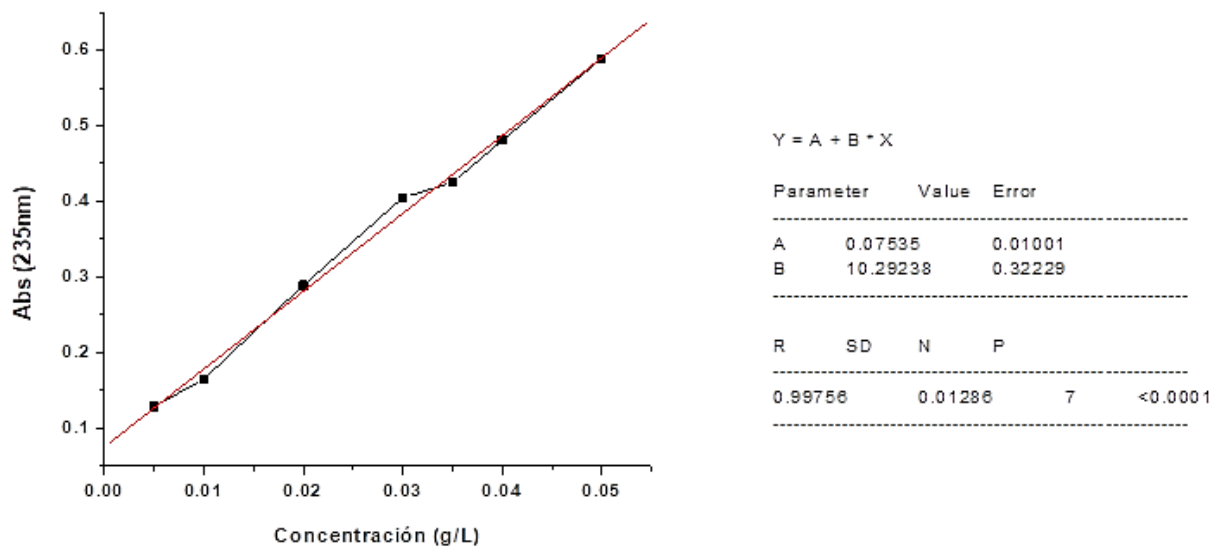
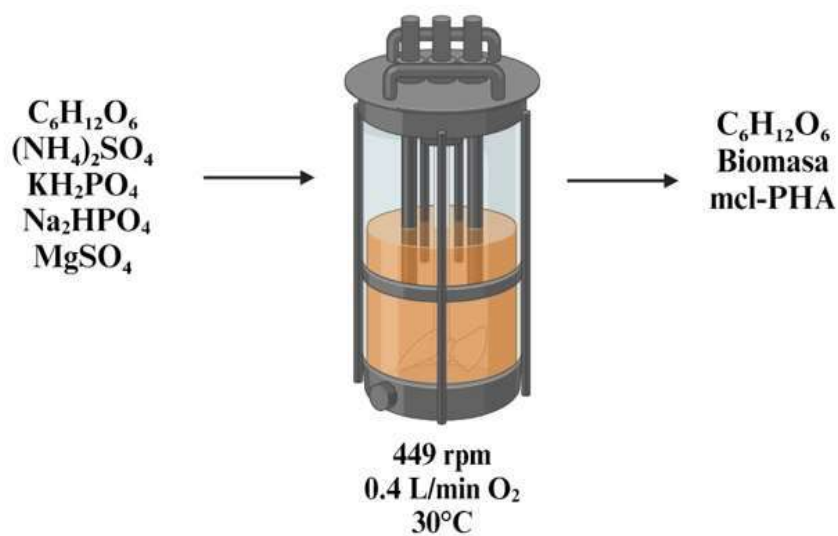


Figura 50. Curva patrón para la cuantificación de PHA mediante la conversión a ácido crotonico.

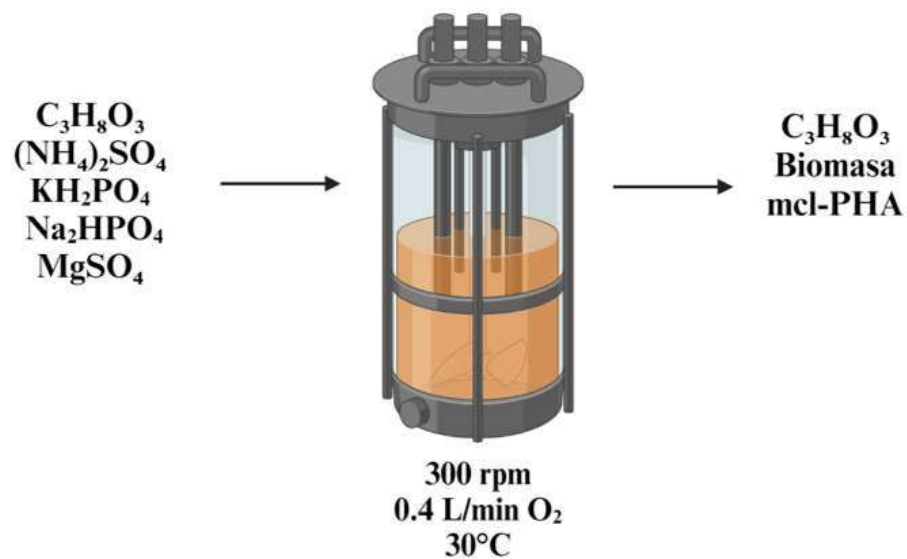
ANEXO 3

Se realizaron los balances de masa para los tratamientos de las mejores condiciones de fermentación.



ENTRADA			SALIDA		
Formula molecular	Compuesto	Concentración (g/L)	Formula molecular	Compuesto	Concentración (g/L)
$C_6H_{12}O_6$	Glucosa	35.16	$C_6H_{12}O_6$	Glucosa	21.98
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio	1	---	Biomasa	1.72
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico	1.5	---	mcl-PHA	1.757
Na_2HPO_4	Fosfato de disódio	16.65			
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio	0.3			

Figura 51. Balance de masa del tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación utilizando glucosa como fuente de carbono; 35.16 g/L glucosa, 449 rpm y 0.4 L/min O_2 .



ENTRADA			SALIDA		
Formula molecular	Compuesto	Concentración (g/L)	Formula molecular	Compuesto	Concentración (g/L)
$C_3H_8O_3$	Glicerol	14.86	$C_3H_8O_3$	Glicerol	21.98
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio	1	---	Biomasa	2.63
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico	1.5	---	mcl-PHA	2.282
Na_2HPO_4	Fosfato de disódio	16.65			
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio	0.3			

Figura 52. Balance de masa del tratamiento realizado bajo las mejores condiciones de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono; 14.86 g/L glicerol, 300 rpm y 0.4 L/min O_2 .