

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**“OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)
POR *BREVIBACTERIUM HALOTOLERANS* EMPLEANDO SUERO DE LECHE
DERIVADO DE LA PRODUCCIÓN DE QUESO COMO SUSTRATO”**

PRESENTA

QFB. BELEM LORELAY LÓPEZ GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

OCTUBRE, 2017



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



Tesis

**“Optimización de la producción de polihidroxiclcanoato (PHA) por
Brevibacterium halotolerans empleando suero de leche derivado de la
producción de queso como sustrato”**

Presenta

QFB. Belem Lorelay López González

**Como requisito para obtener el Grado de Maestría en Ciencias
con Orientación en Microbiología Aplicada**

Director

PhD. Juan Francisco Villarreal Chiu

Índice

Resumen.....	3
Abreviaciones y símbolos usados.....	4
Introducción.....	6
Antecedentes.....	10
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos y metas.....	14
Materiales.....	16
Estrategia general del proyecto.....	18
Metodología.....	19
Resultados y discusión.....	26
Conclusiones.....	50
Perspectivas.....	51
Referencias.....	52

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Nombre: Q.F.B. Belem Lorelay López González

Octubre, 2017

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

Número de páginas: 54

Área de estudio: Microbiología Ambiental Aplicada

“Optimización de la producción de polihidroxialcanoato por *Brevibacterium halotolerans* utilizando suero de leche derivado de la producción de queso como sustrato”

Propósito y método de estudio:

Con base en la problemática actual de contaminación por plásticos, se buscó una alternativa para atacar el problema: los biopolímeros. Dentro de este grupo, los más importante son los polihidroxialcanoatos (PHA).

Los PHA son biopolímeros producidos intracelularmente en microorganismos eucariotas y procariotas en forma de carboxomas. Se acumulan intracelularmente como reserva de energía y ante un estrés nutricional con altas fuentes de carbono.

En busca de su síntesis, en trabajos previos se realizó un *screening* de fuentes de carbono y microorganismos que lo produjeran, hallando que el suero de leche podría servir como sustrato para la producción de PHA por *B. halotolerans*. Nuestro trabajo consistió en optimizar las condiciones de síntesis de PHA por medio de un DOE Box-Behnken.

Conclusiones y contribuciones:

Se obtuvo PHA del tipo PHBV con un rendimiento del 0.169% bajo las siguientes condiciones: 28°C, 15% de inóculo y 20% de NaCl con una respuesta de 4.6298 g. El biopolímero obtenido se caracterizó por FT-IR, ¹³CRMN, CPG y TGA-DSC.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

BaCl ₂	Cloruro de Bario
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
CGP	Cromatografía de permeación en gel
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
FT-IR	Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier
g	Gramos
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ITESM	Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey
kTon	Kilotoneladas
Min	Minutos
mL	Mililitros
MT	Millones de toneladas
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
PET	Tereftalato de polietileno
pH	Potencial de Hidrógeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
TGA-DSC	Análisis termogravimétrico-calorimetría diferencial de barrido
THF	Tetrahidrofurano
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
kDa	Kilo Daltones
M _w	Peso molecular en promedio de peso
M _n	Peso molecular en promedio de número
MHz	Mega Hertz
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa

ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Citrato
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Indol
VP	Voges-Proskauer
GEL	Gelatinasa
GLU	Glucosa
MAN	Manitol
PHB	Polihidroxi butirato
PHBV	Polihidroxi butirato-valerato
INO	Inositol
SOR	Sorbitol
RHA	Ramnosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melobiosa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa
ScI-PHA	Polihidroxi alcanoato de cadena corta
mcl-PHA	Polihidroxi alcanoato de cadena media
P	Fósforo
N	Nitrógeno
O	Oxígeno
TCS	Tripticaseína de soya
DOE	Diseño de experimentos

INTRODUCCIÓN

Los polímeros se componen de largas moléculas compuestas de pequeñas unidades llamadas “monómeros” que se obtienen del procesamiento de productos naturales o mediante la síntesis de materiales primarios del aceite, gas o carbón.

Lo que diferencia a un plástico de un polímero es la adición de aditivos que le favorecen para obtener ciertas ventajas como lo son ligereza, elasticidad, resistencia a la fatiga, bajo coeficiente de fricción, aislamiento térmico, resistencia a la corrosión, economía y facilidad en su fabricación con respecto a otros materiales (Farshad 2006; Webb *et al.* 2013).

Los plásticos derivados del petróleo cada vez son más empleados en la industria, por lo que es difícil prescindir de ellos por su utilidad y por la importancia económica que tienen (Ortiz Hernández 2013; Webb *et al.* 2013). Dentro de los más utilizados se encuentra el tereftalato de polietileno (PET) que ha sido diseñado para resistir cambios ambientales como la foto-degradación, termo-degradación, degradación hidrolítica y la bio-degradación por microorganismos.

Debido a la gran demanda que tienen, se genera mucho residuo plástico que no puede ser reciclado lo que conlleva a una problemática de contaminación terrestre y marítima; tan solo en México se producen 800,000 Ton de PET cada año y solo el 15% se recicla. Por lo que existe un área de oportunidad en la investigación que es el desarrollo de biopolímeros que tengan semejanza en composición química y física con el PET pero que su vida promedio en el ambiente sea menor que la de los plásticos convencionales (Fujiwara Montelongo 2015).

El mercado de los biopolímeros se encuentra en pleno crecimiento, de tal forma que del año 2006 al 2012 la producción aumentó de 186 kTon a 545 kTon. Cerca del 90% de esta producción fue dedicada a la fabricación de envases (Koller *et al.* 2015). La sustitución gradual de los plásticos no biodegradables por los biopolímeros ayudará a disminuir la contaminación en el medio ambiente (Valero-Valdivieso *et al.* 2013).

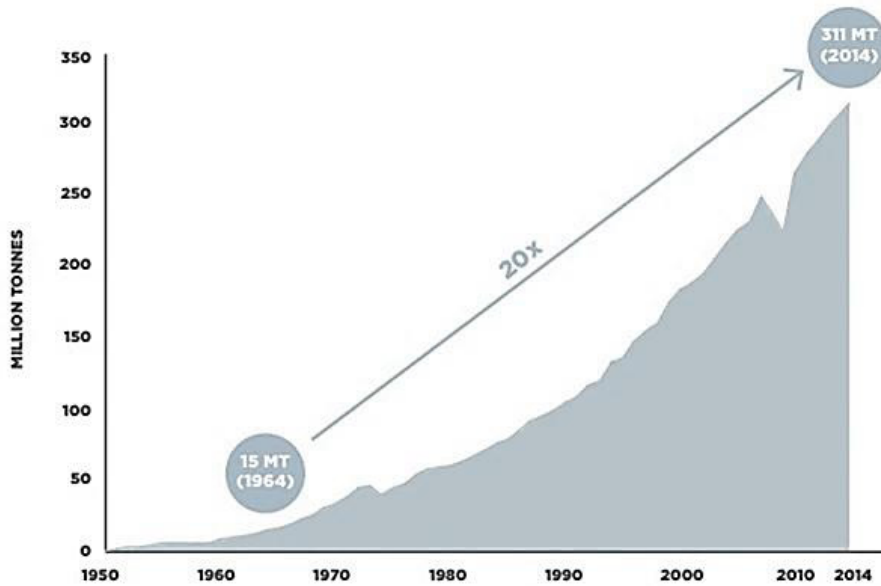


Figura 1. Muestra el aumento de producción de plástico desde 1950 hasta el 2014 en MT (Rodríguez 2016).

Dentro de las diferentes alternativas de biopolímeros que existen, se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA) los cuales son polímeros biodegradables con propiedades semejantes a los plásticos derivados del petróleo (Baikar *et al.* 2017). Se acumulan intracelularmente en forma de gránulos como reserva de energía (Catzin *et al.* 2014).

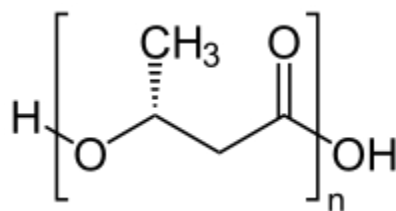


Figura 2. Estructura general de los PHA (Kahar *et al.* 2004).

Se hidrolizan por las enzimas polimerasas que son secretadas por la célula para adherirse a la superficie del polímero y convierten a los PHA en unidades de monómeros independientes.

Estudios recientes indican reportes de más de 150 monómeros de PHA descubiertos (Urtuvia *et al.* 2014) y se pueden clasificar en función al número de carbonos que conforman la cadena lateral en PHA-scl (3-5 carbonos), PHA-mcl (6-12 carbonos) e híbridos (González-García *et al.* 2013).

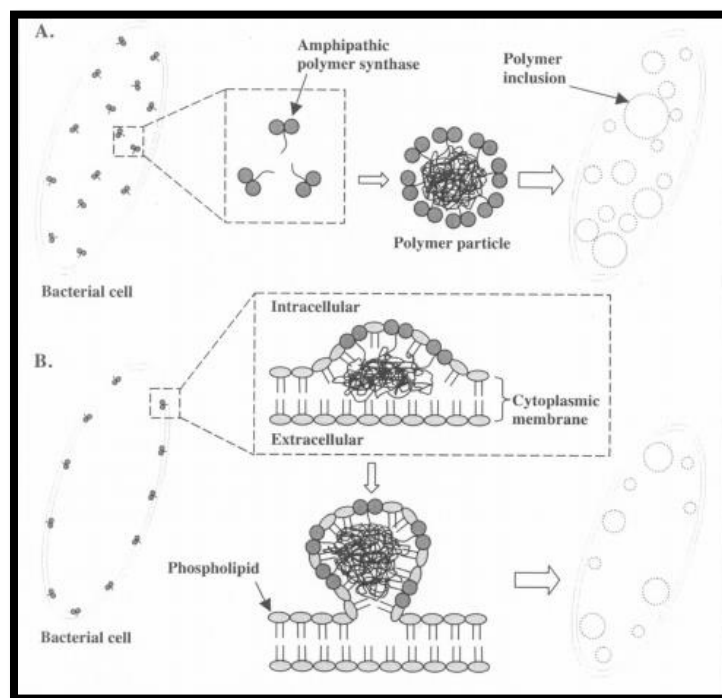


Figura 3. Formación general de gránulos de PHA en bacterias (Kumar and Abe 2010).

El PHB es el producido más comúnmente pero debido a su disminuido número de monómeros es rígido y quebradizo, por lo que se ha reportado la producción de mezclas de PHA, como lo es el PHBV y ha demostrado tener mejores propiedades mecánicas y térmicas para sustituir a los plásticos convencionales (Escapa 2012; González-García *et al.* 2013).

Debido a estas propiedades la producción de PHBV se realiza bajo condiciones limitadas de nutrientes pudiendo ser fósforo, nitrógeno u oxígeno, y con un exceso de suministro de fuente de carbono. Como su producción en la industria se realiza con cultivos microbianos y

fuentes de carbono puros, ha elevado el costo considerablemente comparado con los plásticos derivados del petróleo (Babel and Steinbüchel 2001).

Tabla 1. Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA en diferentes microorganismos (Babel and Steinbüchel 2001).

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	
<i>Rhizobium</i> ORS571	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Con el fin de economizar costos se han investigado diferentes subproductos y desechos de la industria del azúcar, del papel y del aceite, así como aguas residuales que puedan servir como un buen sustrato para la producción de PHA por su alto contenido de materia orgánica (Munir and Jamil 2015).

En cuanto a la industria láctea, el subproducto más abundante es el suero de leche que se obtiene a partir de la producción de queso. Por su alto contenido nutricional, podría ser un medio de cultivo selectivo aportando gran fuente de carbono para la producción de PHA (García-Garibay *et al.* 2004; Urribarrí *et al.* 2004).

El aprovechamiento del suero de leche se sugiere por ser un residuo de bajo costo que impacta de manera importante en la contaminación de suelo y mares; debido a las propiedades nutricionales que presenta, podría ser un sustrato óptimo para el desarrollo de *B. halotolerans* y acumular intracelularmente PHA.

ANTEDECENTES

Los polihidroxicanoatos son poliésteres de ácidos grasos hidroxilados que son almacenados intracelularmente por diferentes microorganismos procariotas, eucariotas y plantas modificadas genéticamente. Se han reportado más de 300 diferentes especies que tienen la habilidad de sintetizar PHA (Sakai et al. 2014; Kaur and Roy 2015; Balakrishna Pillai et al. 2017).

Los ácidos hidroxialcanoicos se polimerizan por acción de la enzima PHA-sintasa mediante la condensación del grupo carboxilo con el grupo hidroxilo del siguiente monómero, y es ahí cuando se forma el enlace éster. Es por esto, que se le conoce como biopoliésteres (Jacquel *et al.* 2008; González-García *et al.* 2013).

El componente monomérico mayor empleado por las bacterias de acuerdo con Cervantes-Uc (Cervantes-Uc *et al.* 2014) es el PHB pero se ha comprobado que tiene aplicaciones limitadas por sus propiedades rígidas y quebradizas.

Por tanto, las investigaciones han sido enfocadas en el estudio de co-polímeros que contengan monómeros como el 4-hidroxicloroato (4HV), entre otros como el 3-hidroxi-4-metilvalerato (3H4MV) con el fin de producir distintos tipos de PHA con diferentes propiedades fisicoquímicas y aplicaciones potenciales más amplias (Ng and Sudesh 2016).

Para producirlo existen numerosas investigaciones acerca de los sustratos y las fuentes de carbono utilizadas por los microorganismos capaces de producir PHA (Kumar and Abe 2010; Bugnicourt *et al.* 2014). Generalmente se dividen en tres categorías: monosacáridos (azúcares simples), triacilgliceroles e hidrocarburos. La mayoría de los microorganismos productores de PHA utilizan azúcares simples mientras que los triacilgliceroles y los hidrocarburos, de acuerdo a reportes, solo los pueden utilizar ciertos microorganismos (Jiang *et al.* 2016).

Entre los sustratos que destacan se encuentra el uso de aceites derivados de plantas (triacilgliceroles); de estos sustratos se ha visto que el aceite de palma muestra buenos

rendimientos pero el costo se incrementa debido a que se debe de comprar, por lo que se sugiere el uso de desechos industriales con el fin de disminuir costos en la producción (Sudesh *et al.* 2011; Thomas *et al.* 2013).

En México en el año 2014 se produjeron 4,440 Ton de queso los cuales generaron un residuo de 124,000 Ton de suero de leche en establecimientos grandes del sector privado y paraestatal (INEGI 2015). En el mundo se producen anualmente 120 millones Ton de suero de los cuales el 66% se produce en Estados Unidos de América, y el 25% en Norte América. En Lombardía, Italia, se producen alrededor de 3.3 millones de Ton de suero, que representa el 2.75% de la producción a nivel mundial (Colombo *et al.* 2016).

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, el cual es obtenido a partir de la producción del queso. El suero dulce proviene del queso panela, y el suero ácido del queso asadero. Debido a esto, mediante diferentes procesos se pueden obtener sus componentes como la proteína cruda (0.6%) y la lactosa (4.9%) (García-Garibay *et al.* 2004). Debido a su alto contenido nutricional, se podría emplear este residuo como un medio de cultivo selectivo para la producción de PHA (Urribarrí *et al.* 2004).

En México aún no se trabaja con el suero de leche para producir PHA, sin embargo, en Italia, Colombo logró producir PHA a partir de suero de leche esterilizado y fermentado en reactores tipo Batch utilizando una mezcla de microorganismos aislados de lodos activados obteniendo un resultado de 10.2 g/L de PHB. Así mismo, Gouveia reporta el cambio dinámico que tiene el pH en una fermentación acidogénica de suero de leche sobre la producción de PHA llegando a la conclusión que los productos de dicha fermentación y por ende, la producción del biopolímero, es constante a pH 6 y sugiere que variando dichas condiciones se puede mejorar (Gouveia *et al.* 2017).

Otro factor de importancia es el microorganismo empleado. La mayoría de los biopolímeros del tipo PHA se han producido por distintos microorganismos como por ejemplo Gram positivos tales como *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, etc., algunos Gram negativos como *Cupriavidus* y *Pseudomonas* y en cepas de arqueas como *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum* y

Haloferax; la mayoría de estos microorganismos producen PHB por lo que es importante buscar bacterias que puedan producir PHBV (Balakrishna Pillai *et al.* 2017).

La acumulación de PHA también se ha demostrado en microorganismos halófilos, sin embargo, sólo un número limitado de reportes acerca de ellos están disponibles. Algunos microorganismos halófilos mencionados en la literatura como productores de PHA son *Haloferax mediterranei*, *Halomonas boliviensis*, *Azotobacter vineladii*, *Escherichia coli* *Alcaligenes latus*, entre otros (Quillaguamán *et al.* 2010).

En estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología I, López-Ayala aisló una cepa halófila denominada 21D identificada como *Brevibacterium halotolerans* que produjo PHA con características muy similares al PET empleando soya como fuente de carbono, convirtiéndola en un microorganismo modelo de estudio (López-Ayala 2016). Aprovechando este microorganismo con suero de leche como sustrato, se podría disminuir costos en la producción de PHA al eliminar la esterilización en el proceso.

Brevibacterium es un género Gram-positivo que fue establecido en 1953 por Breed. Una especie de este género, *B. halotolerans*, fue descrita por primera vez por Delaporte y Sasson, aislada de aceite de Marruecos (Ben-Gad and Gerchman 2017). Tiene reporte de 5 cepas conocidas, y 2 secuencias de nucleótidos (GCOM 2017). No se conoce su vía de biosíntesis, sin embargo, al ser miembro de la familia *Bacillaceae* se puede inferir que toma la ruta metabólica por carbohidratos como los *Bacillus*.

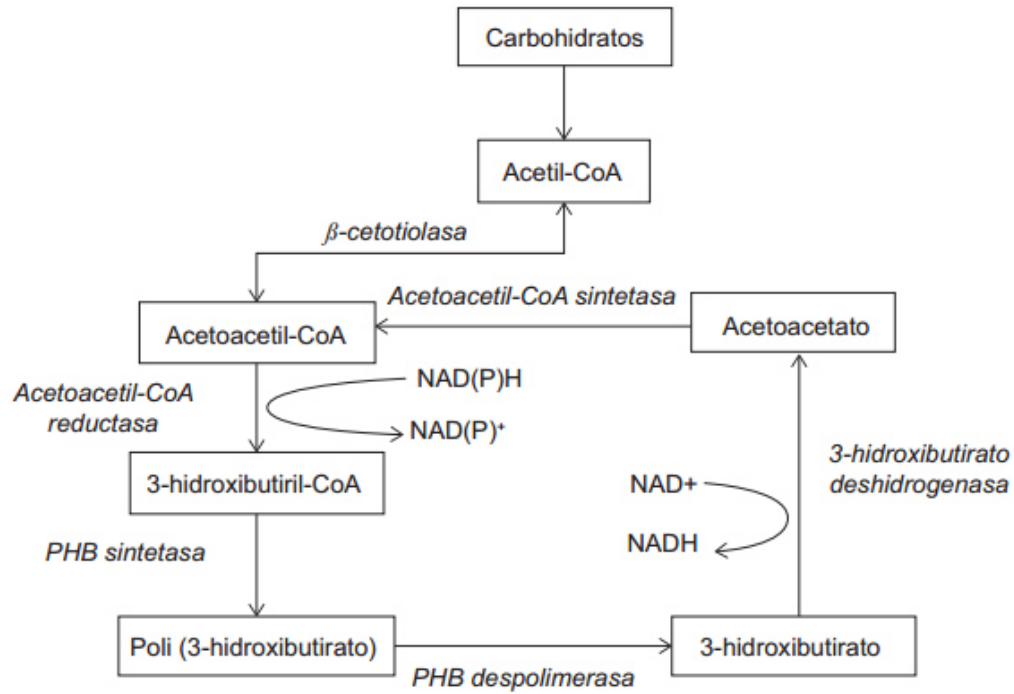


Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de PHA a partir de carbohidratos (Babel and Steinbüchel 2001).

Tomando en cuenta todos los factores para la producción de PHA como lo es la fuente de carbono, el microorganismo y el sustrato a utilizar, se deben optimizar para llegar a un punto máximo de producción.

HIPÓTESIS

El suero de leche servirá como un buen sustrato para la producción de PHA por *B. halotolerans*.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de PHA por *B. halotolerans* mediante un diseño Box-Behnken empleando como sustrato suero de leche.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y METAS

1. Identificar y caracterizar a la bacteria *B. halotolerans*.

- 1 Reactivar la bacteria *B. halotolerans* en medio LB y monitorear su crecimiento por densidad óptica.
- 2 Identificar mediante pruebas bioquímicas estandarizadas a la bacteria *B. halotolerans*.
- 3 Caracterizar el crecimiento de *B. halotolerans* en medio LB mediante un estudio cinético.
- 4 Caracterizar el crecimiento de *B. halotolerans* en medio TCS mediante un estudio cinético.

2. Comparar la producción de PHA por la bacteria *B. halotolerans* en los sueros de leche ácido y dulce.

- 5 Caracterizar la composición nutricional de los sueros de leche ácido y dulce.
- 6 Realizar un estudio cinético de la producción de PHA por *B. halotolerans* en suero de leche ácido.
- 7 Realizar un estudio cinético de la producción de PHA por *B. halotolerans* en suero de leche dulce.

3. **Evaluar los factores donde se haya producido mayor PHA por la bacteria *B. halotolerans* en el suero de leche dulce y su optimización.**
 - 8 Evaluar los factores que afectan la producción de PHA en suero de leche dulce mediante un diseño de experimentos exploratorio.
 - 9 Optimizar mediante un diseño de experimentos Box-Behnken la producción de PHA en suero de leche dulce con base en los resultados del diseño de experimentos exploratorio.
4. **Producir y caracterizar el biopolímero obtenido a partir de las condiciones experimentales resultantes del diseño Box-Behnken.**
 - 10 Producir PHA por la bacteria *B. halotolerans* en suero de leche dulce empleando las condiciones experimentales resultantes del diseño de optimización.
 - 11 Extracción y purificación del biopolímero producido por *B. halotolerans* en suero de leche dulce con solventes polares y no polares.
 - 12 Caracterización por FT-IR del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.
 - 13 Caracterización por RMN del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.
 - 14 Caracterización por CGP del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.
 - 15 Caracterización por TGA-DSC del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.

MATERIALES

LOCALIZACIÓN

El material, los equipos y la infraestructura requerida para realizar el presente proyecto de investigación, se encuentran disponibles en el Laboratorio de Biotecnología I del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. y los ensayos específicos para el análisis de caracterización se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L y en el Laboratorio de Ingeniería Química del I.T.E.S.M. campus Monterrey.

EQUIPO

A continuación, se mencionan el material y los equipos utilizados para la elaboración de dicho proyecto, señalando la marca y modelo de cada uno.

- Material de vidrio (Pyrex/Kimax)
- Balanza analítica (AND/HR-200)
- Incubadora con agitación (Barnstead International/Shka-4000)
- Autoclave automática (Tuttnauer/2540M)
- Microscopio binocular (Carl Zeiss/Standard 25)
- Baño de ultrasonido (Branson/1510R-DHT)
- Estufa de secado (Lab-Line/3513)
- Espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Spectronic/400114)
- Microscopio de fluorescencia (Leica/DM3000)
- Microcentrífuga (Eppendorf/5415D)
- Autoclave (AESA/CV300)
- Incubadora con agitación (SHEL-LAB/1575)
- Resonancia Magnética Nuclear (Bruker/500MHz)
- TGA-DSC (Linseis Sta/Platinum Series)
- Cromatógrafo de gel permeable (Young-Lin/YL9131)
- Espectrofotómetro infrarrojo (Perkin Elmer/Spectrum One)

REACTIVOS

Los reactivos utilizados se mencionan a continuación, así como su marca.

- Suero de leche
- Azul Nilo 1% (Sigma-Aldrich)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Hipoclorito de sodio 5% (Cloralex)
- Etanol 96% (J.T. Baker)
- Metanol (J.T. Baker)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker)
- Ácido clorhídrico (DEQ)
- Agar LB (BD Bioxon)
- Agar nutritivo (BD Bioxon)
- Agar TCS (BD Bioxon)
- Glicerina (BioBasic Canada)
- Levadura (BD Bioxon)
- Aceite mineral (Kemcare)
- Cloruro de bario (J.T. Baker)
- Ácido sulfúrico (Jalmek)
- Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich)
- Acetona (J.T. Baker)
- Agua desionizada (FCQ)
- Tetrahidrofurano (DEQ)

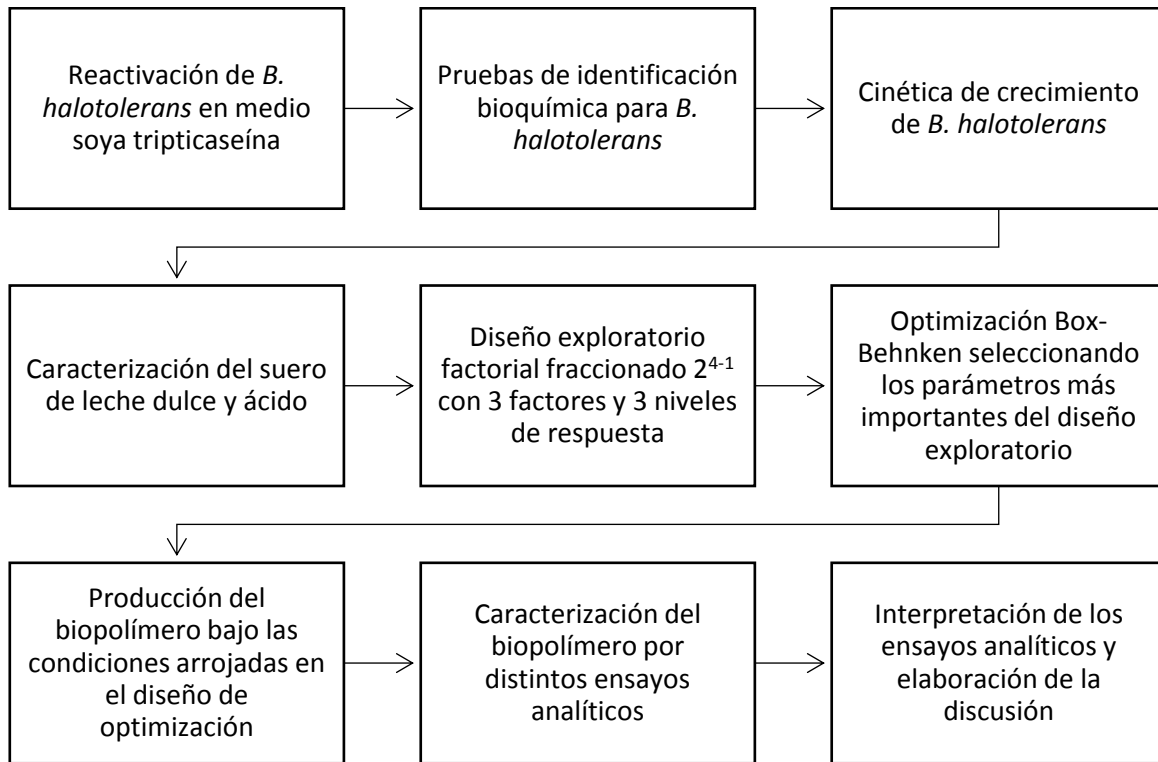
DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS

Los residuos generados no categorizados en la tabla 2, se desecharon según la clasificación de residuos peligrosos PR-CLB-SRR/000 de la Facultad de Ciencias Químicas; así todo experimento que generó residuos su desecho fue acorde con el departamento de Manejo y Control de Residuos de la FCQ, UANL.

Tabla 2. Residuos generados y recolector empleado

Residuo	Tipo de colector
Colorantes de tinción (Rojo Nilo, Gram)	Lugol y colorantes
Caldo (medio de cultivo) post-esterilización	Drenaje
Agar (medio de cultivo) post-esterilización	Bolsa roja

ESTRATEGIA GENERAL DEL PROYECTO



METODOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *B. HALOTOLERANS*.

Reactivación de B. halotolerans en medio LB

Se reactivó el microorganismo en 5 mL de caldo LB, incubándose a 28°C/150 rpm/48 horas. Ya que se encontraba en fase exponencial (aproximadamente a las 24 horas) se inocularon en 100 mL de caldo LB en un matraz EM de 250 mL bajo las mismas condiciones de incubación.

Identificación mediante pruebas bioquímicas estandarizadas la bacteria B. halotolerans

Se realizó un frotis del microorganismo en un portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó a calor por 10 segundos. Se le agregó colorante cristal violeta hasta abarcar el área del frotis y se dejó actuar por 1 min. Pasado el tiempo, se enjuagó con agua desionizada y se le añadió el fijador de iodo-lugol por 1 min. Después, con alcohol-acetona se decoloró el frotis y para finalizar, se le añadió colorante de safranina por 1 min. Una vez terminado el procedimiento, se enjuagó con agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente para ser observado al microscopio óptico.

Para identificar bioquímicamente a la bacteria se realizaron pruebas API 20E. El procedimiento consistió en resembrar las colonias en agar TCS e incubarlas por 24 horas. Pasado este tiempo, se suspendió el crecimiento bacteriano obtenido en 5 mL de solución salina al 0.8% (P/V) hasta llegar a la turbidez indicada en la escala 1 de McFarland, misma que se prepara mezclando 0.3 mL de BaCl₂ 1% con 9.7 mL de H₂SO₄ 1%. Se inoculó el sistema API 20E llenando el tubo y la cúpula de las pruebas CIT, VP y GEL con la suspensión bacteriana, mientras que el resto de las 20 pruebas solo se llenó el tubo pero no la cúpula. A las pruebas ADH, LDC, ODC, URE y H₂S se le añadió aceite mineral en la cúpula para crear un ambiente anaerobio para el crecimiento bacteriano. La prueba se incubó a 37°C/48 horas.

Caracterización del crecimiento de *B. halotolerans* en medio LB y medio TCS mediante un estudio cinético.

Para conocer el crecimiento de *B. halotolerans* se realizaron dos curvas cinéticas. Se llevaron a cabo en matraces EM con capacidad de 250mL, donde se depositó 50 mL de caldo LB estéril y, en otro matraz de la misma capacidad, 50 mL de caldo TCS, determinando la cantidad de medio a inocular en el suero por medio de la ecuación $C_1V_1=C_2V_2$. El crecimiento se determinó por medio de densidad óptica en un espectrofotómetro UV-VIS a $\lambda=620$ nm utilizando celdas de plástico desechables. Las lecturas se realizaron por triplicado cada 6 horas con condiciones de incubación de 28°C/150 rpm/72 horas.

COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHA POR LA BACTERIA *B. halotolerans* EN LOS SUEROS DE LECHE ÁCIDO Y DULCE.

Caracterización de los contenidos nutricionales de los sueros de leche ácido y dulce.

Se realizó la caracterización del suero de leche ácido y dulce en el Laboratorio de Alimentos de la FCQ, UANL. Los parámetros determinados y su método de análisis se mencionan a continuación: pH (AOAC 981.12C), azúcares totales % (NOM-086-SSA1-1994), carbohidratos totales % (por diferencia), cenizas totales % (NMX-F-607-NORMEX-2013), cloruro de sodio % (AOAC 935-47), grasa % (NOM-086-SSA1-1994), humedad % (AOAC 925.45A) y la cantidad de proteína (NMX-F-608-NORMEX-2011). Dichos análisis se realizaron en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Estudio cinético de la producción de PHA por *B. halotolerans* en sueros de leche ácido y dulce.

Se realizó una producción preliminar de PHA por *B. halotolerans* para observar en cuál de los dos sueros se producía el biopolímero. Cervantes menciona que los microorganismos halófilos crecen en un rango de 10-20% de concentración de NaCl (Cervantes-Uc *et al.* 2014), por lo que tomando en cuenta la referencia citada se tomaron 50 mL de cada tipo de suero,

y se les añadió 15% de NaCl y se inoculó *B. halotolerans* para incubarse por 13 días/28°C/50 rpm. Como pruebas control, se inoculó la misma cantidad de cada tipo de suero por separado, pero sin la adición de NaCl.

Como prueba determinante de producción de PHA se realizó una tinción de azul Nilo, misma que se llevó a cabo tomando 1 mL de muestra y añadiéndole 100 µL de colorante azul Nilo. Se incubó a 55°C/25 min y pasado este tiempo, se centrifugó a 3,500 rpm/5 min. Posteriormente se le realizaron 3 lavados con solución salina y se re-suspendió en 20 µL de la misma.

Se realizó un frotis seco de cada muestra y se observó al microscopio en el objetivo 100X para visualizar la producción de carboxomas.

EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PHA POR LA BACTERIA *B. halotolerans* EN EL SUERO DE LECHE DULCE Y SU OPTIMIZACIÓN.

Evaluación de los factores que afectan la producción de PHA en suero de leche dulce mediante un diseño de experimentos exploratorio.

Para el diseño de experimentos exploratorio se eligió un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} por el número de factores y niveles mencionados en la Tabla 3. El software utilizado fue *Design Expert* versión 7.0. La serie de experimentos y sus parámetros se pueden observar en la Tabla 4. Los puntos del diseño se sitúan en combinaciones de los niveles altos y bajos de los factores y sus puntos medios, asegurando que no se establezcan todos los factores en sus niveles altos al mismo tiempo (Inc 2016).

Factor	Nivel inferior	Nivel medio	Nivel superior
--------	----------------	-------------	----------------

pH	4.5	5.5	6.5
Inóculo (%)	5	10	15
NaCl (%)	0	10	20
Temperatura (°C)	28	32	36

Tabla 3. Factores y niveles en el diseño exploratorio.

Run	pH	Inóculo (%)	NaCl (%)	Temperatura (°C)
1	4.5	15	20	28
2	6.5	5	20	28
3	6.5	15	0	28
4	4.5	5	0	28
5	5.5	10	10	32
6	5.5	10	10	32
7	5.5	10	10	32
8	6.5	5	0	36
9	4.5	5	20	36
10	6.5	15	20	36
11	4.5	15	0	36

Tabla 4. Parámetros para los 11 ensayos del diseño exploratorio.

Se inoculó el suero de leche con la bacteria *B. halotolerans* cuando la densidad óptica del medio TCS con el microorganismo en crecimiento alcanzó los 0.9 nm a una $\lambda=620$ nm en el espectrofotómetro UV-VIS posteriormente se realizaron los 11 experimentos arrojados por el *software*, respetando las condiciones de cada ensayo en particular. Se incubaron por 13 días y pasado este tiempo, se realizó la prueba de azul Nilo descrita anteriormente y la prueba de peso seco que consiste en tomar el peso inicial de la muestra (C_1) para llevarla enseguida a calentamiento a 80°C hasta evaporación y tomar el peso final de la misma (C_2). El control utilizado fue el suero de leche sin inocular. La cantidad de biomasa generada se calculó siguiendo la fórmula (C_2-C_1).

Optimización mediante un diseño de experimentos Box-Behnken de la producción de PHA en suero de leche dulce con base en los resultados del diseño de experimentos exploratorio.

Con los resultados obtenidos en el diseño factorial fraccionado 2^{4-1} , se seleccionaron los factores que tuvieron una respuesta significativa en la producción de PHA y se realizó un diseño Box-Behnken utilizando el programa estadístico *Design-Expert* versión 7.0. El factor que se descartó para realizar el diseño de optimización fue el pH, mismo que no mostró relevancia estadística en la producción de PHA. En la Tabla 5 se muestran los ensayos realizados para la optimización.

<i>Run</i>	<i>Inóculo (%)</i>	<i>NaCl (%)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	5	10	28
2	15	10	28
3	10	0	28
4	10	20	28
5	5	20	32
6	5	0	32
7	15	20	32
8	10	10	32
9	10	10	32
10	10	10	32
11	10	10	32
12	10	10	32
13	15	0	32
14	10	20	36
15	5	10	36
16	10	0	36
17	15	10	36

Tabla 5. Parámetros de los 17 ensayos del diseño de optimización.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO OBTENIDO A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES RESULTANTES DEL DISEÑO BOX-BEHNKEN.

Producción PHA por la bacteria *B. halotolerans* en 150 mL de suero de leche dulce empleando las condiciones experimentales resultantes del diseño de optimización.

Con base en los resultados obtenidos en el diseño de optimización, se realizó un ensayo por triplicado con las condiciones óptimas para la producción de PHA incubándose por 13 días, esto se hizo con el fin de verificar que la respuesta esperada (en gramos) señalada por el programa estadístico haya coincidido con los resultados de los ensayos del laboratorio.

Extracción y purificación del biopolímero producido por *B. halotolerans* en suero de leche dulce con solventes polares y no polares.

Para la extracción y purificación del biopolímero se utilizó la metodología propuesta por López-Ayala modificada, la cual consistió en añadirle a la muestra seca 200 mL de hipoclorito de sodio 5% y llevarla a sonicación por 3 min. En un embudo de separación de 500 mL se llevó a cabo 3 extracciones de la fase orgánica con 30 mL cloroformo, realizando este procedimiento por triplicado. La fase orgánica resultante se llevó a evaporación a 40°C hasta precipitar y quedar en sequedad (López-Ayala 2016). Para la purificación del precipitado obtenido, se realizaron lavados por triplicado en una relación 1:5 con los siguientes compuestos y en el mismo orden: agua desionizada, metanol, acetona y hexano. El biopolímero purificado obtenido se llevó a sequedad total a temperatura ambiente.

Identificación por FT-IR y 13C-RMN del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.

La identificación de grupos funcionales del biopolímero se realizó por Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) que es una técnica que se basa en la vibración de las moléculas; se hace pasar una radiación infrarroja sobre la muestra y determina la

fracción de esa radiación que es absorbida en una energía particular haciendo un barrido de las longitudes de onda de las moléculas de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} (Stuart 2004) y por espectroscopia de resonancia magnética Nuclear de carbono (^{13}C -RMN) de 500 MHz que aporta mucho conocimiento sobre la estructura carbonada y sobre el número y tipos de átomos de hidrógeno; cuando se combina con técnicas como FT-IR, suele ser posible establecer con certeza la estructura de un compuesto desconocido (Weininger and Stermitz 1988), para ambas técnicas se utilizó cloroformo deuterado para la disolución de las muestras.

Análisis de las propiedades termo-mecánicas por CPG del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por B. halotolerans.

El peso molecular absoluto del biopolímero se determinó con la técnica de Cromatografía de Permeación en Gel (CPG), utilizando THF como solvente para la disolución de la muestra misma que fue filtrada en un filtro de nylon con tamaño de poro de 0.45 micras. La columna utilizada fue PLGel 5 Micro Mixed $300 \times 7.5\text{ mm}$ y como fase móvil THF, a un flujo de 1 mL/min . Para la curva de calibración se utilizaron estándares en un rango de 162 kDa - $1,053,000\text{ kDa}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *B. HALOTOLERANS*

Reactivación de B. halotolerans en medio LB y medio TCS.

En la Figura 5 se visualiza el crecimiento típico de *B. halotolerans* en agar TCS observando colonias pequeñas, cremosas, de color beige, de forma amiboide y poco elevadas. En la Figura 6 se aprecia la imagen de la tinción Gram vista en un microscopio óptico a 100X.

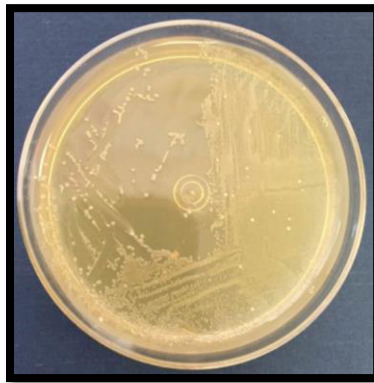


Figura 5. Crecimiento de *B. halotolerans* en agar de soya tripticaseína.

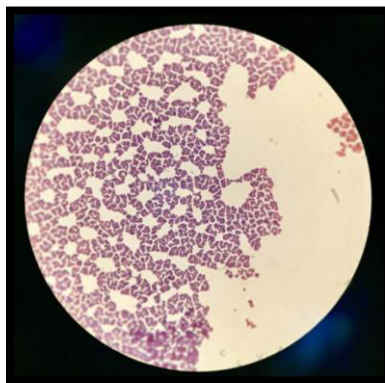


Figura 6. Tinción Gram de *B. halotolerans*. Se observan bacterias pleomórficas Gram positivos.

Identificación mediante pruebas bioquímicas estandarizadas la bacteria B. halotolerans

Dado que no se encontraron reportes de pruebas bioquímicas para *B. halotolerans* en la búsqueda bibliográfica, se hizo una comparación con *Bacillus axarquiensis*, ya que en el presente año Tindall menciona que ambos microorganismos pueden ser tomados como sinónimos heterotróficos (Tindall 2017). Los resultados comparativos de las pruebas se muestran en la Tabla 6 y el sistema API 20E en la Figura 7.

Tabla 6. Resultado de las pruebas de identificación bioquímica de *B. halotolerans* comparados con los resultados de *B. axarquiensis* publicados por Ruíz-García (Ruiz-García *et al.* 2005). *N.R.: No reportado.

	Prueba bioquímica	<i>B. halotolerans</i>	<i>B. axarquiensis</i>
	Tinción de Gram	+	+
ONPG	Beta-galactosidasa	+	+
ADH	Arginina deshidrolasa	+	+
LDC	Lisina descarboxilasa	-	+
ODC	Ornitina descarboxilasa	-	+
CIT	Utilización del citrato	-	+
H2S	Producción de H2S	-	N.R.
URE	Ureasa	-	N.R.
TDA	Triptófano desaminasa	-	N.R.
IND	Producción de indol	-	N.R.
VP	Producción de acetoina (VP)	+	+
GEL	Gelatinasa	-	N.R.
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	+	+
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	-	N.R.
INO	Fermentación/oxidación de inositol	-	N.R.
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	-	+
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	+	N.R.
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	+	N.R.
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	-	-
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	+	+
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	+	+



Figura 7. Resultados del Sistema de identificación bacteriana bioquímica API® 20E para *B. halotolerans*.

Caracterización del crecimiento de *B. halotolerans* en medio LB y medio TCS mediante un estudio cinético.

Los resultados del estudio de crecimiento de *B. halotolerans* en medio LB y en medio TCS se muestran en la Figura 8.

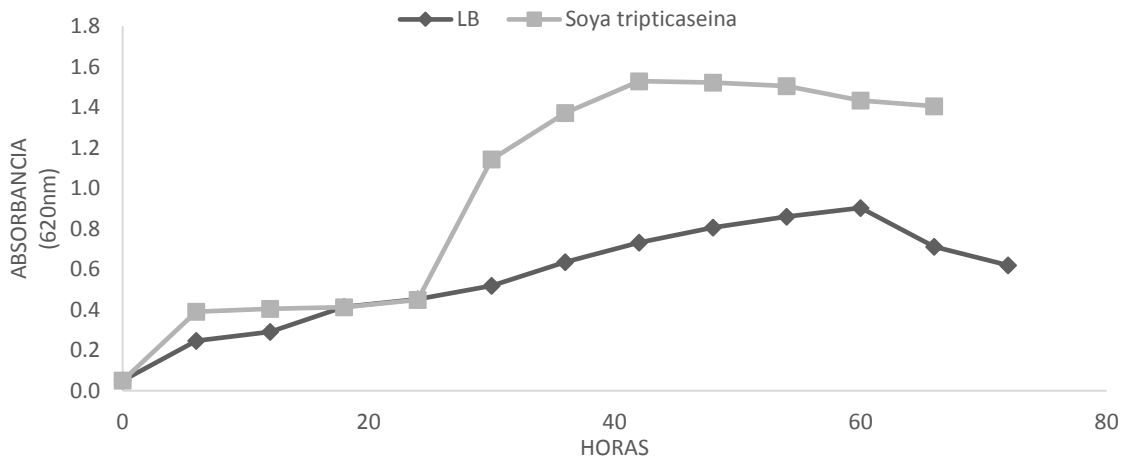


Figura 8. Cinética de crecimiento de *B. halotolerans* en medio LB y en medio TCS.

Se comparó el crecimiento del microorganismo en dos medios distintos, mostrando un mejor desarrollo en el medio TCS. Aproximadamente a las 22-24 horas es cuando inicia su fase exponencial, a las 40 horas entra en fase estacionaria en medio de soya tripticaseína y justo

a las 60 horas empieza su fase de muerte en ambos medios. En la Tabla 6 se puede observar la composición de los medios utilizados.

Tabla 6. Comparación de la composición química de los medios de cultivo utilizados para el estudio de crecimiento de *B. halotolerans* (DIBICO 1972; Laboratorios-Britania 2015).

Medio LB		Medio TCS	
Peptona de caseína	10.0 g	Peptona de caseína	17.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	Peptona de soya	3.0 g
Extracto de levadura	5.0 g	Cloruro de sodio	5.0 g
		Fosfato dipotásico	2.5 g
		Dextrosa	2.5 g

Ambos medios coinciden en contener peptona de caseína y cloruro de sodio, por lo que se puede inferir que el microorganismo utiliza a su favor la peptona de soya, misma que el inserto de Sigma-Aldrich menciona que se puede utilizar como fuente de nitrógeno y para el rápido crecimiento del microorganismo debido al alto contenido en azúcar (Sigma-Aldrich 2017).

El fosfato dipotásico actúa como buffer del sistema debido a su composición química, y la dextrosa (enantiómero de la glucosa), sirve como fuente de energía primaria.

COMPARAR LA PRODUCCIÓN DE PHA POR LA BACTERIA *B. halotolerans* EN LOS SUEROS DE LECHE ÁCIDO Y DULCE.

Caracterización de los contenidos nutricionales de los sueros de leche ácido y dulce.

Se caracterizó el suero de leche ácido y el suero de leche dulce, con el fin de conocer las similitudes y diferencias de cada uno y decidir cuál fue la mejor opción para producir PHA. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Caracterización de los sueros de leche. **Según la regresión de Pearson

Contenido	Suero dulce	Suero ácido
pH	4	4.27
Azúcares totales (%)	4.44	4.19
Carbohidratos totales (%)	4.44	4.46
Cenizas totales (%)	0.5	0.64
Cloruro de sodio (%)	0.22	0.17
Grasa (%)	1.31	1.71
Humedad (%)	93.04	92.37
Proteínas	0.71	0.82
Resultado	99.999%**	

Se realizó una regresión de Pearson, misma que sirve para medir la variabilidad sobre los valores de cierta variable a partir de la de otra obteniendo un coeficiente adimensional de correlación lineal, arrojando un 99.999% de similitud en los sueros, por lo que son idénticos en composición (Marill 2004).

Sin embargo, Alsaed reporta una significativa diferencia entre el suero de leche ácido y el suero de leche dulce en cuanto a su composición de minerales o elementos traza, mostrando el suero dulce una menor concentración de K, Ca, Mg, Al, Zn y Cu (Alsaed *et al.* 2013). Así mismo Jelen reportó que el suero dulce contiene menos cantidad de fosfato y lactato, por lo cual, con la referencia de dichos autores, se puede inferir que estas diferencias en composición de los sueros pueden favorecer a la producción de PHA al causarle un estrés nutricional al microorganismo.

Estudio de la cinética de producción de PHA por B. halotolerans en sueros de leche ácido y dulce.

Dado que ambos sueros caracterizados fueron idénticos, se realizó la producción preliminar de PHA en suero ácido y dulce. Los resultados se muestran a continuación en las Figuras 9 y 10.

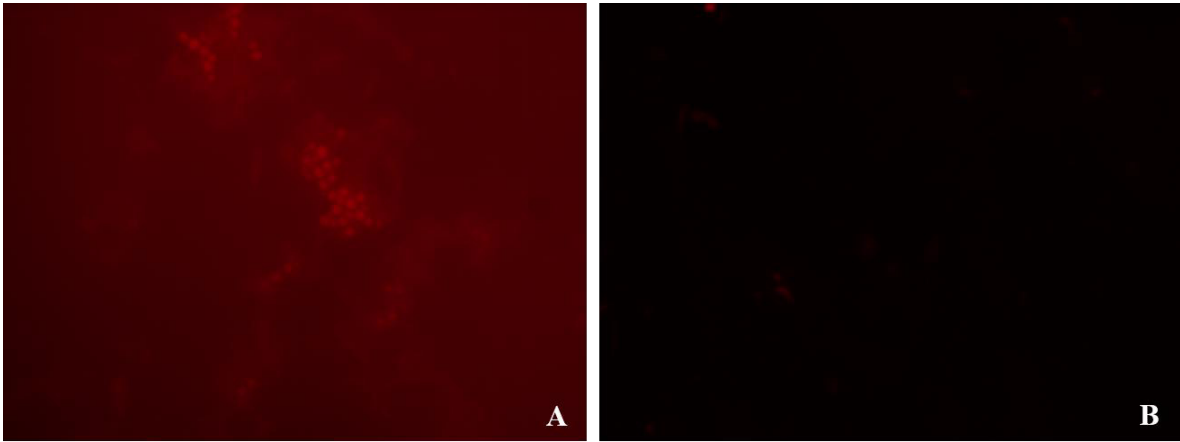


Figura 9. A: Suero de leche ácido inoculado con *B. halotolerans* y 15% de NaCl, observado en microscopía de fluorescencia 100X con tinción azul Nilo. B: Suero de leche ácido inoculado con *B. halotolerans* observado en microscopía de fluorescencia 100X con tinción azul Nilo.

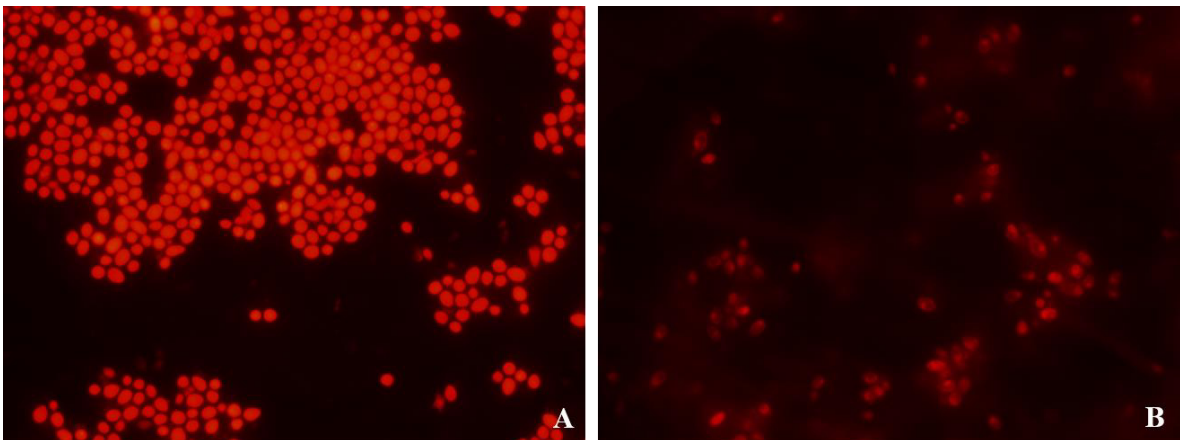


Figura 10. A: Suero de leche dulce inoculado con *B. halotolerans* y 15% de NaCl, observado en microscopía de fluorescencia 100X con tinción azul Nilo. B: Suero de leche dulce inoculado con *B. halotolerans* observado en microscopía de fluorescencia 100X con tinción azul Nilo.

Conforme a los resultados obtenidos, se mostró producción de PHA en suero de leche dulce adicionado con 15% de NaCl, mostrando fluorescencia en los carboxomas observados (Figura 11).

En cambio, con el suero de leche ácido no hubo evidencia de fluorescencia en la muestra con y sin NaCl, por lo que al no haber producción de PHA en el mismo, quedó descartado y el presente trabajo se realizó en suero de leche dulce.

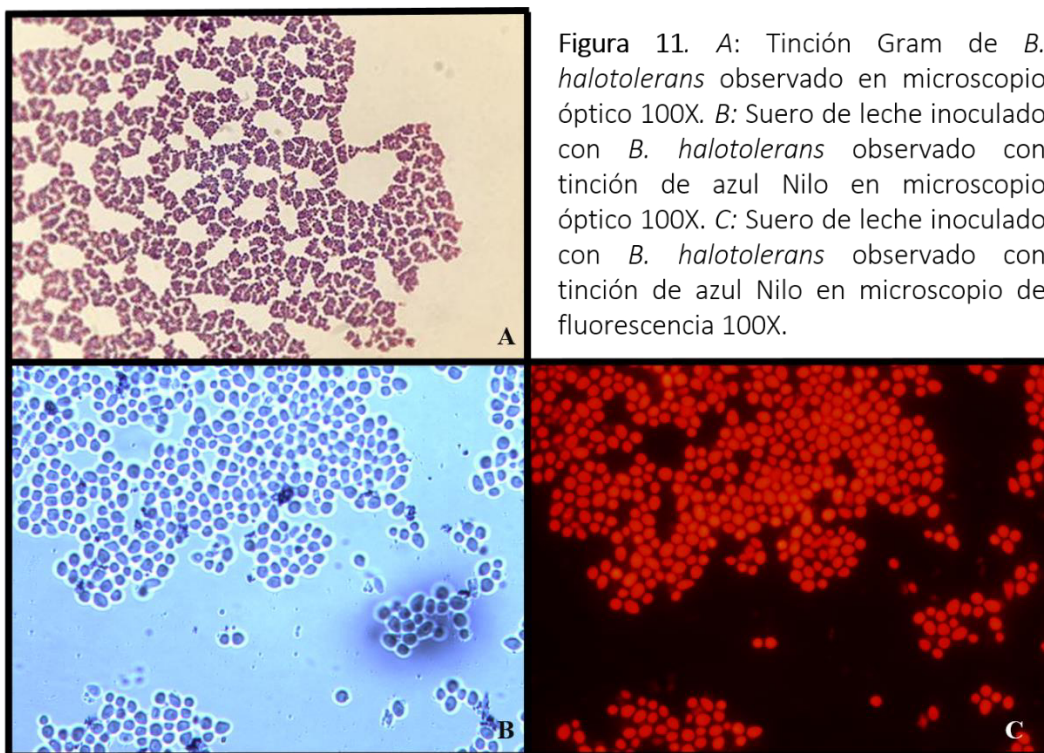


Figura 11. A: Tinción Gram de *B. halotolerans* observado en microscopio óptico 100X. B: Suero de leche inoculado con *B. halotolerans* observado con tinción de azul Nilo en microscopio óptico 100X. C: Suero de leche inoculado con *B. halotolerans* observado con tinción de azul Nilo en microscopio de fluorescencia 100X.

EVALUAR LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PHA POR LA BACTERIA *B. halotolerans* EN EL SUERO DE LECHE DULCE Y SU OPTIMIZACIÓN.

Evaluación de los factores que afectan la producción de PHA en suero de leche dulce mediante un diseño de experimentos exploratorio.

Los resultados obtenidos en los 11 experimentos realizados en diseño exploratorio se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del experimento exploratorio. R1: respuesta de peso seco. R2: (+) Positivo, (-) Negativo.

Número de experimento	Inóculo (%)	NaCl (%)	Temperatura (°C)	pH	Respuesta (g)	Tinción
1	15	20	28	4.5	0.0208	-
2	5	20	28	6.5	0.0142	-
3	15	0	28	6.5	0.0187	-
4	5	0	28	4.5	0	-

5	10	20	32	5.5	0.0179	+
6	10	20	32	5.5	0.0172	+
7	10	10	32	5.5	0.0175	+
8	5	0	36	6.5	0.0175	+
9	5	20	36	4.5	0.0275	-
10	15	20	36	6.5	0.0177	+
11	15	0	36	4.5	0.0029	-

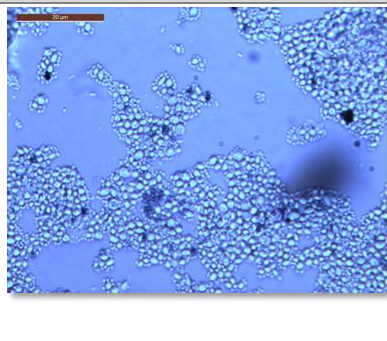

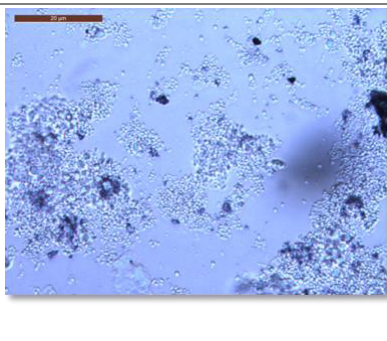
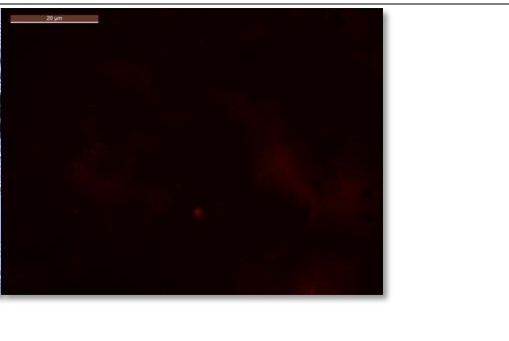
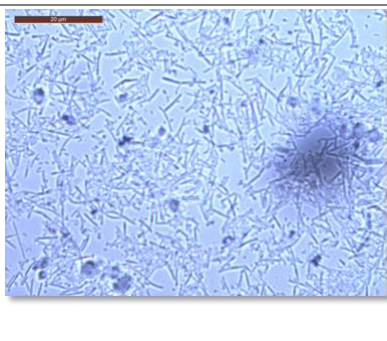

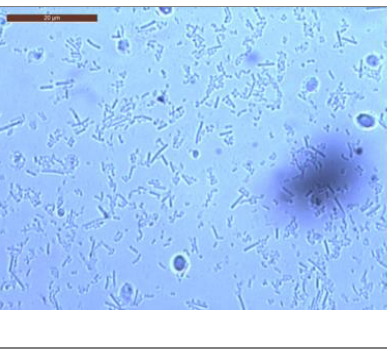
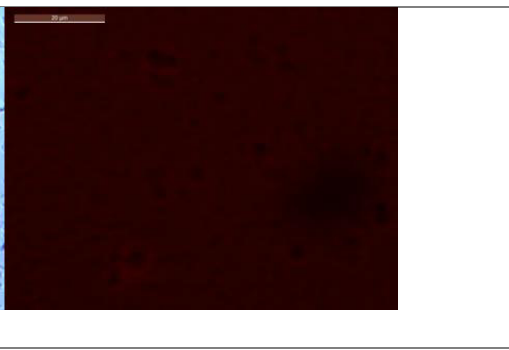
Como se puede apreciar en la Tabla 9, el *software* estadístico nos indicó que nuestro diseño fue significativo con un valor de 0.0011 y el parámetro que menos influye en la producción de PHA es el pH con un valor de F de 3.28, por cual se descartó para desarrollar el experimento de optimización. La temperatura es el factor con mayor impacto en la producción del biopolímero.

Tabla 9. Tabla ANOVA del diseño de experimentos.

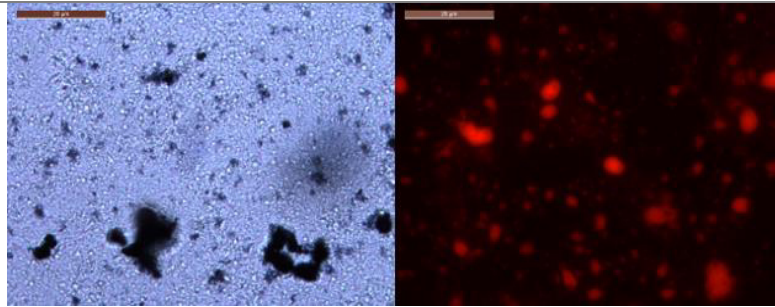
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	7.534E-004	7	1.076E-004	872.70	0.0011	significant
A-pH	4.050E-007	1	4.050E-007	3.28	0.2117	
B-[Inóculo]	3.698E-005	1	3.698E-005	299.84	0.0033	
C-[NaCl]	7.200E-005	1	7.200E-005	583.78	0.0017	
D-Temperatur	1.232E-004	1	1.232E-004	999.28	0.0010	

A continuación, se presentan en la Tabla 10 las microscopías ópticas y de fluorescencia de cada ensayo del diseño de experimentos exploratorio.

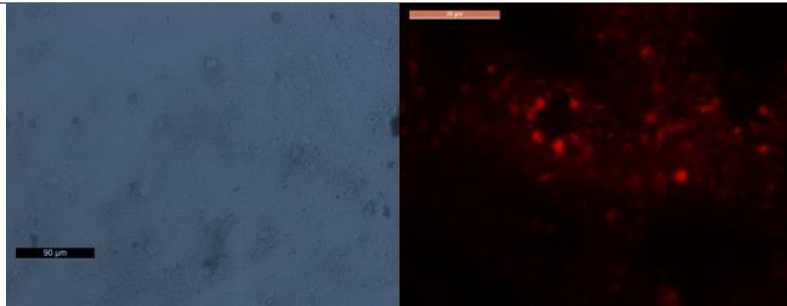
Tabla 10. Resultados de microscopia óptica y de fluorescencia de cada ensayo del diseño exploratorio.

Run	Imagen en el microscopio óptico/Microscopio de fluorescencia	
1		
2		
3		
4		

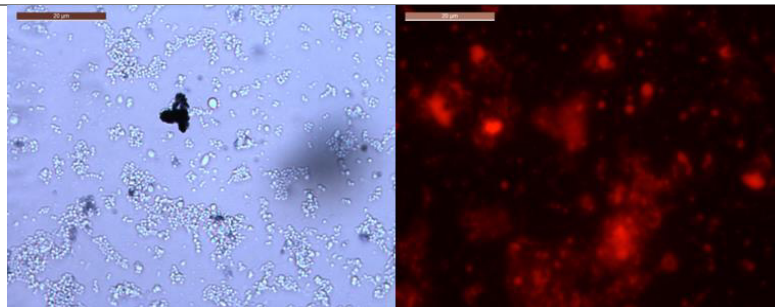
5



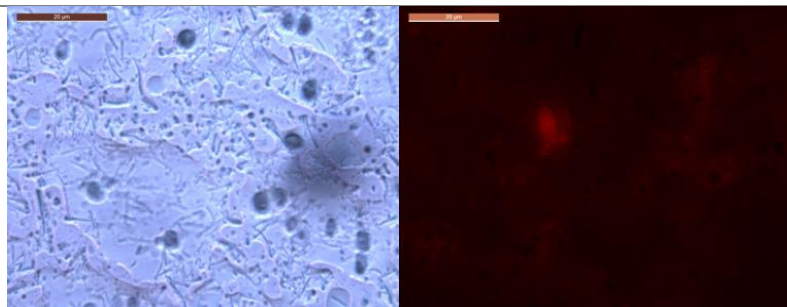
6



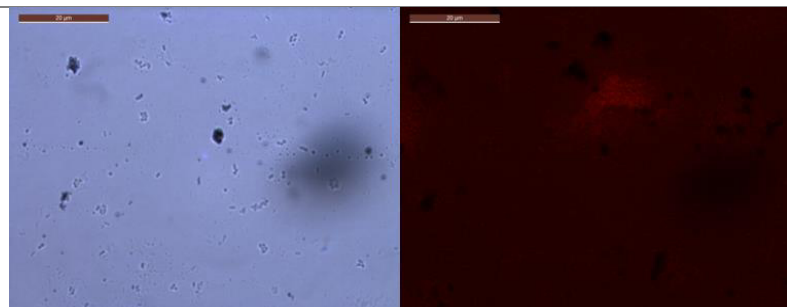
7

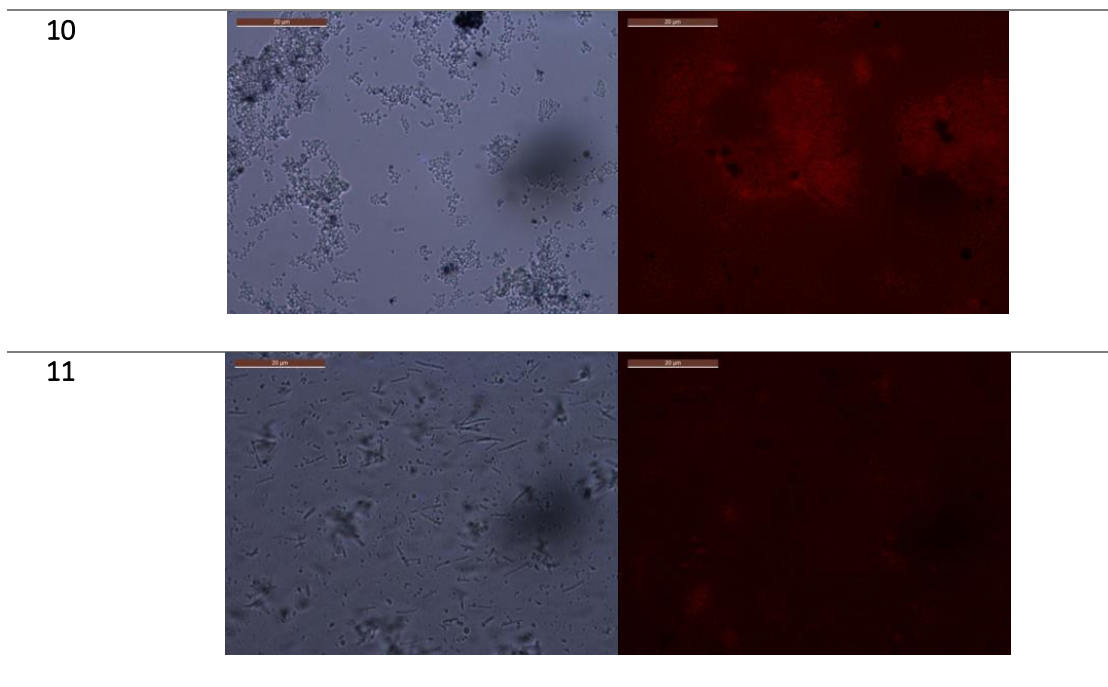


8



9





Optimizar mediante un diseño de experimentos Box-Behnken la producción de PHA en suero de leche dulce con base en los resultados del diseño de experimentos exploratorio.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de optimización. Para medir el valor de la respuesta (R), se realizó bajo el mismo procedimiento mencionado anteriormente en el diseño exploratorio.

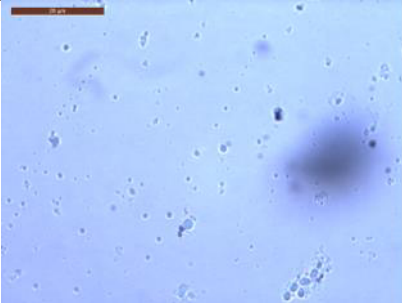
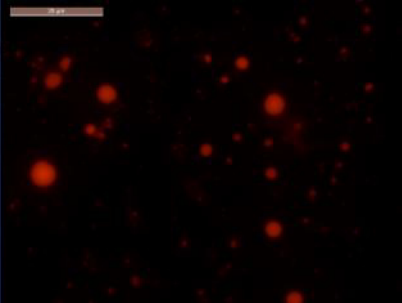
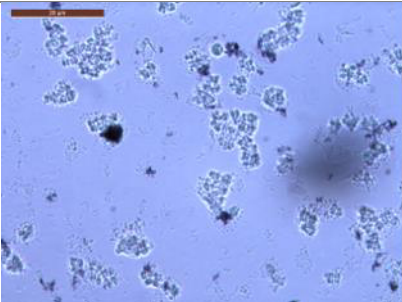
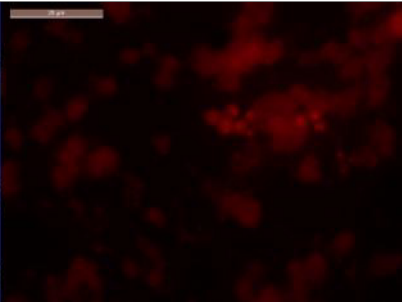
Tabla 11. Resultados del diseño de optimización.

Número de experimento	Inóculo (%)	NaCl (%)	Temperatura (°C)	Respuesta
1	5	10	28	2.5177
2	15	10	28	3.2321
3	10	0	28	0.5092
4	10	20	28	5.1743
5	5	20	32	1.4174
6	5	0	32	0.2667
7	15	20	32	2.6105
8	10	10	32	1.5135

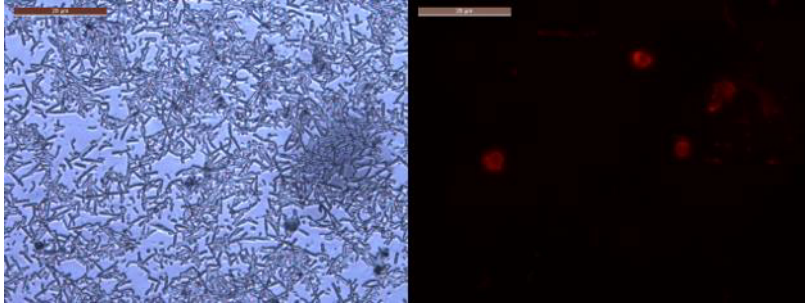
9	10	10	32	1.5367
10	10	10	32	1.5443
11	10	10	32	1.5531
12	10	10	32	1.4441
13	15	0	32	0.4857
14	10	20	36	3.3562
15	5	10	36	1.5953
16	10	0	36	0.2147
17	15	10	36	2.957

En la Tabla 12 se presentan las imágenes capturadas en el microscopio óptico y de fluorescencia para cada uno de los 17 ensayos realizados en la optimización de producción del biopolímero. En todos los experimentos se observa fluorescencia, por lo que infiere que existe acumulación de PHA.

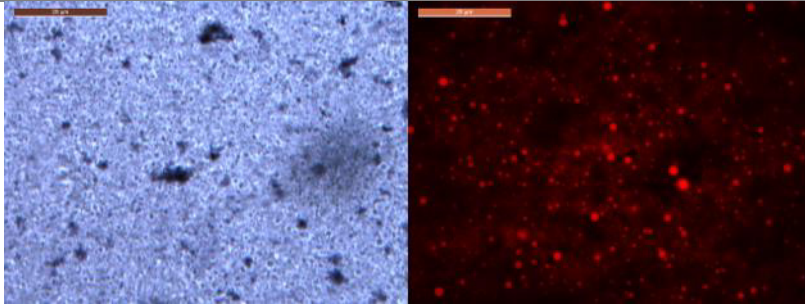
Tabla 12. Resultados de microscopia óptica y de fluorescencia de cada ensayo del diseño de optimización.

<i>Run</i>	Imagen en el microscopio óptico/Microscopio de fluorescencia	
1		
2		

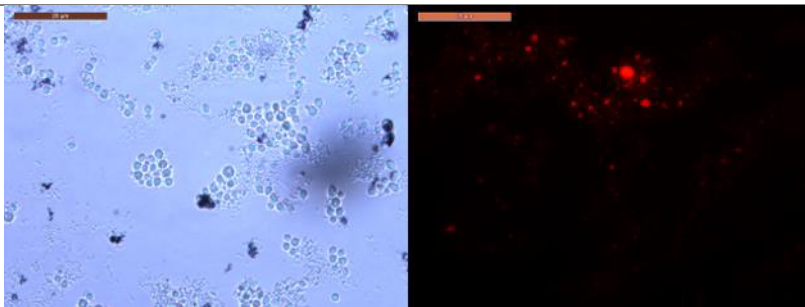
3



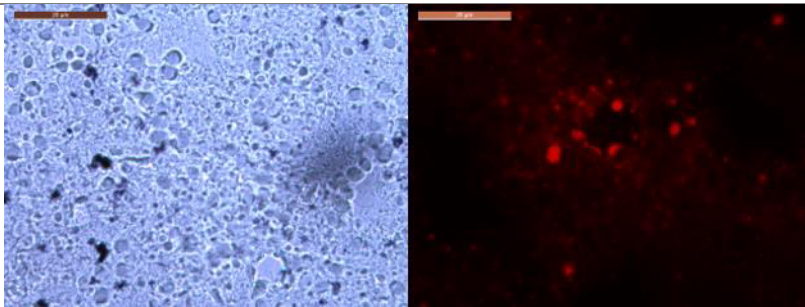
4



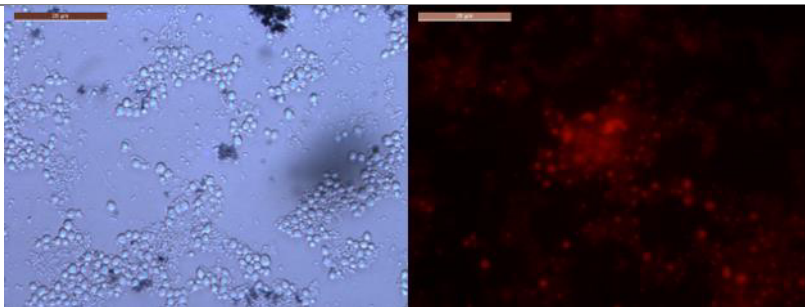
5



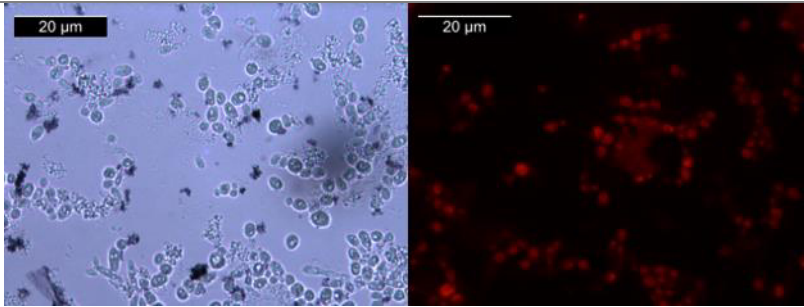
6



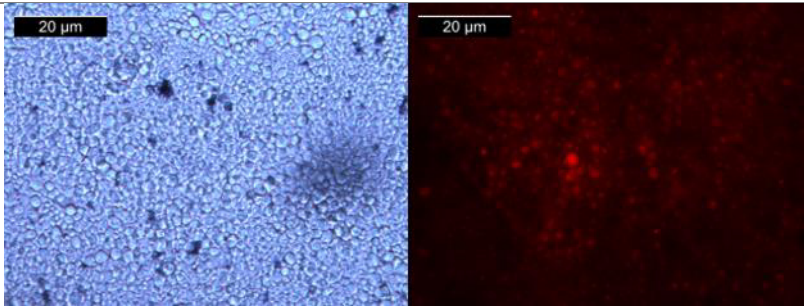
7



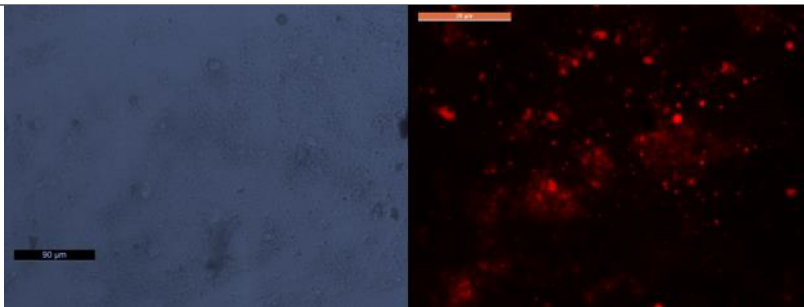
8



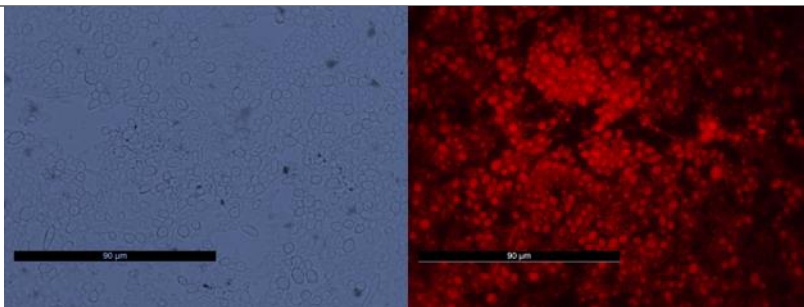
9



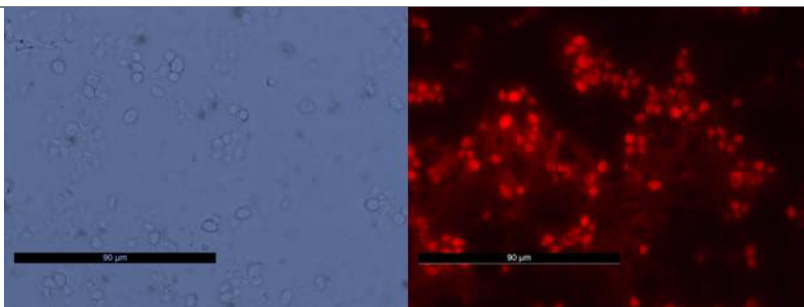
10



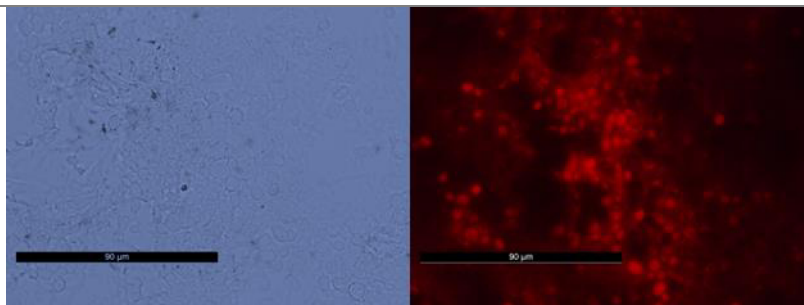
11



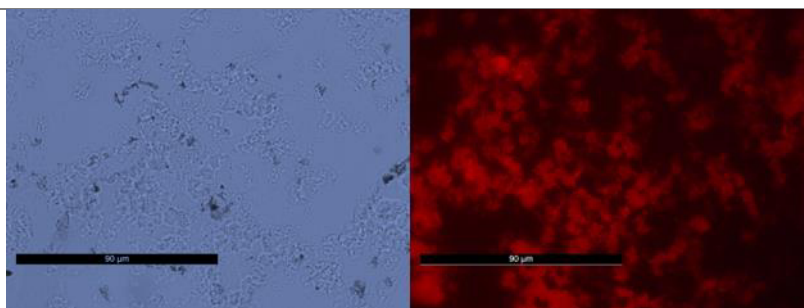
12



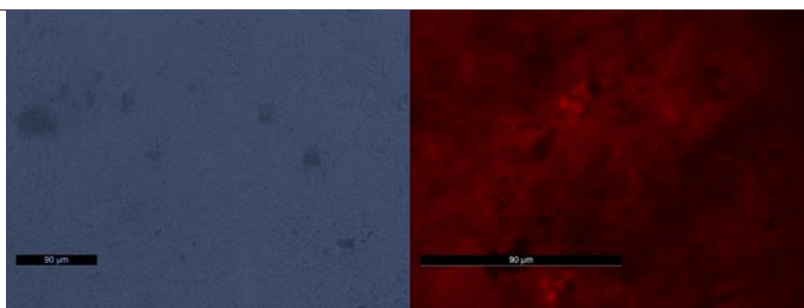
13



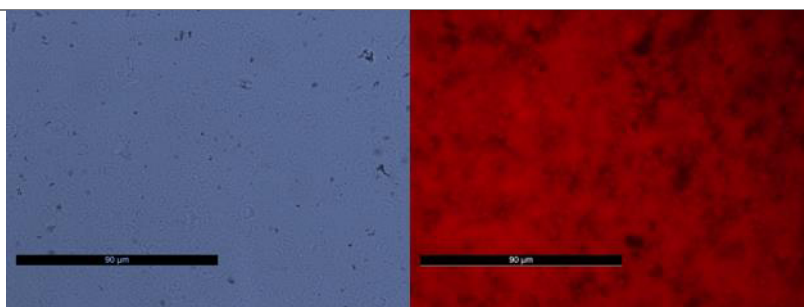
14



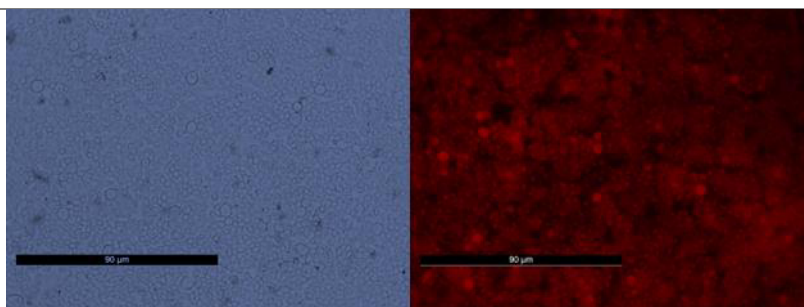
15



16



17



Con base en las respuestas obtenidas y el análisis del programa estadístico, nos arrojó un modelo con valor de 0.0091 lo que lo hace significativo. El valor de F más alto fue para el NaCl, por lo que es el factor con mayor impacto en la producción del biopolímero.

Tabla 13. Tabla ANOVA del diseño de optimización.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	24.38	9	2.71	6.94	0.0091	significant
A-Inóculo	1.52	1	1.52	3.89	0.0890	
B-NaCl	15.35	1	15.35	39.31	0.0004	
C-Temperatura	1.37	1	1.37	3.51	0.1033	

En la optimización el programa estadístico arrojó los resultados de las condiciones óptimas para la producción de PHA, mismos que son presentados en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones óptimas para la producción de PHA.

Factor	Valor
Inóculo (%)	15
NaCl (%)	20
Temperatura (°C)	28
R deseable (g)	4.98

En las Figuras 12 y 13 se presentan las gráficas de superficie de respuesta de Box-Behnken, en donde hace énfasis en los parámetros mencionados en la Tabla 14.

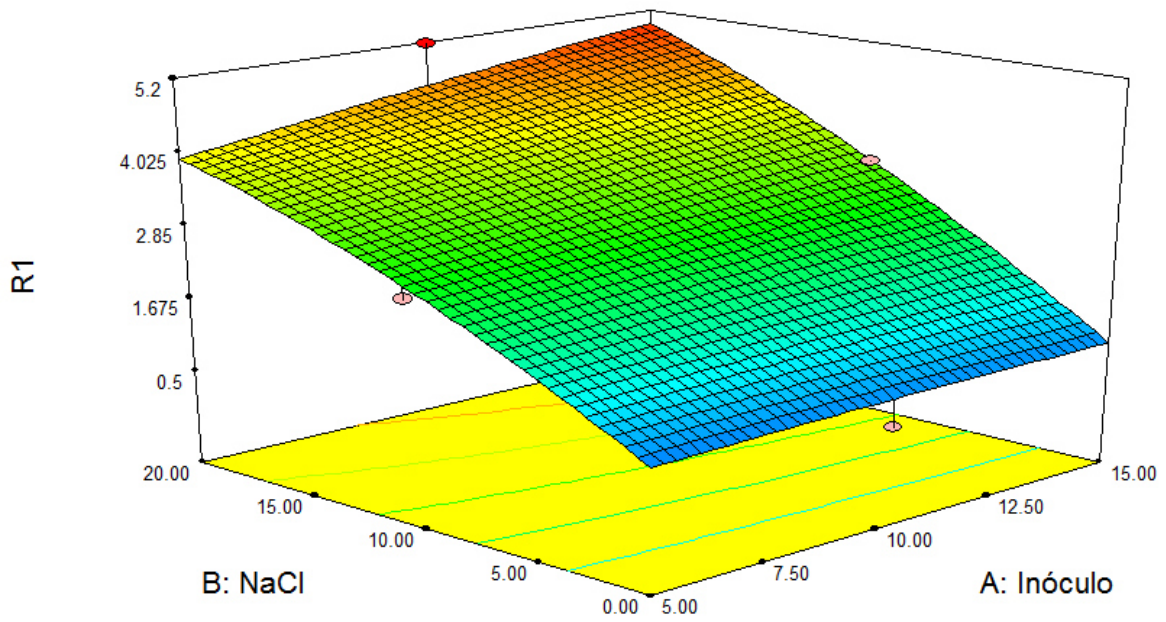


Figura 12. Gráfica de superficie de respuesta del diseño de optimización: NaCl vs. Inóculo respecto a la respuesta.

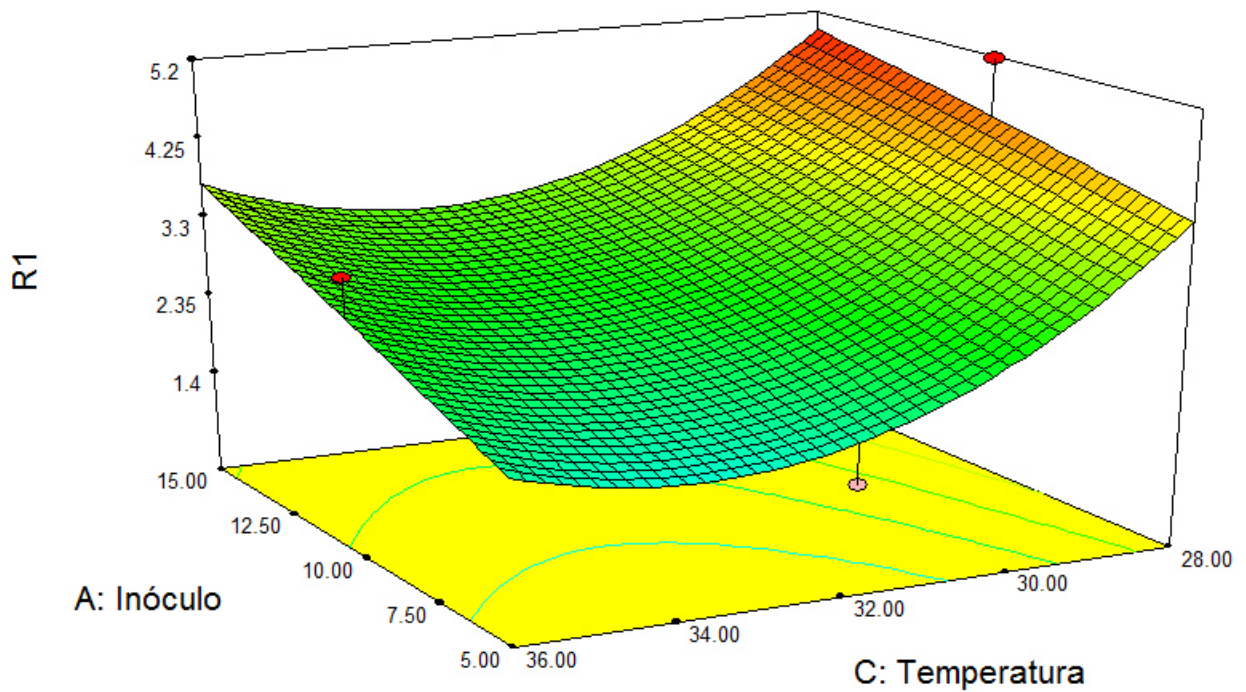


Figura 13. Gráfica de superficie de respuesta del diseño de optimización: Inóculo vs. Temperatura respecto a la respuesta.

PRODUCIR Y CARACTERIZAR EL BIOPOLÍMERO A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES RESULTANTES DEL DISEÑO BOX-BEHNKEN.

Producción PHA por la bacteria B. halotolerans en 150 mL de suero de leche dulce empleando las condiciones experimentales resultantes del diseño de optimización.

Para confirmar la respuesta deseable en la producción mencionada anteriormente, se realizó un ensayo por triplicado con las condiciones de optimización. Los resultados se muestran en la Tabla 15 y se realizó una tinción de azul Nilo para observar fluorescencia en las muestras.

Tabla 15. Ensayos por triplicado con las condiciones optimizadas para la producción de PHA.

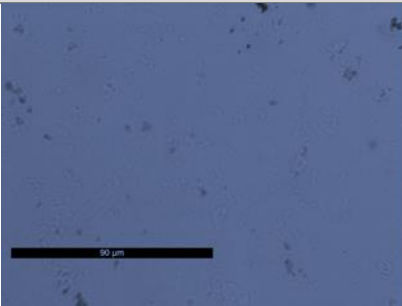
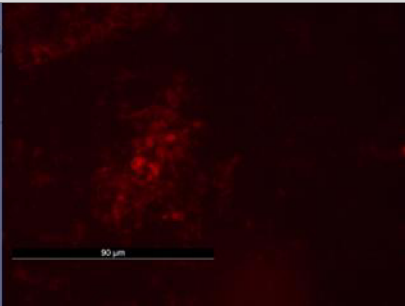
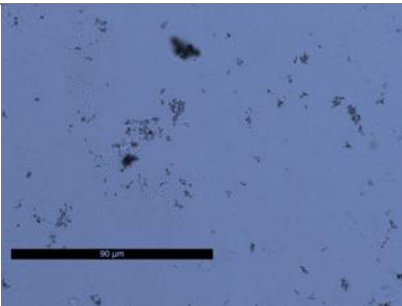
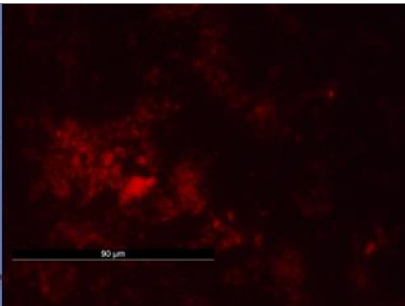
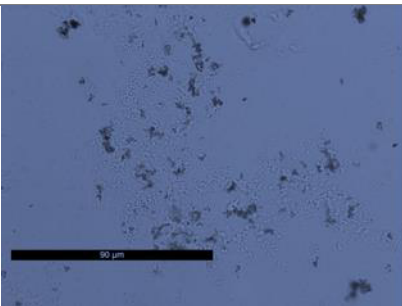
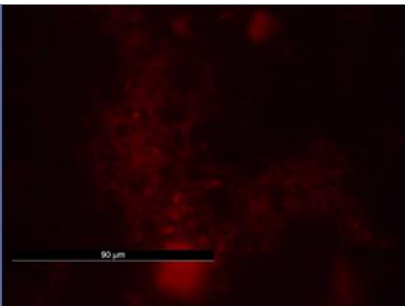
<i>Run</i>	R (g)	Imagen en microscopio de fluorescencia	
1	5.0996		
2	4.3399		
3	4.4500		

Tabla 16. Comparación de R deseable (g) por Box-Behnken y R obtenida (g) experimentalmente.

Respuesta deseable	Respuesta obtenida	Diferencia
4.9800	4.6298	0.3502

Extracción y purificación del biopolímero producido por B. halotolerans en suero de leche dulce con solventes polares y no polares.

Después de realizar el ensayo de optimización por triplicado se pesaron los matraces obteniendo un resultado de 60.7882 g de biomasa en la producción de PHA a partir de 150 mL de suero de leche dulce. Al realizar la extracción y los lavados del precipitado, se obtuvo 0.0130 g; por lo que el rendimiento de la producción es del 0.169%. En las Figuras 14 y 15 se muestran imágenes del producto obtenido. Setiadi y colaboradores en el 2015 reportaron un rendimiento del 0.045% en la producción de PHA por *R. eutropha* utilizando aceite de palma como sustrato (Setiadi *et al.* 2015).



Figura 14. Producto obtenido después de la extracción.



Figura 15. Biopolímero obtenido después de los lavados.

Identificación por FT-IR y ^{13}C -RMN del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por *B. halotolerans*.

En la Figura 16 se muestra el espectro de infrarrojo obtenido de la muestra. Principalmente se observan las señales correspondientes a los estiramientos C-H de los grupos CH y CH₂ que componen la cadena alifática de polímero (2,919 y 2,851 cm⁻¹). Además se aprecia una banda a 1,740 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento C-O del grupo carbonilo (C=O) de un éster alifático saturado, la cual es característica del PHB de acuerdo a lo reportado por González y Cha (González-García *et al.* 2008; Cha *et al.* 2016). De igual manera, Gumel en el 2012 reporta la producción de PHB a partir de *Pseudomonas putida* aislada de aceite de palma obteniendo una señal en FT-IR de 1,741 cm⁻¹ (Gumel *et al.* 2012). Así también, en otro estudio realizado utilizando la bacteria marina *Saccharophagus degradans*, González reporta la producción de dicho polímero encontrando una señal característica del mismo a los 1,742 cm⁻¹ (Koenig 2001; González-García *et al.* 2008). Todo lo anterior apoya que las bandas arrojadas en la espectroscopía de IR del compuesto obtenido indica la presencia de PHB.

Además, se observa una banda ancha importante de 3,350 a 3,150 cm^{-1} , correspondiente a estiramientos H-O. Esta señal puede deberse a los grupos COOH residuales de la cadena polimérica.

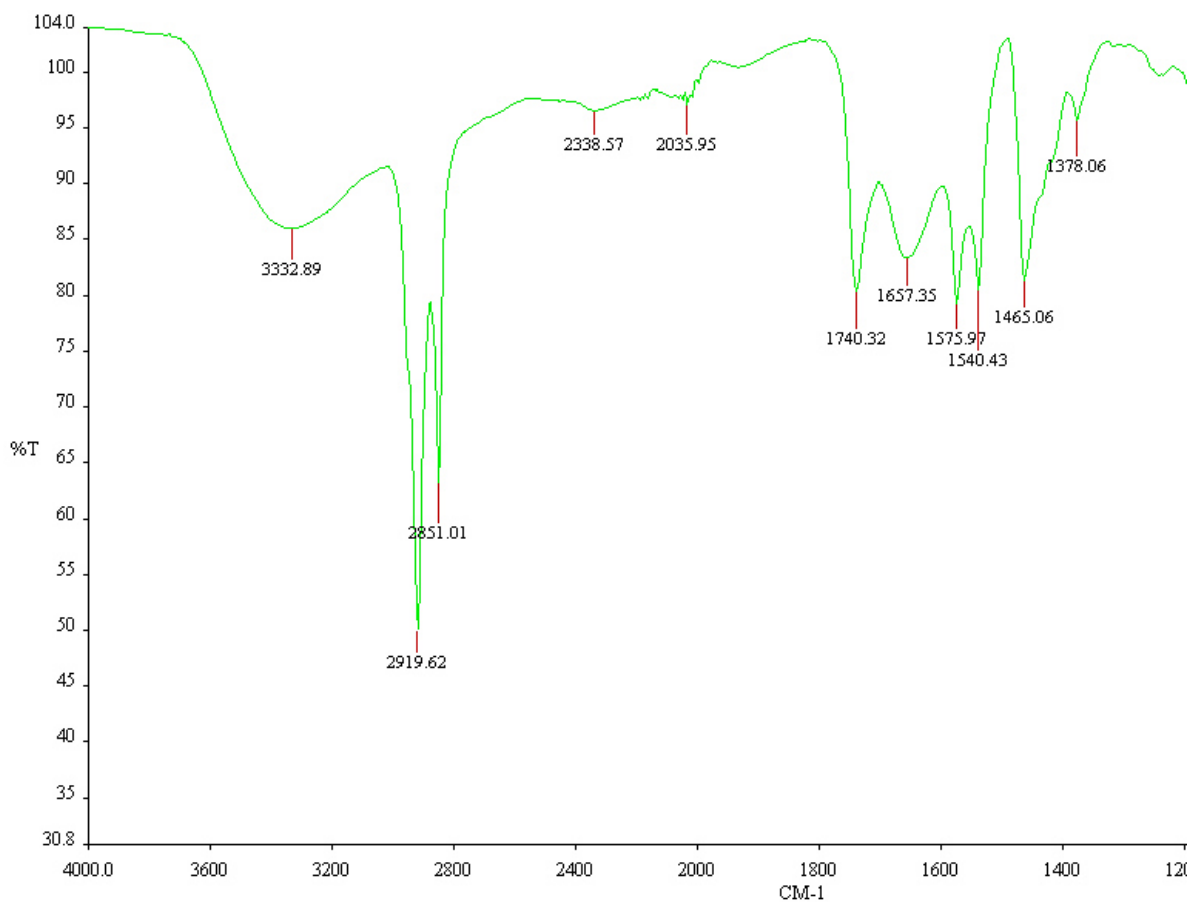


Figura 16. Espectro infrarrojo del producto obtenido.

Se realizaron análisis de RMN sobre la muestra de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en CD_3Cl . Dada la complejidad arrojada por el espectro de ^1H -RMN, la elucidación del polímero se realizó con el espectro de ^{13}C -RMN (Figura 17). En éste se observan las señales correspondientes a 9 carbonos. De manera general se tiene la señal a 169.1 ppm correspondiente a los $\text{C}=\text{O}$ de los grupos éster del butirato y valerato. A desplazamiento de 67.6 ppm y 59.5 ppm se observan las señales de los hidrógenos metilénicos adyacentes al oxígeno de ambos grupos éster, tanto del butirato como del valerato. Las señales de los grupos CH y CH_2 de las cadenas alifáticas de los ésteres se encuentran a 40.7, 38.1, 31.2 y 29.7 ppm. Además, se tiene una señal del CH_3 de valerato a 19.7 ppm (Pasto and Johnson 2003; Silverstain et al. 2005). Lo anterior nos hace inferir que el compuesto obtenido es el PHBV. Baikar y Chen han reportado resultados similares previamente (Chen *et al.* 2014; Baikar *et al.* 2017).

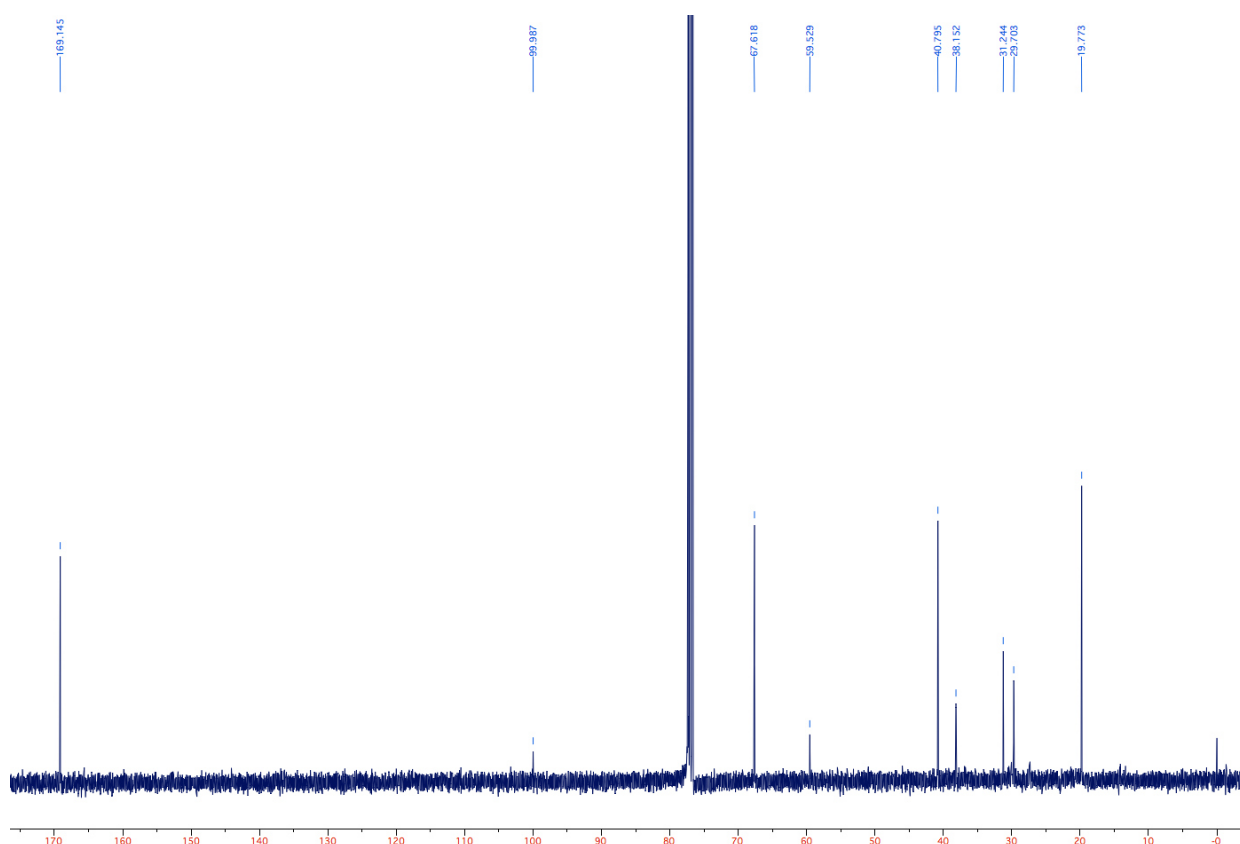


Figura 17. Espectro de ^{13}C -RMN del producto obtenido.

Análisis de las propiedades termo-mecánicas por TGA-DSC y CPG del biopolímero obtenido en la producción en suero de leche dulce por B. halotolerans.

El peso molecular promedio en peso (M_w) detectado fue de 4,579 kDa y el peso molecular promedio en número (M_n) fue de 2,535 kDa, como se observa en la Figura 19. El índice de polidispersión (D) de la muestra es obtenida siguiendo la fórmula M_w/M_n , lo que es igual a 1.8063. Sudesh menciona que una bacteria produce PHB cuando su peso molecular promedio en peso está en un rango de 10-3,000 kDa y su polidispersión alrededor de 2 (Sudesh *et al.* 2000).

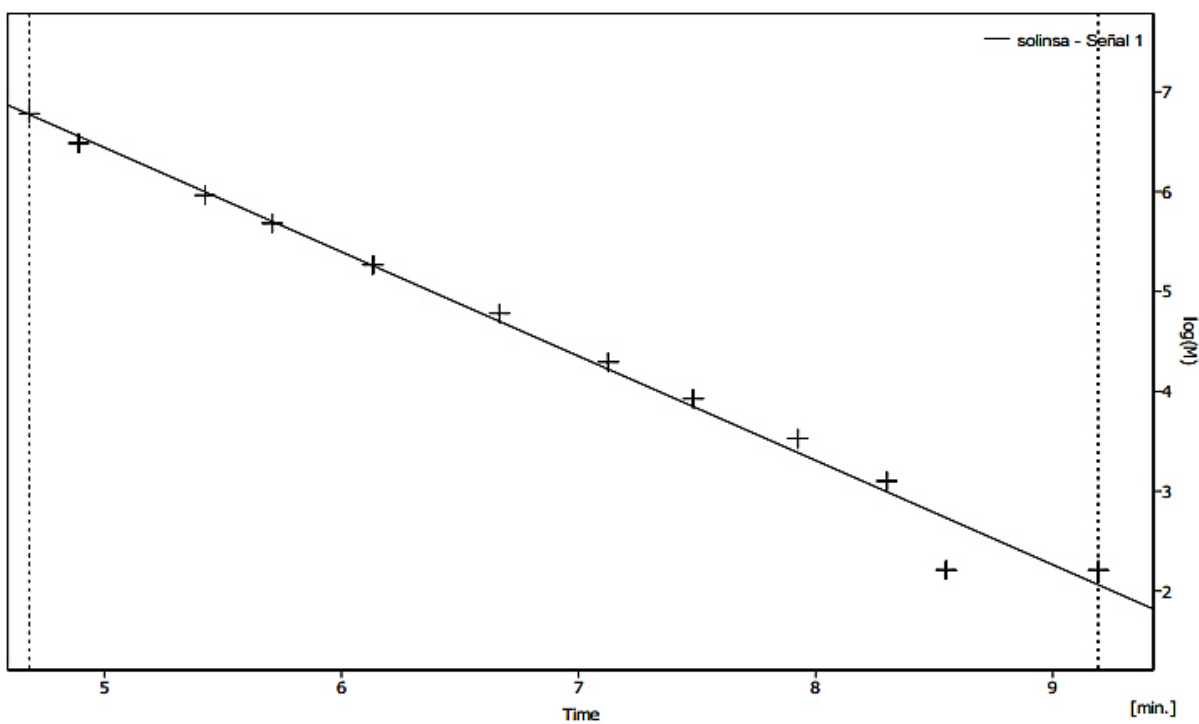


Figura 18. Curva de calibración para la cromatografía de permeación en gel.

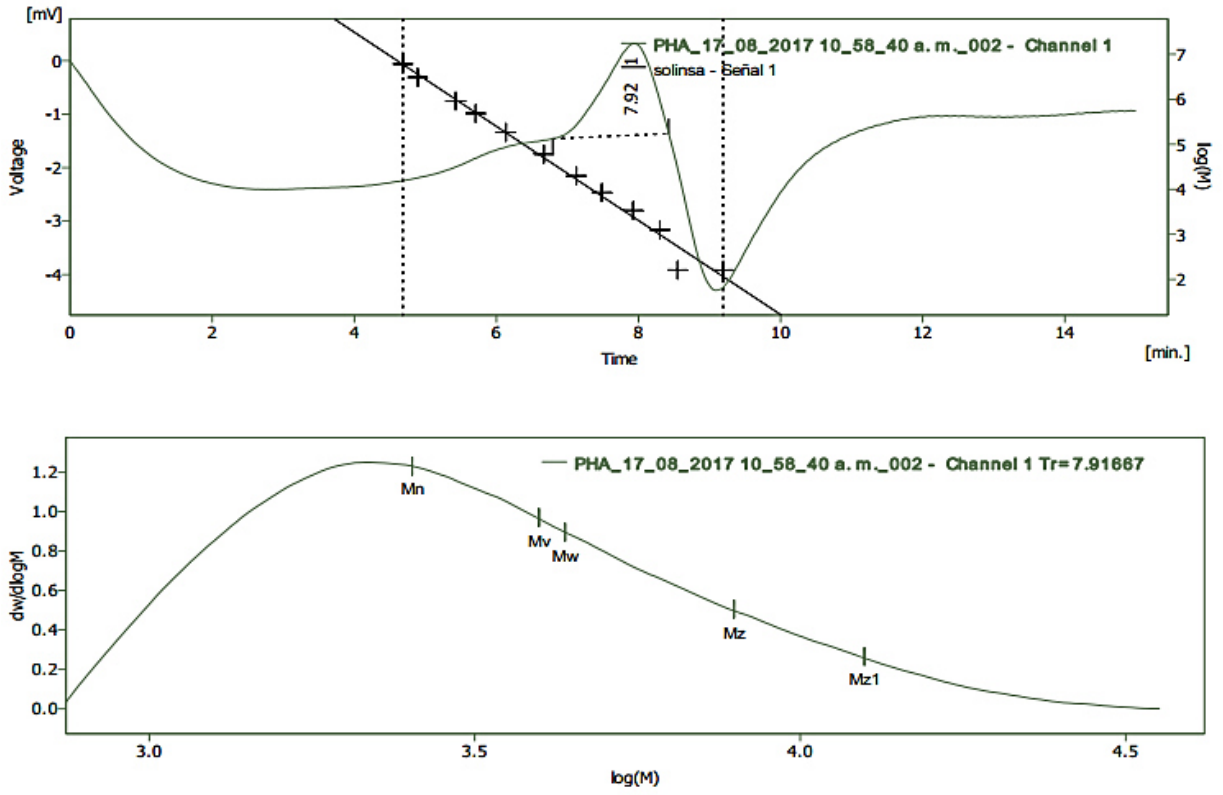


Figura 19. Cromatograma de permeación en gel.

CONCLUSIONES

B. halotolerans es un microorganismo Gram (+) que presenta un crecimiento óptimo en medio agar soya tripticaseína, alcanzó la fase exponencial de crecimiento aproximadamente a las 24 horas y el inicio de la fase de muerte a las 60 horas en medio TCS. Dentro de su perfil bioquímico encontramos que es positivo para las pruebas ONPG, ADH, VP, GLU, RHA SAC, AMY y ARA.

El suero de leche dulce fue el utilizado para la producción del biopolímero debido a su composición con menor cantidad de nutrientes favoreciendo el estrés nutricional para la bacteria.

En el diseño exploratorio nos arrojó que los factores que afectan la producción de PHA son la temperatura, la cantidad de inóculo y la cantidad de NaCl, siendo este primero el que mayor impacto tiene. Con base en los resultados de los ensayos, el diseño Box-Behnken determinó la optimización con los siguientes parámetros para cada factor: Inóculo 15%, NaCl 20% y temperatura (28°C), obteniendo un rendimiento de producción del 0.169%.

La caracterización del producto por FT-IR muestra la señal característica del PHB a 1740 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O del grupo carbonilo; en el análisis de ^{13}C -RMN se observaron señales correspondientes a 9 carbonos, así mismo una señal a 169.1 ppm correspondiente a los grupos éster del butirato y valerato, y se tiene una señal a 19.7 ppm correspondiente al CH_3 del valerato, lo que nos hace inferir que el producto obtenido es PHBV. El M_n del compuesto obtenido por CPG es de 2,535 kDa y el M_w de 4,579 kDa, con un índice de polidispersión de 1.80.

PERSPECTIVAS

Al ya tener optimizada su producción, es importante llevarla a una escala mayor (2 L, 7 L y 11 L), para generar más biopolímero y buscar aplicaciones.

Las aplicaciones sugeridas son en micro-cápsulas para el riego de fertilizantes al campo, en nano-esferas para el transporte de medicamentos en el cuerpo humano y como aditivos para biocombustibles.

REFERENCIAS

- Alsaed AK, Ahmad R, Aldoomy H, et al (2013) Characterization, concentration and utilization of sweet and acid whey. *Pakistan J Nutr* 12:172–177. doi: 10.3923/pjn.2013.172.177
- Babel W, Steinbüchel A (2001) Biopolyesters. Special issue of advances in Biochemistry. Engineering. Biotechnology., 1st. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Alemania
- Baikar V, Rane A, Deopurkar R (2017) Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Bacillus megaterium* VB89 Isolated from Nisargruna Biogas Plant. *Appl Biochem Biotechnol* 1–13. doi: 10.1007/s12010-017-2441-4
- Balakrishna Pillai A, Jaya Kumar A, Thulasi K, Kumarapillai H (2017) Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian J Microbiol* 48:451–460. doi: 10.1016/j.bjm.2017.01.005
- Ben-Gad D, Gerchman Y (2017) Reclassification of *Brevibacterium halotolerans* DSM8802 as *Bacillus halotolerans* comb . nov . Based on Microbial and Biochemical Characterization and Multiple Gene Sequence. *Curr Microbiol* 74:1–5. doi: 10.1007/s00284-016-1143-4
- Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis , characteristics , processing and potential applications in packaging. 8:791–808. doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82
- Catzin J, Vargas I, Moguel F, Ramirez E (2014) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium , *Halomonas nitroreducens* , isolated from hypersaline ponds. doi: 10.1111/jam.12605
- Cervantes-Uc JM, Catzin J, Vargas I, et al (2014) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *J Appl Microbiol* 11. doi: 10.1111/jam.12605
- Cha S, Son J, Jamal Y, et al (2016) Characterization of polyhydroxyalkanoates extracted from wastewater sludge under different environmental conditions. *Biochem Eng J* 112:1–12. doi: 10.1016/j.bej.2015.12.021
- Chen YJ, Huang YC, Lee CY (2014) Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *J Biosci Bioeng* 118:145–152. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.01.012
- Colombo B, Pepè T, Reis M, et al (2016) Bioresource Technology Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresour Technol* 218:692–699. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.024
- DIBICO (1972) *Caldo Luria-Bertani*. México, Distrito Federal
- Escapa IF (2012) Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida*:

implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. 1–217. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2

- Farshad M (2006) Plastic Pipe Systems: Failure Investigation and Diagnosis, First Edit. BH, Suiza
- Fujiwara Montelongo R (2015) NTR Periodismo Crítico. En México se recicla 15% Anu. 800 mil toneladas PET 1.
- García-Garibay M, Quintero-Ramírez R, López-Munguía A (2004) Biotecnología alimentaria, Quinta Edi. LIMUSA, México, Distrito Federal
- GCOM (2017) *Brevibacterium halotolerans*. In: Species Inf. http://gcm.wfcc.info/speciesPage.jsp?strain_name=Brevibacterium_halotolerans. Accessed 1 Sep 2017
- González-García Y, Carlos J, Contreras M, et al (2013) Síntesis y Biodegradación de Polihidroxiálcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Rev Int Contam Ambient* 29:77–115.
- González-García Y, Nungaray J, Córdova J, et al (2008) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:629–633. doi: 10.1007/s10295-007-0299-0
- Gouveia AR, Freitas EB, Galinha CF, et al (2017) Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. *N Biotechnol* 37:108–116. doi: 10.1016/j.nbt.2016.07.001
- Gumel AM, Annuar MSM, Heidelberg T (2012) Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0045214
- Inc M (2016) Soporte de MiniTab 17. <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/doe/response-surface-designs/what-is-a-box-behnken-design/>.
- INEGI (2015) Censo Económico. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ce/ce2014/>.
- Jacquel N, Lo CW, Wei YH, et al (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J* 39:15–27. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029
- Jiang G, Hill DJ, Kowalczyk M, et al (2016) Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17071157
- Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polym Degrad Stab* 83:79–86. doi: 10.1016/S0141-3910(03)00227-1
- Kaur G, Roy I (2015) Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates.

29:157–172. doi: 10.15255/CABEQ.2014.2255

- Koenig JL (2001) *Infrared and Raman Spectroscopy of polymers*, 12st edn. Rapra, USA
- Koller M, Miranda M, Dias DS, Braunegg G (2015) Liquefied Wood as Inexpensive Precursor-Feedstock for Bio-Mediated Incorporation of (R)-3-Hydroxyvalerate into Polyhydroxyalkanoates. 6543–6557. doi: 10.3390/ma8095321
- Kumar S, Abe H (2010a) *Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates*.
- Kumar S, Abe H (2010b) *Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates*, First. Smithers, United Kingdom
- Laboratorios-Britania SA (2015) *Caldo soya tripticaseína*. Argentina
- López-Ayala O (2016) *Producción de PHA por bacterias aisladas del Estado de Nuevo León, México*. Universidad Autónoma de Nuevo León
- Marill KA (2004) *Advanced statistics: linear regression, part I: simple linear regression*. Acad Emerg Med 11:87–93.
- Munir S, Jamil N (2015) Characterization of Polyhydroxyalkanoates Produced by Contaminated Soil Bacteria using Wastewater and Glucose as Carbon Sources. 14:1605–1611.
- Ng LM, Sudesh K (2016) Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase. *J Biosci Bioeng* 122:550–557. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.024
- Ortiz Hernández ML (2013) El impacto de los plásticos en el ambiente. In: *Cent. Investig. en Biotecnol. la Univ. Autónoma del Estado Morelos*. <http://www.jornada.unam.mx/2013/05/27/eco-f.html>.
- Pasto D, Johnson C (2003) *Organic structure determination*, 1st. Ed. Reverté, S.A., España
- Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R (2010) Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1687–1696. doi: 10.1007/s00253-009-2397-6
- Rodríguez J (2016) Más plásticos que peces en el océano para el 2050. 1.
- Ruiz-García C, Quesada E, Martí F, et al (2005) *Bacillus axarquiensis* sp . nov . and *Bacillus malacitensis* sp . nov ., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1279–1285. doi: 10.1099/ijs.0.63567-0
- Sakai K, Miyake S, Iwama K, et al (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA-accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol* 118:13. doi: 10.1111/jam.12683
- Setiadi T, Aznury M, Trianto A, Pancoro A (2015) Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Ralstonia eutropha* JMP 134 with volatile fatty acids from palm oil mill effluent as precursors Tjandra Setiadi , Martha Aznury , Azis Trianto and Adi Pancoro. *Water Sci*

- Technol 72:1889–1896. doi: 10.2166/wst.2015.391
- Sigma-Aldrich (2017) Peptone from soybean, enzymatic digest. In: Microbiology. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70178?lang=es®ion=MX>. Accessed 1 Aug 2017
- Silverstain R, Webster F, Kiemle D (2005) Spectrometric identification of organic compounds, Seventh Ed. Jhon Wiley, New York
- Stuart B (2004) Infrared spectroscopy: introduction. In: Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. WILEY, Rusia, pp 1–2
- Sudesh H, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25:54.
- Sudesh K, Bhubalan K, Chuah JA, et al (2011) Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1373–1386. doi: 10.1007/s00253-011-3098-5
- Thomas S, Ninan N, Mohan S, Francis E (2013) Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends and IPN's, Volume 2. Apple Academic Press, Toronto
- Tindall BJ (2017) The consequences of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García et al. 2005, *Bacillus malacitensis* Ruiz-García et al. 2005 and *Brevibacterium halotolerans* Delaporte and Sasson 1967 (Approved Lists 1980) being treated as heterotypic synonyms. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:175–176. doi: 10.1099/ijsem.0.001589
- Urribarrí L, Vielma A, Paéz G, et al (2004) Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia* 14:297–302.
- Urtuvia V, Villegas P, González M, Seeger M (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int J Biol Macromol* 70:208–213. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001
- Valero-Valdivieso M, Ortegon Y, Uscategui Y (2013) Biopolímeros: Avances Y Perspectivas Biopolymers: Progress and Prospects. *SciELO Colômbia* 171–180.
- Webb HK, Arnott J, Crawford RJ, Ivanova EP (2013) Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly(ethylene terephthalate). 1–18. doi: 10.3390/polym5010001
- Weininger S, Stermitz F (1988) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y carbono. In: Química orgánica, First. Reverté, S.A., Barcelona, pp 323–326