

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



ESTUDIO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* PRODUCTORAS DE
BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS (PHA) Y SU POTENCIAL
APLICABILIDAD BIOMÉDICA

Por

QFB GUSTAVO DE JESUS SAN MIGUEL GONZALEZ

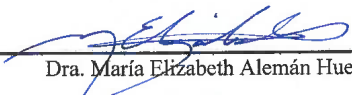
Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

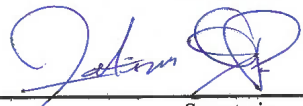
2025

ESTUDIO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* PRODUCTORAS
DE BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS (PHA) Y SU POTENCIAL
APLICABILIDAD BIOMÉDICA

Comité de Tesis


Dra. María Elizabeth Alemán Huerta

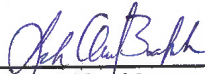
Presidente


Dra. Fatima Lizeth Gandarilla Pacheco

Secretario


Vocal 1

Dra. Susana de la Torre Zavala


Vocal 2

Dra. Isela Quintero Zapata


Vocal 3

Dra. Verónica Almaguer Cantón


Subdirector de Posgrado

Dra. Katiushka Arévalo Niño



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

ESTUDIO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* PRODUCTORAS
DE BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS (PHA) Y SU POTENCIAL
APLICABILIDAD BIOMÉDICA

Dirección de Tesis



Dra. María Elizabeth Alemán Huerta

Director



Director externo

Dr. Raúl Enrique Martínez Herrera

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnologías e Innovación (SECIHTI) por el apoyo otorgado a manera de beca nacional de Doctorado (beca número 1152042), a la UANL por el apoyo económico aportado por los proyectos PAICYT 2022 y 2023, y la beca de Movilidad Académica Internacional a través del departamento de Internacionalización.

Agradecimiento especial a la Dra. María Elizabeth Alemán Huerta por brindarme este proyecto, en el cual trabajamos arduamente para culminarlo, por su gran apoyo y consejos en todo mi posgrado, fue la mejor directora de tesis que pude tener. Así como al Dr. Raúl Enrique Martínez Herrera por enseñarme a trabajar de manera correcta, por compartir sus conocimientos conmigo y guiar todo mi proyecto de tesis. También a la Dra. Isela Quintero Zapata, por su apoyo técnico, moral y profesional en todo momento. Además, se agradece a la Dra. Susana de la Torre Zavala y al Dr. Hamlet Avilés Arnaut, por su valioso apoyo técnico en parte importante de este proyecto, y a la técnica del laboratorio 3, Teresa Burgos por su apoyo técnico y moral.

Igualmente, se agradece a la Dra. Maraolina Domínguez Díaz, por guiar mi trabajo en la estancia de investigación en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Saltillo (CINVESTAV), así mismo al Dr. José Escorcía García por el espacio brindado en su laboratorio en el CINVESTAV. A la Dra. Elisabeth Engel López por aceptarme en su laboratorio en el IBEC Barcelona para lograr mi estancia de investigación.

Finalmente, a todos mis colegas y amigos que conocí en este camino: Mariana, Jhossep y Alex por ser los mejores compañeros de generación. A Bere, Diego, Melennie, Valeria, David y Paola por ser parte de esta aventura.

DEDICATORIAS

Primeramente, a mi madre, todo lo que soy se lo debo a ella.

A mis hermanos, que los quiero con todo mi corazón.

A mi abuela y toda mi familia por el apoyo brindado.

A mis amigos, que siempre confiaron en mí.

A Dios, por acompañarme en cada lugar y momento de mi formación.

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnologías e Innovación (SECIHTI) y el proyecto ProACTI 2023 y 2024.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. RESUMEN GRAFICO	3
4. ANTECEDENTES	4
4.1 Problemática ambiental	4
4.2 Biopolímeros	5
4.3 Polihidroxialcanoatos	6
4.4 Bioprospección	8
4.5 Géneros microbianos productores de PHA	9
4.6 Aplicaciones	9
5. JUSTIFICACIÓN	12
6. HIPÓTESIS	13
7. OBJETIVO GENERAL	14
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15

9. CAPÍTULO 1. Aislamiento y selección de cepas del género <i>Bacillus</i> productoras de biopolímeros tipo Polihidroxialcanoatos (PHA)	16
9.1 Resumen	16
9.2 Introducción	17
9.3 Material y métodos	18
9.4 Resultados	22
9.5 Discusión	26
10. CAPÍTULO 2. Optimización de los parámetros de fermentación de dos cepas bacterianas mediante un diseño experimental Taguchi	28
10.1 Resumen	28
10.2 Introducción	29
10.3 Material y métodos	30
10.4 Resultados	34
10.5 Discusión	41
11. CAPÍTULO 3. Caracterización bioquímica y molecular (16S ARNr) de la cepa de <i>Bacillus</i> híper productora	43
11.1 Resumen	43
11.2 Introducción	44
11.3 Material y métodos	45
11.4 Resultados	48
11.5 Discusión	50

12. CAPÍTULO 4. Comportamiento cinético de <i>Bacillus cereus</i> 12GS en relación a la productividad de PHA y caracterización fisicoquímica del polímero	52
12.1 Resumen	52
12.2 Introducción	53
12.3 Material y métodos	54
12.4 Resultados	59
12.5 Discusión	64
13. CAPÍTULO 5. Elaboración de membranas hiladas de PHB y su evaluación en la liberación controlada de nicotina	66
13.1 Resumen	66
13.2 Introducción	67
13.3 Material y métodos	68
13.4 Resultados	73
13.5 Discusión	76
14. CAPÍTULO 6. Estudio de la factibilidad de andamios electrohilados de PHB como vehículo en el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos	78
14.1 Resumen	78
14.2 Introducción	79
14.3 Material y métodos	80
14.4 Resultados	86
14.5 Discusión	92
15. CONCLUSIONES	94

16. PERSPECTIVAS	95
17. DECLARACIÓN SOBRE EL USO DE HERRAMIENTAS DE IA	96
18 CRÉDITOS	97
19. BIBLIOGRAFÍA	98
20. RESUMEN BIOGRÁFICO	112
21. PRODUCTOS GENERADOS	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis elemental de suelo agrícola en estudio.	23
Tabla 2. Evaluación cualitativa de PHA por cepas aisladas de <i>Bacillus</i> .	24
Tabla 3. Evaluación cuantitativa de biomasa g/L, PHA g/L, % PHA de cepas de <i>Bacillus</i> .	25
Tabla 4. Factores y niveles utilizados en el diseño experimental de Taguchi para producir PHA.	30
Tabla 5. Diseño experimental utilizando un arreglo ortogonal de Taguchi L25 (5*4) de la cepa B12.	34
Tabla 6. Diseño experimental utilizando un arreglo ortogonal de Taguchi L25 (5*4) de la cepa B1.	37
Tabla 7. Comparación de la producción de B12 y B1 en condiciones originales y optimizadas.	40
Tabla 8. Características bioquímicas y morfológicas de <i>Bacillus</i> sp. (B12) y <i>Bacillus cereus</i> saba.zh.	48
Tabla 9. Producción y rendimiento máximo de PHB de distintos <i>B. cereus</i> y su lugar de aislamiento.	51
Tabla 10. Parámetros cinéticos calculados para <i>B. cereus</i> 12GS.	59
Tabla 11. Propiedades térmicas del PHB comercial (Sigma-Aldrich) y del PHB producido por <i>B. cereus</i> 12GS	63
Tabla 12. Productividad volumétrica (Qp) de biopolímeros por distintas cepas de <i>B. cereus</i> utilizando glucosa como fuente de carbono.	64
Tabla 13. Componentes de las membranas de PHB a evaluar.	69
Tabla 14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de PHB y andamios de PHB.	87
Tabla 15. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de andamios de PHB cargado con nanopartículas.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación y ejemplos de biopolímeros.	5
Figura 2. Morfología microscópica de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas (1–20) observadas mediante microscopía óptica después de 24 h, 30 °C, agar nutritivo, tinción de Gram (100X).	22
Figura 3. Tinción para la confirmación de PHA. a) negro Sudán B b) azul de Nilo A de una cepa de <i>Bacillus</i> .	23
Figura 4. Efecto del factor de control para la optimización de PHA de la cepa B12. a) Gráfica de efectos principales para Medias, b) Gráfica de efectos principales para Relaciones SN.	36
Figura 5. Efecto del factor de control para la optimización de PHA de la cepa B1. a) Gráfica de efectos principales para Medias, b) Gráfica de efectos principales para Relaciones SN.	39
Figura 6. Árbol filogenético sobre la relación genética de PRJNA1066477 <i>B. cereus</i> 12GS. Se presenta el número de acceso en GenBank para cada cepa. Se utilizó <i>Amphibacillus</i> sp. como grupo externo.	49
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>B. cereus</i> 12GS con 20 g/L de fuente de carbono.	60
Figura 8. Análisis cinético de la producción de PHB por <i>B. cereus</i> 12GS.	60
Figura 9. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de a) PHB comercial (Sigma-Aldrich), b) PHB producido por <i>B. cereus</i> 12GS.	61
Figura 10. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de a) PHB comercial (Sigma-Aldrich) b) PHB producido por <i>B. cereus</i> 12GS.	62
Figura 11. Espectros de ¹ H RMN de PHB producido por <i>B. cereus</i> 12GS.	63
Figura 12. Análisis FTIR de las membranas preparadas.	72
Figura 13. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las composiciones de membrana estudiadas: a) PHB, b) PHB/PEG, c) PHB/Nicotina, d) PHB/PEG/Nicotina. Los histogramas correspondientes del diámetro de la fibra se presentan respectivamente.	73

Figura 14. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las composiciones de membrana estudiadas: a) PHB, b) PHB/PEG, c) PHB/Nicotina, d) PHB/PEG/Nicotina y su respectivo ángulo de contacto.	74
Figura 15. Mapeo elemental de las membranas que contienen a) PHB, b) PHB/PEG, c) PHB/Nicotina, d) PHB/PEG/Nicotina.	75
Figura 16. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de andamios de PHB elaboradas a diferentes concentraciones.	86
Figura 17. Ensayo de células vivas/muertas para la determinación de la viabilidad de las células HDF. Control a) día 1, b) día 3, c) día 7. Andamio de PHB d) día 1, e) día 3, f) día 7.	87
Figura 18. Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos a) día 0, b) día 1, c) día 3, d) día 7.	88
Figura 19. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de los andamios (Alamar blue).	89
Figura 20. Evaluación del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> (Alamar blue) de andamios de PHB cargadas con nanopartículas de calcio.	89
Figura 21. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de los andamios cargados con nanopartículas.	90
Figura 22. Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de los andamios: a) PHB alineado, b) PHB/Ca-np alineado. Se presentan los histogramas correspondientes del diámetro de la fibra respectivamente.	98

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Biopolímeros

- **PEG:** Polietilenglicol.
- **PHA:** Polihidroxialcanoatos.
- **PHB:** Polihidroxibutirato.
- **PHB/Ca-np:** Polihidroxibutirato cargado con nanopartículas de Calcio.
- **PHBV:** Polihidroxibutirato-valerato.
- **PLA:** Ácido poliláctico.
- **scl-PHA:** PHA de cadena corta.

Células

HDF: Fibroblastos dérmicos humanos

Elementos y compuestos químicos

- **Ca:** Calcio.
- **CDCl₃:** Cloroformo deuterado.
- **CHCl₃:** Cloroformo.
- **CO₂:** Dióxido de carbono.
- **DNS:** Ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- **NaCl:** Cloruro de sodio.
- **NaOCl:** Hipoclorito de sodio.
- **PBS:** Disolución salina tamponada con fosfato.

Medios de cultivo

- **DMEM:** medio Eagle modificado de Dulbecco.
- **FBS:** Suero bovino fetal.
- **GRPD:** Medio rico en glucosa y deficiente en peptona.

Metodologías

- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

Métodos de caracterización fisicoquímica

- **DSC:** Calorimetría diferencial de barrido.
- **FTIR:** Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier.
- **^1H -RMN:** Resonancia magnética nuclear de protones.
- **SEM:** Microscopía electrónica de barrido.

Parámetros cinéticos y productivos

- **qp:** Velocidad de generación de producto.
- **Qp:** Productividad volumétrica de P3HB.
- **qs:** Velocidad de consumo de sustrato.
- **Td:** Tiempo de duplicación.
- **Y p/s:** Rendimiento producto sobre sustrato.
- **Y p/x:** Rendimiento producto sobre biomasa.
- **Y x/s:** Rendimiento biomasa sobre sustrato.
- **% PHA:** Porcentaje de acumulación de PHA.
- **%PHB:** Porcentaje de acumulación de PHB.
- **μ :** Velocidad de crecimiento.

Propiedades térmicas y cristalinas

- **Tc:** Temperatura de cristalización.
- **Td:** Temperatura de degradación.
- **Tm:** Temperatura de fusión.
- **Xc:** Grado de cristalinidad.
- **ΔH_m :** Entalpía de fusión.

Pruebas bioquímicas

- **SIM:** Azufre, Indol y Motilidad

- **TSI:** Triple Azúcar Hierro
- **MIO:** Motilidad Indol Ornitina
- **MR-VP:** Voges- Proskauer

Unidades

- **cm:** Centímetro.
- **cm⁻¹:** Longitud de onda.
- **G:** Gramos.
- **gg⁻¹:** Gramos por gramo.
- **g/L:** Gramos por litro.
- **h:** Horas.
- **Kb:** Kilobase.
- **kV:** Kilovolts.
- **L:** Litros.
- **MHz:** Frecuencia de radiofrecuencia en megahercios.
- **mg:** Miligramos.
- **mL:** Mililitros.
- **mL/h:** Mililitro por hora.
- **mm:** milímetros.
- **nm:** Nanometros.
- **p/v:** Peso/Volumen.
- **rpm:** Revoluciones por minuto
- **UFC/mL:** Unidades formadoras de colonia por mililitro.
- **V:** Volts
- **v/v:** Volumen/Volumen.
- **°C:** Grados centígrados.
- **μL:** microlitros
- **μg:** Microgramos.
- **Xc (%):** Porcentaje de cristalinidad

1. RESUMEN

La producción excesiva de plásticos sintéticos ha causado grandes problemas ambientales en distintos ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a la gran acumulación y baja reciclabilidad. Por lo tanto, se ha intensificado la investigación de los biopolímeros, los cuales se definen como macromoléculas naturales o producidas mediante procesos biotecnológicos, formadas por la polimerización de monómeros orgánicos, que se obtienen a partir de organismos vivos o de materias primas renovables mediante fermentación microbiana, ingeniería genética o síntesis enzimática. Dentro de estos, existen los Polihidroxialcanoatos (PHA) son biopolímeros microbianos con características biodegradables y biocompatibles que son producidos por distintos microorganismos. Dentro del grupo de los PHA, el polihidroxibutirato (PHB) se destaca debido a que posee características similares al polipropileno. Por esta razón, el objetivo de este proyecto fue aislar cepas bacterianas del género *Bacillus*, seleccionar una cepa altamente productora de PHA, Determinar su género y especie mediante análisis filogenético, así como optimizar los parámetros de fermentación, estudiar la cinética de producción de PHA a distintos tiempos de fermentación, así como caracterizar el biopolímero con técnicas fisicoquímicas (FTIR, DSC, RMN) y evaluar la potencial aplicabilidad del biomaterial en el área biomédica. Los resultados mostraron a una cepa altamente productora de PHA, identificada como *B. cereus* 12GS, la cual demostró hasta un 87% de rendimiento utilizando parámetros óptimos de fermentación. Asimismo, se analizó el extracto polimérico, demostrando que se produjo un Polihidroxialcanoato de cadena corta denominado polihidroxibutirato (PHB), se demostró que el PHB producido cuenta con características ideales para distintas aplicaciones. El PHB producido sirvió como modelo para la producción de andamios hilados y electrohilados, donde demostró ser un material apto para el crecimiento de células HDF (Fibroblastos dérmicos humanos).

Palabras clave: Andamios; *Bacillus*; Biopolímeros; Fermentación; Polihidroxibutirato

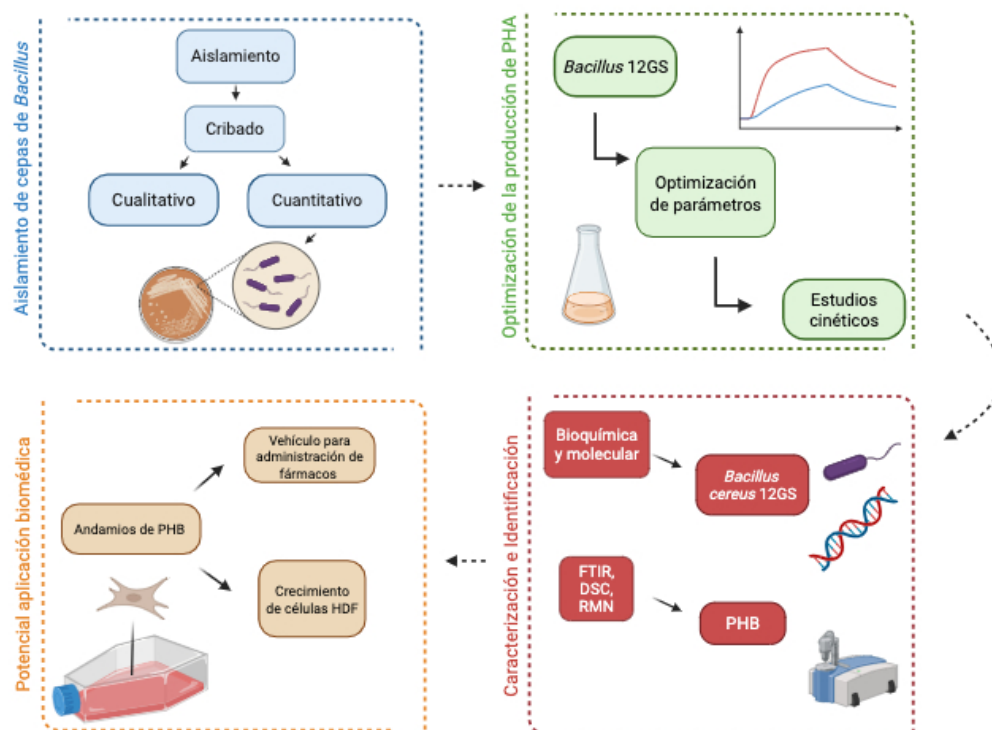
2. ABSTRACT

The excessive production of synthetic plastics has caused significant environmental issues in various terrestrial and aquatic ecosystems, due to their high accumulation and low recyclability. Consequently, research on biopolymers has intensified. These are defined as natural macromolecules, or macromolecules produced through biotechnological processes, formed by the polymerization of organic monomers obtained from living organisms or renewable raw materials via microbial fermentation, genetic engineering, or enzymatic synthesis. Among these, Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are microbial biopolymers characterized by their biodegradability and biocompatibility and are synthesized by various microorganisms. Within the PHA group, polyhydroxybutyrate (PHB) stands out due to its properties, like polypropylene.

Therefore, this project aimed to isolate bacterial strains of the *Bacillus* genus, select a highly efficient PHA-producing strain, determine its genus and species through phylogenetic analysis, and optimize fermentation parameters. Additionally, the study aimed to investigate the production kinetics of PHA at different fermentation times, characterize the biopolymer using physicochemical techniques (FTIR, DSC, NMR), and evaluate the potential applicability of the biomaterial in the biomedical field. The results revealed a highly efficient PHA-producing strain, *Bacillus cereus* 12GS, which achieved up to 87% yield under optimal fermentation conditions. Moreover, analysis of the polymer extract confirmed the production of a short chain polyhydroxyalkanoate, specifically polyhydroxybutyrate (PHB), exhibiting properties suitable for various applications. The produced PHB served as a model for the fabrication of spun and electro spun scaffolds, demonstrating its suitability as a material for the growth of human dermal fibroblast (HDF) cells.

Keywords: *Bacillus*; Biopolymers; Fermentation; Polyhydroxybutyrate; Scaffolds.

3. RESUMEN GRÁFICO



Creado en: Biorender.com

4. ANTECEDENTES

4.1 Problemática ambiental

La dependencia de la sociedad actual de los plásticos derivados del petróleo o plásticos convencionales, es innegable debido a su gran desempeño en términos de propiedades físicas y durabilidad. Sin embargo, tienen aspectos negativos que incluyen la recalcitrancia a la biodegradación, la toxicidad después de la incineración y el acumulamiento masivo de desechos en los vertederos y el medio ambiente marino. Esto, a su vez, ha estado conduciendo a una de las crisis ambientales más graves, esta es, la contaminación por plástico (Mohapatra et al., 2020).

La cantidad de residuos plásticos aumentó significativamente durante la pandemia de COVID-19 (Badrkhani, 2021). Se observó un aumento importante en el uso de plásticos de un solo uso. Por lo tanto, existe una enorme cantidad de desechos no gestionados que amenazan directamente los ecosistemas. Según la literatura, se producen y desechan 1.6 millones de toneladas de desechos plásticos y 3400 millones de mascarillas cada día (Badrkhani, 2021; Nanekaran et al., 2023). El impacto perjudicial de este problema en el ecosistema ha sido revelado por varios estudios científicos que señalan la necesidad urgente de desarrollar materiales más amigables con el medio ambiente. La preocupación por el rápido agotamiento de los combustibles fósiles ha creado un interés renovado por desarrollar procesos alternativos para producir polímeros de origen biológico que satisfagan las necesidades humanas (Aeschelmann & Carus, 2015).

Los problemas relacionados con la acumulación de plásticos que no son biodegradables procedentes del petróleo en el medio ambiente, y la rápida terminación de los recursos naturales que se utilizan en su producción, han motivado la investigación de alternativas a los polímeros no degradables. En tal caso, los plásticos biodegradables ofrecen la mejor solución al peligro ambiental que es causado por los plásticos convencionales y sintéticos (Muhammadi et al., 2015). El desafío para los nuevos polímeros, se basa más que nada en conservar las características fisicoquímicas de los plásticos tradicionales, pero que a su vez, se demuestren competencia a los plásticos sintéticos, lo que indica buen camino debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Keshavarz & Roy, 2010).

4.2 Biopolímeros

Se pueden clasificar como biopolímeros naturales, biopolímeros sintetizados químicamente y biopolímeros microbianos (**Fig. 1**). Los polímeros naturales se clasifican en tres clases con respecto a sus estructuras químicas como polisacáridos, donde destaca el almidón, además de proteínas como la albumina y por último poliésteres (Olatunji, 2015). Los biopolímeros sintéticos son un tipo de copoliéster de origen natural, mientras que los biopolímeros microbianos, como los polihidroxicanoatos (PHA), son bioplásticos termoestables y sintetizados por bacterias acumulados como reserva de energía (Bajaj & Singhal, 2011). En este contexto, la solución ideal a la contaminación ambiental por plásticos es utilizar bioplásticos o biopolímeros derivados de recursos de biomasa renovable o producidos por una variedad de microorganismos. Al mercado actual han llegado varios biopolímeros, sin embargo, sólo el ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxicanoatos (PHA) poseen propiedades térmicas y mecánicas similares a las de los plásticos convencionales (Kaur et al., 2017).

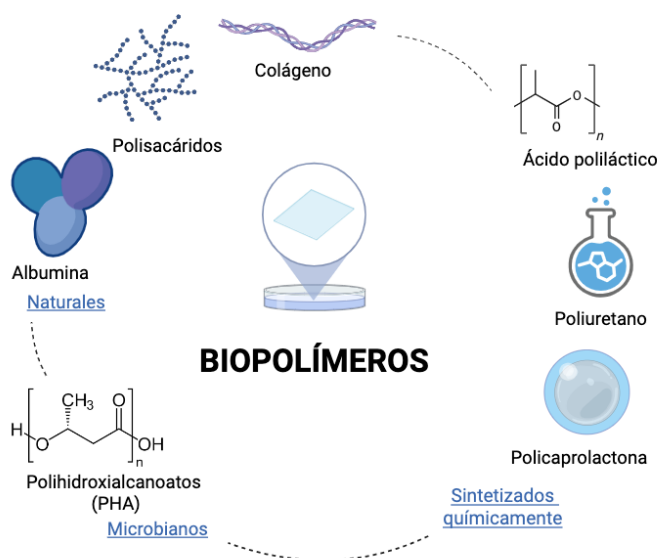


Figura 1. Clasificación y ejemplos de biopolímeros.

4.3 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son bioplásticos termoestables, sintetizados por bacterias que los acumulan como reservas de carbono y energía, esto de gran importancia

en las distintas cepas productoras, en forma de gránulos intracitoplasmáticos. Dependiendo de la especie bacteriana, del sustrato que se usa y de la fase de crecimiento microbiana, éstos pueden llegar a representar hasta más del 80 % del peso seco celular (Aramvash et al., 2015). Estos microorganismos pueden producirlos a partir de fuentes de carbono económicas generalmente residuos y son de suma importancia por sus características físicas similares a las de los plásticos convencionales que son derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno. Los PHA se pueden obtener a partir de recursos renovables como azúcares y aceites vegetales (Tsuge, 2016). Además, no se disuelven en agua, no son tóxicos, son biocompatibles, Estos tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o metano en condiciones anaerobias (Du et al., 2001). Los PHA se pueden clasificar en tres distintos grupos según la cantidad de carbonos presentes en su estructura (Raza et al., 2018):

- PHA de cadena corta (scl-PHA): monómeros que contienen menos de 5 átomos de carbono, donde destaca el Polihidroxibutirato (PHB).
- PHA de cadena media (mcl-PHA): monómeros que contienen de 5 a 14 átomos de carbono.
- PHA de cadena larga (lcl-PHA): con más de 14 átomos de carbono; suelen ser poco comunes.

Los PHA han recibido atención debido a sus aplicaciones en la industria del embalaje, biomédica, envasado y agrícola. En el embalaje, sirven como alternativas sostenibles y al mismo tiempo se desarrollan para su uso en plásticos rígidos y flexibles, como revestimientos y recubrimientos de papel, con propiedades similares al polietileno (Muthuraj et al., 2021) en el sector biomédico, pueden utilizarse como andamios para la ingeniería de tejidos y para dispositivos implantables, así como para sistemas de administración de medicamentos (Pulingam et al., 2022) en la agricultura, destacan como láminas y productos similares al embalaje, en estudios tempranos de mercado (Muthuraj et al., 2021). En México, se ha investigado el uso de agave y mezquite para la producción de estos biopolímeros, mismos que son importantes en diversos rubros de la economía y tradición mexicana, también se ha observado su potencial biotecnológico (Martínez-Herrera et al., 2021). Su aprovechamiento para la producción de Polihidroxialcanoatos, que es considerado como el plástico del futuro, el cual pretende seguir estudiando fuentes

de carbono económicas o de residuos que sirvan como fuente nutricional para su producción (Koller, 2017).

Uno de los representantes de los PHA de cadena corta (scl-PHA) de los biopolímeros microbianos es el polihidroxibutirato (PHB), debido a que contiene un grupo metilo en su estructura química; además, el PHB tiene una alta cristalinidad considerablemente mayor, una estabilidad térmica mejorada y una permeabilidad al oxígeno reducida en comparación con otros miembros de los PHA (Markl, 2018; Puppi et al., 2019).

El PHB ha ganado gran atención como reemplazo de polímeros comerciales no biodegradables debido a atributos de resistencia mecánica similar al polietileno (PE) y el polipropileno (PP). Además, el PHB exhibe la biodegradabilidad total en diversos entornos dinámicos naturales, como suelo, compostaje industrial y agua de mar (*Altaee et al., 2016; Thirumala et al., 2010*). Así mismo, tales propiedades inherentes del PHB permiten su aplicación en material de empaque, recubrimiento agrícola y como portador en sistema de administración de fármacos (Boey et al., 2021).

Las empresas productoras de PHA han aumentado dependiendo de su localización, Estados Unidos lidera Norteamérica, por empresas como Danimer Scientific y Newlight Technologies. En Europa, países como Alemania, Francia y Reino Unido poseen en conjunto el 35 % de la cuota de mercado mundial, mientras que Asia se perfila como un mercado importante con inversiones significativas (*Top Polyhydroxyalkanoate (PHA) Companies in Global 2025 | Global Growth Insights, n.d.*).

En la actualidad, existe una creciente demanda de producción de PHA. Según las estadísticas del Instituto Nova, se proyectó que la producción mundial de biopolímeros aumentaría un 400 % del 2013 al 2018. Dicho lo anterior, se documenta la promesa que ofrecen los PHA, reforzados por los avances en la ingeniería genética y la fermentación bacteriana, pero señalan que los desafíos económicos y técnicos limitan al desarrollo actual (Pulingam et al., 2022). El obstáculo significativo que dificulta la producción de PHA a gran escala sigue siendo su costo de producción (Aeschelmann & Carus, 2015). Se han invertido grandes esfuerzos en mitigar los gastos de producción de PHA, donde una parte se ha logrado mediante la búsqueda de cepas bacterianas eficientes y la optimización de los distintos procedimientos de fermentación y recuperación (Gurieff & Lant, 2007). Esos desafíos incluyen un alto costo de producción independiente a la aplicación; un

precio elevado de alrededor de 10 dólares por kilo, donde el costo de otros polímeros es más bajo (Bugnicourt et al., 2014). Para combatir tales problemáticas, se deben implementar el establecer los valores óptimos para cada uno de los parámetros de operación involucrados en el proceso de fermentación, siendo de mayor incidencia el pH, tiempo de fermentación y la temperatura (Kulpreecha et al., 2009), el uso de materias primas alternativas como desechos y residuos (Koller, 2018), combinar los materiales con otros polímeros de mayor resistencia (Hutanu, 2014) y lograr una pureza adecuada de los biomateriales (Pulingam et al., 2022).

4.4 Bioprospección

La bioprospección bacteriana consiste en la exploración y utilización sistémica sobre especies para descubrir nuevos compuestos y aplicaciones, especialmente en el campo de la biotecnología (Demisie et al., 2024). Además, la bioprospección no sólo implica una exploración científica, también un compromiso ético y legal, en especial bajo el marco del Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se seriven de su utilización, es decir, que al aislar bacterias de un entorno natural, se está accediendo a un recurso genético, y si este recurso tiene potencial biotecnológico, puede generar beneficios económicos (México Coyoacán et al., n.d.). La selección de la cepa microbiológica es el punto inicial para la producción de PHA deseado. Esta elección es de gran impacto en el tipo de sustrato utilizado, los parámetros de fermentación y la estructura molecular del biopolímero producido, de aquí viene la inquietud por seguir buscando nuevas cepas productoras con propiedades cada vez mejores de las ya reportadas (Han et al., 2014). Sin embargo, todavía hay muchas bacterias productoras de polihidroxialcanoatos potenciales que permanecen sin descubrir. Diversas investigaciones han intentado aislar nuevos biopolímeros que producen bacterias de varios entornos para producir nuevos componentes de PHA con potenciales aplicaciones industriales (Han et al., 2014). Así mismo, se han reportado aislamientos a partir de muestras de suelo caracterizadas por presentar condiciones climáticas favorables para el desarrollo de microorganismos productores de PHA (Thirumala et al., 2022).

4.5 Géneros microbianos productores de PHA

Se han reportado más de 300 especies de microorganismos productores de PHA, principalmente bacterias. Diversas cepas se han estudiado en la producción de PHA, y por este motivo se planea producirlo a escala industrial utilizando bacterias Gram negativas como *Cupriavidus necator*, *Aeromonas hydrophila*, y algunas especies de *Pseudomonas*, porque estas bacterias muestran un mejor crecimiento y una mayor producción de PHA que las bacterias Gram positivas (Arikawa et al., 2017; Wang et al., 2017). Sin embargo, los PHA aislados de bacterias Gram negativas contienen endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS) de la membrana exterior, que dan una fuerte reacción inmunogénica en los seres humanos. Por esto, los PHA de tales bacterias, son indeseables, particularmente para aplicaciones biomédicas y/o en el área de alimentos (Reinecke & Steinbüchel, 2008).

Hasta el momento, se conocen diversas especies bacterianas productoras de PHA, incluyendo diversas bacterias Gram negativas y Gram positivas, pero solo unas pocas se utilizan industrialmente, dadas sus altas eficiencias en la transformación de los sustratos y concentración final del biopolímero en sus células (López et al., 2012).

Con respecto a las bacterias Gram positivas, se han reportado como productoras de PHA algunas especies del género *Bacillus*, incluyendo *B. megaterium* y *B. cereus* (San Miguel-González et al., 2024) así como también actinomicetos del género *Streptomyces* (Vishnuvardhan Reddy et al., 2009). El grupo de bacterias Gram positivas con mejor caracterización y el primer productor de PHA del género *Bacillus* fue identificado como *Bacillus megaterium* por Lemoigne en 1926. Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado muchas especies de bacilos productores de PHA de varios ambientes. Algunos de estos pueden producir copolímeros de PHA a partir de fuentes de carbono baratas y estructuralmente no relacionadas (Vishnuvardhan Reddy et al., 2009).

4.6 Aplicaciones

Debido a que los PHA son biodegradables y biocompatibles, suelen tener aplicaciones prometedoras e interesantes. Se ha utilizado en el campo de la industria para producir algunas botellas, películas protectoras, fibras para empacar los alimentos y cubiertas agrícolas (López et al., 2012). También ha sido reportado para distintas aplicaciones industriales como material consumibles de uso diario, aditivos para biocombustibles y

recubrimiento de papel. Varias combinaciones de copolímeros producen biopolímeros con varias propiedades físicas interesantes (Rodríguez-Sepúlveda & Orrego-Alzate, 2016). En la agricultura, el PHB se ha informado para la producción de la manufactura de bolsas (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). A pesar de que aún no hay empresas mexicanas que se dedican a la producción de este biopolímero, existe ya un importante avance en la investigación sobre el uso de sustratos económicos que pueden disminuir el costo de fermentación (Flores-Sánchez et al., 2017).

Estas aplicaciones están mayormente producidas a las comparadas con la medicina, campo donde también pueden aportar avances significativos (Abdeladhim et al., 2024). Uno de los PHA más utilizados en el campo médico es el PHB, esto gracias a su biocompatibilidad, siendo el soporte para elaborar filamentos de suturas, vehículo para fármacos, constructos para el crecimiento de células, entre otros (Grigore et al., 2019). Además, en medicina, este biomaterial ha sido utilizado para la producción de válvulas cardíacas, injertos para regeneración de tejidos, guías nerviosas, síntesis de fármacos de liberación controlada, hilos para suturas y algodón quirúrgico. Debido a esto, se ha despertado el interés en los PHA para la investigación sobre el desarrollo de nanopartículas cargadas de fármacos dirigidos a la industria farmacéutica, se dice que estos proporcionan diversas ventajas para la liberación sostenida de fármacos, basada en la tecnología de microencapsulación, pues se ha demostrado que pueden usarse en la liberación controlada de varios medicamentos (Zhang et al., 2018). Estos materiales también han sido probados *in vitro* e *in vivo* en estudios que utilizan diferentes líneas celulares como modelos de crecimiento y tejido conectivo de ratón y ratas, como modelos para la ingeniería de tejidos (Costa-Pinto et al., 2016). Por lo tanto, para poder establecer aplicaciones comerciales de PHB, especialmente en el área biomédica, es importante obtener polímeros con peso molecular adecuado y comprender la interrelación entre peso molecular y propiedades físicas, como transiciones térmicas, comportamiento mecánico (Domínguez-Díaz et al., 2021).

En la última década, las nanopartículas basadas en PHA como transportadores de fármacos han atraído una atención significativa para el tratamiento de diversas enfermedades, debido a su potencial para mejorar los sistemas de administración de fármacos existentes mediante el diseño de nuevas formas de dosificación. Dichas

formulaciones podrían tener un mejor resultado de tratamiento que la terapia convencional debido a sus prometedoras propiedades fisicoquímicas (Prakash et al., 2022). Estos incluyen: La capacidad de superar la solubilidad de los fármacos hidrófobos, ser fácilmente manipulables para la orientación activa, estabilización de los agentes quimioterapéuticos, biocompatibilidad y no inmunogenicidad, así como farmacocinética y farmacodinámica superiores en comparación con la terapia con medicamentos libres (Aghebati-Maleki et al., 2020). Sin embargo, los nano-medicamentos basados en PHA aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) no están disponibles para el tratamiento, las terapias basadas en nanotecnología y PHA aún se encuentran en etapas experimentales, además que el costo de producción es elevado, y aquí radica la importancia de incluir más ensayos que conduzcan al próximo tratamiento y sustratos económicos en la producción del biopolímero (Prakash et al., 2022; Ren et al., 2023).

5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se produjo alrededor del 50 % de la producción total de plástico de todos los tiempos, además, por la pandemia de COVID-19 estas cifras siguieron en aumento.

Por lo tanto, se propone la bioprospección de nuevos microorganismos con altos rendimientos de biopolímeros tipo PHA, ya que representa el punto inicial en el ámbito biotecnológico de producción de biomateriales. Asimismo, una optimización de parámetros de fermentación para obtener un mayor rendimiento.

Por otro lado, los estudios a nivel laboratorio, permitirá que tales biomateriales sean factibles y competentes para su empleo en aplicaciones biomédicas, debido a que bacterias Gram positivas son ideales para tales fines.

6. HIPÓTESIS

Una nueva cepa del género *Bacillus* aislada de un suelo agrícola demuestra rendimientos elevados de biomateriales tipo PHA, que bajo parámetros óptimos para su biosíntesis permitirá obtener un material con cualidades aptas para generar andamios de importancia biomédica.

7. OBJETIVO GENERAL

Aislar cepas del género *Bacillus* productoras de biopolímeros tipo Polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de un suelo agrícola, seleccionar una cepa altamente productora, conocer su identidad mediante pruebas bioquímicas y análisis filogenético del gen 16S rRNA, y evaluar la potencial aplicabilidad del biopolímero en la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y seleccionar mediante técnicas cualitativas y cuantitativas cepas del género *Bacillus* altamente productoras de biopolímeros tipo Polihidroxialcanoatos (PHA)
- Optimizar los parámetros de fermentación de dos cepas bacterianas mediante un diseño experimental Taguchi
- Identificar la cepa seleccionada de *Bacillus* por técnicas bioquímicas y moleculares (16S ARNr)
- Evaluar el comportamiento cinético de *Bacillus cereus* 12GS en relación a la productividad de PHA (g/L) y caracterizar por FTIR, DSC y RMN el biopolímero producido
- Elaborar membranas hiladas de PHB para su evaluación como vehículo en la liberación controlada de nicotina
- Estudiar la factibilidad de andamios electrohilados de PHB para el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos

9. CAPÍTULO 1.

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO *BACILLUS* PRODUCTORAS DE BIOPOLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

9.1 Resumen

El aislamiento de bacterias productoras de biopolímeros microbianos tipo Polihidroxialcanoatos (PHA) y la selección de cepas altamente productoras representa el primer paso en el estudio del incremento de producción de tal bioplástico. Distintas especies del género *Bacillus* han sido reportadas con rendimientos interesantes, sin embargo, se pretende incrementar tales valores reportadas a través de cepas altamente productoras y un medio de cultivo de sólo cuatro componentes. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue aislar cepas del género *Bacillus*, evaluarlas por métodos cualitativos y cuantitativos la producción de PHA y seleccionar las sobresalientes, donde resaltó el aislado B12 en biomasa y PHA g/L con 4.6 y 0.65 g/L respectivamente. Por otro lado, la cepa B1 resultó con un rendimiento elevado de 40.1 %. Dichas cepas seguirán siendo estudiadas con la finalidad de incrementar tales rendimientos por medio de fermentación líquida a nivel matraz.

Palabras clave: Aislamiento, *Bacillus*, Cribado, Fermentaciones, Polihidroxialcanoatos

9.2 Introducción

Actualmente, los plásticos se han convertido en un componente esencial de la vida cotidiana, lo que ha dado como resultado un aumento importante en su producción, que ha pasado de 1,5 millones de toneladas métricas en 1950 a aproximadamente 370 millones de toneladas métricas en los últimos años (Horton, 2022). Una alternativa a tal problemática, son los polímeros biodegradables de base biológica, con el objetivo de mitigar la acumulación de plásticos sintéticos (Moshood et al., 2022).

Los PHA son polímeros biodegradables producidos por diversos microorganismos, incluidas las cepas de *Bacillus*, en condiciones ambientales específicas. La producción del biopolímero está ampliamente influenciada por la disponibilidad de nutrientes, así como la composición del medio de cultivo (Chaudhry et al., 2011). Aunque la acumulación de tales carbonosomas se ha investigado en varios microorganismos, las especies de *Bacillus*, han demostrado altos rendimientos de hasta 90%. Asimismo, la versatilidad fisiológica le permite distribuirse en la naturaleza ampliamente, además, esta bacteria se encuentra en casi todos los hábitats, desde climas extremos hasta templados alrededor del mundo (Mohapatra et al., 2017; Thirumala et al., 2010).

El aislamiento de cepas de *Bacillus* que son productoras de Polihidroxialcanoatos (PHA) es un tópico muy importante en la investigación biotecnológica, ya que los PHA son polímeros biodegradables que ofrecen alternativas sostenibles a los plásticos derivados del petróleo. Las especies de *Bacillus*, precisamente *B. subtilis* y *B. cereus* han demostrado un potencial considerable para la producción PHA (Singh et al., 2009).

Los métodos de aislamiento de estas cepas bacterianas implican el muestreo de entornos donde los factores de estrés pueden mejorar la producción de PHA como reserva de energía (Chaudhry et al., 2011). La selección de cepas bacterianas de este género esta guiada por varios criterios que garantizan un rendimiento y eficiencia óptimos, por tanto, es importante enfatizar cepas bacterianas eficientes con la finalidad de reducir el costo de producción (Aeschelmann & Carus, 2015; Gurieff & Lant, 2007).

Por lo anterior, el objetivo del presente capítulo se centró en el aislamiento de cepas del género *Bacillus* a partir de un suelo con alto contenido de carbono y realizar tamizajes cualitativo y cuantitativo con la finalidad de seleccionar cepas altamente productoras de PHA.

9.3 Materiales y Métodos

9.3.1 *Reactivos y sustratos*

Todos los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (EUA). (Agua destilada, Agar nutritivo, negro Sudán B, azul de Nilo A, Xileno, Safranina, Dextrosa, Extracto de levadura, Peptona, NaCl, NaOH, CHCl₃).

9.3.2 *Toma de muestra y análisis de suelo agrícola*

Se recolectó una muestra de suelo agrícola de manera aséptica en General Terán, Nuevo León, México (25°20'45.0" N 99°35'29.0" O) y se analizó por combustión flash (Método Dumas Modificado) con detección por conductividad térmica a través de un analizador elemental, modelo FlashSmart (Thermo Fisher Scientific). Además, se sometió a procedimientos para el aislamiento de microorganismos productores de polihidroxialcanoatos (PHA).

9.3.3 *Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del género *Bacillus**

Se disolvió 1 g de la muestra de suelo en 10 mL de agua destilada estéril y se calentó a 80 °C durante 10 min, con la finalidad de aislar sólo bacterias formadoras de endosporas (*Bacillus*). Se realizaron diluciones seriadas de esta muestra de 10⁻¹ hasta 10⁻⁵. Luego, 1 mL de la muestra diluida se agregó por el método de vertido en placa de agar nutritivo previamente preparado y se incubó a 30 °C durante 48 h (Thapa et al., 2018). Posteriormente, se observaron las colonias aisladas y se purificaron nuevamente en placas de agar nutritivo, incubando a 30°C por 48 h. Se purificaron un total de 20 colonias bacterianas, las cuales fueron sometidas a estudios de tinción de Gram.

9.3.4 *Detección cualitativa de cepas bacterianas productoras de PHA*

9.3.4.1 Tinción negro Sudán B

Se prepararon distintos frotis a partir de colonias aisladas en portaobjetos limpios y se fijaron con calor. Luego, se tiñeron con el colorante negro Sudán B (0.3 % p/v) durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con xileno y se tiñeron con safranina (0.5 % p/v) durante 5 minutos. Finalmente, los frotis teñidos se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Los frotis se observaron a través de un microscopio óptico BA410E a un aumento de 100X (Mesquita et al., 2015).

9.3.4.2 Tinción azul de Nilo A

Se realizaron distintos frotis y se fijaron con calor en portaobjetos limpios, luego se tiñeron con colorante azul de Nilo A (1 % p/v) a 55°C durante 10 minutos y se lavaron con ácido acético al 8% (v/v). Finalmente, la preparación se cubrió con un cubreobjetos limpio y se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia VE-146YT a un aumento de 100 × y a una longitud de onda de 460nm (Tekin et al., 2012). Las imágenes resultantes se analizaron en Image J utilizando el complemento de densidad integrada y se seleccionaron distintas cepas para evaluación cuantitativa.

9.3.5 Detección cuantitativa de cepas bacterianas productoras de PHA

9.3.5.1 Evaluación de la generación de biomasa y producción de PHA

La producción de biomasa y generación de PHA de las cepas bacterianas seleccionadas cualitativamente se evaluaron utilizando el medio de cultivo GRPD a pH 6. Este medio está compuesto de glucosa (15 g/L), peptona (2 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L) y cloruro de sodio (1,25 g/L) (Masood et al., 2017). Se colocó un pre-inóculo, siendo un matraz de 250 mL, que contenía 100 mL de medio de cultivo GRPD, se inoculó 100 µL (10^8 UFC/mL) de una solución de esporas de las cepas previamente seleccionadas y se incubó a 30°C, 150 rpm durante 24 horas en una incubadora con agitación MaxQ4000. Posteriormente, se evaluó la producción de PHA en matraces Erlenmeyer de 500 mL

conteniendo 200 mL de medio de cultivo GRPD, el cual fue inoculado con 2 % (v/v) del pre-inóculo de 24 horas y se incubó a 150 rpm y 30°C durante 48 horas utilizando una incubadora con agitación MaxQ4000.

9.3.5.2 Protocolo de extracción de PHA

La extracción y purificación de PHA se llevó a cabo siguiendo el protocolo US & SFE reportado por (Martínez-Herrera et al., 2020). En la primera etapa, los medios de cultivo después de la fermentación se trasvasaron a botes de polipropileno y se centrifugaron a 8,000 rpm y 4°C durante 15 minutos usando una ultracentrífuga J251, y el sobrenadante fue descartado. En la segunda etapa, los pellets obtenidos fueron tratados con 15 mL de NaClO comercial e incubados durante 30 minutos en un baño de ultrasonido 5510R-MT con potencia de 117 V y 135 W, y frecuencia 42 kHz. Luego, se volvieron a centrifugar con las mismas condiciones y los pellets se sometieron a un enjuague con agua destilada y se volvieron a centrifugar. En la última etapa, los pellets resultantes fueron tratados con 10 mL de cloroformo y se sometieron a un baño de ebullición durante 1 minuto. El extracto se colocó en placas Petri de vidrio previamente pesadas y se dejaron secar durante la noche.

9.3.5.3 Cuantificación de la generación de biomasa

Para la evaluación de la generación de biomasa, se dispensaron 10 mL de medio de cultivo posterior a la fermentación en microtubos de 2 mL previamente pesados y se centrifugaron durante 15 minutos y 3,000 rpm utilizando una microcentrífuga TM22R. Después, se descartó el sobrenadante y los pellets se dejaron secar a 60°C durante 24 horas. Finalmente, los microtubos se pesaron utilizando una balanza analítica AG204, con una precisión de 0,1 mg. La generación de biomasa se cuantificó en gramos por litro (g/L).

9.3.5.4 Cuantificación del rendimiento o porcentaje de acumulación de PHA

El porcentaje de acumulación (% PHA) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%PHB = \left[\frac{P}{X} \right] * 100$$

Donde P es la producción de PHA calculada en g/L y X es la generación de biomasa calculada en g/L.

9.3.6 Análisis estadístico

El análisis cuantitativo (sección 2.5) se realizó por triplicado. Asimismo, estos datos se compararon y evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), así como una prueba posterior de Tukey para grupos de homogeneidad, se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$. Los datos se expresan como valores medios $\pm$ desviación estándar. Los parámetros evaluados fueron generación de biomasa (g/L) y producción de PHA (g/L). El análisis estadístico se realizó a través del software SPSS v20.

9.4 Resultados

A partir de la muestra de suelo recolectada en el presente estudio, se aislaron 20 cepas bacterianas con diversas morfologías coloniales, obtenidas mediante técnicas de cultivo puro en agar nutritivo. Las veinte cepas aisladas mostraron características morfológicas microscópicas (Gram positivas, formadoras de endosporas, de forma bacilar) típicas del género *Bacillus* (Fig. 2). Por otro lado, los resultados del análisis elemental de la muestra de suelo muestran una elevada cantidad de Carbono y Oxígeno (Tabla 1).

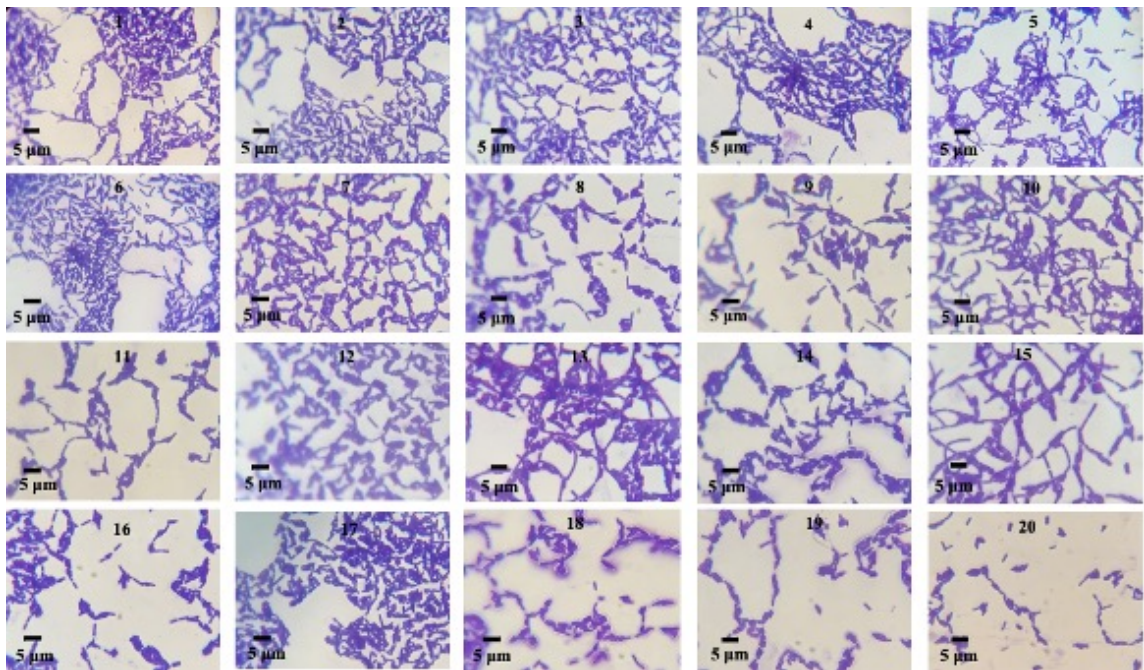


Figura 2. Morfología microscópica de las cepas de *Bacillus* aisladas (1–20) observadas mediante microscopía óptica después de 24 h, 30 °C, agar nutritivo, tinción de Gram (100 x).

Tabla 1. Análisis elemental de suelo agrícola en estudio

CHON en muestras orgánicas y suelos				
Composición química (%)				
C	H	O	N	TOC
7.521	0.408	16.4	0.14	1.36

Nota: C – Carbono, H – Hidrógeno, O – Oxígeno, N – Nitrógeno, TOC – Carbono orgánico total.

Las cepas bacterianas aisladas resultaron positivas en la producción de PHA. Por medio de la tinción negro Sudán B, se observaron gránulos compuestos por ácidos grasos, de color negro, y el citoplasma de color rosa (**Fig. 2a**).

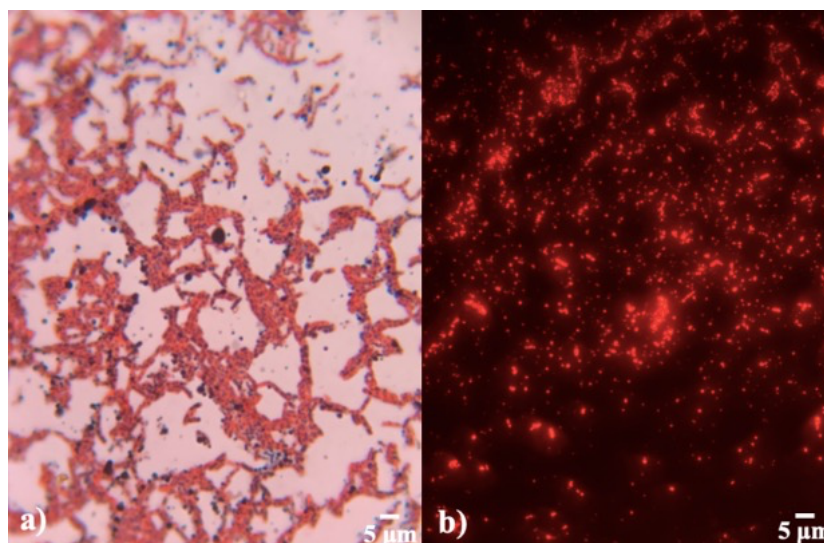


Figura 3. Tinción para la confirmación de PHA. a) negro Sudán B b) azul de Nilo A de una cepa de *Bacillus*

Las cepas de *Bacillus* también se evaluaron con azul de Nilo A para confirmar la producción de PHA (**Fig. 3b**). Se observó que los aislados presentaron una producción de PHA distinta, debido a la presencia de varios grados de fluorescencia naranja-roja en todas las cepas. Las cepas B1, B2, B3, B4, B5, B6, B9, B11, B12, B13 fueron seleccionadas para el tamizaje cuantitativo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Evaluación cualitativa de PHA por cepas aisladas de *Bacillus*

Tinciones de detección de la producción de PHA		
Cepa	negro Sudan B (Producción)	azul de Nilo A (Densidad integrada)
B1	(++)	44,013.228
B2	(++)	166,705.709
B3	(+++)	728,499.860
B4	(++)	31,617.513
B5	(++)	87,029.191
B6	(++)	8,140.101
B7	(+)	2,472.227
B8	(+)	2,551.696
B9	(++)	7,311.102
B10	(+)	4,247.510
B11	(++)	173,663.663
B12	(+++)	1,695,242.386
B13	(++)	123,182.626
B14	(++)	72,675.122
B15	(+)	5,060.914
B16	(+)	4,856.413
B17	(++)	175,356.035
B18	(+++)	347,629.345
B19	(+)	5,420.557
B20	(++)	29,617.563

(+): Producción baja, (++): Producción media, (+++): Producción alta

Las cepas restantes se evaluaron de manera cuantitativa, y los resultados mostraron, primeramente, que todas las cepas de *Bacillus* producían PHA, luego, al realizar un

análisis estadístico Tukey, se observó una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre las cepas bacterianas aisladas, únicamente en la producción de biomasa (g/L), por lo tanto, se seleccionó la cepa B12 al ser sobresaliente en producción de biomasa y PHA (g/L), asimismo, la cepa con mayor rendimiento (% PHA) fue la cepa B1 (**Tabla 3**). Debido a esto, tales cepas se seleccionaron para experimentos posteriores.

Tabla 3. Evaluación cuantitativa de biomasa g/L, PHA g/L, % PHA de cepas de *Bacillus*

Cepa bacteriana	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	Rendimiento (% PHA)
B1	0.96 ± 0.18^e	0.39 ± 0.08^a	40.7 ^a
B2	$1.67 \pm 0.3^{b,c,d,e}$	0.43 ± 0.15^a	25.8 ^a
B3	$1.49 \pm 0.07^{d,e}$	0.59 ± 0.18^a	39.8 ^a
B4	$1.4 \pm 0.1^{d,e}$	0.39 ± 0.14^a	28.1 ^a
B5	$1.84 \pm 0.22^{b,c,d,e}$	0.52 ± 0.1^a	29.8 ^a
B6	$1.73 \pm 0.11^{b,c,d,e}$	0.31 ± 0.05^a	18 ^a
B9	$1.88 \pm 0.07^{b,c,d,e}$	0.48 ± 0.14^a	25.7 ^a
B11	$1.95 \pm 0.26^{b,c,d,e}$	0.41 ± 0.01^a	21.1 ^a
B12	4.6 ± 0.7^a	0.65 ± 0.15^a	14.2 ^a
B13	2.81 ± 0.5^b	0.49 ± 0.16^a	17.3 ^a
B14	$2.48 \pm 0.27^{b,c,d}$	0.44 ± 0.09^a	17.6 ^a
B17	$2.69 \pm 0.9^{b,c}$	0.63 ± 0.15^a	18 ^a
B18	$2.42 \pm 0.17^{b,c,d}$	0.44 ± 0.14^a	18.3 ^a
B20	$1.63 \pm 0.08^{c,d,e}$	0.64 ± 0.15^a	39.1 ^a

Nota: Las letras superíndices (a-e) indican diferencias significativas entre los tratamientos.

9.5 Discusión

El aislamiento y selección de bacterias del género *Bacillus* para la producción de biopolímeros microbianos (PHA) representa un área crítica en la investigación, cuyo objetivo es preservar e identificar cepas microbianas eficientes (Singh et al., 2009).

De la muestra de suelo agrícola utilizada en este estudio, veinte aislados con distintas morfologías de colonias, fueron obtenidas por técnicas de cultivo puro en agar nutritivo. Los aislados de *Bacillus* presentaron características morfológicas macroscópicas (colonias circulares, tamaño mediano, color blanco grisáceo) y características microscópicas (Gram positivas, formadoras de endosporas, forma de bacilos) típicas del género *Bacillus* (Lu et al., 2018).

Las tinciones representativas de la producción de PHA son negro Sudán B (caracterizada por tener la capacidad de observar el tamaño y volumen que ocupa el gránulo dentro de la célula) (Aljuraifani et al., 2019; Evangeline & Sridharan, 2019) y azul de Nilo A (utilizada como prueba específica y confirmatoria de la producción de PHA) en este caso, se observó que los aislados presentaron una producción distinta de Polihidroxialcanoatos, debido a la presencia de varios grados de fluorescencia naranja-roja en todas las cepas, al utilizar microscopía de fluorescencia. Esta tinción es capaz de seleccionar las cepas por intensidad de fluorescencia (**Tabla 2**). Estudios publicados anteriormante, mencionan un valor de densidad integrada de 6513,5 como un signo alto de productor de PHA (Bhagowati et al., 2015). De tal modo, las cepas del presente estudio con valores elevados al mencionado, fueron seleccionadas para el tamizaje cuantitativo.

Los aislados B1, B2, B3, B4, B5, B6, 9, B11, B12, B13, B14, 17, B18, B20 evaluados en el tamizaje cuantitativo mostraron que en la biomasa seca, los resultados variaron de 0.96 a 4.6 g/L, tales resultados fueron similares reportados anteriormente, donde otuvieron 4.3 g/L de biomasa utilizando cepas de *Bacillus* aisladas de aguas residuales petroquímicas y 3.76 g/L utilizando medio de cultivo GRPD Y *Bacillus* aislados de suelo respectivamente (Kojuri et al., 2021) (Martínez-Herrera et al., 2020). Asimismo, otros autores reportan

valores inferiores de veinte aislados en comparación a los del presente estudio utilizando 1 % de sacarosa como fuente de carbono (Thammasittirong et al., 2017).

La producción de PHA (g/L) varió de 0.31 a 0.65 g/L. Todas las cepas bacterianas presentaron valores superiores a distintos autores, donde muestran 0.07 g/L utilizando *B. subtilis* y 0.55 g/L utilizando *Bacillus* sp., mientras que también se reportan valores similares a los del presente estudio, mostrados respectivamente (Alshehrei, 2019; Lee et al., 2021; Yadav et al., 2017).

Por otro lado, el rendimiento de las cepas (% PHA) osciló entre 18 y 40.7 %, la literatura muestra 20 % PHA utilizando glucosa como fuente de carbono, también reportan valores similares a los del presente estudio, mostrados respectivamente (El-Kadi et al., 2021; Masood et al., 2012). La cepa bacteriana B12 produjo la mayor producción de biomasa seca 4.6 g/L, junto con una producción de PHA g/L de 0.65 g/L, mientras que la cepa B1 produjo 40.7 % de rendimiento de PHA, es por tanto que fueron seleccionadas para evaluar posteriores parámetros de optimización.

10. CAPÍTULO 2

OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE DOS CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE UN DISEÑO EXPERIMENTAL TAGUCHI

10.1 Resumen

Actualmente, la optimización de parámetros de fermentación permite la eficiencia de producción de PHA y representa una parte importante en la investigación de bioprocesos, debido a esto, un diseño de experimentos adecuado dará paso a la obtención de parámetros óptimos. Por tal motivo, el objetivo del presente capítulo fue la implementación de un diseño experimental Taguchi, el cual se caracteriza por destacar el rendimiento individual de cada parámetro. Los resultados obtenidos demostraron a la cepa B12 (150 rpm, pH 8, 30°C y 4 % de inóculo) y la cepa B1 (150 rpm, pH 7, 28 °C y 2 % de inóculo) un rendimiento de 0.65 a 1.91 g/L y 0.39 a 0.67 g/L respectivamente, por lo que, además de conocer los parámetros óptimos de cada cepa en estudio, se procedió a seleccionar a la cepa B12 para futuros experimentos por resultar rendimientos sobresalientes sobre la cepa B1.

Palabras clave: Diseño de experimentos, Optimización, PHA, Taguchi

10.2 Introducción

La optimización de los parámetros para la producción de biopolímeros microbianos mediante el diseño de experimentos (DOE) de Taguchi ha surgido como una estrategia importante para mejorar la rentabilidad y eficiencia de producción (Mohan, 2013). Mediante la aplicación de Taguchi, se puede identificar de manera eficiente factores clave, como la velocidad de agitación, pH, temperatura, concentración de fuente de carbono, entre otros que influyen en la acumulación de PHA (Trego et al., 2024).

Generalmente, el diseño incluye:

- Identificación de los parámetros; donde se especifican los niveles en que variarán los parámetros. Creación de matrices ortogonales; que determinan las condiciones de cada experimento en función de la cantidad de parámetros y sus niveles.
- Realización de experimentos; en el cual se llevan a cabo los experimentos como específica la matriz ortogonal completa para la recopilación de datos.
- Análisis de datos; después de recopilar los datos, se realiza un análisis estadístico para evaluar la influencia de cada parámetro, esto incluye la relación señal-ruido (S/N) para cada experimento y cuantificar el efecto del rendimiento (Nurul Fazita et al., 2021).

Al analizar los valores óptimos, se puede determinar un conjunto óptimo de condiciones que mejoran significativamente los resultados del rendimiento de, en este caso, el biopolímero (Patyal, 2012).

Por lo anterior, el presente capítulo se centró en la implementación de un diseño experimental efectivo para conocer los parámetros óptimos de dos cepas en estudio y conocer el rendimiento de cada una, así como seleccionar una cepa altamente productora de PHA.

10.3 Materiales y métodos

10.3.1 Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (EUA). (Agua destilada, Dextrosa, Extracto de levadura, Peptona, NaCl, NaOH, CHCl₃).

10.3.2 Optimización de distintos parámetros de fermentación

Este diseño de experimentos (Taguchi) implementado para dos cepas bacterianas distintas incluyó cuatro factores con cinco niveles cada uno: pH (6, 6.5, 7, 7.5, y 8), temperatura (28, 30, 32, 34 y 36 °C), tamaño del inóculo (1, 2, 3 ,4 y 5 %) y velocidad de agitación (110, 120, 130, 140 y 150 rpm) fueron identificados y seleccionados para la optimización de PHA (**Tabla 4**). A continuación, se creó una matriz experimental para tener en cuenta las distintas variaciones de los factores en los cinco niveles diferentes. Se utilizó un diseño de matriz ortogonal Taguchi L25 (5*4) para realizar 25 ensayos experimentales para determinar y analizar los procesos óptimos de biosíntesis de PHA g/L.

Tabla 4. Factores y niveles utilizados en el diseño experimental de Taguchi para producir PHA.

Experimento	Factor			
	A: Agitación (rpm)	B: pH	C: Temperatura (°C)	D: Inóculo (%)
1	110	6	28	1
2	110	6.5	30	2
3	110	7	32	3
4	110	7.5	34	4
5	110	8	36	5

6	120	6	30	3
7	120	6.5	32	4
8	120	7	34	5
9	120	7.5	36	1
10	120	8	28	2
11	130	6	32	5
12	130	6.5	34	1
13	130	7	36	2
14	130	7.5	28	3
15	130	8	30	4
16	140	6	34	2
17	140	6.5	36	3
18	140	7	28	4
19	140	7.5	30	5
20	140	8	32	1
21	150	6	34	4
22	150	6.5	28	5
23	150	7	30	1
24	150	7.5	32	2
25	150	8	34	3

Los procesos de fermentación se llevaron a cabo a partir de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio de cultivo. Luego, estos fueron inoculados con 100 μ L (10^8 UFC/mL) de la solución de esporas de las cepas de *Bacillus* B12 y B1 por separado y previamente reactivadas con un choque térmico a 100 °C durante 1 min, y se incubaron en agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a las condiciones correspondientes por cada experimento durante 24 h. Después, matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL del mismo medio de cultivo se inocularon con el porcentaje del pre-inóculo correspondiente al experimento con el preinóculo de 24 h. Finalmente, estos matraces de fermentación se incubaron con

agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a las condiciones correspondientes.

10.3.3 Extracción de PHA

La extracción y purificación de los polihidroxialcanoatos (PHA) se llevó a cabo conforme al procedimiento descrito por Martínez-Herrera *et al.* (2020). Primeramente, los cultivos fermentados fueron transferidos a recipientes de polipropileno y sometidos a centrifugación a 8,000 rpm y 4°C durante 15 minutos utilizando una ultracentrífuga J251, eliminando el sobrenadante. Posteriormente, los sedimentos obtenidos fueron tratados con 15 mL de hipoclorito de sodio comercial y expuestos a un baño de ultrasonido (modelo 5510R-MT) con potencia de 117 V y 135 W, y frecuencia 42 kHz durante 30 minutos. A continuación, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y los pellets fueron lavados con agua destilada antes de ser centrifugados nuevamente. Finalmente, los sedimentos resultantes fueron tratados con 10 mL de cloroformo y expuestos a un baño de ebullición durante un minuto. El extracto obtenido se depositó en placas Petri de vidrio previamente pesadas y se dejó secar durante la noche.

10.3.4 Cuantificación de biomasa y porcentaje de acumulación de PHA

La cuantificación de la biomasa se realizó siguiendo la metodología documentada por Aramvash *et al.* (2015). Para ello, se tomaron 10 mL del medio de cultivo fermentado en tubos de microcentrífuga de 2 mL previamente pesados, y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos utilizando una microcentrífuga modelo TM22R. El sobrenadante fue descartado y los pellets resultantes se secaron a 60°C durante 24 horas. Finalmente, los tubos fueron pesados en una balanza analítica modelo AG204 con una precisión de 0,1 mg. La biomasa generada se expresó en gramos por litro (g/L).

El porcentaje de acumulación de PHA (% PHA) fue calculado utilizando la siguiente fórmula donde P representa la producción de PHA en g/L y X corresponde a la biomasa generada en g/L:

$$\%PHA = \left[\frac{P}{X} \right] * 100$$

10.3.5 Análisis estadístico Minitab

El análisis de validación se basó en los experimentos diseñados y los resultados obtenidos, utilizando la relación señal-ruido (S/N). Durante este paso se consideraron para la validación la generación de biomasa (g/L), PHA (g/L), y % PHA. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Minitab 17v.

10.4 Resultados

La biosíntesis de PHA se optimizó para la cepa B12 y B1 utilizando el método DOE Taguchi (**Tabla 5 y 6**). En el caso de la cepa B12, los niveles, medias y relaciones S/N para el factor de control que pudieron dar el mejor nivel de concentración de PHA g/L analizado en Minitab 17v, demostró, en caso de las medias, el factor A nivel 5, media = 1.1613, factor B nivel 5, media = 0.9577, factor C nivel 2, media = 1.0195 y factor D nivel 4, media = 0.9889, (**Fig. 4a**). Mientras que relaciones señal/ruido, los factores que causaron mayor impacto fueron agitación, pH, inóculo y temperatura respectivamente (**Fig. 4b**). Por lo tanto, los parámetros óptimos para producir PHA g/L de la cepa B12 fueron 150 rpm, pH 8, 30°C y 4 % de inóculo.

Tabla 5. Diseño experimental utilizando un arreglo ortogonal de Taguchi L25 (5*4) de la cepa B12.

Experimento	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	Rendimiento (% PHA)
1	1.89 ± 0.57	0.65 ± 0.12	52.24
2	1.86 ± 0.14	0.58 ± 0.21	31.35
3	1.93 ± 0.52	0.62 ± 0.13	31.92
4	1.7 ± 0.01	0.53 ± 0.15	30.9
5	1.33 ± 0.07	0.25 ± 0.12	19.19
6	1.82 ± 0.11	1.01 ± 0.05	55.45
7	2.29 ± 0.18	0.93 ± 0.2	40.37
8	1.96 ± 0.17	0.58 ± 0.04	29.61
9	2.06 ± 0.05	0.61 ± 0.09	29.52
10	2.6 ± 0.06	1.14 ± 0.07	43.76
11	2.16 ± 0.12	0.63 ± 0.22	32.33
12	2.03 ± 0.27	0.42 ± 0.11	20.5

13	1.45 ± 0.08	0.3 ± 0.14	20.48
14	2.27 ± 0.11	0.7 ± 0.14	30.77
15	2.52 ± 0.34	1.26 ± 0.15	50.03
16	2.02 ± 0.41	0.53 ± 0.1	26.18
17	2.28 ± 0.25	0.55 ± 0.4	42.07
18	2.61 ± 0.25	1.52 ± 0.13	58.35
19	2.96 ± 0.43	0.97 ± 0.22	32.75
20	3.26 ± 0.32	1.11 ± 0.04	34.09
21	3.42 ± 0.09	0.79 ± 0.19	23.10
22	4.33 ± 0.62	1.06 ± 0.33	24.46
23	2.6 ± 0.17	1.28 ± 0.14	48.78
24	2.95 ± 0.12	1.67 ± 0.23	56.60
25	2.2 ± 0.21	1.01 ± 0.16	45.98

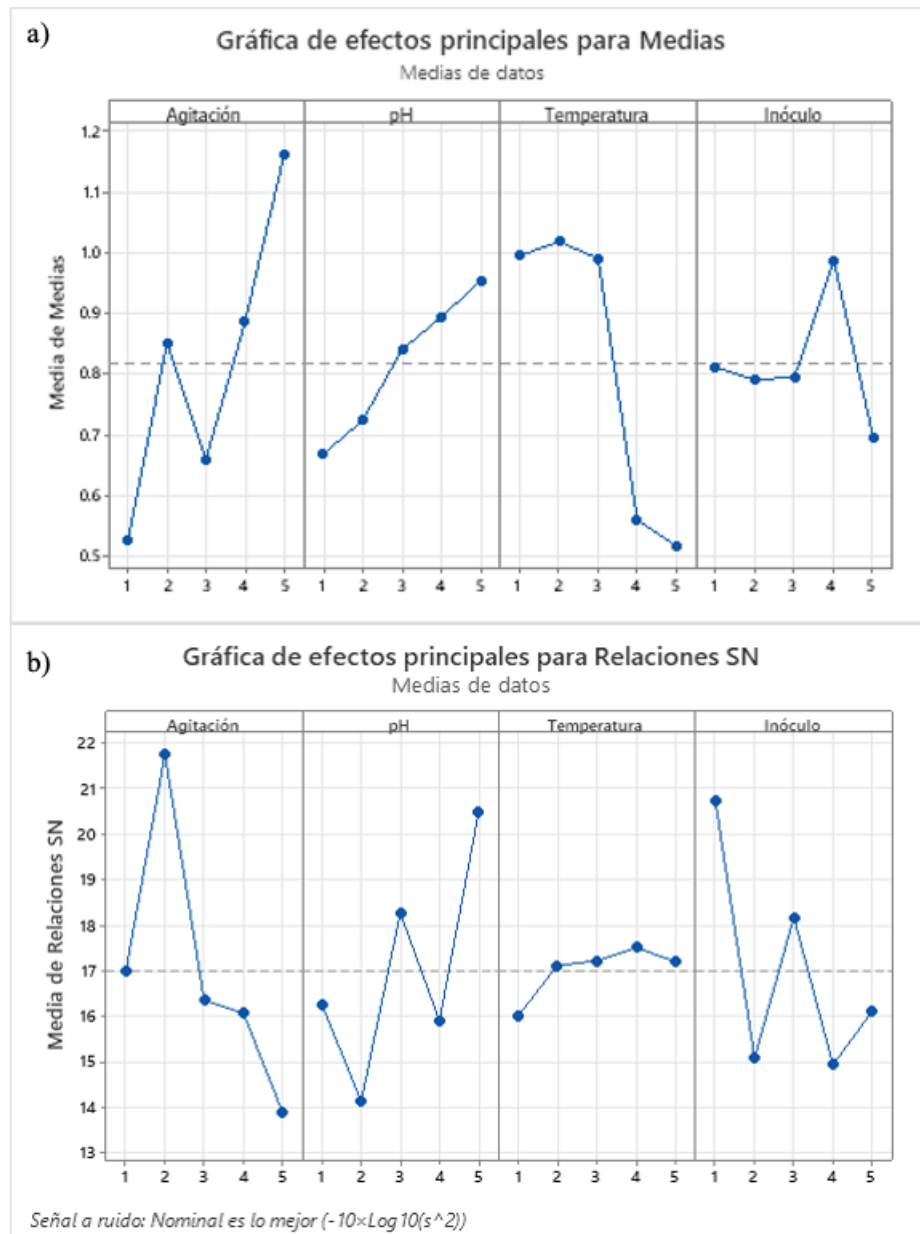


Figura 4. Efecto del factor de control para la optimización de PHA de la cepa B12.

a) Gráfica de efectos principales para Medias, b) Gráfica de efectos principales para Relaciones SN.

Por otro lado, la cepa B1, demostró valores sobresalientes, de las medias el factor A nivel 5, media = 0.7537, factor B nivel 3, media = 0.6482, factor C nivel 1, media = 0.6772 y factor D nivel 2, media = 0.6540 (**Fig. 5a**). Mientras que relaciones señal/ruido, los factores que causaron mayor impacto fueron pH, inóculo, temperatura y agitación respectivamente (**Fig. 5b**). De tal manera, los parámetros óptimos para producir PHA g/L de la cepa B1 fueron 150 rpm, pH 7, 28 ° C y 2 % de inóculo.

Tabla 6. Diseño experimental utilizando un arreglo ortogonal de Taguchi L25 (5*4) de la cepa B1.

Experimento	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	Rendimiento (% PHA)
1	1.27±0.08	0.42±0.01	33.33
2	1.43±0.01	0.55±0.06	38.44
3	1.17±0.4	0.49±0.15	41.9
4	1.18±0.46	0.51±0.15	43.23
5	1.16±0.58	0.31±0.11	26.4
6	1.28±0.23	0.44±0.06	34.64
7	1.64±0.1	0.44±0.05	26.97
8	0.96±0.31	0.68±0.03	71.14
9	0.79±0.23	0.46±0.16	58.22
10	1.46±0.03	0.55±0.15	37.17
11	1.47±0.18	0.51±0.08	34.54
12	1.5±0.11	0.55±0.09	36.8
13	1.76±0.04	0.6±0.05	33.9
14	2.7±0.14	0.55±0.06	20.27
15	1.96±0.17	0.63±0.08	32.24
16	3.89±0.41	0.74±0.07	18.91
17	0.97±0.14	0.25±0.12	25.51

18	2.52 ± 0.22	0.85 ± 0.07	33.59
19	2.4 ± 0.37	0.76 ± 0.1	31.73
20	2.55 ± 0.02	0.62 ± 0.04	24.41
21	2.46 ± 0.26	0.52 ± 0.08	20.9
22	5.19 ± 1.16	1.02 ± 0.08	19.68
23	4.03 ± 0.84	0.64 ± 0.1	15.83
24	2.67 ± 0.44	0.83 ± 0.06	34.18
25	2.67 ± 0.44	1.01 ± 0.02	37.62

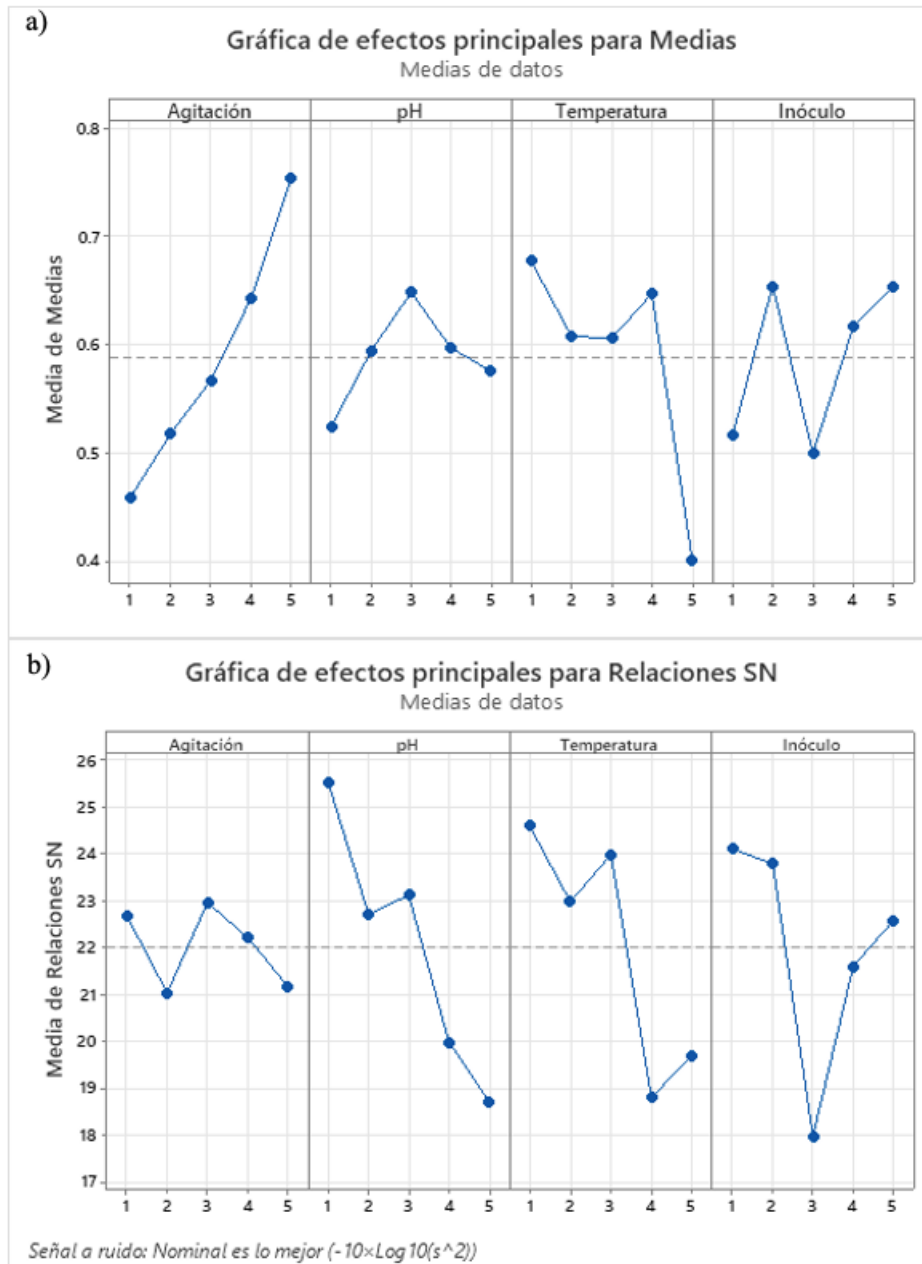


Figura 5. Efecto del factor de control para la optimización de PHA de la cepa B1.

a) Gráfica de efectos principales para Medias, b) Gráfica de efectos principales para Relaciones SN.

Posterior al análisis de validación en Minitab v17 y al determinar las condiciones óptimas para la cepa B12 (150 rpm, pH 8, 30°C y 4 % de inóculo) y la cepa B1 (150 rpm, pH 7,

28 °C y 2 % de inóculo) se procedió a probar las condiciones óptimas de fermentación en el laboratorio y se comparó con las condiciones originales del tamizaje cuantitativo (150 rpm, pH 6, 30 °C, 2 % de inóculo) de cada cepa, lo que resultó a la cepa B12 sobresaliente en rendimiento y PHA g/L en comparación a la cepa B1, por lo que se seleccionó a la cepa B1 para continuar con los futuros experimentos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Comparación de la producción de B12 y B1 en condiciones originales y optimizadas.

Condiciones	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	% PHA
Originales Cepa B12	4.6 ± 0.7	0.65 ± 0.15	14.2
Optimizadas Cepa B12	2.19 ± 0.05	1.91± 0.1	87.2
Originales Cepa B1	0.96 ± 0.18	0.39 ± 0.08	40.7
Optimizadas Cepa B1	1.7 ± 0.3	0.67 ± 0.22	39.3

10.5 Discusión

El diseño de experimentos (DOE) es un enfoque utilizado para analizar la influencia de distintos parámetros de proceso en los resultados de rendimiento. Es eficaz para optimizar distintos procesos de producción, debido a que permite identificar configuraciones de parámetros óptimos con una reducción de las ejecuciones experimentales y los costos asociados a la producción (Patyal, 2012).

El método experimental de Taguchi, tiene como objetivo optimizar las características de rendimiento individuales (Mohammed et al., 2020). Este diseño utilizó una función de pérdida para medir la desviación entre los valores experimentales y los valores deseados. Esta función de pérdida luego se transforma en una relación señal ruido (S/N). En el análisis de la relación S/N, se consideran tres tipos de características de calidad: “cuanto más pequeño mejor”, “cuanto más grande mejor” y “el nominal mejor” (Xiao et al., 2017). En este estudio, se utilizó el enfoque “el nominal mejor” para la experimentación y validación de los procesos de optimización de PHA, debido a que se pretende definir el objetivo de respuesta y basar la relación de señal a ruido en desviaciones estándar (Gupta et al., 2011). Independientemente de las características que se utilicen para el enfoque, la relación S/N de cada factor debe ser amplia, lo que indica la influencia del parámetro (Gupta et al., 2011).

Los parámetros óptimos para la cepa B12 fueron 150 rpm, pH 8, 30 °C y 4 % de inóculo, elevando la producción de PHA de 0.65 a 1.91 g/L y el rendimiento de 14.2 a 87.2 % de PHA con tales parámetros, por su parte, al ejecutar los parámetros óptimos de la cepa B1, los cuales fueron 150 rpm, pH 7, 28 °C y 2 % de inóculo se incrementó la producción de PHA de 0.39 a 0.67 g/L, mientras que el rendimiento se mantuvo prácticamente igual (De 40.7 a 39.3 %). Es por tanto que se optó por continuar con la experimentación de los siguientes capítulos con la cepa bacteriana de *Bacillus* B12, al demostrar rendimientos sobresalientes.

Los parámetros más importantes para la determinación de la selección fueron la velocidad de agitación y el pH, según otros reportes (Masood et al., 2017) informaron que la agitación de 150 rpm era la mejor velocidad para la producción de PHA utilizando *B. cereus* FA11, por otro lado, el pH 8, un pH alcalino, representa un rendimiento elevado e

inusual para bacterias de este género, sin embargo, estudios lo han reportado como el mejor para la producción del biomaterial utilizando *B. megaterium* JHA (Mascarenhas & Aruna, 2021). Esto sugiere que el diseño experimental utilizado para optimizar la producción de PHA se basó en la combinación de diferentes factores y su desempeño individual (Mohammed et al., 2020; Mokhtarani et al., 2012). Estudios reportados anteriormente optimizaron las condiciones del medio de cultivo y obtuvieron el 49 % de PHA (Rond’osová et al., 2022). Del mismo modo, se reportó otro estudio un 29 % de PHA usando el diseño experimental de Taguchi (García *et al.*, 2020).

Al evaluar la relación señal-ruido (S/N), es posible discernir características favorables. Tales discrepancias podrían deberse a que las cepas de *Bacillus* demuestran una variedad de comportamientos productivos específicos de cada cepa. Además, cada cepa bacteriana tiende a responder de acuerdo con su lugar de aislamiento, lo que ocasiona la adaptación a diferentes condiciones ambientales, también conocido como plasticidad metabólica (Martínez-Herrera *et al.*, 2023). El parámetro que exhibe la mayor relación SN indica el de mayor impacto. Por lo tanto, el diseño experimental facilita la optimización de los parámetros, y detalla la influencia de cada factor (Ramarao et al., 2021).

11. CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR (16S ARNr) DE LA CEPA DE *BACILLUS* ALTAMENTE PRODUCTORA

11.1 Resumen

Bacillus se ha caracterizado entre las bacterias Gram positivas con mayor rendimiento en la producción de biopolímeros (PHA), además, algunas especies en específico, como *B. cereus* ha reportado valores de interés biotecnológico e industrial. Es por tanto que la identificación bioquímica y molecular de microorganismos juega un papel importante, debido a que, al conocer la identidad del microorganismo que se está estudiando, se eleva su importancia en el ámbito. Por tal motivo, el objetivo del presente capítulo fue realizar la caracterización bioquímica y molecular de la cepa. Los resultados de la identificación molecular 16S rRNA demuestran a un *B. cereus* denominado *B. cereus* 12GS recientemente aislado y que produce valores elevados de PHA, y se encuentra con un número de acceso en GenBank: PRJNA1066477.

Palabras clave: ADN, Árbol filogenético, *B. cereus*, Biopolímeros

11.2 Introducción

La caracterización de cepas bacterianas altamente productoras de PHA por medio de métodos bioquímicos y moleculares es un tópico interesante en la investigación de la biotecnología microbiana. Las especies de *B. cereus*, han surgido como caballo de batalla en la producción de biopolímeros debido a sus rápido crecimiento y su versatilidad metabólica en condiciones de limitación de nutrientes, ofreciendo potenciales alternativas a los petroplásticos (Porwal et al., 2009; Martínez-Herrera et al., 2023).

El ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) es un componente importante de la subunidad ribosómica 30S que se encuentra en microorganismos procariotas, como bacterias y arqueas. Esta molécula de ARN tiene aproximadamente 1500 nucleótidos de longitud y varias regiones hipervariables, sujetas a mutaciones y cambios al paso del tiempo (Mohammed & Ray, 2022).

La clasificación de las cepas de *Bacillus* suele ser complicada debido a la alta variabilidad genética entre sus especies, en particular dentro de *B. cereus*. Los espaciadores transcritos internos (ITS) entre los genes 16S se han identificado como regiones hipervariables que pueden ofrecer cierta resolución para diferenciar estas especies, este método, implementado por primera vez por Carl Woese y George E. Fox, se ha convertido en un estándar de oro para identificar la diversidad bacteriana (Porwal et al., 2009; Garrett, 2014). Sin embargo, la presencia de múltiples operones rRNA en genomas de *Bacillus* puede conducir a variaciones intragenómicas, afectando el análisis de secuencia y la discriminación de especies (Masood et al., 2012; Hakovirta et al., 2016). Si bien, la secuenciación 16S rRNA es generalmente efectiva para la identificación de especies, puede que no siempre sea distinta entre *B. cereus* y *B. anthracis* (Blackwood et al., 2004) por lo que, se puede confirmar la especie por medio de pruebas bioquímicas si sólo se cuenta con tal recurso molecular.

Dado lo anterior, el objetivo del presente capítulo fue evaluar al microorganismo por métodos bioquímicos y morfológicos, así como su identificación molecular a través de extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de secuenciación ARNr 16S y la elaboración del árbol filogenético sobre su relación genética con la finalidad conocer la identidad del *Bacillus* en estudio y profundizar su estudio en la producción de Polihidroxialcanoatos.

11.3 Materiales y métodos

11.3.1 Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (EUA). (Agar nutritivo, Oxidasa, Catalasa, Medios de cultivo SIM, Citrato, TSI, LIA, MIO, Urea, MR-VP, Hidrólisis de Almidón, Lecitinasa, CHCl₃, EtOH 100 %, EDTA, Triton 2 %, SDS 1 %, NaCl, HCl, fenol-cloroformo, Agarosa 1 %, DreamTaq PCR master mix (2X), H₂O libre de nucleasas, cebadores universales 27F y 1492R).

11.3.2 Caracterización bioquímica

La identificación de las cepas bacterianas aisladas se llevó acabo mediante estudios macroscópicos y microscópicos, así como pruebas bioquímicas. La identificación macroscópica implicó evaluar la morfología de las colonias, pigmentación, forma y tamaño en placas de agar nutritivo. Los estudios microscópicos incluyeron tinción de Gram para estudiar el comportamiento de tinción, la disposición celular y la granulación, así como tinción de esporas. Asimismo, se realizaron distintas pruebas bioquímicas, incluyendo las siguientes pruebas: Oxidasa, Catalasa, Azufre, Indol y Motilidad (SIM), Citrato, Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Motilidad Indol Ornitina (MIO), Urea, Rojo de Metilo, Voges- Proskauer (MR-VP), Crecimiento en NaCl 6.5%, Hidrólisis de Almidón, y Lecitinasa.

11.3.3 Identificación molecular

11.3.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos líquidos de 24 horas, aislados utilizando el método de fenol-cloroformo modificado (Arocha-Garza et al., 2017). Primeramente, para preparar la pared celular del aislado, se realiaron múltiples

lavados con Buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). Luego, el pellet de estos lavados, se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS 1 % p/v) y se agregaron perlas de vidrio de 0.1 mm. Utilizando un instrumento MagnaLyser, se aplicaron cuatro ciclos de 40 segundos, con intervalos de un minuto. Utilizando el sobrenadante, los pasos posteriores incluyeron lavados con fenol-cloroformo para separar el material genético de las impurezas, siguiendo con lavados de Etanol al 70% para eliminar el fenol residual. Finalmente, utilizando el precipitado, se cuantificó utilizando un espectrofotómetro nanodrop para la evaluación de la calidad y la concentración. Luego, se prepararon geles de agarosa al 1 % para la electroforesis, ejecutando las muestras de ADN con GelRed y el marcador Hyperleadeff 1kb. El gel de agarosa se fijó a una concentración del 1 % y las muestras se sometieron a electroforesis a 110V durante 45 minutos. Posteriormente, los geles se visualizaron utilizando un transiluminador UV.

11.3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Como parte de la metodología de PCR, los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') se sometieron a amplificación en un volumen de reacción de 15 µL. La composición incluía 0.5 µg del ADN genómico aislado, 0.5 µL para cada cebador, 7.5 µL de DreamTaq PCR master mix (2X) y 6 µL de agua libre de nucleasas. El termociclador utilizando para el protocolo de ciclado PCR se definió de la siguiente manera: Primeramente, una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de cebadores a 49°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante un minuto, seguido de un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Posteriormente, los productos de PCR amplificados se sometieron a un nuevo experimento a través de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

11.3.3.3 Análisis filogenético mediante secuenciación del ARNr 16S

El producto de PCR se clonó utilizando el sistema de vector pGEM t easy, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y siguiendo el método publicado anteriormente (Fuentes-Garibay et al., 2015). Luego, la muestra de ADN genómico se envió para ser secuenciada mediante tecnología Sanger para el gen 16S rRNA utilizando un analizador genético 3130. La secuencia se derivó de los electroferegramas resultantes y la cepa bacteriana se identificó utilizando la herramienta BLAST.

La secuencia ribosomal 16S, obtenida a partir de los cebadores, fue procesada en Bioedit v 7.0.5.3. Posteriormente, la secuencia fue consultada en la base de datos NCBI, utilizando la herramienta BLAST para identificar las coincidencias más cercanas a las secuencias identificadas. Posteriormente, la secuencia fue alineada, incorporando secuencias de referencia obtenidas de la base de datos NCBI. La alineación comprendió 15 secuencias y posteriormente procesadas en MEGA 11. Finalmente, esta alineación fue analizada para determinar el modelo de sustitución óptimo para construir el árbol filogenético ‘*Kimura 2-parameter*’. Dentro del mismo software, el árbol filogenético fue construido utilizando ‘*Maximum Likelihood*’.

11.4 Resultados

La cepa del género *Bacillus* seleccionada (B12) es Gram positiva, forma endosporas luego de la tinción con las técnicas Shaffer Fulton y Gram; la prueba catalasa y oxidasa fueron positivas, del mismo modo, la lecitinasa y la hidrólisis de almidón fueron positivas (**Tabla 8**). Las características bioquímicas de la cepa en estudio se compararon con una cepa de *Bacillus cereus* denominada *Bacillus cereus* saba.zh (Amiri et al., 2021) y se encontraron similitudes considerables a esta especie.

Tabla 8. Características bioquímicas y morfológicas de *Bacillus* sp. (B12) y *Bacillus cereus* saba.zh

Caracterización	<i>Bacillus</i> sp. (B12)	<i>Bacillus cereus</i> saba.zh
Forma	Bacilo	Bacilo
Esporulación	(+)	(+)
Gram	(+)	(+)
Oxidasa	(+)	(+)
Catalasa	(+)	(+)
H ₂ S	(-)	—
Indol	(-)	(-)
Motilidad	(-)	-
Citrato	(-)	(+)
TSI	(K/A)	(K/A)
MIO	(-)	—
LIA	(-)	—
Urea	(+)	(-)
Rojo de metilo	(-)	(-)
Voges-Proskauer	(-)	(+)
NaCl 6.5%	(-)	—
Hidrólisis de almidón	(+)	(+)
Lecitinasa	(+)	—

(+): Reacción positiva, (-) Reacción negativa, (K/A): Alcalino/ácido, — : No mencionado.

Para amplificar el gen 16S rRNA de la cepa B12, se extrajo ADN genómico y se utilizó para la amplificación por PCR. Como resultado de la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, se encontró que la cepa B12 comparte una elevada identidad con *Bacillus cereus*. La secuencia del gen que se obtuvo se depositó en GenBank con el número de acceso “PRJNA1066477” y se conoce como *Bacillus cereus* 12GS. Se construyó un árbol filogenético para la cepa y otras especies de *Bacillus* (**Figura 6**). Se utilizaron cuatro cepas de *B. cereus*, dos de *B. anthracis*, una de *B. licheniformis*, dos de *B. paramycoides*, dos de *B. albus*, dos de *B. proteolyticus*, una de *B. megaterium* y el género *Amphibacillus* sp. como grupo externo.

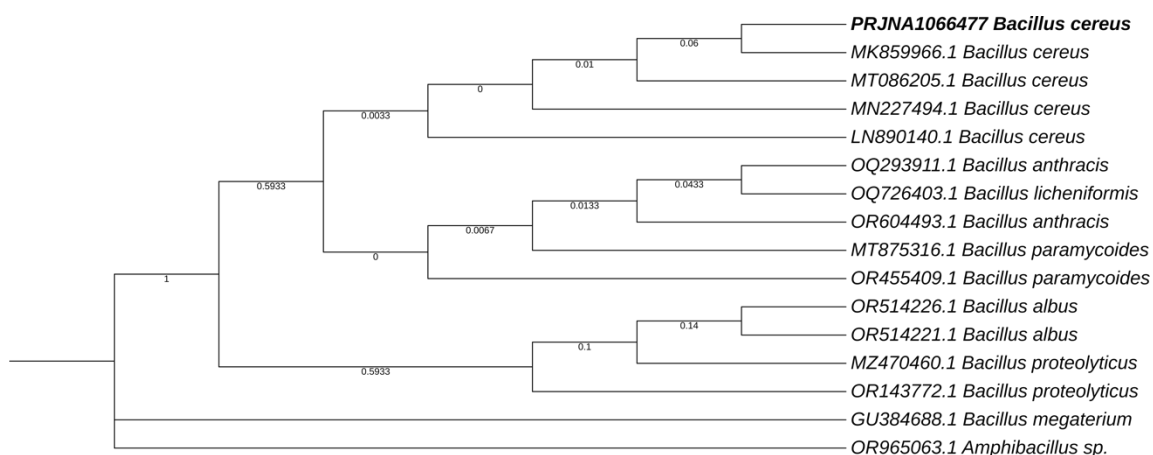


Figura 6. Árbol filogenético sobre la relación genética de PRJNA1066477 *B. cereus* 12GS (mostrado en negritas). Se presenta el número de acceso en GenBank para cada cepa. Se utilizó *Amphibacillus* sp. como grupo externo.

11.5 Discusión

Las técnicas de identificación molecular, incluida la extracción de ADN y la amplificación de ARNr 16S, desempeñan un papel importante en la diferenciación de *B. cereus* de especies estrechamente relacionadas (Adesetan et al., 2020). Las pruebas bioquímicas, implementadas como caracterización preliminar de la cepa de *B. cereus* en estudio, donde las pruebas que resultaron positivas como catalasa, oxidasa, lecitinasa e hidrólisis de almidón, coinciden con cepas de la literatura de *Bacillus cereus* (Amiri et al., 2021; Pirttijärvi et al., 2000).

Se han reportado estudios similares que implementan el análisis del gen 16S rRNA para la identificación de aislados desconocidos que producen PHA. Se han aislado de distintos ecosistemas y se identificaron mediante el análisis de secuencias de ARNr 16S, incluidas *B. cereus* saba.zh aislada de aguas residuales petroquímicas (Amiri et al., 2021), suelo contaminado con TNT en el caso de *B. cereus* FA11 (Masood et al., 2012), residuos plásticos *B. cereus* BNPI-92 (Mohammed et al., 2020), y suelo (*B. cereus* VIT-SSR1, *B. cereus* 4N) (Evangeline & Sridharan, 2019; Martínez-Herrera et al., 2020) con diferentes cantidades de producción y rendimientos (Tabla 9). Las cepas de esta especie pueden producir PHA en distintas condiciones nutricionales y de incubación, así como un exceso de fuentes de carbono y limitantes de nitrógeno (Javaid et al., 2020). Actualmente, se han identificado varios medios de crecimiento para la producción de biopolímero con *B. cereus*, y el tipo de sustrato agregado al medio de cultivo no impide su capacidad para producir PHA.

En general, tales cepas microbianas pueden producirlo en condiciones de pH no controlado, temperaturas moderadas y velocidades de agitación que varían desde 120 a 250 rpm (Martínez-Herrera et al., 2023). Tales condiciones deberían garantizar niveles óptimos de oxígeno disuelto, transferencia de masa eficiente y prevenir la degradación del polímero (Masood et al., 2017; Philip et al., 2009).

Tabla 9. Producción y rendimiento máximo de PHB de distintos *B. cereus* y su lugar de aislamiento.

<i>Bacillus cereus</i> como productor de PHA			
Nombre de la cepa	Lugar de aislamiento	Máxima producción de PHA	Referencia
<i>B. cereus</i> 12GS	Suelo agrícola	1.91 g/L, 87 %	Este estudio
<i>B. cereus</i> saba.zh	Aguas residuales petroquímicas	1.6 g/L, 60 %	(Amiri et al., 2021)
<i>B. cereus</i> BNPI-92	Residuos plásticos	0.95 g/L, 38 %	(Mohammed et al., 2020)
<i>B. cereus</i> FA11	suelo contaminado con TNT	3.1 g/L, 48.4 %	(Masood et al., 2017)
<i>B. cereus</i> VIT-SSR1	Suelo	1.1 g/L, 33 %	(Evangeline & Sridharan, 2019)
<i>B. cereus</i> 4n	Suelo	1.52 g/L, 40.4 %	(Martínez-Herrera et al., 2020)

12. CAPÍTULO 4

COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE *Bacillus cereus* 12GS EN RELACIÓN A LA PRODUCTIVIDAD DE PHA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL POLÍMERO

12.1 Resumen

La evaluación del crecimiento microbiano es importante debido a que colabora a optimizar procesos biotecnológicos, como la producción de PHA. Tal biomaterial alcanza niveles elevados de producción al realizar un estudio cinético previo. Además, la caracterización es importante debido a que se demuestra la potencial aplicabilidad que tiene con otros materiales sintéticos. Por tales motivos, el presente estudio se centró en conocer la concentración óptima de fuente de carbono (20 g/L), el tiempo de fermentación (48 h), así como conocer los parámetros cinéticos. Asimismo, analizar la estructura del biopolímero, demostrando que *B. cereus* 12GS produjo un PHA de cadena corta denominado polihidroxibutirato a través de FTIR y ^1H RMN. Finalmente, conocer las propiedades térmicas del PHB producido, donde se demostraron temperaturas de interés industrial.

Palabras clave: Cinética de crecimiento, DSC, FTIR, RMN

12.2 Introducción

Bacillus cereus ha demostrado un potencial prometedor para la producción de PHA, polímeros biodegradables con potencial para reemplazar a los plásticos derivados del petróleo (Martínez-Herrera et al., 2023). Distintas investigaciones han demostrado la capacidad de *B. cereus* para acumular PHA en condiciones ricas en carbono y limitadas en nitrógeno. Se ha observado una producción óptima de PHA utilizando glucosa como fuente de carbono con rendimientos elevados (Yasin & Al-Mayaly, 2021). Además, puede producir el biopolímero utilizando residuos agroindustriales como fuentes de carbono económicas (Murugan et al., 2021). Asimismo, otra ventaja de este género de *Bacillus* es la copolimerización al usar distintas fuentes de carbono, como el glicerol, donde se ha reportado que se produjeron copolímeros de PHA con 13 % mol de 3-hidroxivalerato (Mohandas et al., 2018). Además, la hidrólisis controlada de biorresiduos puede generar ácidos grasos volátiles, que sirven como materia prima para la producción de copolímeros (Kumar et al., 2016). Estos estudios demuestran la versatilidad de *B. cereus* en la producción de pH y su potencial para la biosíntesis a escala industrial utilizando condiciones optimizadas y recursos renovables. Si bien, *B. cereus* muestra potencial para la producción industrial de PHA, se necesitan más estudios de optimización de parámetros (San Miguel-González et al., 2024) así como el uso de subproductos agroindustriales como sustratos y estudios de fermentación a escala piloto (Martínez-Herrera et al., 2023). Debido a lo anterior, el objetivo del presente capítulo fue conocer el comportamiento cinético de la cepa bacteriana en estudio bajo distintas concentraciones de fuente de carbono y tiempos de fermentación, que permitan determinar un incremento de PHA g/L, así como conocer la estructura del material y evaluar las propiedades mediante análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

12.3 Materiales y métodos

12.3.1 Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (EUA) (Agua destilada, Dextrosa, Extracto de levadura, Peptona, NaCl, NaOH, CHCl₃, CDCl₃, ácido 3,5-dinitrosalicílico).

12.3.2 Cepas bacterianas

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 12GS (NCBI- GenBank: PRJNA1066477), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros PHA en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología.

12.3.3 Fermentaciones a nivel matraz para evaluar la producción de PHA

Los procesos de fermentación a nivel matraz se llevaron a cabo a partir de matraces de 250 mL con un volumen de 100 mL de caldo GRPD y con distintas cantidades de fuente de carbono (0, 5, 10, 15, 20 y 25 g/L). Luego, estos fueron inoculados con 100 µL (10⁸ UFC/mL) de la solución de esporas de la cepa de *Bacillus cereus* 12GS previamente reactivada a través de un choque térmico a 100 °C durante 1 min, y se incubaron en agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a las condiciones optimizadas (150 rpm, pH8, 30°C y 4 % de inóculo). Después, matraces de 500 mL con un volumen de 200 mL del medio de cultivo GRPD se inocularon con el preinóculo de 24 h. Finalmente, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 h.

12.3.4 Extracción de PHA

Primeramente, los cultivos fermentados fueron transferidos a recipientes de polipropileno y sometidos a centrifugación a 8,000 rpm y 4°C durante 15 minutos utilizando una ultracentrífuga J251, eliminando el sobrenadante. Luego, los pellets obtenidos fueron tratados con 15 mL de hipoclorito de sodio comercial y expuestos a un baño de ultrasonido (modelo 5510R-MT) con potencia de 117 V y 135 W, y frecuencia 42 kHz durante 30 minutos. A continuación, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y los pellets fueron lavados con 15 mL de agua destilada antes de ser centrifugados nuevamente. Finalmente, los sedimentos resultantes fueron tratados con 10 mL de cloroformo y expuestos a un baño de ebullición durante un minuto. El extracto obtenido se depositó en placas Petri de vidrio previamente pesadas y se dejó secar durante la noche.

12.3.5 Cuantificación de biomasa y porcentaje de acumulación de PHA

Para ello, se tomaron 10 mL del medio de cultivo fermentado en tubos de microcentrífuga de 2 mL previamente pesados, y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos (microcentrífuga modelo TM22R). El sobrenadante fue descartado y los pellets resultantes se secaron a 60°C durante 24 horas. Finalmente, los microtubos fueron pesados en una balanza analítica (AG204) con una precisión de 0,1 mg. La biomasa generada se expresó en gramos por litro (g/L).

El porcentaje de acumulación de PHA (% PHA) fue calculado utilizando la siguiente fórmula donde P representa la producción de PHA en g/L y X corresponde a la biomasa generada en g/L:

$$\%PHA = \left[\frac{P}{X} \right] * 100$$

12.3.6 Análisis de la cinética del crecimiento bacteriano

El análisis cinético de la cepa bacteriana seleccionada en condiciones óptimas se realizó por triplicado. Este análisis cinético se realizó a las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 h, y al

mismo tiempo distintas concentraciones de glucosa (0, 5, 10, 15, 20 y 25 g/L). Además, se empleó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con la finalidad de medir las concentraciones de azúcar al paso del tiempo de fermentación (Gupta et al., 2011). Además, a partir de los datos experimentales, se calcularon los siguientes parámetros cinéticos con la finalidad de evaluar el crecimiento y el comportamiento de la producción de PHA (Amit et al., 2020; Quintero-Silva et al., 2024; Saratale et al., 2022).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{T - T_0}$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}), X_2 y X_1 son la generación de biomasa (g/L) obtenida en el tiempo T_1 and T_2 , respectivamente.

$$T_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde T_d representa el tiempo de duplicación (h), que se calcula como el logaritmo natural de 2 dividido por μ (h^{-1}).

$$Y_{P/X} = \frac{(P_2 - P_1)}{(X_2 - X_1)}$$

$$Y_{X/S} = \frac{(X_2 - X_1)}{(S_1 - S_2)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_2 - P_1)}{(S_1 - S_2)}$$

Donde $Y_{P/X}$ representa el rendimiento del producto sobre biomasa (g/g), calculado como la diferencia entre el PHA producido (g/L) y la biomasa generada (g/L). $Y_{X/S}$ representa el rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g), calculado como la diferencia entre la biomasa generada (g/L) y el sustrato consumido (g/L). $Y_{P/S}$ representa el rendimiento del

producto sobre sustrato (g/g), calculado como la diferencia entre el PHA producido (g/L) y el sustrato consumido (g/L).

$$Q_p = \frac{P}{(T_2 - T_1)}$$

Donde Q_p es la tasa de productividad (g/L*h), que se calcula como la relación entre el PHA producido (g/L) y el tiempo de fermentación (h).

12.3.7 Análisis estadístico

Los tratamientos evaluados en la cinética se realizaron por triplicado. Asimismo, estos datos se compararon y evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$. Los datos se expresan como valores medios $\pm$ desviación estándar. Los parámetros evaluados fueron producción de PHA (g/L) a distintos tiempos de fermentación y cantidad de fuente de carbono. El análisis estadístico se realizó a través del software GraphPad Prism 8.

12.3.8 Caracterización del biopolímero

12.3.8.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización de los grupos funcionales se analizó mediante espectros infrarrojos por transformadas de Fourier (FTIR), se obtuvieron con un espectrofotómetro PerkinElmer Spectrum Frontier. Se escaneó una muestra de biopolímero en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , registrándose 25 escaneos por muestra, utilizando una resolución de 4 cm^{-1} .

12.3.8.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las transiciones térmicas de los compuestos se determinaron mediante DSC utilizando un calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Las

muestras se colocaron en una bandeja hermética de aluminio, se selló y se escaneó en un rango de 25 a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Las propiedades térmicas, incluida la entalpía de fusión (ΔH_m), temperatura de fusión (T_m) y temperatura de cristalización (T_d) se calcularon a partir de los termogramas utilizando el software Universal Analysis 2000 v 2.0. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las bandejas selladas que contenían las muestras se equilibraron a 25 °C durante 1 hora antes del análisis. La cristalinidad (X_c) se evaluó utilizando la fórmula reportada por (Maity et al., 2020).

$$X_c (\%) = (\Delta H_m) / (\Delta H_{mo}) * 100$$

Donde ΔH_m es la entalpía de fusión de la muestra y ΔH_{mo} es el calor de fusión del PHB estándar (146 J/g).

12.3.8.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

El análisis estructural se midió por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (1H RMN) empleando un espectrómetro Eft-90 (Anasazi Instruments, IN, EE. UU.), utilizando cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente. Para este análisis, se disolvió una muestra de PHA, 10 mg en 1 mL de $CDCl_3$ y se analizó a 90 MHz y temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos se presentan en la escala δ (ppm) y las multiplicidades se indican de la siguiente manera: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete) y m (multiplete).

12.4 Resultados

El análisis cinético a distintos tiempos de fermentación y concentraciones de fuente de carbono demostró una producción más elevada de biopolímeros a las 48 h (**Fig. 7**), así como a la concentración de 20 g/L, seguido de 15 y 5 g/L respectivamente según el análisis estadístico (**Fig. 8**). A partir de estos datos, la cepa *B. cereus* 12GS mostró una tasa de crecimiento específico de $0,07 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 9,90 h. Asimismo, el valor de rendimiento de biomasa de PHB ($Y_{p/x}$) fue de $0,52 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ (**Tabla 10**).

Tabla 10. Parámetros cinéticos calculados para *B. cereus* 12GS

Parámetro cinético	Valor
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.07
$\mu_{\text{max}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.09
Td (h)	9.90
$K_s \text{ (g/L)}$	5
$Y_{p/x} \text{ (gg}^{-1}\text{)}$	0.52
$Y_{x/s} \text{ (gg}^{-1}\text{)}$	0.22
$Y_{p/s} \text{ (gg}^{-1}\text{)}$	0.15
$Y_{x+p/s} \text{ (gg}^{-1}\text{)}$	0.37
$q_s \text{ (gg}^{-1} \cdot \text{h)}$	0.09
$q_p \text{ (gg}^{-1} \cdot \text{h)}$	0.014
$Q_p \text{ (g/g} \cdot \text{h)}$	0.04

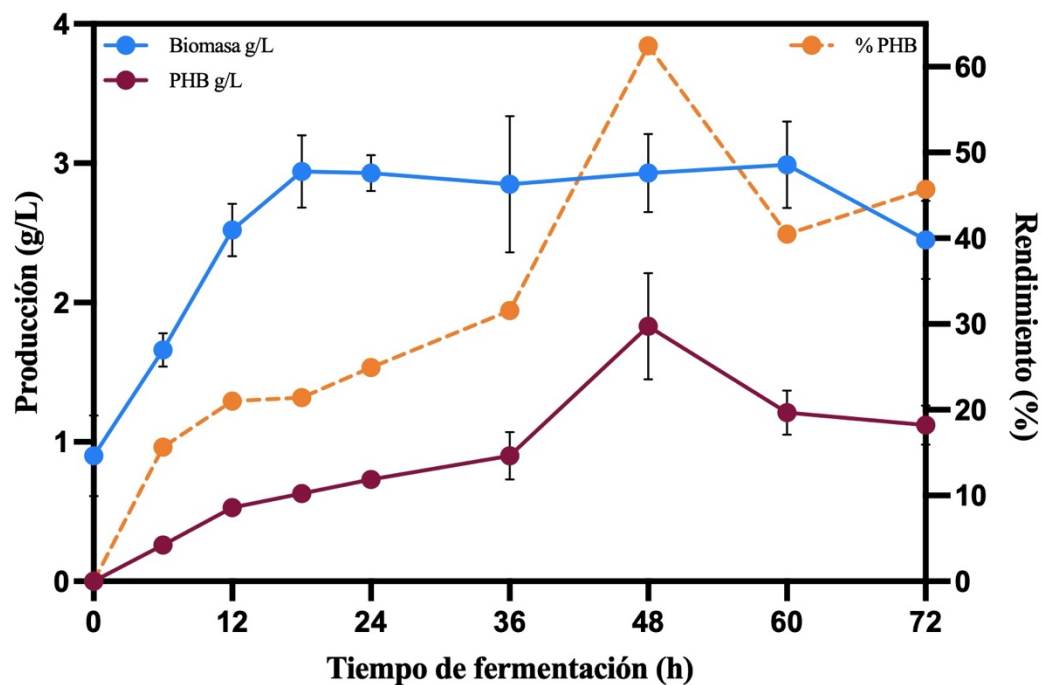


Figura 7. Cinética de crecimiento de *B. cereus* 12GS con 20 g/L de fuente de carbono.

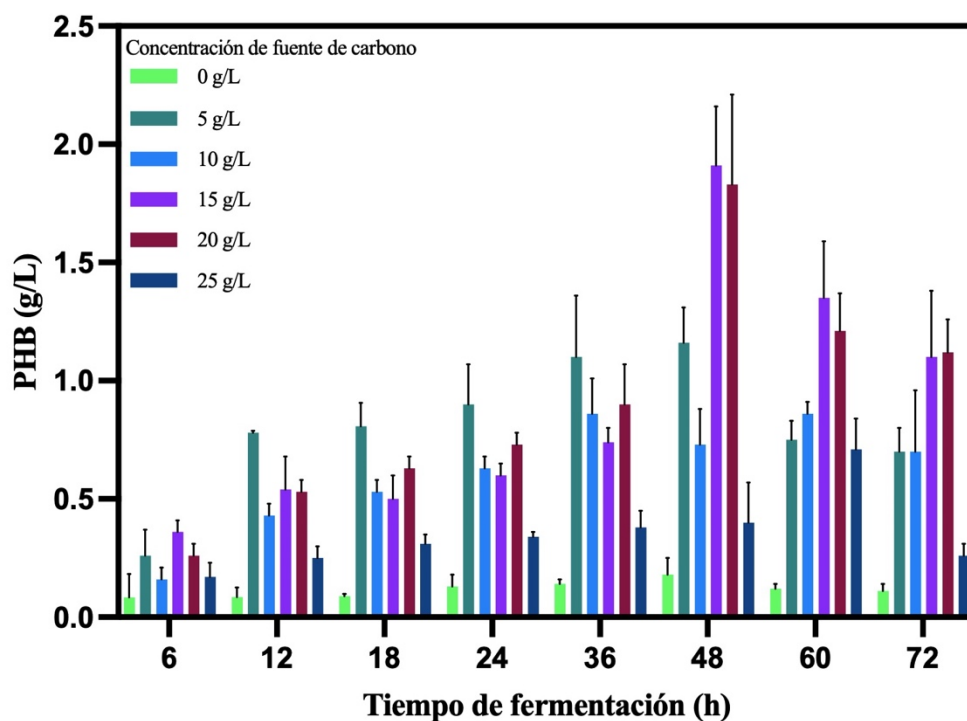


Figura 8. Análisis cinético de la producción de PHB por *B. cereus* 12GS bajo la influencia de distintas concentraciones de glucosa.

El análisis espectrofotométrico por transformada de Fourier infrarroja (FTIR) es una herramienta para mostrar los grupos funcionales químicos presentes en la muestra analizada. El patrón espectral que abarca un rango de 400 a 4000 cm^{-1} se muestra de manera grafica en la **Figura 9**. En particular, los picos formados aproximadamente a 1719 cm^{-1} se atribuyen al grupo carbonilo (C=O) que caracteriza al éster, un pico adicional a 1276 cm^{-1} sugiere la presencia del grupo (-CH). Un análisis más detallado revela una banda distintiva que aparece a 1450 cm^{-1} asociada con la deformación asimétrica de los enlaces (CH) dentro de los grupos (-CH₂) y (-CH₃) con otra aparición notable a 1379 cm^{-1} . Dentro del rango de 1000 a 1300 cm^{-1} , una serie de bandas pronunciadas significa el estiramiento del enlace (C-O) inherente al grupo éster. Es importante destacar que tales características espectrales coinciden con un polihidroxialcanoato de cadena corta (PHB).

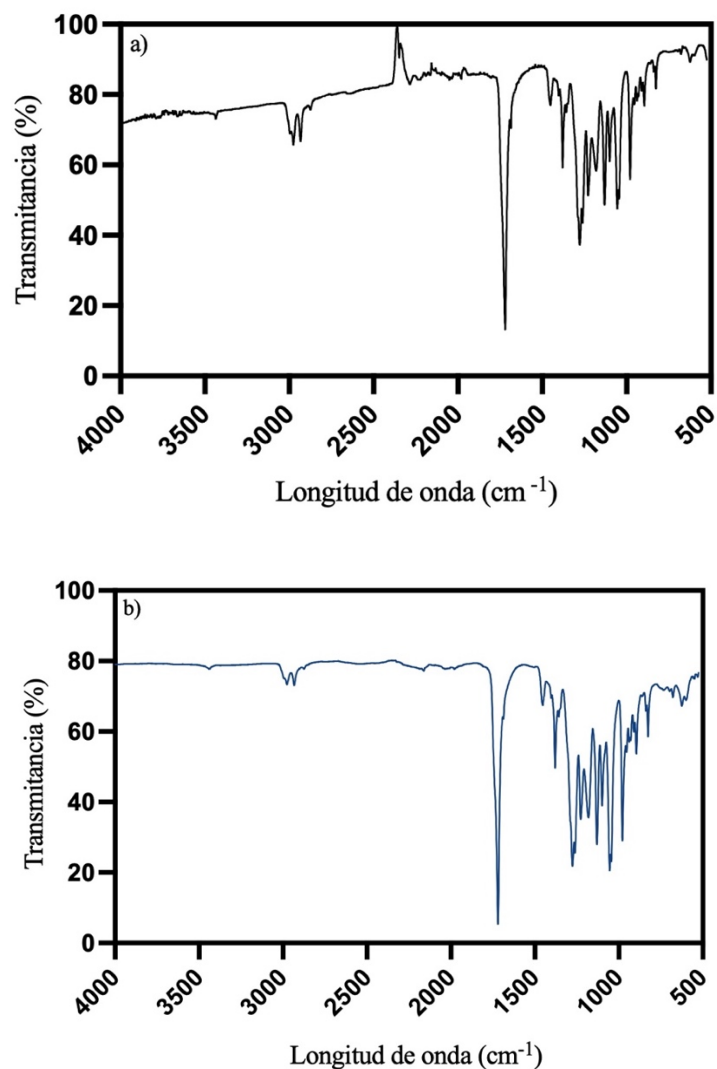


Figura 9. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de **a)** PHB comercial (Sigma-Aldrich), **b)** PHB producido por *B. cereus* 12GS.

El análisis de las propiedades térmicas de PHB se realizó utilizando DSC, conducido para investigar la entalpía de fusión, (ΔH_m), la temperatura de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c), la temperatura de degradación (T_d) y la cristalinidad (χ) de PHB (**Fig. 10**) mostrando resultados similares a las propiedades térmicas del PHB control (**Tabla 11**).

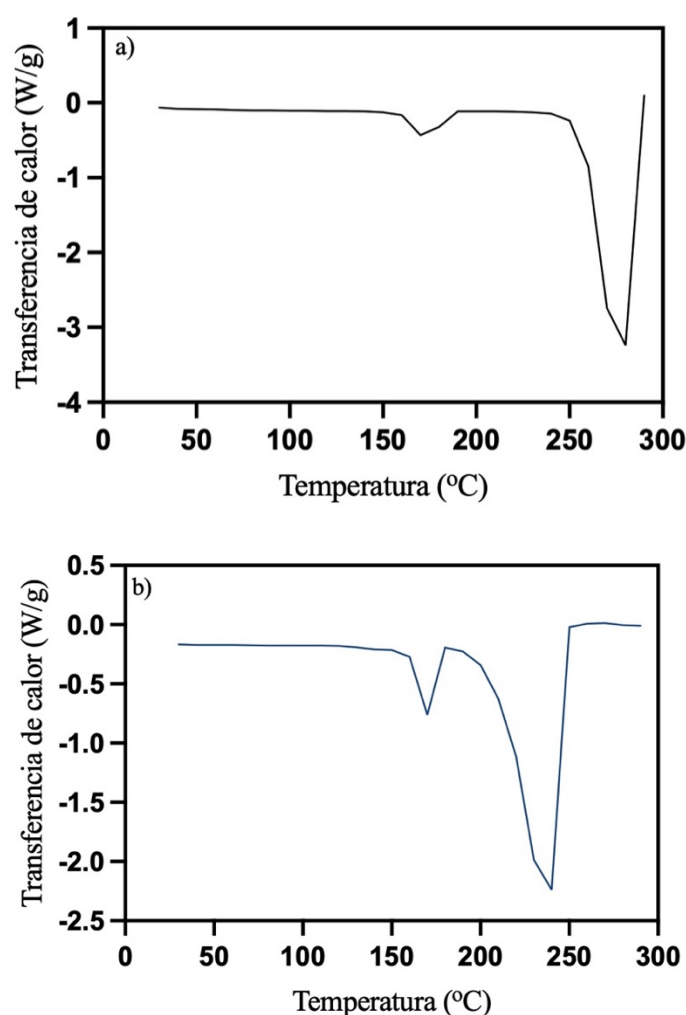


Figura 10. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de a) PHB comercial (Sigma-Aldrich) b) PHB producido por *B. cereus* 12GS.

Tabla 11. Propiedades térmicas del PHB comercial (Sigma-Aldrich) y del PHB producido por *B. cereus* 12GS.

Muestra	Tm (°C)	ΔHm (J/g)	Tc (°C)	Td (°C)	Xc (%)
PHB control (Sigma-Aldrich)	177.38	76.78	166.33	277.83	52.59
PHB producido por <i>B. cereus</i> 12GS	172.49	61.55	163.17	237.82	42

Los espectros de ^1H RMN (**Fig. 11**) representan una estructura más detallada a los análisis anteriores, confirmando la presencia un polihidroxibutirato (PHB).

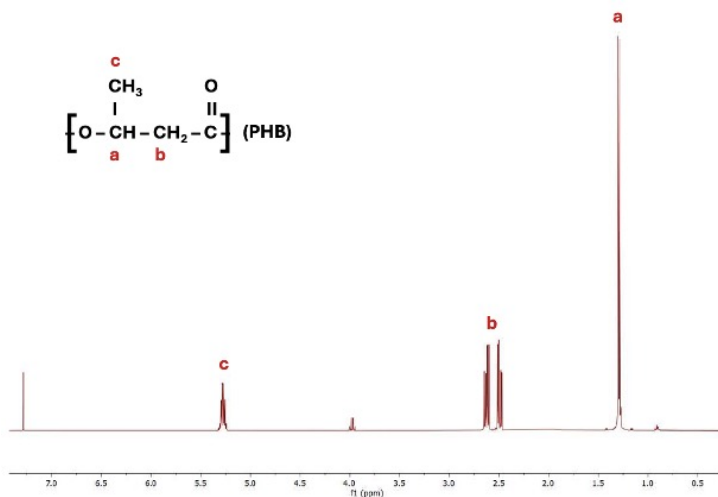


Figura 11. Espectros de ^1H RMN de PHB producido por *B. cereus* 12GS.

12.5 Discusión

Las variaciones en los parámetros de incubación, afectan la productividad del biomaterial y las propiedades fisicoquímicas del biopolímero extraído. Tal variabilidad se atribuye a la plasticidad metabólica, ya que los parámetros óptimos y los comportamientos productivos se diferencian entre las cepas de *B. cereus*. Las fluctuaciones frecuentes en materia orgánica y compuestos químicos son comunes e influyen en las propiedades genéticas y metabólicas (Martínez-Herrera et al., 2023).

El análisis cinético mostró a la concentración de 20 g/L como sobresaliente en producción de PHB g/L. El valor de rendimiento de biomasa de PHB ($Y_{p/x}$) 0.52 g/L/*h. Otras cepas de *Bacillus* reportaron valores más bajos, alrededor de 0.40 g/L*h (Manikandan et al., 2020; Rehman et al., 2020). El valor de productividad volumétrica de PHB (Q_p) fue de 0.04 g/L*h, un valor mayor y similar reportado anteriormente donde se utilizó glucosa como fuente de carbono (Tabla 12). Por otro lado, se reportó que otros *Bacillus cereus* tenían valores similares y más bajos, El tiempo en el que *Bacillus cereus* 12GS alcanza una biosíntesis máxima de PHB (48h) es una de las principales ventajas para la producción de este biomaterial a nivel industrial (Lathwal et al., 2015).

Tabla 12. Productividad volumétrica (Q_p) de biopolímeros por distintas cepas de *B. cereus* utilizando glucosa como fuente de carbono.

Productividad volumétrica (Q_p)		
Cepa	Valor (g/L*h)	Referencia
<i>B. cereus</i> 12GS	0.04	Este estudio
<i>B. cereus</i> FA11	0.064	(Masood et al., 2012)
<i>B. cereus</i> CFR06	0.019	(Halami, 2008)
<i>B. cereus</i> SPV	0.005	(Valappil et al., 2008)
<i>B. cereus</i> 4n	0.032	(Martínez-Herrera et al., 2020)
<i>B. cereus</i> BNPI-92	0.029	(Mohammed et al., 2020)

El análisis fisicoquímico del biopolímero incluyendo al FTIR, DSC y RMN es de gran utilidad para determinar la estructura química del biomaterial, así como conocer sus propiedades térmicas y conocer si es comparable a los plásticos convencionales. El análisis por FTIR demostró que la cepa de *B. cereus* 12GS produjo un polihidroxialcanoato de cadena corta denominado polihidroxibutirato (PHB), esto se comprobó al comparar un PHB comercial (Sigma-Aldrich) y al observar similitudes considerables en sus picos de absorción (Hagagy et al., 2022; Quintero-Silva et al., 2024). Asimismo, el análisis ^1H RMN demuestra una estructura química más detallada del PHB, las señales de protones muestran claramente que la cepa en estudio sintetizó PHB, comparando con la literatura (Van-Thuoc *et al.*, 2012).

Se ha descubierto que *B. cereus* 12GS es un potente productor de PHB, un plástico biodegradable caracterizado por prometedoras características térmicas. Se encontró que la T_m y la cristalinidad de PHB eran 172.4 °C y 42 %, respectivamente; otros estudios informaron un valor similar de T_m 165.6 °C para PHB producido por *B. megaterium* (Chang *et al.*, 2021). Además, Bhagowati y colaboradores informaron una temperatura de fusión (T_m) de 109.4 °C para PHB sintetizado por esta bacteria (Bhagowati *et al.*, 2015). Tal observación fue corroborada por Rheman y colaboradores, quienes notaron una T_m de 162 °C y una cristalinidad de 51.3 % (Pati *et al.*, 2020). Sin embargo, otros autores reportaron una T_m menor de 171 °C y una cristalinidad de 35 % (Pati *et al.*, 2020). La T_c encontrada fue 163.17 °C, un valor mayor comparado con un estudio reportado anteriormente, utilizando glucosa como fuente de carbono en la producción PHB (Martínez-Herrera *et al.*, 2020). La T_d encontrada en este estudio fue 237.24 °C, un valor similar reportado en la literatura (Chang *et al.*, 2021; Pati *et al.*, 2020). El ΔH_m fue reportado en 61.55 J/g, un resultado similar a Oliveira y colaboradores, donde reportaron 66.9 J/g para PHB producido por fermentación con *Cupriavidus necator* (Oliveira *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos por DSC indican que, el PHB producido por *B. cereus* 12GS exhibe temperaturas y peso molecular más bajos (aparentemente), en comparación con el PHB control. Sin embargo, esto lo posiciona como un polímero de baja fragilidad pero con una mejor tasa de biodegradación, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en el área de empaques (Hong *et al.*, 2013; Martínez-Herrera *et al.*, 2021; Sathya *et al.*, 2018).

13. CAPÍTULO 5

ELABORACIÓN DE MEMBRANAS HILADAS DE PHB Y SU EVALUACIÓN COMO VEHÍCULO EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE NICOTINA

13.1 Resumen

El polihidroxubutirato posee propiedades químicas y térmicas aptas para aplicaciones en la administración de fármacos, que puede ser estudiada a través de elaboración de membranas hiladas. Debido a esto, el objetivo del presente capítulo se centró en la preparación y evaluación de distintas membranas preparadas con PHB, PEG y Nicotina. Se encontró que la combinación de distintos polímeros mejoró la procesabilidad de las membranas, asimismo, se observó la adición homogénea de la nicotina (el fármaco en estudio) en las membranas a través de un análisis químico. Estos resultados pueden servir como punto de partida en el uso de la nicotina como sistema de administración de fármacos con un material biodergradable.

Palabras clave: Hilado por centrifugado, Membrana, Nicotina, Polietilenglicol, Polihidroxibutirato

13.2 Introducción

Entre los biopolímeros disponibles en el mercado, solo el ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxialcanoatos (PHA) poseen propiedades térmicas y mecánicas similares a los plásticos convencionales, lo que ofrece alternativas prometedoras (Vu *et al.*, 2021).

Las bacterias de *Bacillus*, al ser Gram-positivas, carecen de lipopolisacáridos en la membrana externa, lo que simplifica la extracción y facilita aplicaciones biomédicas como andamios, administración de fármacos e ingeniería de tejidos (Mohanrasu *et al.*, 2020).

El polihidroxibutirato (PHB), un tipo de PHA de cadena corta, se ha estudiado ampliamente. Sin embargo, presenta limitaciones como la fragilidad e inestabilidad térmica en el estado fundido cuando se usa en andamios (Kandhasamy *et al.*, 2017). Una estrategia para mitigar estas limitantes implica mezclarlo con otros polímeros. La incorporación de plastificantes con mayor hidrofiliidad (afinidad por el agua) en polímeros altamente cristalinos (PHB) puede mejorar la procesabilidad, ofreciendo una solución prometedora (Hutanu, 2014).

Una técnica para la formación de andamios es el hilado centrífugo; tecnología específica de nanofibras caracterizada por una alta eficiencia (Atıcı *et al.*, 2022). Presenta distintas ventajas, como la ausencia de requerimiento de campos eléctricos o diferencias de potencias. Puede utilizarse con polímeros fundidos o soluciones concentradas, y siempre que la viscosidad sea adecuada, mantiene una alta productividad.

El costo de instalación de un dispositivo de hilado centrífugo es menor que el de un dispositivo de electrohilado, por lo que podría volverse popular nuevamente. Es una opción viable para producir telas no tejidas a escala de laboratorio sin requerimientos técnicos especializados (Z. Li *et al.*, 2019; Merchiers *et al.*, 2020).

Dicho lo anterior, el objetivo del presente estudio fue preparar andamios de polihidroxibutirato por medio de hilado centrífugo, así como evaluar el efecto de la incorporación del polietilenglicol y la nicotina, con la finalidad de mejorar la procesabilidad del material y observar el efecto a través de análisis FTIR, SEM y ángulo de contacto, para introducir la investigación del PHB en la administración de fármacos.

13.3 Materiales y métodos

13.3.1 Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (EUA) (Agua destilada, Dextrosa, Extracto de levadura, Peptona, NaCl, NaOH, Polietilenglicol, Nicotina, CHCl_3).

13.3.2 Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 12GS (NCBI- GenBank: PRJNA1066477), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros (PHA) en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología.

11.3.3 Producción y extracción del biopolímero microbiano

Los procesos de fermentación a nivel matraz se llevaron a cabo a partir de matraces de 250 mL con un volumen de 100 mL de caldo GRPD, tomando en cuenta 20 g/L de fuente de carbono. Luego, estos fueron inoculados con 100 μL (10^8 UFC/mL) de la solución de esporas de la cepa de *Bacillus cereus* 12GS previamente reactivada a través de un choque térmico a 100 °C durante 1 min, y se incubaron en agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a las condiciones optimizadas (150 rpm, pH8, 30°C y 4 % de inóculo). Después, matraces de 500 mL con un volumen de 200 mL del medio de cultivo GRPD se inocularon con el preinóculo de 24 h. Finalmente, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a 48 h.

Los cultivos fermentados fueron transferidos a recipientes de polipropileno y sometidos a centrifugación a 8,000 rpm y 4°C durante 15 minutos utilizando una ultracentrífuga J251, eliminando el sobrenadante. Luego, los sedimentos obtenidos fueron tratados con 15 mL de hipoclorito de sodio y expuestos a un baño de ultrasonido (modelo 5510R-MT) con

potencia de 117 V y 135 W, y frecuencia 42 kHz durante 30 minutos. A continuación, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y los pellets fueron lavados con 15 mL de agua destilada antes de ser centrifugados nuevamente. Finalmente, los sedimentos resultantes fueron tratados con 10 mL de cloroformo y expuestos a un baño de ebullición durante un minuto. El extracto obtenido se depositó en placas Petri de vidrio previamente pesadas y se dejó secar por 24h.

11.3.4 Preparación de soluciones poliméricas

Las soluciones poliméricas se realizaron en forma de membranas, utilizando un método de hilado centrífugo para fabricar fibras utilizando una fuerza centrífuga. Este procedimiento implica utilizar un depósito rotatorio con una solución, desde el cual la solución se expulsa en forma de fibra a través de una boquilla y posteriormente se deposita en un colector (Merchiers *et al.*, 2020). Las cuatro distintas muestras se prepararon de acuerdo con la **Tabla 13**.

Tabla 13. Componentes de las membranas de PHB a evaluar.

Soluciones de PHB				
	1	2	3	4
Biopolímero (PHB)	1 g	1 g	1 g	1 g
Polímero (PEG)	-	0.2 g	-	0.2 g
Fármaco (Nicotina)	-	-	20 μ L	20 μ L

El procedimiento para asegurar la dispersión correcta de las mezclas se siguió según lo reportado por la literatura (Domínguez-Díaz *et al.*, 2021): El PHB (1 g) se disolvió en cloroformo (10 mL) bajo agitación magnética durante 4 h a 50°C. Se agregó PEG (0.2 g) a la solución anterior manteniendo la agitación magnética y la temperatura durante 1 h. Finalmente, se incorporó nicotina (20 μ L) a la solución polimérica a 50°C durante 1 h.

11.3.5 Hilado centrífugo

Las membranas se obtuvieron colocando la mezcla de polímero/biopolímero en el depósito de hilado centrífugo. El equipo de centrifugación se construyó modificando una centrífuga comercial, excluyendo la sección destinada a la colocación de tubos para fines de dispersión. Las mejoras incluyeron la integración de un eje giratorio, un depósito de metal equipado con una boquilla de impresora 3D de 0,4 mm de diámetro y la adición de ocho barras de metal que rodean el depósito para la deposición de fibras. La distancia entre la punta de la boquilla del depósito y las barras fue de 8 cm, con una velocidad de rotación de 4000 rpm empleada para facilitar la formación de fibras.

11.3.6 Caracterización

11.3.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

El FT-IR se analizó utilizando un NICOLET iS-5 (Thermo Scientific) para determinar los grupos funcionales presentes en las membranas. Se escaneó una muestra de biopolímero en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , registrándose 25 escaneos por muestra, utilizando una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis de los espectros se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.

11.3.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las distintas membranas de PHB, PEG y Nicotina se analizaron para determinar su apariencia morfológica y diámetros utilizando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEMJSM-7800FPRIME JEOL), y las muestras se montaron en un soporte de cobre. Los diámetros promedio de las fibras se muestran mediante 50 fibras seleccionadas al azar de toda la región de las imágenes SEM. Los histogramas se realizaron en el software GraphPad Prism 8. El mapeo elemental se realizó utilizando una espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).

11.3.6.3 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se obtuvo mediante la técnica de gota sésil utilizando 10 µl de agua destilada (Karbasi *et al.*, 2016). Para cada muestra, se registraron tres mediciones de CA utilizando un microscopio digital (Microview), el análisis de las imágenes se llevó acabo utilizando el software ImageJ.

13.4 Resultados

El análisis de FTIR es útil para mostrar los grupos funcionales químicos presentes en las distintas membranas analizadas. Se muestra un pico característico alrededor de 1720 cm^{-1} atribuido al grupo éster. Además, los picos cerca de 1200 y 1300 cm^{-1} , y las bandas presentes alrededor de 1000 cm^{-1} con distintas intensidades entre cada muestra, representa la presencia de los distintos componentes (**Figura 12**).

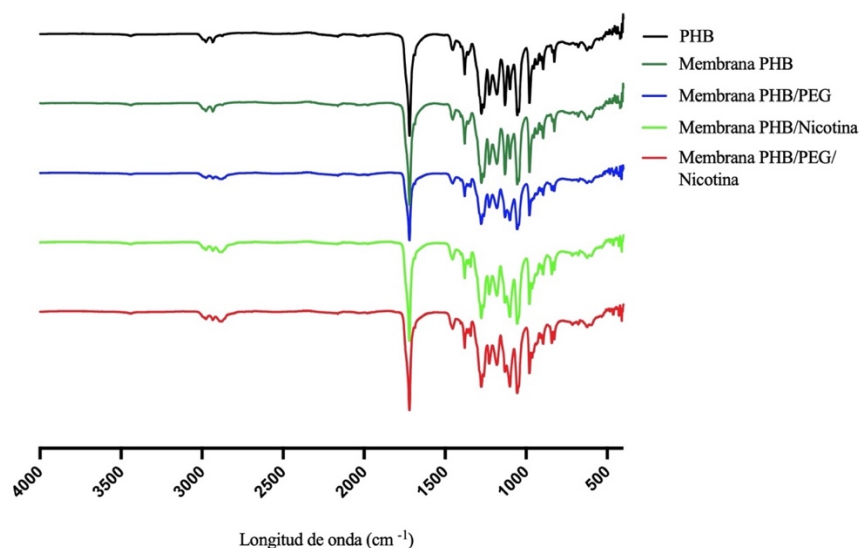


Figura 12. Análisis FTIR de las membranas hildas preparadas.

La **Figura 13** muestra micrografías electrónicas de barrido de las membranas desarrolladas, que revelan patrones morfológicos similares. Las membranas 1 y 2 (**Fig. 13 a-b**) presentan hilos paralelos, mientras que la membrana 3 (**Fig. 13c**) muestra hilos desordenados. Por último, la combinación de dos polímeros y nicotina muestra una disposición menos organizada en comparación con las preparaciones anteriores (**Fig. 13d**). Además, se observó una carga satisfactoria de fármaco en las membranas 3 y 4 (**Fig. 13 c-d**). El análisis estadístico del diámetro de fibra determinó que el diámetro medio de las fibras fue de 8.64 ± 2.35 , $8,62 \pm 2,09$, $7,87 \pm 1,94$ y $8,85 \pm 1,88$ respectivamente. La adición de la combinación de nicotina y polímero alteró la dispersión de la distribución

hacia niveles más altos o más bajos. Dado lo anterior, la preparación 3 fue la única afectada en el tamaño de fibra.

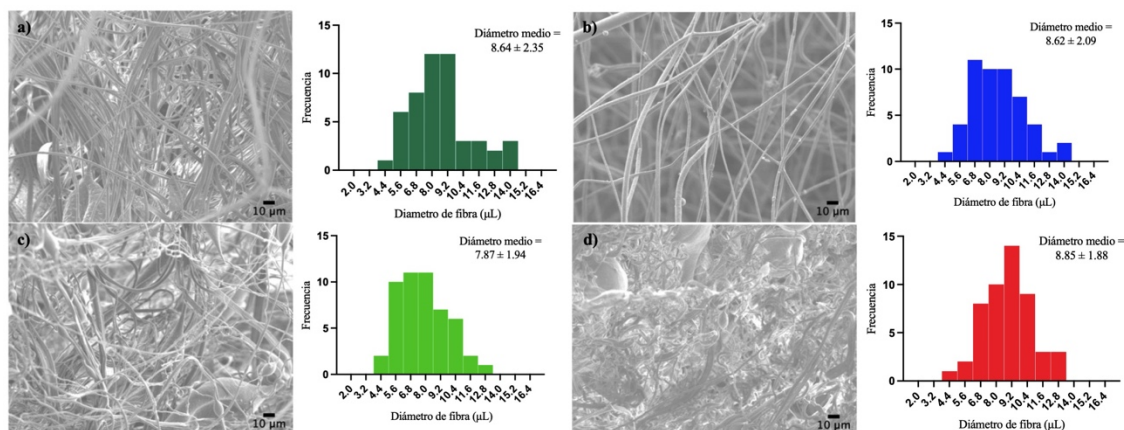


Figura 13. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las composiciones de membrana estudiadas: **a)** PHB, **b)** PHB/PEG, **c)** PHB/Nicotina, **d)** PHB/PEG/Nicotina. Los histogramas correspondientes del diámetro de la fibra se presentan respectivamente.

Los resultados del análisis de membranas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un aumento de 5000X se presentan en la **Figura 14**. Las fibras de la **Figura 14a** exhibieron superficies rugosas debido a la rápida evaporación del solvente, junto con microporosidad en su superficie e hilos paralelos. En la **Figura 14b** (PHA/PEG), se observan significativamente menos hilos porosos en comparación con la **Figura 14a**, atribuidos a diferencias en la preparación de la membrana.

Por otro lado, la adición del fármaco se logró en hilos preparados con PHB, aunque mostró deficiencias en la procesabilidad y la estructura del polímero, como se muestra en la **Figura 14c** (PHB/Nicotina). Finalmente, en la **Figura 14d** (PHA/PEG/Nicotina), se observan hilos sumergidos en el fármaco, junto con un material más robusto; sin embargo, presenta una forma más irregular que las preparaciones anteriores.

Los ángulos de contacto que se muestran en la **Figura 14** (I-IV) fueron $61,7^\circ \pm 11,06$ (a), $28,5^\circ \pm 6,49$ (b). Al añadir PEG, que sirve como plastificante, se logró un ángulo menor en comparación con la membrana anterior. Por otro lado, las membranas que contienen nicotina reducen significativamente su ángulo de contacto.

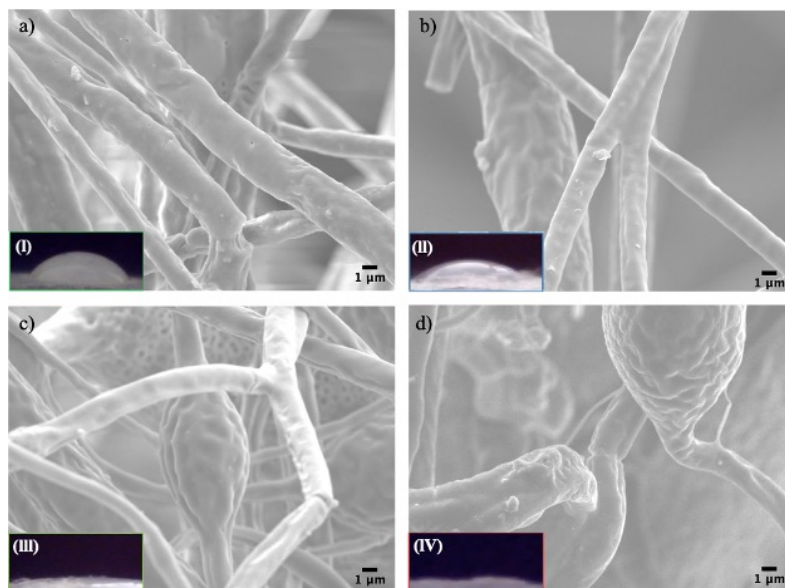


Figura 14. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las composiciones de membrana estudiadas: **a)** PHB, **b)** PHB/PEG, **c)** PHB/Nicotina, **d)** PHB/PEG/Nicotina y su respectivo ángulo de contacto.

Los mapeos elementales de preparaciones que contienen solo polímeros (**Fig. 15 a-b**) revelaron dispersión elemental en su estructura química: Carbono y Oxígeno respectivamente. La distribución de nicotina en las membranas demostró ser homogénea, como lo evidencia la presencia de Nitrógeno (color verde) junto con Carbono y Oxígeno (colores rojo y amarillo respectivamente) (**Fig. 15 c-d**). Este análisis complementa los resultados obtenidos previamente en SEM.

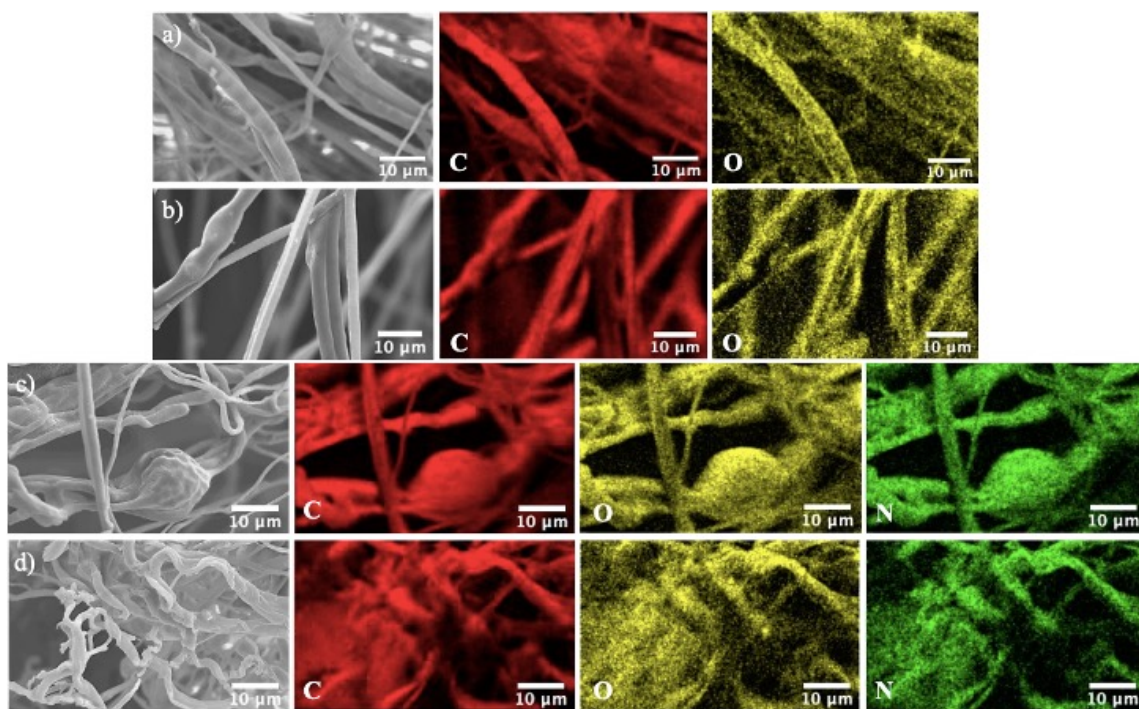


Figura 15. Mapeo elemental de las membranas que contienen a) PHB, b) PHB/PEG, c) PHB/Nicotina, d) PHB/PEG/Nicotina.

13.5 Discusión

Los polímeros biodegradables ofrecen numerosos beneficios en comparación con los derivados del petróleo, entre ellos, la reducción de las emisiones de carbono y la capacidad de biodegradación o compostabilidad (Bezirhan Arikan & Duygu Ozsoy, 2015).

El análisis de FTIR permitió observar diferentes intensidades de las bandas, lo que refleja la compatibilidad del fármaco y el polímero; esta puede ser determinada por la aparición, desaparición, cambios de posición forma e intensidad de las bandas analizadas (Ruela *et al.*, 2014). Para ello, comparando los espectros de membranas cargadas con fármaco y membranas sin carga de fármaco, la capa de fármaco adsorbida sobre la superficie de las partículas de polímero reduce la intensidad de las bandas de absorción del polímero, sugiriendo el establecimiento de enlaces no covalentes entre el fármaco y el polímero (Wu *et al.*, 2009). Las principales diferencias observadas en el espectro FTIR del polímero cargado y el polímero sin fármaco fueron la diferencia de intensidad de un pico de 1720 cm^{-1} y bandas entre 1000 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} . Estos resultados implican compatibilidad fármaco-polímero (Ruela *et al.*, 2014).

Por otro lado, en el análisis de SEM, la porosidad de la membrana preparada con PHB se atribuye al cloroformo, que se ha informado que produce superficies semiporosas similares, así como a la separación de fases en el hilado debido a la centrifugación (Francis *et al.*, 2011; Panith *et al.*, 2016). Además, en la membrana de PHB/PEG, se observan significativamente menos hilos porosos en comparación con la membrana de PHB. La variación en la porosidad puede explicarse por la dispersión del plastificante, que puede reducir la formación de poros en la superficie (Francis *et al.*, 2011). La adición de la combinación de nicotina y polímero alteró la dispersión de la distribución del tamaño de la fibra, debido a los componentes de la preparación (Akia *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2014). Asimismo, la concentración de la solución, la cantidad correspondiente de polímero agregado, así como el tamaño de la boquilla y la distancia de hilado, pueden alterar significativamente el tamaño de la fibra (Y. Li *et al.*, 2017). Para lograr la regularidad de los hilos en esta preparación, se podría implementar una agitación continua durante un tiempo más prolongado (Merchiers *et al.*, 2020). Las membranas de PHB fabricadas con hilado centrífugo son adecuadas para diversas aplicaciones, proporcionando un método

único para introducir funcionalidades específicas como la incorporación de principios activos (Vanheusden *et al.*, 2023).

La reducción del ángulo de contacto al añadir PEG a las membranas se atribuye a la combinación de polímeros (Karbasi *et al.*, 2016). Asimismo, la reducción en las membranas que contenían nicotina, fue debido a que es un candidato ideal para la administración transdérmica debido a que es altamente soluble en lípidos y tiene la capacidad de permear la piel de manera eficiente (Davaran *et al.*, 2005).

La técnica de mapeo elemental es adecuada para confirmar los elementos presentes así como su distribución elemental homogénea (Mukheem *et al.*, 2022). La distribución de nicotina en las membranas demostró ser homogénea, como lo evidencia la presencia de Nitrógeno. Se demuestra que los elementos están presentes de manera uniforme, lo que confirma la adición exitosa del fármaco al polímero (Mukheem *et al.*, 2018).

14. CAPÍTULO 6

ESTUDIO DE LA FACTIBILIDAD DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PHB EN EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

14.1 Resumen

Los estudios de la ingeniería biomédica en los andamios electrohilados a base de PHB muestran un avance significativo en la medicina regenerativa, debido a que han demostrado ser biocompatibles y viables como vehículo en el crecimiento de diversas células, como los fibroblastos dérmicos humanos (HDF), los cuales influyen significativamente en la reparación de tejidos. Por tal motivo, el objetivo del presente capítulo fue evaluar distintas membranas electrohiladas de PHB de distintas concentraciones, así como monitorear el crecimiento de células HDF en las membranas con la finalidad de demostrar la aplicabilidad del biopolímero en el área biomédica. Interesantemente, las membranas electrohiladas alineadas con 14 % de PHB muestran resultados sobresalientes en sus propiedades fisicoquímicas y los ensayos de citotoxicidad, superando al control.

Palabras clave: Biocompatibilidad, Electrohilado, Fibroblastos, PHB

14.2 Introducción

Los andamios a base de polihidroxibutirato (PHB) representan un avance notable en el campo de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, debido a que entre sus propiedades, destaca la biocompatibilidad y las características similares al polipropileno (Raziyan *et al.*, 2024). Asimismo, la importancia de tales andamios radica en la capacidad de proporcionar una estructura y tridimensional de soporte para la adhesión y proliferación celular, lo que representa importancia para una reparación tisular eficaz (Giretová *et al.*, 2025).

Actualmente se han desarrollado diversas técnicas de fabricación de andamios, entre ellos el electrohilado, que optimiza la macroarquitectura de estos andamios, mejorando su estabilidad mecánica y promoviendo funciones celulares críticas para la regeneración de tejidos (C.-S. Li *et al.*, 2025). Además, se han producido andamios con altas relaciones superficie-volumen que replican la estructura fibrosa de la matriz extracelular, mejorando su aplicación en el ámbito. La investigación de estos andamios no está exenta de desafíos, entre ellos la optimización del proceso del electrohilado para eliminar defectos en la morfología de la fibra, la evaluación del rendimiento biológico a largo plazo de los andamios y la solubilidad (Sadat-Shojai, 2016).

La optimización de los parámetros de electrohilado, como la concentración y el voltaje aplicado, es clave para producir fibras uniformes que pueden favorecer el crecimiento y la función celular. Cabe destacar que, los andamios electrohilados de PHB promueven eficazmente el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos, lo que lo convierte en candidatos adecuados para mejorar la cicatrización de heridas y la integración tisular (Zamanifard *et al.*, 2020).

Los fibroblastos dérmicos humanos son células especializadas ubicadas dentro de la capa de la dermis de la piel, responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular y el tejido conectivo. Estos se destacan debido a que muestran una respuesta única a los factores de crecimiento y los estímulos ambientales, lo que influye significativamente en la reparación de tejidos (Smith & Rai, 2024).

Dicho lo anterior, el objetivo del presente capítulo fue elaborar andamios a la concentración óptima y evaluar su capacidad como vehículo en el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos.

14.3 Materiales y métodos

14.3.1 Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (EUA). (Agua destilada, Dextrosa, Peptona, Extracto de levadura, NaCl, NaOH, CHCl_3 , Glicerol, DMEM, Tripsina, PBS, FBS, l-Glutamina, acetoximetil éster de calceína, homodímero de etidio, alamarBlue, alcóxido de calcio).

14.3.2 Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 12GS (NCBI- GenBank: PRJNA1066477), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros (PHA) en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología.

14.3.3 Producción y extracción del biopolímero microbiano

Los procesos de fermentación a nivel matraz se llevaron a cabo a partir de matraces de 250 mL con un volumen de 100 mL de caldo GRPD, tomando en cuenta 20 g/L de fuente de carbono. Luego, estos fueron inoculados con 100 μL (10^8 UFC/mL) de la solución de esporas de la cepa de *Bacillus cereus* 12GS previamente reactivada a través de un choque térmico a 100 °C durante 1 min, y se incubaron en agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a las condiciones previamente optimizadas (150 rpm, pH 8, 30°C y 4 % de inóculo). Después, matraces de 500 mL con un volumen de 200 mL de caldo GRPD se inocularon con el preinóculo de 24 h. Finalmente, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) por 48 h.

Los cultivos fermentados fueron transferidos a recipientes de polipropileno y sometidos a centrifugación a 8,000 rpm y 4°C durante 15 minutos utilizando una ultracentrífuga J251, eliminando el sobrenadante. Luego, los sedimentos obtenidos fueron tratados con 15 mL de hipoclorito de sodio y expuestos a un baño de ultrasonido (modelo 5510R-MT) con

potencia de 117 V y 135 W, y frecuencia 42 kHz durante 30 minutos. A continuación, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y los pellets fueron lavados con 15 mL de agua destilada antes de ser centrifugados nuevamente. Finalmente, los sedimentos resultantes fueron tratados con 10 mL de cloroformo y expuestos a un baño de ebullición durante un minuto. El extracto obtenido se depositó en placas Petri de vidrio previamente pesadas y se dejó secar por 24h.

14.3.4 Preparación de soluciones poliméricas

Se prepararon diferentes soluciones a distintas concentraciones de PHB (10, 12 y 14 %), las cuales fueron preparadas disolviendo con cloroformo y bajo agitación magnética a temperatura ambiente hasta disolver completamente.

14.3.5 Electrohilado

El proceso de electrohilado es un método ampliamente utilizado para producir biomateriales y permite generar esteras de nanofibras poliméricas similares a matrices extracelulares. Después del tiempo de agitación a temperatura ambiente y la obtención de una solución homogénea, la solución de polímero se transfirió a una jeringa esterilizada de polipropileno/poliestireno con una punta 23GA. El proceso de electrohilado se realizó a 10 kV de voltaje aplicado, 1 ml/h de velocidad de la bomba dosificadora y 15 cm de distancia entre la punta y el colector. Las nanofibras se depositaron sobre papel de aluminio colocado sobre un colector giratorio conectado a tierra que giraba a 700 rpm para obtener una orientación de fibra alineada. Antes del proceso de electrohilado, se cubrió el papel de aluminio con una fina capa de glicerol (99%; Panreac) para facilitar el desprendimiento de las nanofibras depositadas. Una vez obtenidas las fibras, los tapetes de nanofibras se mantuvieron en un desecador para mejorar su conservación y permitir la evaporación de posibles trazas.

14.3.6 Caracterización

14.3.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

El FT-IR se analizó utilizando un NICOLET iS-5 (Thermo Scientific) para determinar los grupos funcionales presentes en las membranas. Se escaneó una muestra de biopolímero en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , registrándose 25 escaneos por muestra, utilizando una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis de los espectros se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.

14.3.6.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las transiciones térmicas de los compuestos se determinaron mediante DSC utilizando un calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Las muestras se colocaron en una bandeja hermética de aluminio, se selló y se escaneó en un rango de 25 a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Las propiedades térmicas, incluida la temperatura de fusión (T_m) y temperatura de cristalización (T_d) se calcularon a partir de los termogramas utilizando el software Universal Analysis 2000 v 2.0. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las bandejas selladas que contenían las muestras se equilibraron a 25 °C durante 1 hora antes del análisis.

14.3.6.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las distintas membranas de PHB, PEG y Nicotina se analizaron para determinar su apariencia morfológica y diámetros utilizando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEMJSM-7800FPRIME JEOL), y las muestras se montaron en un soporte de cobre. Los diámetros promedio de las fibras se muestran mediante 50 fibras seleccionadas al azar de toda la región de las imágenes SEM. Los histogramas se realizaron en el software GraphPad Prism 8.

14.3.7 Ensayos de biocompatibilidad

14.3.7.1 Cultivo de células

Se reactivaron células de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) sacando una alícuota de células previamente congeladas, se colocaron en baño de 37°C por 5 minutos. Se traspasó 1 mL de células a un tubo falcon y se mezcló con 1 mL de DMEM previamente temperado. Luego, se agregaron 3 mL más y se homogenizó hasta obtener una solución de células. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y se agregó 1 mL más de DMEM. Posteriormente se procedió a tomar 1 mL de la solución de células preparada a un frasco de 75 cm² de cultivo de células, y finalmente se agregaron 12 mL más de DMEM, se observó en el microscopio que las células estén flotando y se dejó incubar a 37°C por 24h.

El cultivo de células HDF se observó diariamente para observar la morfología y crecimiento de las células, y se procedió a cambiar el medio de cultivo cada tercer día. Para lo anterior, se trabajó en condiciones de esterilidad y se retiró el DMEM del cultivo, se enjuagó el cultivo con 5 mL de PBS previamente atemperado, se retiró el PBS y se añadió 15 mL de medio de cultivo DMEM previamente atemperado y se distribuyó de manera homogénea. Se colocó el cultivo en la incubadora a 37°C.

Al obtener un cultivo confluyente, se procedió al pasaje de células; con la finalidad de contar con un cultivo adecuado para el crecimiento de las células. Para lo anterior, se aspiró el medio DMEM del cultivo de células HDF confluyente, se enjuagó con 5 mL de PBS, luego, se agregaron 3 mL de tripsina al cultivo y se distribuyó de manera homogénea. Después, se incubó el medio por 5 minutos a 37°C y se observó en el microscopio que las células se “despegaran” de la superficie. Posteriormente, se agregó 6 mL de DMEM previamente temperado al cultivo y se vació en un tubo falcon para centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos. Se desactó el sobrenadante y se agregó 5 mL adicionales de DMEM al pellet resultante, se homogenizó la solución de células y se tomó 1 mL en un frasco nuevo previamente etiquetado. Finalmente se agregó 12 mL de DMEM al frasco, se distribuyó de manera homogénea y se dejó incubar a 37°C.

14.3.7.2 Ensayo de citotoxicidad *In vitro* (alamarBlue)

La evaluación de la viabilidad de las células cultivadas durante 24 h en el medio previamente incubado con las fibras preparadas por electrohilado se evaluó con el reactivo alamarBlue (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este experimento, se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos. Estas células se cultivaron en un medio de cultivo que contenía DMEM, 10% FBS, 2 mM l-Glutamina y 100 U/mL de pen-strep (medio de cultivo suplementado) y se incubó a 37 °C y CO₂ al 5% (v/v) de un medio cambiante cada tercer día y se utilizaron los pasajes de células 4-7. El medio acondicionado se preparó añadiendo 500 µL de medio de cultivo suplementado sobre sobre andamios de 1 x 1 cm previamente esterilizados con UV e incubándolos durante 24 h a 37°C en una incubadora de CO₂ (Perez-Amodio *et al.*, 2021). Las células (15,000 células/pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos en medio de cultivo suplementado. A los 1, 3 y 7 días de postratamiento, se midió la fluorescencia a una longitud de onda Ex/Em de 530/590 nm utilizando un lector de microplacas (Infinite M200 Pro; Tecan). Se utilizaron tres réplicas por condición. Los valores obtenidos se normalizaron al valor medio correspondiente a la muestra de control con medio no acondicionado el día 1 (blanco).

14.3.7.3 Ensayo de vida/muerte

A distintos días de cultivo (1, 3 y 7), se determinó la viabilidad celular en los andamios de PHB mediante tinción con el kit Live/Dead Viability según las especificaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Las células/andamios se incubaron en PBS que contenía acetoximetil éster de calceína y homodímero de etidio durante 30 minutos a 20 °C para marcar las células vivas y muertas. La fluorescencia verde y roja indicaron células vivas y células muertas, respectivamente (Ye *et al.*, 2009). Las imágenes se obtuvieron por un microscopio de fluorescencia Thunder Imager Tissue (Leica Microsystems) y se procesaron en ImageJ.

14.3.8 Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas de calcio se sintetizaron mediante el método sol-gel utilizando un precursor de alcóxido de calcio, como se reportó anteriormente (Sachot *et al.*, 2016). Al obtener las nanopartículas, se sometieron a un tratamiento de 400°C por 12 horas en una mufla.

14.4 Resultados

El análisis de FTIR es importante debido a que muestra los grupos funcionales presentes con distintas intensidades en las membranas con las concentraciones de polímero estudiadas. Se muestra un pico con distintas intensidades alrededor de 1720 cm^{-1} atribuido al grupo éster. Asimismo, las bandas presentes alrededor de 1000 cm^{-1} con presencia de distintos picos en 10 % de PHB. (**Fig. 16**).

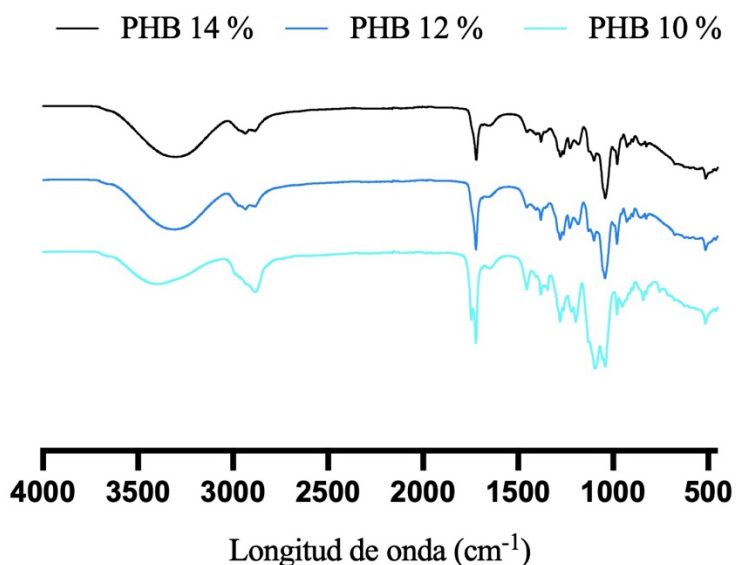


Figura 16. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de andamios de PHB elaboradas a diferentes concentraciones.

La **Tabla 14** muestra el análisis las propiedades térmicas de PHB, conducido para comparar las propiedades térmicas de los andamios preparados con distintas concentraciones de polímero, los resultados muestran temperaturas similares al PHB control y al PHB producido por *B. cereus* 12GS, lo que representa buena estabilidad de los andamios. Además, se seleccionó el andamio 14 % PHB debido a sus características térmicas sobresalientes.

Tabla 14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de PHB y andamios de PHB

Análisis DSC			
Muestra	Tc (°C)	Tm (°C)	Td (°C)
PHB control	163	174	292.9
PHB 12GS	157	163	289.4
Andamio PHB 10 %	146	151	279.8
Andamio PHB 12 %	145	150	282
Andamio PHB 14 %	153.7	156.5	279.6

El ensayo de células vivas/muertas permitió determinar la viabilidad celular en los andamios de PHB 14 %, las células verdes representan a las células vivas y las rojas a las células muertas. Se observan en su mayoría células vivas, por lo que el andamio es adecuado para el cultivo de células HDF *in vitro* (**Fig. 17**).

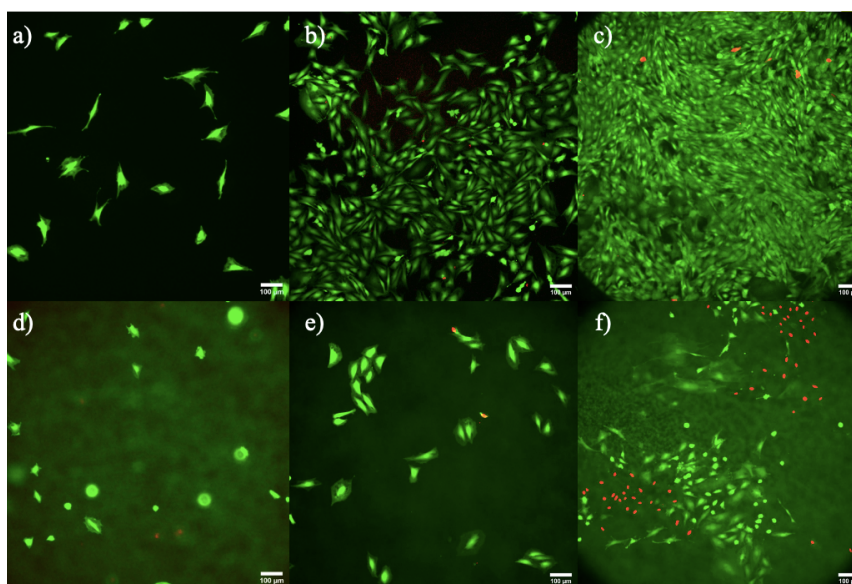


Figura 17. Ensayo de células vivas/muertas para la determinación de la viabilidad de las células HDF. Control a) día 1, b) día 3, c) día 7. Andamio de PHB d) día 1, e) día 3, f) día 7.

La **figura 18** representa los distintos días de cultivo de células HDF, en el día 0 se observan las células flotando (día del pasaje de células), en el día 1 las células comienzan a adherirse, mientras que en el día 3 se observa mayor presencia de células con la morfología característica de las células HDF, finalmente, en el día 7, se observa un cultivo confluyente, en este día, con las células suficientes, se montaron los experimentos de citotoxicidad *in vitro*.

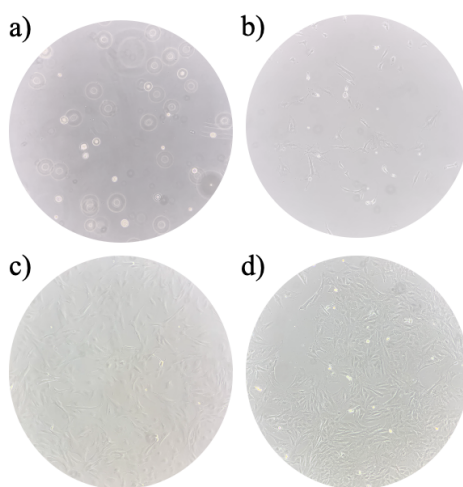


Figura 18. Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos a) día 0, b) día 1, c) día 3, d) día 7.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad *in vitro* con las membranas (preparadas de manera aleatoria) de PHB se compararon con un control que consistía en células expuestas sin membranas. Como se muestra en la **Figura 19**, se detectó una viabilidad de fibroblastos dérmicos de alrededor de 70-80 % en los días estudiados.

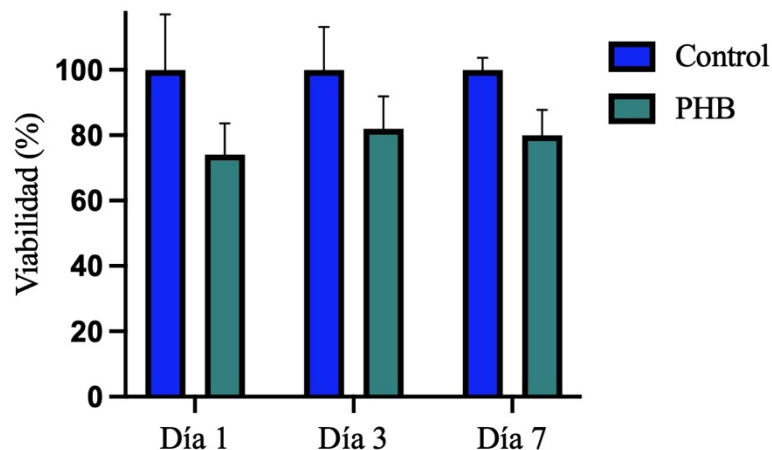


Figura 19. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de los andamios (alamarBlue).

La adición de nanopartículas de calcio a las membranas de PHB demostró una buena viabilidad, asimismo, la preparación de membranas alineadas aumentó la viabilidad en comparación con las membranas preparadas de manera aleatoria (**Fig. 20**).

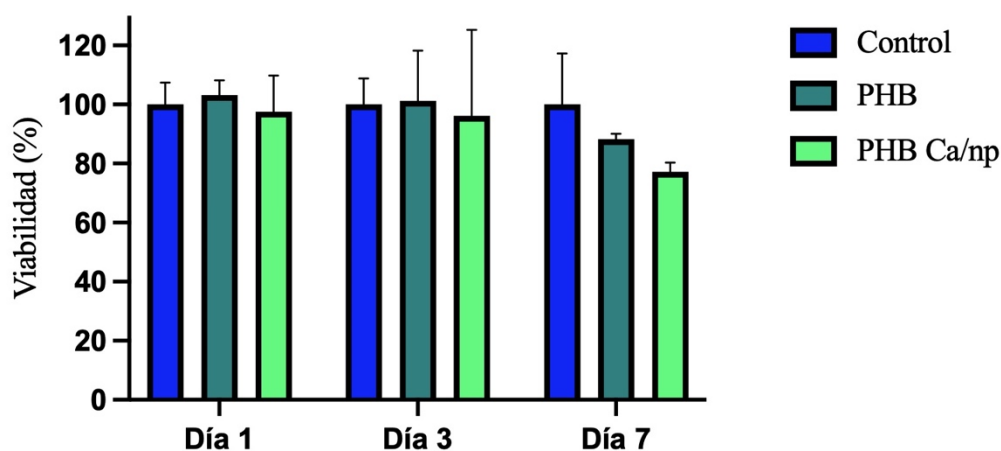


Figura 20. Evaluación del ensayo de citotoxicidad *in vitro* (Alamar blue) de andamios de PHB cargadas con nanopartículas de calcio.

El análisis fisicoquímico de las membranas de PHB y PHB/Ca-np (cargadas con nanopartículas de Calcio), demuestran diferencias en la intensidad de picos característicos descritos anteriormente, además, se mostró la aparición de nuevas bandas en los espectros (**Fig. 21**). Por otro lado, el análisis de DSC muestra que la membrana de PHB cargada con nanopartículas no tiene pico de fusión debido a su naturaleza amorfa (**Tabla 15**).

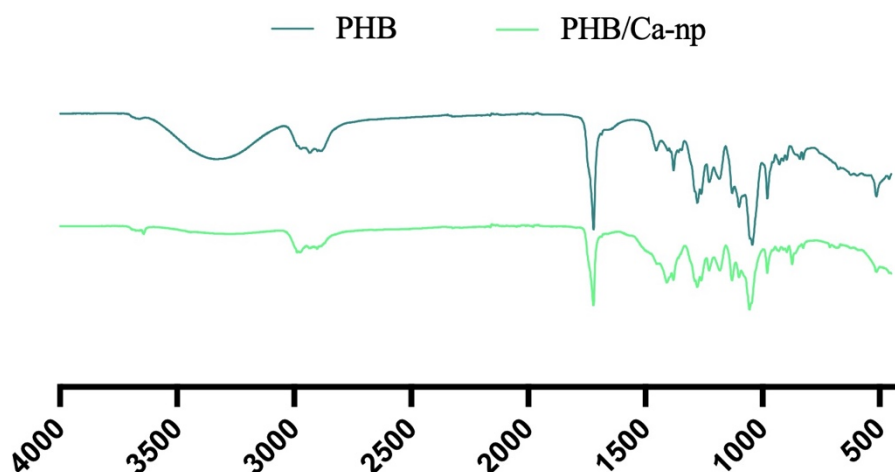


Figura 21. Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de los andamios cargados con nanopartículas.

Tabla 15. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de andamios de PHB cargado con nanopartículas.

Análisis DSC			
Muestra	T _c (°C)	T _m (°C)	T _d (°C)
Andamio PHB 14 %	176	179	274.7
Andamio PHB 14 % + Nanopartículas de calcio	-	-	-

La microscopía electrónica de barrido de las membranas alineadas mostró tamaños de las fibras similares, sin embargo, al observar el histograma se observa que las membranas cargadas con nanopartículas de calcio, muestra fibras de tamaño disperso, así como se observa a simple vista en las imágenes (**Fig. 22**).

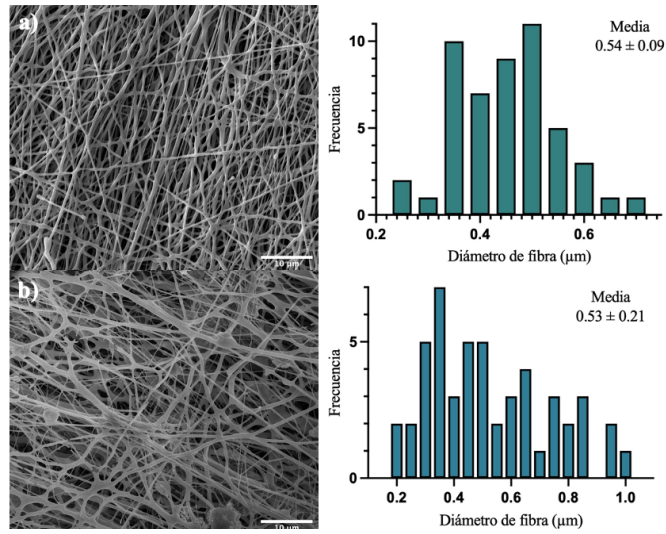


Figura 22. Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de los andamios: a) PHB alineado, b) PHB/Ca-np alineado. Se presentan los histogramas correspondientes del diámetro de la fibra respectivamente.

14.5 Discusión

La técnica de electrohilado ha demostrado ser adecuada para la producción de andamios tridimensionales útiles para la ingeniería de tejidos. Dichas estructuras se caracterizan de manera general por un alto grado de porosidad, que permiten una circulación eficiente de elementos necesarios para el crecimiento de células, así como un área que imita a la matriz extracelular natural (Sill & von Recum, 2008).

Además de las características ideales ya mencionadas, los andamios también deben proporcionar un soporte mecánicamente estable para el desarrollo celular (Ramier *et al.*, 2014), en este estudio, esto se demuestra con los análisis de DSC realizado a las membranas (**Tabla 12**). Asimismo, la membrana de PHB cargada con nanopartículas de calcio no tiene pico de fusión debido a su naturaleza amorfa (**Tabla 13**), y no tiene una estructura definida, lo que representa una ventaja del andamio para aplicaciones en materiales de embalaje o dispositivos médicos (Pryadko *et al.*, 2022).

En el ensayo de células vivas/muertas no se encontró efecto citotóxico después de 24h, sin embargo, en los siguientes días se nota la presencia de células muertas. Aún así, el ensayo mostró principalmente células vivas teñidas de color verde en el día 3 y 7 del experimento (**Fig. 15**). De forma general, los andamios mostraron una porosidad ideal que facilitó la penetración celular (Gabriel *et al.*, 2017).

Por otro lado, los estudios de citotoxicidad realizados por alamarBlue, demostraron viabilidad mayor al 85 % en las membranas de PHB de manera ordenada, lo que los coloca como andamios ideales para la regeneración de tejidos (Heydari *et al.*, 2024). Sin embargo, también se observaron disminuciones en la viabilidad celular. Este hallazgo se puede explicar por el hecho de que el Ácido Polihidroxibutírico es un intermediario presente de forma natural en la sangre humana (Williams *et al.*, 1999). Otros estudios reportan membranas de PHBV donde se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos, y las células pudieron crecer y proliferar de manera satisfactoria. Las células exhibieron las características normales y saludables, así como se comprobó la biocompatibilidad con ensayos relacionados al alamarBlue (Naphorn, 2014).

Dados los resultados del SEM, las nanopartículas de calcio quedaron atrapadas dentro de los andamios de PHB, como se ha reportado anteriormente con distintas nanopartículas

(Ramier *et al.*, 2014). El diámetro de las fibras de PHB electrohiladas fue considerablemente uniforme (**Fig. 20**), lo que representa una estructura favorable para el soporte en el crecimiento de células (Zamanifard *et al.*, 2020).

Estos resultados indican que los andamios preparados pueden ser aplicados como biomateriales en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

15. CONCLUSIONES

En la actualidad, la bioprospección de microorganismos indican el punto de partida en la investigación biotecnológica, debido a que se han demostrado aislados recientes como potenciales para las exigencias actuales donde se necesita la producción de bioplásticos aptos para la industria y la biomedicina, capaces de ser biodegradables, biocompatibles y que su costo de producción no se eleve drásticamente. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran a una cepa bacteriana de *B. cereus* (aislada de suelo agrícola con un alto contenido de carbono) la cual, mostró rendimientos de hasta un 87 %, para lograrlo, se estudiaron distintas condiciones de fermentación y un medio de cultivo de cuatro componentes (Glucosa, peptona, extracto de levadura y NaCl) que no necesitó requerimientos especiales más que el ajuste de pH.

Aunado a ello, el diseño de experimentos de Taguchi facilitó la identificación de las condiciones óptimas de fermentación así como los parámetros con mayor influencia, que fueron pH 8, 30°C, 150 rpm, 4 % de inóculo así como la agitación y el pH los parámetros de mayor influencia. Los análisis fisicoquímicos por FTIR, DSC y H-RMN indican que el polímero producido es PHB. Por otro lado, los andamios preparados mediante hilado centrífugo y electrohilado presentaron propiedades aptas para aplicaciones biomédicas, por lo que pueden ofrecer un vehículo apto para la administración de fármacos y el cultivo de células de fibroblastos dérmicos humanos, ya que mostró ausencia de toxicidad y un buen encapsulamiento.

Dados los resultados obtenidos en el presente estudio, donde un biomaterial microbiano demostró cualidades químicas y térmicas comparables a los polímeros sintéticos, así como una buena compatibilidad, esta investigación contribuye a las alternativas de la producción excesiva de plásticos derivados del petróleo.

16. PERSPECTIVAS

- Continuar realizando bioprospección en ecosistemas híper salinos o extremos de cepas bacterianas con propiedades sobresalientes en el ámbito de los Polihidroxialcanoatos.
- Reforzar los análisis moleculares con estudios de genoma completo con la finalidad de conocer toda la información genética del microorganismo estudiado.
- Probar distintos medios de cultivo que permita la biosíntesis óptima de polihidroxibutirato a través de *B. cereus* 12GS.
- Estudiar el análisis tecno económico de la producción del polímero a través de una producción nivel biorreactor.
- Proponer un estudio más exhaustivo del polímero producido en este proyecto mediante difracción de rayos X, pruebas mecánicas y espectroscopía de Raman.
- Realizar estudios de biodegradabilidad del biopolímero para comprobar el tiempo en comparación al polietileno.
- Probar el efecto de distintas líneas celulares con los andamios electrohilados de PHB, así como conocer el efecto de la combinación de polímeros naturales con los andamios.

17. DECLARACIÓN SOBRE EL USO DE HERRAMIENTAS DE IA

Durante la escritura de esta tesis, se utilizaron herramientas de inteligencia artificial (IA) de manera complementaria para mejorar ciertas etapas del proceso de redacción e investigación. En particular, se empleó Elicit, Consensus y Storm IA para:

- Sugerencias de redacción, coherencia textual y estilo académico.
- Búsqueda y organización de información general.

El escrito final, la interpretación de los resultados y las conclusiones presentadas en este trabajo son de exclusiva autoría del tesista, quien se responsabiliza plenamente por la veracidad, originalidad y rigor académico de lo expuesto. El uso de la IA se limitó a funciones de apoyo y no reemplazó en ningún momento el pensamiento crítico, el análisis propio ni la redacción sustancial del texto.

18. CRÉDITOS

Dra. María Elizabeth Alemán Huerta

Investigación, Conceptualización, Metodología, Supervisión, Administración del proyecto, Adquisición de fondos, Validación, Análisis formal.

Dr. Raul Enrique Martinez Herrera

Conceptualización, Metodología, Software, Investigación, Validación, Análisis formal, Supervisión.

Dra. Isela Quintero Zapata

Recursos, Supervisión, Adquisición de fondos, Investigación.

Dra. Susana de la Torre Zavala

Software, Metodología, Recursos, Supervisión.

Dra. Verónica Almaguer Cantú

Recursos, Supervisión, Adquisición de fondos.

Dra. Fatima Lizeth Gandarilla Pacheco

Recursos, Supervisión.

Dr. Hamlet Aviles Arnaut

Software, Metodología, Recursos, Supervisión.

Dr. Erick de Jesus de Luna Santillana

Recursos, Supervisión.

Dra. Maraolina Dominguez Diaz

Metodología, Supervisión, Recursos, Software, Investigación.

Dra. Elisabeth Engel Lopez

Metodología, Supervisión, Recursos, Investigación.

19. BIBLIOGRAFÍA

- Abdeladhim, B., Reis, R. ;, Vieira, J. A. ;, De Almeida, A. M. ;, Abdeladhim, R. Ben, Reis, J. A., Vieira, A. M., & Dias De Almeida, C. (2024). Polyhydroxyalkanoates: Medical Applications and Potential for Use in Dentistry. *Materials* 2024, Vol. 17, Page 5415, 17(22), 5415. <https://doi.org/10.3390/MA17225415>
- Adesetan, T. O., Efuntoye, M. O., & Babalola, O. O. (2020). Genotypic Profiling of *Bacillus cereus* Recovered from Some Retail Foods in Ogun State, Nigeria, and Their Phylogenetic Relationship. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3750948>
- Aeschelmann, F., & Carus, M. (2015). Biobased building blocks and polymers in the world: Capacities, production, and applications-status quo and trends towards 2020. *Industrial Biotechnology*, 11(3), 154–159. <https://doi.org/10.1089/IND.2015.28999.FAE>
- Aghebati-Maleki, A., Dolati, S., Ahmadi, M., Baghbanzhadeh, A., Asadi, M., Fotouhi, A., Yousefi, M., & Aghebati-Maleki, L. (2020). Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1962–1972. <https://doi.org/10.1002/JCP.29126>
- Akia, M., Salinas, N., Rodriguez, C., Gilkerson, R., Materon, L., & Lozano, K. (2018). Texas Sour Orange Juice Used in Scaffolds for Tissue Engineering. *Membranes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES8030038>
- Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M., & Ghazwani, A. A. (2019). Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00755. <https://doi.org/10.1002/MBO3.755>
- Alshehrei, F. (2019). Citation: Fatimah Alshehrei, Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by Bacteria Isolated from Soil of Saudi Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by Bacteria Isolated from Soil of Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbiol*, 13(2), 897–904. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.2.26>
- Altaee, N., El-Hiti, G. A., Fahdil, A., Sudesh, K., & Yousif, E. (2016). Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/S40064-016-2480-2>
- Amiri, S., Mohammadi Zeydi, M., & Amiri, N. (2021). *Bacillus cereus* saba.zh, a novel bacterial strain for the production of bioplastic (polyhydroxybutyrate). *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2117–2128. <https://doi.org/10.1007/S42770-021-00599-9/FIGURES/6>
- Amit, Nayak, J. K., & Ghosh, U. K. (2020). Microalgal remediation of anaerobic pretreated pharmaceutical wastewater for sustainable biodiesel production and electricity generation. *Journal of Water Process Engineering*, 35, 101192. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101192>
- Aramvash, A., Gholami-Banadkuki, N., Moazzeni-Zavareh, F., & Hajizadeh-Turchi, S. (2015). An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1936–1943. <https://doi.org/10.4014/JMB.1505.05053>
- Arikawa, H., Matsumoto, K., & Fujiki, T. (2017). Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring csc genes from *Escherichia coli* W.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7497–7507.
<https://doi.org/10.1007/S00253-017-8470-7/FIGURES/7>
- Arocha-Garza, H. F., Castillo, R. C. Del, Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, 5(5).
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.3247>
- Atıcı, B., Ünlü, C. H., & Yanilmaz, M. (2022). A Review on Centrifugally Spun Fibers and Their Applications. *Polymer Reviews*, 62(1), 1–64.
<https://doi.org/10.1080/15583724.2021.1901115>
- Badrkhani, P. (2021). Pros and cons of Covid-19 in Iran: How Coronavirus outbreak has affected culture and living style of people of this ancient land. *Journal of Human Behavior in the Social Environment*, 31(1–4), 340–352.
<https://doi.org/10.1080/10911359.2020.1825261;SUBPAGE:STRING:ACCESS>
- Bajaj, I., & Singhal, R. (2011). Poly (glutamic acid)--an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 102(10), 5551–5561.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.02.047>
- Bezirhan Arikan, E., & Duygu Ozsoy, H. (2015). A Review: Investigation of Bioplastics. *Journal of Civil Engineering and Architecture*, 9, 188–192.
<https://doi.org/10.17265/1934-7359/2015.02.007>
- Bhagowati, P., Pradhan, S., Dash, H. R., & Das, S. (2015). Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(9), 1454–1463.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1034651>
- Blackwood, K. S., Turenne, C. Y., Harmsen, D., & Kabani, A. M. (2004). Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of *Bacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1626–1630. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1626-1630.2004>
- Boey, J. Y., Mohamad, L., Khok, Y. Sen, Tay, G. S., & Baidurah, S. (2021). A Review of the Applications and Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) and Its Composites. *Polymers*, 13(10), 1544.
<https://doi.org/10.3390/POLYM13101544>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808.
<https://doi.org/10.3144/EXPRESSPOLYMLETT.2014.82>
- Chang, Y. C., Reddy, M. V., Imura, K., Onodera, R., Kamada, N., & Sano, Y. (2021). Two-Stage Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Cheese Whey Using *Acetobacter pasteurianus* C1 and *Bacillus* sp. CYR1. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING8110157>
- Chaudhry, W. N., Jamil, N., Ali, I., Ayaz, M. H., & Hasnain, S. (2011). Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Annals of Microbiology*, 61(3), 623–629. <https://doi.org/10.1007/S13213-010-0181-6/FIGURES/7>
- Costa-Pinto, A., Santos, T. C., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2016). Testing Natural Biomaterials in Animal Models. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, 562–579. <https://doi.org/10.1002/9781119126218.CH30>

- Davaran, S., Rashidi, M. R., Khandaghi, R., & Hashemi, M. (2005). Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch. *Pharmacological Research*, 51(3), 233–237. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2004.08.006>
- Demisie, S., Oh, D. C., Abera, A., Tasew, G., Satessa, G. D., Fufa, F., Shenkutie, A. M., Wolday, D., & Tafess, K. (2024). Bioprospecting secondary metabolites with antimicrobial properties from soil bacteria in high-temperature ecosystems. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12934-024-02589-6/TABLES/7>
- Domínguez-Díaz, M., Cortés-Hernández, D. A., De la O-Baquera, E., & Dávila Medina, M. D. (2021). Photocatalytic degradation of methylene blue dye using poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol)/titanite films and membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(11). <https://doi.org/10.1002/APP.51805>
- Domínguez-Díaz, M., Cortés-Hernández, D. A., De la O-Baquera, E., & Dávila Medina, M. D. (2022). Photocatalytic degradation of methylene blue dye using poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol)/titanite films and membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(11), 51805. <https://doi.org/10.1002/APP.51805>
- Du, G., Chen, J., Yu, J., & Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*, 88(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00266-8)
- El-Kadi, S. M., Elbagory, M., El-Zawawy, H. A. H., El-Shaer, H. F. A., Shoukry, A. A., El-Nahrawy, S., Omara, A. E. D., & Ali, D. F. I. (2021). Biosynthesis of poly-β-hydroxybutyrate (Phb) from different bacterial strains grown on alternative cheap carbon sources. *Polymers*, 13(21), 3801. <https://doi.org/10.3390/POLYM13213801/S1>
- Evangeline, S., & Sridharan, T. B. (2019). Biosynthesis and statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 and fabrication of biopolymer films for sustained drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 945–958. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.05.163>
- Flores-Sánchez, A., López-Cuellar, M. D. R., Pérez-Guevara, F., Figueroa López, U., Martín-Bufájer, J. M., & Vergara-Porras, B. (2017). Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 Using Mexican Avocado (*Persea americana*) Oil as a Carbon Source. *International Journal of Polymer Science*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6942950>
- Francis, L., Meng, D., Knowles, J., Keshavarz, T., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2011). Controlled Delivery of Gentamicin Using Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4294. <https://doi.org/10.3390/IJMS12074294>
- Fuentes-Garibay, J. A., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Guerrero-Olazarán, M., & Viader-Salvadó, J. M. (2015). Tannase Sequence from a Xerophilic *Aspergillus niger* Strain and Production of the Enzyme in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 57(5), 439–447. <https://doi.org/10.1007/S12033-014-9836-Z/FIGURES/3>
- Gabriel, L. P., Rodrigues, A. A., Macedo, M., Jardini, A. L., & Maciel Filho, R. (2017). Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 72, 113–117. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.11.057>

- Giretová, M., Medvecký, Ľ., Demčišáková, Z., Luptáková, L., Petrovová, E., & Štulajterová, R. (2025). *Effect of agarose/gelatin gel addition on the pro-angiogenic potential of polyhydroxybutyrate/chitosan scaffolds*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1504268>
- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R. M., Zaharia, C., & Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 30(9), 695–712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>
- Gupta, A., Singh, H., & Aggarwal, A. (2011a). Taguchi-fuzzy multi output optimization (MOO) in high speed CNC turning of AISI P-20 tool steel. *Expert Systems with Applications*, 38(6), 6822–6828. <https://doi.org/10.1016/J.ESWA.2010.12.057>
- Gupta, A., Singh, H., & Aggarwal, A. (2011b). Taguchi-fuzzy multi output optimization (MOO) in high speed CNC turning of AISI P-20 tool steel. *Expert Systems with Applications*, 38(6), 6822–6828. <https://doi.org/10.1016/J.ESWA.2010.12.057>
- Gurieff, N., & Lant, P. (2007a). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technology*, 98(17), 3393–3403. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.10.046>
- Gurieff, N., & Lant, P. (2007b). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technology*, 98(17), 3393–3403. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.10.046>
- Hagagy, N., Saddiq, A. A., Tag, H. M., Selim, S., AbdElgawad, H., & Martínez-Espinosa, R. M. (2022). Characterization of Polyhydroxybutyrate, PHB, Synthesized by Newly Isolated Haloarchaea Halolamina spp. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217366>
- Hakovirta, J. R., Prezioso, S., Hodge, D., Pillai, S. P., & Weigel, L. M. (2016). Identification and Analysis of Informative Single Nucleotide Polymorphisms in 16S rRNA Gene Sequences of the Bacillus cereus Group. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(11), 2749–2756. <https://doi.org/10.1128/JCM.01267-16>
- Halami, P. M. (2008). Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate Bacillus cereus CFR06. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 805–812. <https://doi.org/10.1007/S11274-007-9543-Z/FIGURES/5>
- Hammami, M. A., Krifa, M., & Harzallah, O. (2014). Centrifugal force spinning of PA6 nanofibers – processability and morphology of solution-spun fibers. *The Journal of The Textile Institute*, 105(6), 637–647. <https://doi.org/10.1080/00405000.2013.842680>
- Han, X., Satoh, Y., Kuriki, Y., Seino, T., Fujita, S., Suda, T., Kobayashi, T., & Tajima, K. (2014). Polyhydroxyalkanoate production by a novel bacterium Massilia sp. UMI-21 isolated from seaweed, and molecular cloning of its polyhydroxyalkanoate synthase gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(5), 514–519. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2014.04.022>
- Heydari, P., Zargar Kharazi, A., & Shariati, L. (2024). Enhanced wound regeneration by PGS/PLA fiber dressing containing platelet-rich plasma: an in vitro study. *Scientific Reports 2024 14:1*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62855-w>
- Hong, S. G., Hsu, H. W., & Ye, M. T. (2013). Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *Journal of Thermal Analysis and*

- Calorimetry*, 111(2), 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/S10973-012-2503-3/FIGURES/10>
- Horton, A. A. (2022). Plastic pollution: When do we know enough? *Journal of Hazardous Materials*, 422. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126885>
- Hutanu, D. (2014). Recent Applications of Polyethylene Glycols (PEGs) and PEG Derivatives. *Modern Chemistry & Applications*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000132>
- Javaid, H., Nawaz, A., Riaz, N., Mukhtar, H., Ikram-Ul-haq, Shah, K. A., Khan, H., Naqvi, S. M., Shakoor, S., Rasool, A., Ullah, K., Manzoor, R., Kaleem, I., & Murtaza, G. (2020). Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by the Valorization of Biomass and Synthetic Waste. *Molecules*, 25(23), 5539. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235539>
- Kandhasamy, S., Perumal, S., Madhan, B., Umamaheswari, N., Banday, J. A., Perumal, P. T., & Santhanakrishnan, V. P. (2017). Synthesis and Fabrication of Collagen-Coated Ostholamide Electrospun Nanofiber Scaffold for Wound Healing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(10), 8556–8568. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B16488/SUPPL_FILE/AM6B16488_SI_001.PDF
- Karbasi, S., Khorasani, S., Ebrahimi, S., Khalili, S., Fekrat, F., & Sadeghi, D. (2016). Preparation and characterization of poly (hydroxy butyrate)/chitosan blend scaffolds for tissue engineering applications. *Advanced Biomedical Research*, 5(1), 177. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.188490>
- Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., & Dimpal Singh, G. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis to commercial production- A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(4), 1098–1106. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2017.6.4.1098-1106>
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2010.02.006>
- Kojuri, S. A., Issazadeh, K., Heshmatipour, Z., Mirpour, M., & Zarrabi, S. (2021). Production of Bioplastic (Polyhydroxybutyrate) with Local *Bacillus megaterium* Isolated from Petrochemical Wastewater. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(3), e2849. <https://doi.org/10.30498/IJB.2021.244756.2849>
- Koller, M. (2017). Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* 2017, Vol. 4, Page 88, 4(4), 88. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING4040088>
- Koller, M. (2018). Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020362>,
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 240–245. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2008.10.006>
- Kumar, P., Ray, S., & Kalia, V. C. (2016). Production of co-polymers of polyhydroxyalkanoates by regulating the hydrolysis of biowastes. *Bioresource Technology*, 200, 413–419. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.10.045>

- Lathwal, P., Nehra, K., Singh, M., Jamdagni, P., & Rana, J. S. (2015). Optimization of culture parameters for maximum polyhydroxybutyrate production by selected bacterial strains isolated from rhizospheric soils. *Polish Journal of Microbiology*, 64(3), 227–239. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0009.2118>
- Lee, S. M., Lee, H. J., Kim, S. H., Suh, M. J., Cho, J. Y., Ham, S., Jeon, J. M., Yoon, J. J., Bhatia, S. K., Gurav, R., Lee, E. Y., & Yang, Y. H. (2021). Screening of the strictly xylose-utilizing *Bacillus* sp. SM01 for polyhydroxybutyrate and its co-culture with *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 for enhanced production of PHB. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 410–417. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.149>
- Li, C.-S., Xu, Y., Li, J., Qin, S.-H., Huang, S.-W., Chen, X.-M., Luo, Y., Gao, C.-T., & Xiao, J.-H. (2025). Ultramodern natural and synthetic polymer hydrogel scaffolds for articular cartilage repair and regeneration. *BioMedical Engineering OnLine* 2025 24:1, 24(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S12938-025-01342-3>
- Li, Y., Chao Zou, ab, Shao, J., Xiangwu Zhang, ab, & Li, nan. (2017). *Preparation of SiO₂ /PS superhydrophobic fibers with bionic controllable micro-nano structure via centrifugal spinning*. <https://doi.org/10.1039/c6ra25813a>
- Li, Z., Mei, S., Dong, Y., She, F., & Kong, L. (2019). High Efficiency Fabrication of Chitosan Composite Nanofibers with Uniform Morphology via Centrifugal Spinning. *Polymers*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/POLYM11101550>
- López, J. A., Naranjo, J. M., Higueta, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 250–258. <https://doi.org/10.1007/S12257-011-0448-1/METRICS>
- Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 427–433. <https://doi.org/10.1292/JVMS.16-0572>
- Maity, S., Das, S., Mohapatra, S., Tripathi, A. D., Akthar, J., Pati, S., Pattnaik, S., & Samantaray, D. P. (2020). Growth associated polyhydroxybutyrate production by the novel *Zobellella tiwanensis* strain DD5 from banana peels under submerged fermentation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 461–469. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.004>
- Manikandan, N. A., Pakshirajan, K., & Pugazhenth, G. (2020). A closed-loop biorefinery approach for polyhydroxybutyrate (PHB) production using sugars from carob pods as the sole raw material and downstream processing using the co-product lignin. *Bioresource Technology*, 307. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123247>
- Markl, E. (2018). PHB - Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, 2(5). <https://doi.org/10.31031/NTNF.2018.02.000546>
- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Almaguer-Cantú, V., Rosas-Flores, W., Martínez-Gómez, V. J., Quintero-Zapata, I., Rivera, G., & Rutiaga-Quinones, O. M. (2020). Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 771–782. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.101>

- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Flores-Rodríguez, P., Almaguer-Cantú, V., Valencia-Vázquez, R., Rosas-Flores, W., Medrano-Roldán, H., Ochoa-Martínez, L. A., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2021). Utilization of Agave durangensis leaves by Bacillus cereus 4N for polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 199–208. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.01.167>
- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Rutiaga-Quiñones, O. M., de Luna-Santillana, E. de J., & Elufisan, T. O. (2023). A comprehensive view of Bacillus cereus as a polyhydroxyalkanoate (PHA) producer: A promising alternative to Petroplastics. *Process Biochemistry*, 129, 281–292. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2023.03.032>
- Mascarenhas, J., & Aruna, K. (2021). Production and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Obtained from Bacillus megaterium JHA. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 8(4), 346–360. <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.242493.1263>
- Masood, F., Abdul-Salam, M., Yasin, T., & Hameed, A. (2017). Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by Bacillus cereus FA11. *Biotech*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0712-Y/METRICS>
- Masood, F., Hasan, F., Ahmed, S., & Hameed, A. (2012). Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) from Bacillus cereus FA11 isolated from TNT-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1377–1384. <https://doi.org/10.1007/S13213-011-0386-3/FIGURES/5>
- Merchiers, J., Meurs, W., Deferme, W., Peeters, R., Buntinx, M., & Reddy, N. K. (2020). Influence of Polymer Concentration and Nozzle Material on Centrifugal Fiber Spinning. *Polymers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/POLYM12030575>
- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Ferreira, E. C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta*, 865(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.01.018>
- México Coyoacán, A., Xoco, C., Benito Juárez, D., & por Carla Becerril Cruz Hecho en México, F. (n.d.). *Versión electrónica 2015 Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas*. Retrieved May 23, 2025, from <http://www.cdi.gob.mxSepermitelareproduccióndeloscontenidos,sinfinesdelucro,sie mpreycuandosecitela fuente>.
- Mohammed, S., Behera, H. T., Dekebo, A., & Ray, L. (2020). Optimization of the culture conditions for production of Polyhydroxyalkanoate and its characterization from a new Bacillus cereus sp. BNPI-92 strain, isolated from plastic waste dumping yard. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1064–1080. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.11.138>
- Mohammed, S., & Ray, L. (2022). Polyhydroxyalkanoate recovery from newly screened Bacillus sp. LPPI-18 using various methods of extraction from Loktak Lake sediment sample. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S43141-022-00392-7/FIGURES/9>
- Mohan, V. R. (2013). Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental

- methodology. *Bioresource Technology*.
https://www.academia.edu/42984903/Optimization_of_critical_factors_to_enhance_polyhydroxyalkanoates_PHA_synthesis_by_mixed_culture_using_Taguchi_design_of_experimental_methodology
- Mohandas, S. P., Balan, L., Jayanath, G., Anoop, B. S., Philip, R., Cubelio, S. S., & Bright Singh, I. S. (2018). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 380–392. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.07.044>
- Mohanrasu, K., Rao, R. G. R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Prakash, G. S., Song, D. P., Muniyasamy, S., Pugazhendhi, A., Jeyakanthan, J., & Arun, A. (2020). Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117522>
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206–213. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2017.10.001>
- Mohapatra, S., Pattnaik, S., Maity, S., Sharma, S., Akhtar, J., Pati, S., Samantaray, D. P., & Varma, A. (2020). Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1242–1250. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.02.001>
- Mokhtarani, N., Ganjidoust, H., & Vasheghani Farahani, E. (2012). Effect of process variables on the production of Polyhydroxyalkanoates by activated sludge. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1735-2746-9-6>
- Moshood, T. D., Nawanir, G., Mahmud, F., Mohamad, F., Ahmad, M. H., AbdulGhani, A., & Kumar, S. (2022). Green product innovation: A means towards achieving global sustainable product within biodegradable plastic industry. *Journal of Cleaner Production*, 363, 132506. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.132506>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271–282. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.07.010>
- Muhammadi, Shabina, 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. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Mukheem, A., Muthoosamy, K., Manickam, S., Sudesh, K., Shahabuddin, S., Saidur, R., Akbar, N., & Sridewi, N. (2018). Fabrication and Characterization of an Electrospun PHA/Graphene Silver Nanocomposite Scaffold for Antibacterial Applications. *Materials*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/MA11091673>
- Mukheem, A., Shahabuddin, S., Akbar, N., Ahmad, I., Sudesh, K., & Sridewi, N. (2022). Development of Biocompatible Polyhydroxyalkanoate/Chitosan-Tungsten Disulphide Nanocomposite for Antibacterial and Biological Applications. *Polymers*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/POLYM14112224>

- Murugan, S., Duraisamy, S., Balakrishnan, S., Kumarasamy, A., & Raju, A. (2021). *Bioprocess optimization of PHB production utilizing agro (sago) waste as a sustainable substrate by the native isolate, Bacillus cereus*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-334519/V1>
- Muthuraj, R., Valerio, O., & Mekonnen, T. H. (2021). Recent developments in short- and medium-chain- length Polyhydroxyalkanoates: Production, properties, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 422–440. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.143>
- Nanehkaran, Y. A., Licai, Z., Azarafza, M., Talaei, S., Jinxia, X., Chen, J., & Derakhshani, R. (2023). The predictive model for COVID-19 pandemic plastic pollution by using deep learning method. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-023-31416-Y>,
- Napathorn, S. C. (2014). Biocompatibilities and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s produced by a model metabolic reaction-based system. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-014-0285-4>
- Nurul Fazita, M. R., Johary, N., Abdul Khalil, H. P. S., Norazli, N., Azniwati, A. A., & Mohamad Haafiz, M. K. (2021). Parameter Optimization via the Taguchi Method to Improve the Mechanical Properties of Bamboo Particle Reinforced Polylactic Acid Composites. *BioResources*, 16(1), 1914–1939. <https://doi.org/10.15376/BIORES.16.1.1914-1939>
- Olatunji, O. (2015). Natural polymers: Industry techniques and applications. *Natural Polymers: Industry Techniques and Applications*, 1–370. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1/COVER>
- Oliveira, F. C., Dias, M. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2007). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98(3), 633–638. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.02.022>
- Panith, N., Assavanig, A., Lertsiri, S., Bergkvist, M., Surarit, R., & Niamsiri, N. (2016). Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(42). <https://doi.org/10.1002/APP.44128>
- Pati, S., Maity, S., Dash, A., Jema, S., Mohapatra, S., Das, S., & Samantaray, D. P. (2020). Biocompatible PHB Production from *Bacillus* Species Under Submerged and Solid-State Fermentation and Extraction Through Different Downstream Processing. *Current Microbiology*, 77(7), 1203–1209. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-01922-7>
- Patyal, vishal. (2012). OPTIMIZING CHEMICAL PROCESS THROUGH ROBUST TAGUCHI DESIGN: A CASE STUDY. *International Journal of Mechanical Engineering and Technology*. https://www.academia.edu/2235896/OPTIMIZING_CHEMICAL_PROCESS_THROUGH_ROBUST_TAGUCHI_DESIGN_A_CASE_STUDY
- Perez-Amodio, S., Rubio, N., Vila, O. F., Navarro-Requena, C., Castaño, O., Sanchez-Ferrero, A., Marti-Munoz, J., Alsina-Giber, M., Blanco, J., & Engel, E. (2021). Polymeric Composite Dressings Containing Calcium-Releasing Nanoparticles

- Accelerate Wound Healing in Diabetic Mice. *Advances in Wound Care*, 10(6), 301–316. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2020.1206>
- Philip, S., Sengupta, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2009). Effect of impeller speed and pH on the production of poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, 10(4), 691–699. https://doi.org/10.1021/BM801395P/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BM-2008-01395P_0008.GIF
- Pirttijärvi, T. S. M., Andersson, M. A., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2000). Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00313-5)
- Porwal, S., Lal, S., Cheema, S., & Kalia, V. C. (2009). Phylogeny in Aid of the Present and Novel Microbial Lineages: Diversity in *Bacillus*. *PLOS ONE*, 4(2), e4438. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004438>
- Prakash, P., Lee, W. H., Ching-Yeelo, Wong, H. S. J., & Parumasivam, T. (2022). Advances in Polyhydroxyalkanoate Nanocarriers for Effective Drug Delivery: An Overview and Challenges. *Nanomaterials 2022, Vol. 12, Page 175*, 12(1), 175. <https://doi.org/10.3390/NANO12010175>
- Pryadko, A. S., Botvin, V. V., Mukhortova, Y. R., Pariy, I., Wagner, D. V., Laktionov, P. P., Chernonosova, V. S., Chelobanov, B. P., Chernozem, R. V., Surmeneva, M. A., Kholkin, A. L., & Surmenev, R. A. (2022). Core-Shell Magnetoactive PHB/Gelatin/Magnetite Composite Electrospun Scaffolds for Biomedical Applications. *Polymers*, 14(3), 529. <https://doi.org/10.3390/POLYM14030529/S1>
- Pulingam, T., Appaturi, J. N., Parumasivam, T., Ahmad, A., & Sudesh, K. (2022). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoate in Tissue Engineering. *Polymers*, 14(11), 2141. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112141>
- Puppi, D., Pecorini, G., & Chiellini, F. (2019). Biomedical Processing of Polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING6040108>
- Quintero-Silva, M. J., Suárez-Rodríguez, S. J., Gamboa-Suárez, M. A., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2024). Polyhydroxyalkanoates Production from Cacao Fruit Liquid Residues Using a Native *Bacillus megaterium* Strain: Preliminary Study. *Journal of Polymers and the Environment*, 32(3), 1289–1303. <https://doi.org/10.1007/S10924-023-03018-2/TABLES/5>
- Ramarao, M., King, M. F. L., Sivakumar, A., Manikandan, V., Vijayakumar, M., & Subbiah, R. (2021). Optimizing GMAW parameters to achieve high impact strength of the dissimilar weld joints using Taguchi approach. *Materials Today: Proceedings*, 50, 861–866. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.06.137>
- Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., Renard, E., Albanese, P., & Grande, D. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 38(1), 161–169. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.01.046>

- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45–56. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.10.001>
- Raziyan, M. S., Palevicius, A., Perkowski, D., Urbaite, S., & Janusas, G. (2024). Development and Evaluation of 3D-Printed PLA/PHA/PHB/HA Composite Scaffolds for Enhanced Tissue-Engineering Applications. *Journal of Composites Science* 2024, Vol. 8, Page 226, 8(6), 226. <https://doi.org/10.3390/JCS8060226>
- Rehman, Z. U., Ali, H. H., Akbar, A., Basheer, S., & Taj, M. K. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from soil bacterium (*Bacillus megaterium* TISTR 1814) with Cantaloupe waste extract as potential carbon source. *Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences*, 3(1), 6–11. <https://doi.org/10.31580/PJMLS.V3I1.1293>
- Reinecke, F., & Steinbüchel, A. (2008). *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 91–108. <https://doi.org/10.1159/000142897>
- Ren, Z. W., Wang, Z. Y., Ding, Y. W., Dao, J. W., Li, H. R., Ma, X., Yang, X. Y., Zhou, Z. Q., Liu, J. X., Mi, C. H., Gao, Z. C., Pei, H., & Wei, D. X. (2023). Polyhydroxyalkanoates: the natural biopolyester for future medical innovations. *Biomaterials Science*, 11(18), 6013–6034. <https://doi.org/10.1039/D3BM01043K>
- Rodríguez-Sepúlveda, L. J., & Orrego-Alzate, C. E. (2016). Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: Revisión bibliográfica - Applications of blends of biopolymers and synthetic polymers: Bibliographic review. *Revista Científica*, 2(25), 252. <https://doi.org/10.14483//UDISTRITAL.JOUR.RC.2016.25.A9>
- Rondošová, S., Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M., & Miertuš, S. (2022). Optimization of Growth Conditions to Enhance PHA Production by *Cupriavidus necator*. *Fermentation* 2022, Vol. 8, Page 451, 8(9), 451. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION8090451>
- Ruela, A. L. M., Figueiredo, E. C., & Pereira, G. R. (2014). Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. *Chemical Engineering Journal*, 248, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2013.12.106>
- Sachot, N., Castañ, O., Oliveira, H., Martí -Muñ Oz, J., Roguska, A., Amedee, J., Lewandowska, M., Planell, J. A., & Engel, E. (2016). A novel hybrid nanofibrous strategy to target progenitor cells for cost-effective in situ angiogenesis †. *J. Mater. Chem. B*, 4, 6967. <https://doi.org/10.1039/c6tb02162j>
- Sadat-Shojai, M. (2016). Electrospun Polyhydroxybutyrate/Hydroxyapatite Nanohybrids: Microstructure and Bone Cell Response. *Journal of Materials Science and Technology*, 32(10), 1013–1020. <https://doi.org/10.1016/J.JMST.2016.07.007>
- San Miguel-González, G. J., Alemán-Huerta, M. E., Martínez-Herrera, R. E., Quintero-Zapata, I., de la Torre-Zavala, S., Avilés-Arnaut, H., Gandarilla-Pacheco, F. L., & de Luna-Santillana, E. J. (2024). Alkaline-Tolerant *Bacillus cereus* 12GS: A Promising Polyhydroxybutyrate (PHB) Producer Isolated from the North of Mexico. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, Page 863, 12(5), 863. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12050863>
- Saratale, R. G., Cho, S. K., Kadam, A. A., Ghodake, G. S., Kumar, M., Bharagava, R. N., Varjani, S., Nair, S., Kim, D. S., Shin, H. S., & Saratale, G. D. (2022). Developing Microbial Co-Culture System for Enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA)

- Production Using Acid Pretreated Lignocellulosic Biomass. *Polymers*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM14040726>
- Sathya, A. B., Sivasubramanian, V., Santhiagu, A., Sebastian, C., & Sivashankar, R. (2018). Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3995–4012. <https://doi.org/10.1007/S10924-018-1259-7/TABLES/4>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.011>
- Singh, M., Patel, S. K. S., & Kalia, V. C. (2009a). Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-38/TABLES/2>
- Singh, M., Patel, S. K. S., & Kalia, V. C. (2009b). Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-38/TABLES/2>
- Smith, J., & Rai, V. (2024). Novel Factors Regulating Proliferation, Migration, and Differentiation of Fibroblasts, Keratinocytes, and Vascular Smooth Muscle Cells during Wound Healing. *Biomedicines 2024, Vol. 12, Page 1939*, 12(9), 1939. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES12091939>
- Tekin, E., Ateş, M., & Kahraman, Ö. (2012). Poly-3-hydroxybutyrate-producing extreme halophilic archaeon: Haloferax sp. MA10 isolated from Çamaltı Saltern, İzmir. *Turkish Journal of Biology*, 36(3), 303–312. <https://doi.org/10.3906/biy-1102-16>
- Thammasittirong, A., Saechow, S., & Thammasittirong, S. N. R. (2017). Efficient polyhydroxybutyrate production from Bacillus thuringiensis using sugarcane juice substrate. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 992–1002. <https://doi.org/10.3906/biy-1704-13>
- Thapa¹, C., Shakya¹, P., Shrestha¹, R., Pal¹, S., & Manandhar², P. (2018). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 62–68. <https://doi.org/10.3126/NJB.V6I1.22339>
- Thirumala, M., Krishna, E. S., Priya, P. S., & Reddy, S. V. (2022). Isolation and Characterization of Two PHA Producing Strains Isolated from Soil Sample of Nalgonda District. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4), 2738–2746. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.44>
- Thirumala, M., Reddy, S. V., & Mahmood, S. K. (2010). Production and characterization of PHB from two novel strains of Bacillus spp. isolated from soil and activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(3), 271–278. <https://doi.org/10.1007/S10295-009-0670-4>
- Top Polyhydroxyalkanoate (PHA) Companies in Global 2025 | Global Growth Insights. (n.d.). Retrieved May 23, 2025, from <https://www.globalgrowthinsights.com/blog/top-polyhydroxyalkanoate-pha-companies-in-global-2025-global-growth-insights-664>
- Trego, A., Palmeiro-Sánchez, T., Graham, A., Ijaz, U. Z., & O’Flaherty, V. (2024). First evidence for temperature’s influence on the enrichment, assembly, and activity of polyhydroxyalkanoate-synthesizing mixed microbial communities. *Frontiers in*

- Tsuge, T. (2016). Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal* 48:11, 48(11), 1051–1057. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.78>
- Valappil, S. P., Rai, R., Bucke, C., & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1624–1635. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2007.03678.X>
- Vanheusden, C., Vanminsel, J., Reddy, N., Samyn, P., D’Haen, J., Peeters, R., Ethirajan, A., & Buntinx, M. (2023). Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Fibers Using Centrifugal Fiber Spinning: Structure, Properties and Application Potential. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 1181, 15(5), 1181. <https://doi.org/10.3390/POLYM15051181>
- Van-Thuoc, D., Huu-Phong, T., Thi-Binh, N., Thi-Tho, N., Minh-Lam, D., & Quillaguamán, J. (2012). Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *MicrobiologyOpen*, 1(4), 395–406. <https://doi.org/10.1002/MBO3.44>
- Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., & Mahmood, S. K. (2009). Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 391–397. <https://doi.org/10.1007/S11274-008-9903-3/FIGURES/5>
- Vu, D. H., Wainaina, S., Taherzadeh, M. J., Åkesson, D., & Ferreira, J. A. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids. *Bioengineered*, 12(1), 2480–2498. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1935524>
- Wang, Y., Chung, A., & Chen, G. Q. (2017). Synthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymers, Random Copolymers, and Block Copolymers by an Engineered Strain of *Pseudomonas entomophila*. *Advanced Healthcare Materials*, 6(7). <https://doi.org/10.1002/ADHM.201601017>,
- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M., & Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1–3), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00022-7)
- Wu, C. T., Chen, P. Y., Chen, J. G., Suryanarayanan, V., & Ho, K. C. (2009). Detection of nicotine based on molecularly imprinted TiO₂-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 633(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.11.038>
- Xiao, Z., Liao, X., Long, Z., & Li, M. (2017). Effect of cutting parameters on surface roughness using orthogonal array in hard turning of AISI 1045 steel with YT5 tool. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 93(1–4), 273–282. <https://doi.org/10.1007/S00170-016-8933-5/METRICS>
- Yadav, J., Balabantaray, S., & Patra, N. (2017). Statistical optimization of fermentation conditions for the improved production of poly-β-hydroxybutyrate from *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Communications*, 204(10), 1122–1128. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1347094>

- Yasin, A. R., & Al-Mayaly, I. (2021). *Study of the Fermentation Conditions of the Bacillus Cereus Strain ARY73 to Produce Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Glucose*.
- Ye, C., Hu, P., Ma, M. X., Xiang, Y., Liu, R. G., & Shang, X. W. (2009). PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30(26), 4401–4406. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.05.001>
- Zamanifard, M., Khorasani, M. T., Daliri, M., & Parvazinia, M. (2020a). Preparation and modeling of electrospun polyhydroxybutyrate/polyaniline composite scaffold modified by plasma and printed by an inkjet method and its cellular study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(12), 1515–1537. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1764162>
- Zamanifard, M., Khorasani, M. T., Daliri, M., & Parvazinia, M. (2020b). Preparation and modeling of electrospun polyhydroxybutyrate/polyaniline composite scaffold modified by plasma and printed by an inkjet method and its cellular study. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 31(12), 1515–1537. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1764162>
- Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., & Chen, G. Q. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 86, 144–150. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.12.035>

20. RESUMEN BIOGRÁFICO

Gustavo de Jesus San Miguel Gonzalez

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Biotecnología

Tesis: Estudio de bacterias del género *Bacillus* productoras de biopolímeros microbianos (PHA) y su potencial aplicabilidad biomédica

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en Monclova, Coahuila, México el 28 de abril de 1998, hijo de Nancy Mireya González Delgado y Raúl Gustavo San Miguel Padilla

Educación: Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido Químico Farmacobiólogo en 2021 mediante la presentación de Tesis: Evaluación de los parámetros que influyen en la producción de pigmentos por *Streptomyces* sp. utilizando fermentación sumergida.

21. PRODUCTOS GENERADOS

Artículos de investigación

San Miguel-González, G. J., Alemán-Huerta, M. E., Martínez-Herrera, R. E., Quintero-Zapata, I., de la Torre-Zavala, S., Avilés-Arnaut, H., Gandarilla-Pacheco, F. L., & de Luna-Santillana, E. J. (2024). Alkaline-Tolerant *Bacillus cereus* 12GS: A Promising Polyhydroxybutyrate (PHB) Producer Isolated from the North of Mexico. *Microorganisms*, 12(5), 863. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050863>



microorganisms



Article

Alkaline-Tolerant *Bacillus cereus* 12GS: A Promising Polyhydroxybutyrate (PHB) Producer Isolated from the North of Mexico

Gustavo de J. San Miguel-González ^{1,*}, María E. Alemán-Huerta ^{1,*}, Raul E. Martínez-Herrera ^{2,3,*}, Isela Quintero-Zapata ¹, Susana de la Torre-Zavala ¹, Hamlet Avilés-Arnaut ¹, Fátima L. Gandarilla-Pacheco ¹ and Erick de J. de Luna-Santillana ⁴

- ¹ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, San Nicolás de los Garza C.P. 66455, Nuevo León, Mexico; gustavo.sanmiguelg@uanl.edu.mx (G.d.J.S.M.-G.); isela.quintero@uanl.edu.mx (I.Q.-Z.); susana.delatorrez@uanl.edu.mx (S.d.L.T.-Z.); hamlet.avilesarn@uanl.edu.mx (H.A.-A.); fatima.gandarillap@uanl.edu.mx (F.L.G.-P)
 - ² Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, Monterrey C.P. 64849, Nuevo León, Mexico
 - ³ Institute of Advanced Materials for Sustainable Manufacturing, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, Monterrey C.P. 64849, Nuevo León, Mexico
 - ⁴ Laboratorio Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del Maestro esq. Elías Piña, Colonia Narciso Mendoza, Reynosa C.P. 88700, Tamaulipas, Mexico; edeluna@ipn.mx
- * Correspondence: maria.alemanhr@uanl.edu.mx (M.E.A.-H.); raul.martinezhr@tec.mx (R.E.M.-H.)



Citation: San Miguel-González, G.d.J.; Alemán-Huerta, M.E.; Martínez-Herrera, R.E.; Quintero-Zapata, I.; de la Torre-Zavala, S.; Avilés-Arnaut, H.; Gandarilla-Pacheco, F.L.; de Luna-Santillana, E.J. Alkaline-Tolerant *Bacillus cereus* 12GS: A Promising Polyhydroxybutyrate (PHB) Producer Isolated from the North of Mexico. *Microorganisms* 2024, 12, 863. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050863>

Academic Editors: Alejandro Chamizo-Ampudia, Silvia González-Rojo and Maurizio Ciani

Received: 21 March 2024

Revised: 16 April 2024

Accepted: 24 April 2024

Published: 26 April 2024

Abstract: Environmental pollution caused by petroleum-derived plastics continues to increase annually. Consequently, current research is interested in the search for eco-friendly bacterial polymers. The importance of *Bacillus* bacteria as producers of polyhydroxyalkanoates (PHAs) has been recognized because of their physiological and genetic qualities. In this study, twenty strains of *Bacillus* genus PHA producers were isolated. Production was initially evaluated qualitatively to screen the strains, and subsequently, the strain B12 or *Bacillus* sp. 12GS, with the highest production, was selected through liquid fermentation. Biochemical and molecular identification revealed it as a novel isolate of *Bacillus cereus*. Production optimization was carried out using the Taguchi methodology, determining the optimal parameters as 30 °C, pH 8, 150 rpm, and 4% inoculum, resulting in 87% and 1.91 g/L of polyhydroxybutyrate (PHB). Kinetic studies demonstrated a higher production within 48 h. The produced biopolymer was analyzed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), confirming the production of short-chain-length (scl) polyhydroxyalkanoate, named PHB, and differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed thermal properties, making it a promising material for various applications. The novel *B. cereus* isolate exhibited a high %PHB, emphasizing the importance of bioprospecting, study, and characterization for strains with biotechnological potential.

Keywords: *Bacillus cereus*; fermentations; isolation; polyhydroxybutyrate; Taguchi design

Microorganisms

ISSN: 2076-2607 Impact Factor: 4.1 CiteScore: 7.4

Index: Scopus, SCIE (Web of Science), PubMed, PMC, PubAg, CAPlus / SciFinder, AGRIS.

SAN MIGUEL GONZALEZ, G. D. J., MARIA ELIZABETH, Martínez Herrera, R. E., DE LA TORRE ZAVALA, S., QUINTERO ZAPATA, I., & SILVA ORTIZ , T. C. (2024). ESTUDIO DE BACTERIAS HALÓFILAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMATERIALES TIPO POLIHIDROXIALCANOATOS. Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability, 8(1), 75-82. <https://doi.org/10.19136/jeeos.a8n1.6059>



Journal of Energy, Engineering,
Optimization and Sustainability

San Miguel-González G.¹
Vol.8 Num 1: 2024 pág. 75-82

ESTUDIO DE BACTERIAS HALÓFILAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMATERIALES TIPO POLIHIDROXIALCANOATOS

STUDY OF HALOPHILIC BACTERIA FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE TYPE BIOMATERIALS

San Miguel-González G.¹, Alemán-Huerta M.E.^{1*}, Silva-Ortiz T. C. ¹, De La Torre-Zavala S.¹,
Quintero- Zapata I.¹, Martínez-Herrera R.E.²

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, México

²Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, México

*maria.alemanhr@uanl.edu.mx

Artículo Científico

Publicado: 30 abril 2024

Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability

ISSN: 2448-8186

Indizada: LATINDEX.

Artículos de divulgación

San Miguel González, G. de J., Alemán Huerta, M. E., Ramírez Sánchez, G. B., & Navarro Díaz, D. P. (2024). *Bacillus*: Una bacteria versátil, multifuncional y ampliamente aplicada. *Biología Y Sociedad*, 7(13), 73–81. <https://doi.org/10.29105/bys7.13-108>



Biología y sociedad

ISSN: 2992-6939

Luna Almaraz, A. G., Martínez Herrera, R. E., & San Miguel González, G. de J. (2024). Fenómenos paranormales y su acercamiento científico: cuatro ejemplos históricos y su impacto en la sociedad. *Biología Y Sociedad*, 7(14), 18–25. <https://doi.org/10.29105/bys7.14-128>

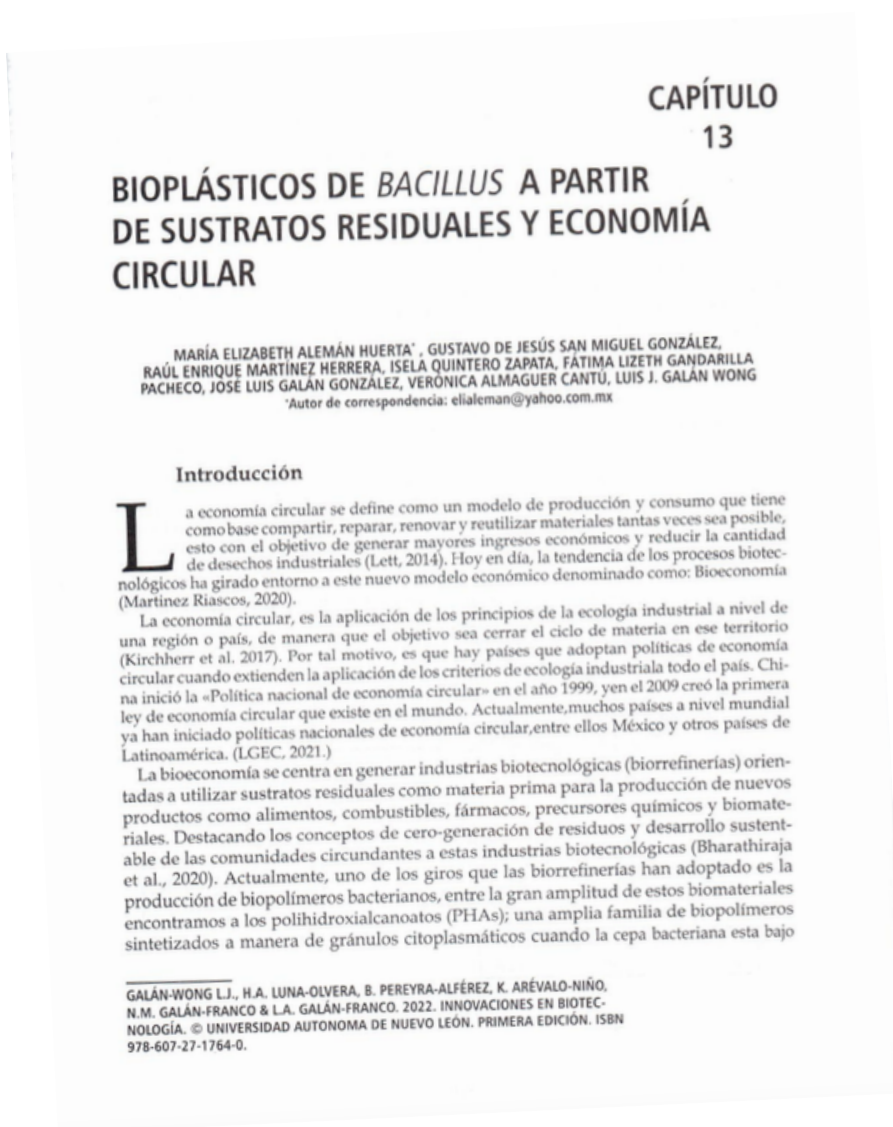


Biología y sociedad

ISSN: 2992-6939

Capítulo de libro

GALÁN-WONG L.J., H.A. LUNA-OLVERA, B. PEREYRA-ALFÉREZ, K. ARÉVALO-NIÑO, N.M. GALÁN-FRANCO & L.A. GALÁN-FRANCO. 2022. INNOVACIONES EN BIOTECNOLOGÍA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. PRIMERA EDICIÓN. ISBN 978-607-27-1764-0



Asesoramiento de tesis de licenciatura

RC-07-026
REV.0-09/06

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



IMPORTANCIA DE PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS EN EL RENDIMIENTO DE
LA BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA
GLENDA BERENICE RAMIREZ CHARLES

San Nicolás de los Garza, N. L.

Abril de 2025

Título: “Importancia de parámetros físicos y químicos en el rendimiento de la biosíntesis de Polihidroxialcanoatos (PHAs)”

Estudiante: QBP. Glenda Berenice Ramirez Charles

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



TECNICAS DE TINCION DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS
(PHAs) Y SU RELACION CON PARAMETROS CINETICOS

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA
VALERIA GISEH MARTINEZ CANTU

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

24 NOVIEMBRE DE 2023

Título: “Técnicas de tinción de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) y su relación con parámetros cinéticos”

Estudiante: Valeria Giseh Martinez Cantu

RC-07-026
REV.0-09/06

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



AGRORESIDUOS DE BEBIDAS ARTESANALES REGIONALES Y ESTUDIO DE
SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA
MELENNIE AIME TORRES SÁNCHEZ

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.

ENERO 2023

Título: “Agroresiduos de bebidas artesanales regionales y estudio de su uso en la producción de biopolímeros microbianos”

Estudiante: Biól. Melennie Aime Torres Sanchez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



PROYECTO DE TESIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO
DE: QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

KARLA BRIGITTE RANGEL IBARRA

TÍTULO:

“MEDIOS DE CULTIVO SUPLEMENTADOS CON DOS TIPOS DE MIEL PARA
LA PRODUCCION DE POLÍMEROS BACTERIANOS (PHAs)”

DIRECTOR: Dra. María Elizabeth Alemán Huerta

San Nicolás de los Garza, N.L. Junio 2022

Título: “Medios de cultivo suplementados con dos tipos de miel para la producción de polímeros bacterianos (PHAs)”

Estudiante: QBP. Karla Brigitte Rangel Ibarra

Asistencia y participación en congresos



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Efecto de dos medios de cultivo convencionales en la producción y rendimiento de biomateriales bacterianos producidos por una cepa nativa” en el **1º Congreso Estatal Queretano de Materiales** llevado a cabo en la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro Abril de 2022.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Bioprospección y técnicas de microscopía en la selección de cepas bacterianas productoras de biomateriales tipo PHA” en el **1º Congreso Estatal Queretano de Materiales** llevado a cabo en la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro, México en Abril de 2022.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Effect of the carbon source on the yield and physicochemical analysis of PHA – type microbial biofilms produced by a strain of the genus *Bacillus*” en el **3º Biotechnology World Symposium** llevado a cabo en Mazatlán, Sinaloa, México en Octubre 2022.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: "Evaluation of the production of microbial biopolymers PHA – type from strains of the genus *Bacillus*" en el **3º Biotechnology World Symposium** llevado a cabo en Mazatlán, Sinaloa, México en Octubre 2022.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: "Evaluación de las condiciones del hilado de membranas obtenidas por extractos poliméricos tipo PHA" en el **1º Congreso Internacional de Polímeros y Alimentos** llevado a cabo en Popayán, Colombia en Marzo 2023.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: "Aprovechamiento de un residuo agroindustrial (Mosto de cerveza artesanal) para la producción de biopolímeros microbianos" en **1º Congreso Internacional de Polímeros y Alimentos** llevado a cabo en Popayán, Colombia en Marzo 2023.





Asistencia y participación como ponente (presentación oral) del trabajo titulado: “Estudio de bacterias halófilas para la producción de biomateriales tipo PHA” en el **2º Foro nacional de divulgación de la ingeniería química y su relación con otras áreas** llevado a cabo en Cunduacán, Tabasco, México en Octubre 2023.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Efecto del tiempo de fermentación en la producción de polihidroxialcanoatos y su relación con la tinción negro sudán” en el **X Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI** llevado a cabo en Tlaxcala, México en Diciembre 2023.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: ‘Uso de agroresiduos en la producción de biomateriales tipo polihidroxialcanoatos por una cepa bacteriana halófila’ en el **X Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI** llevado a cabo en Tlaxcala, México en Diciembre 2023.

Asistencia y participación como ponente (ponencia oral) del trabajo titulado: ‘Study and optimization of microbial bioplastics by a Bacillus strain using a Taguchi method’ en el **4to Bio IberoAmerica IberoAmerican Congress on Biotechnology** llevado acabo en San Nicolás de los Garza en Septiembre 2024.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: ‘Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by Bacillus cereus 12GS for applications in regenerative therapies’ en el **17th IBEC Symposium “Bioingeeniring for emergent and advances therapies”** llevado acabo en Barcelona, España en Octubre 2024.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: ‘Influencia del pH del medio de fermentación en la producción de biopolímeros a partir de una bacteria halófila’ en el **XI Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI** llevado acabo en Tlaxcala, México en Diciembre 2024.





Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: ‘Efecto de la salinidad en la producción de biopolímeros a nivel matraz’ en el **XI Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI** llevado a cabo en Tlaxcala, México en Diciembre 2024.

Memorias electrónicas

Memorias electrónicas publicadas en Mexican Journal of Biotechnology (2022) ISSN: 2448-6590



Mexican Journal of Biotechnology 2022, 7(4): 97

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com

ISSN:2448-6590

Effect of the carbon source on the yield and physicochemical analysis of PHA - type microbial biofilms produced by a strain of the genus *Bacillus*

Efecto de la fuente de carbono sobre el rendimiento y análisis fisicoquímico de bioplásticos microbianos tipo PHA producidos por una cepa del género *Bacillus*

Gustavo de J. San Miguel-González¹, María E. Alemán-Huerta^{1*}, Fatima L. Gandarilla-Pacheco¹, Raúl E. Martínez-Herrera²

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

²Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, México

*Corresponding author

*Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx



Mexican Journal of Biotechnology 2022, 7(4): 98

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com

ISSN:2448-6590

Evaluation of the production of microbial biopolymers PHA - type from strains of the genus *Bacillus*

Evaluación de la producción de biopolímeros microbianos tipo PHA a partir de cepas del género *Bacillus*

Gustavo de J. San Miguel-González¹, María E. Alemán-Huerta^{1*}, Isela Quintero-Zapata¹, Erick de J. de Luna-Santillana²

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, México

*Corresponding author

*Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx

Memorias electrónicas publicadas en Innovación como eje para el desarrollo (2023) ISBN: 978-958-5493-98-8

32. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL HILADO DE MEMBRANAS OBTENIDAS POR EXTRACTOS POLIMERICOS TIPO PHA

San Miguel-González Gustavo¹, Alemán-Huerta María E.^{1*}, Domínguez-Díaz Maraolína, Escorcia-García José², Martínez-Herrera Raúl E.³, Quintero-Zapata Isela¹, Gandarilla-Pacheco Fátima L.¹, De Luna-Santillana Erick⁴

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

² Departamento de Ingeniería Cerámica, CINVESTAV Saltillo, México

³ Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, México

⁴ Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México

(*) Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx

36. APROVECHAMIENTO DE UN RESIDUO AGROINDUSTRIAL (MOSTO DE CERVEZA ARTESANAL) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS

Torres-Sánchez Melennie A.¹, Alemán-Huerta María E.^{1*}, San Miguel-González Gustavo¹, Quintero-Zapata Isela¹, Gandarilla-Pacheco Fátima L.¹, Elías-Santos Myriam¹

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

(*) Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx

Memorias electrónicas publicadas en Mexican Journal of Biotechnology (2023) ISSN:
2448-6590



Mexican Journal of Biotechnology 2024, 9(1):96

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com

SOCIEDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL DE
BIOTECNÓLOGOS A. C. (SOCIBI)

ISSN:2448-6590



Fermentation time effect in the polyhydroxyalkanoates production, and its relation with Sudan black staining

Efecto del tiempo de fermentación en la producción de polihidroxialcanoatos y su relación con la tinción negro Sudán

Valeria G. Martínez-Cantú¹, María E. Alemán-Huerta^{1*}, Gustavo de J. San Miguel-González¹, Isela Quintero-Zapata¹.

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

*Corresponding author

Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx



Use of agrowaste in the production of polyhydroxyalkanoate-type biomaterials by a halophilic bacterial strain

Uso de agroresiduos en la producción de biomateriales tipo polihidroxialcanoatos por una cepa bacteriana halófila

Valeria G. Martínez-Cantu¹, Gustavo de J. San Miguel-González¹, de la Torre-Zavala Susana¹, María E. Alemán-Huerta^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

*Corresponding author: Email: maria.alemanhr@uanl.edu.mx

Memoria electrónica publicada del 4to Ibero-American congress on Biotechnology



Environmental Biotechnology

Study and optimization of microbial bioplastics by a *Bacillus* strain using Taguchi method

Ramírez-Charles, G.B.^{1*}, San Miguel-González, G.J.¹, Alemán-Huerta, M.E.¹, Martínez-Herrera R.E.^{2,3}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, C. P. 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

²Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, C.P. 64849, Monterrey, Nuevo León, México

³Tecnológico de Monterrey, Institute of Advanced Materials for Sustainable Manufacturing, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, C.P. 64849, Monterrey, Nuevo León, México

*E mail: glenda.ramirezch@uanl.edu.mx

Memoria electrónica publicada del 17th IBEC symposium (Bioengineering for emergent and advanced therapies)

INSTITUTE FOR BIOENGINEERING OF CATALONIA (IBEC)
17th IBEC SYMPOSIUM - BIOENGINEERING FOR EMERGENT AND ADVANCED THERAPIES

POSTERS

MECHANOBIOLOGY

POSTER 21 presented by:

NAME: Gustavo San Miguel

GROUP: Biomaterials for regenerative therapies

INSTITUTION: Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)

Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* 12GS for applications in regenerative therapies

Gustavo de Jesus San Miguel Gonzalez^{1,2}, Elisabeth Engel López², Oscar Castaño Linares², María Elizabeth Alemán Huerta¹, Isela Quintero Zapata¹, Raúl Enrique Martínez Herrera^{1,3,4}

¹ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, San Nicolás de los Garza C.P. 66455, Nuevo León, Mexico

² Biomaterials for Regenerative Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona

Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain

³ Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, Monterrey C.P. 64849, Nuevo León, Mexico

⁴ Institute of Advanced Materials for Sustainable Manufacturing, Tecnológico de Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, Monterrey C.P. 64849, Nuevo León, Mexico