

Evaluación de pectina como fuente de carbono aprovechable para la producción microbiana de bioplásticos tipo polihidroxialcanoatos (PHAs)

Ana Gabriela Báez Beltrán

Trabajo de Grado para optar al título de Química

Director

Dr. William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A mis padres, mi mayor inspiración y mi ejemplo a seguir. Gracias por creer en mí siempre y por su amor incondicional.

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al doctor William Hidalgo, mi director de tesis, por su invaluable guía, paciencia y conocimientos. Sus enseñanzas han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Asimismo, agradezco a la Universidad Industrial de Santander por brindarme las facilidades y recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. La infraestructura, los laboratorios y el acceso a la bibliografía especializada han sido elementos clave para el éxito de este proyecto.

A mis padres, Ana Beltrán y Wilson Báez, por su apoyo incondicional, amor y confianza en mí a lo largo de todos estos años. Gracias por siempre creer en mí y motivarme a alcanzar mis metas. A mis amigas Elizabeth G. y Paula B., por las risas, por los consejos, por alentarme en los momentos difíciles. A mis compañeros de laboratorio, por hacer más divertida cada jornada de trabajo, por animarme y compartir conmigo momentos inolvidables. A Pennywise y Gris, por ser mi compañía en las largas horas de estudio, por dormirse sobre los libros y cuadernos, gracias por sus travesuras y ronroneos. A mi amor Carlos Linares, por su apoyo y amor durante toda la carrera, gracias por celebrar mis logros y por estar siempre a mi lado.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	16
1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo general.....	18
1.2 Objetivos específicos	18
2. Marco teórico.....	19
2.1 Plásticos sintéticos.....	19
2.2 Biopolímeros	20
2.3 Polihidroxicanoatos.....	20
2.4 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los polihidroxicanoatos	22
2.5 Biosíntesis de PHA.....	25
2.6 Microorganismos productores de PHA	29
2.6.1 Arqueas.....	29
2.6.2 Bacterias Gram-negativas	30
2.6.3 Bacterias Gram-positivas	30
2.6.3.1 <i>Bacillus cereus</i>	30
2.6.3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
2.7 Biodegradación de PHA	32
2.8 Comparación de la vida útil del PHA y los plásticos convencionales	33
2.9 Aplicaciones biomédicas de los PHA.....	35
2.9.1 Ingeniería de tejido blando	35
2.9.2 Ingeniería de tejidos duros	36
2.9.3 Administración de fármacos	36

2.9.4 Dispositivos médicos	37
2.10 Fuentes de carbono utilizadas en la biosíntesis de PHA	37
2.10.1 Carbohidratos	38
2.10.2 Triacilglicerolos	38
2.10.3 Hidrocarburos	39
2.11 Pectina	40
2.12 Degradación microbiana de la pectina	41
2.12.1 Producción de pectinasas por hongos	42
2.12.2 Producción de pectinasas en levaduras	42
2.12.3 Producción bacteriana de pectinasas	42
3. Estado del Arte	43
4. Metodología	48
4.1 Etapa 1: Determinación de la tasa de degradación de pectina por parte de los microorganismos <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i>	49
4.1.1 Preparación de medios de cultivos sólidos para el crecimiento de los microorganismos ...	49
4.1.2 Evaluación semicuantitativa de la actividad pectinolítica	49
4.1.3 Preparación del inóculo para los experimentos de fermentación	50
4.1.4 Curva de crecimiento de los microorganismos utilizando glucosa y pectina como fuente de carbono	51
4.1.5 Monitoreo de la degradación de pectina	52
4.1.6 Cuantificación de azúcares reductores	52
4.1.7 Cuantificación de proteínas	53
4.2 Etapa 2: Comparación del rendimiento en la producción de PHA bajo condiciones óptimas de fermentación utilizando pectina como fuente de carbono para las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i>	54

4.2.1 Optimización clásica de un factor a la vez de las condiciones de fermentación: Diseño de Plackett-Burman.....	54
4.2.1.1 Efecto de la concentración de pectina.....	54
4.2.1.2 Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno.....	54
4.2.1.3 Efecto del pH	55
4.2.1.4 Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo.....	55
4.2.1.5 Efecto de la temperatura de incubación.....	55
4.2.2 Determinación de la biomasa seca	55
4.3 Etapa 3: Cuantificación, identificación y caracterización del tipo de monómero del PHA obtenido como producto de la fermentación microbiana	56
4.3.1 Cuantificación y extracción del PHA producido por el aislado bacteriano.....	56
4.3.1.1 Análisis estadístico	57
4.3.2 Determinación del punto de fusión del PHA obtenido.....	58
4.3.3 Caracterización del biopolímero mediante FTIR.....	58
4.3.4 Caracterización del biopolímero mediante GC/MS.....	58
4.3.5 Análisis por resonancia magnética nuclear	60
5. Resultados y discusión.....	60
5.1 Etapa 1: Determinación de la tasa de degradación de pectina por parte de los microorganismos <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i>	60
5.1.1 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática	60
5.1.2 Análisis del crecimiento con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria	61
5.1.3 Monitoreo de la degradación de pectina	64
5.1.4 Cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo	65
5.1.5 Cuantificación de proteínas en el medio de cultivo.....	66

5.2 Etapa 2: Optimización clásica de un factor a la vez de las condiciones de fermentación para las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i> : Diseño de Plackett-Burman	68
5.2.1 Efecto de la concentración de pectina como fuente de carbono	68
5.2.2 Efecto de la glucosa como fuente de carbono complementaria	71
5.2.3 Efecto de la fuente de nitrógeno	72
5.2.4 Efecto del pH inicial	77
5.2.5 Efecto de la concentración del fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).....	79
5.2.6 Efecto de la concentración del fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).....	81
5.2.7 Efecto de la temperatura de incubación	83
5.2.8 Verificación de las condiciones de cultivo optimizadas	85
5.3 Etapa 3: Identificación y caracterización del tipo de monómero del PHA obtenido como producto de la fermentación microbiana.....	88
5.3.1 Caracterización mediante análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	88
5.3.2 Temperatura de fusión del polímero.....	89
5.3.3 Caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN)	90
5.3.4 Caracterización mediante análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).....	95
6. Conclusiones.....	100
Bibliografía	101
Apéndices.....	125

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura y nomenclatura de los polihidroxicanoatos.....	21
Figura 2. Vías biosintéticas de PHA.	26
Figura 3. Representación simplificada de la degradación extracelular de PHA en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.....	33
Figura 4. Vía metabólica simplificada que describen la producción de TAG y PHA a partir de lípidos en cultivos microbianos	39
Figura 5. Estructura química de la molécula de pectina.	40
Figura 6. Tendencia creciente en las publicaciones que involucran el género <i>Bacillus</i> como productor de polihidroxicanoatos (PHA).....	46
Figura 7. Halo de degradación de pectina formado por las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus cereus</i>	61
Figura 8. (A) Curva de crecimiento bacteriano y degradación de pectina durante la fermentación para la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> , en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria: Glucosa y pectina (GP), solo pectina (P). (B) Degradación de pectina y cuantificación de azúcares reductores en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria.	62
Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano y degradación de pectina durante la fermentación para la bacteria <i>Bacillus cereus</i> , en el medio de cultivo mínimo de sales con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria.	63
Figura 10. Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> . 67	
Figura 11. Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria <i>Bacillus cereus</i> . ..	68
Figura 12. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> , con 10 y 20 g/L de pectina como fuente de carbono.	68
Figura 13. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA con 10 y 20 g/L de pectina para la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	69

- Figura 14. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus* con 10 y 20 g/L de pectina como fuente de carbono. 70
- Figura 15. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria para la bacteria *Bacillus thuringiensis*. 71
- Figura 16. Curva de crecimiento bacteriano para *Bacillus thuringiensis* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (YE)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (AS)* y la combinación *extracto de levadura más sulfato de amonio (YE + AS)*. 73
- Figura 17. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (YE)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (AS)*. 74
- Figura 18. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis* con extracto de levadura como fuente de nitrógeno en concentraciones de 0,2% p/v; 0,4% p/v y 0,6% p/v. 75
- Figura 19. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con extracto de levadura como fuente de nitrógeno en concentraciones de: 0,2% p/v; 0,4% p/v y 0,6% p/v. 76
- Figura 20. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (EL)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (SA)*. 77
- Figura 21. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferente pH: *ácido (6)*, *neutro (7)* y *básico (8)*. 78
- Figura 22. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con pH *ácido (6)*, *neutro (7)* y *básico (8)*. 79
- Figura 23. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 : 7 g/L, 4,6 g/L y 2,2 g/L. 79
- Figura 24. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 : 7 g/L, 4,6 g/L y 2,2 g/L. 80
- Figura 25. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 : 2 g/L, 1,25 g/L y 0,5 g/L. 81

- Figura 26. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 : 2 g/L, 1,25 g/L y 0,5 g/L. 82
- Figura 27. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes temperaturas: 37 °C, 30 °C Y 23 °C..... 83
- Figura 28. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes temperaturas: 37 °C, 30 °C Y 23 °C. 84
- Figura 29. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, en condiciones de cultivo optimizadas. 86
- Figura 30. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con pectina en condiciones optimizadas (BtP), con glucosa (BtG) y, para la bacteria *Bacillus cereus* con glucosa (BcG). 86
- Figura 31. Espectro infrarrojo del biopolímero extraído producido por la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Primera extracción (E-1), segunda extracción (E-2) y tercera extracción (E-3).. 89
- Figura 32. Espectro de protones ^1H del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono. 91
- Figura 33. Espectro de carbono ^{13}C del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono..... 91
- Figura 34. Espectro bidimensional de correlación (COSY) del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono..... 92
- Figura 35. Espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC), del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono..... 94
- Figura 36. Espectro de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC), del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono..... 94
- Figura 37. Perfil cromatográfico del biopolímero de PHA extraído de *Bacillus thuringiensis* utilizando pectina como fuente de carbono. 96
- Figura 38. Espectro de masas del compuesto (E)-2-butenoato de metilo..... 97
- Figura 39. Espectro de masas del compuesto (R/S)-metil-3-hidroxi-butirato..... 98
- Figura 40. Espectro de masas del compuesto 3-metoxibutanoato de metilo. 99

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Comparación de propiedades físicas y mecánicas de scl-PHA, mcl-PHA y sus copolímeros con polipropileno	23
Tabla 2. Enzimas implicadas en las vías de biosíntesis de PHA	27

Lista de Apéndices

Apéndice A. Ficha técnica de la pectina cítrica utilizada.	125
Apéndice B. Escala de soluciones de MacFarland y curva de McFarland.	125
Apéndice C. Curva de calibración para la cuantificación de pectina utilizando solución Lugol 5% 126	
Apéndice D. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo.....	126
Apéndice E. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. 127	
Apéndice F. Absorbancia obtenida a 595nm para determinar el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).....	127
Apéndice G. Análisis estadístico para el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).	128
Apéndice H. Absorbancia obtenida a 680 nm para el monitoreo de la degradación de pectina en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).....	130
Apéndice I. Análisis estadístico de la degradación de pectina en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).	131
Apéndice J. Absorbancia obtenida a 540 nm para el monitoreo de la producción de azúcares reductores en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).	133
Apéndice K. Análisis estadístico de la producción máxima de azúcares reductores a las 48 horas de fermentación en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).	134
Apéndice L. Absorbancia obtenida a 595 nm para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).....	137
Apéndice M. Análisis estadístico de la cuantificación de proteínas a las 72 horas de fermentación en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).	137
Apéndice N. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con 10 g/L y 20 g/L de pectina.....	140

Apéndice O. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.	141
Apéndice P. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio de cultivo con diferentes pH.....	143
Apéndice Q. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio de cultivo con diferentes concentraciones de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).....	143
Apéndice R. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio de cultivo con diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	144
Apéndice S. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio de cultivo con diferentes temperaturas.....	145
Apéndice T. Análisis estadístico del crecimiento bacteriano al optimizar las condiciones de cultivo. 145	
Apéndice U. Análisis estadístico del rendimiento de la producción de PHA por parte de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	151
Apéndice V. Curvas de crecimiento bacteriano al optimizar los parámetros de incubación.	157
Apéndice W. Espectro de FTIR del biopolímero extraído.....	166
Apéndice X. Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN).....	167
Apéndice Y. Perfiles cromatográficos del biopolímero extraído.	173

Resumen

Título: Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar la biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHA) por las cepas *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* utilizando pectina como fuente de carbono*

Autor: Ana Gabriela Báez Beltrán**

Palabras Clave: Polihidroxicanoatos, pectina, biopolímero, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, microorganismos.

Descripción: La producción mundial de plásticos es de alrededor de 390 millones de toneladas al año, lo cual está causando enormes desafíos en diversos ámbitos, como el medio ambiente, el desarrollo sostenible y la salud. Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres que han ganado gran popularidad, ya que se pueden sintetizar completamente utilizando bacterias, algas y hongos. Los PHA son producidos como gránulos en el citoplasma de la célula, cuando el suministro de nutrientes está limitado. Sin embargo, los sustratos utilizados son costosos, por lo que es necesario la búsqueda de materias primas de bajo costo. Asimismo, la identificación de los componentes del medio y las condiciones de cultivo adecuados son de gran importancia para la producción óptima de biomasa y biopolímero. La presente investigación tuvo como objetivo optimizar la producción de PHA por las cepas *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* utilizando pectina como fuente de carbono renovable. La cepa *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones óptimas (2% pectina, 0,2% extracto de levadura, 2,2 g/L Na₂HPO₄, 0,5 g/L KH₂PO₄, pH 7 y 30°C) produjo un total de 1,607 g/L de PHA con un rendimiento del 58,29%. En contraste, si bien la cepa de *Bacillus cereus* exhibió capacidad para degradar pectina y utilizarla como fuente de carbono, la producción de PHA fue muy pobre o nula. El biopolímero obtenido de los dos microorganismos, independientemente de la fuente de carbono utilizada, fue identificado como poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) con base en los análisis por FTIR, GC-MS y RMN unidimensional y bidimensional. De esta manera, en condiciones óptimas se obtuvo una producción 1,5 veces mayor y menores costos de producción, ya que la pectina es un sustrato económico, en comparación con la glucosa. Por tanto, se podría estudiar la posibilidad de obtener polihidroxicanoatos con *Bacillus thuringiensis* a partir de residuos agroindustriales, para así contribuir a la bioeconomía circular.

*Trabajo de grado

** Facultad, de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Título académico completo de mayor rango: Doctor en Química.

Abstract

Title: Optimization of culture conditions to improve the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains using pectin as a carbon source*

Author: Ana Gabriela Báez Beltrán**

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, pectin, biopolymer, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, microorganisms.

Description: Global plastics production is around 390 million tons per year, which is causing enormous challenges in various fields such as the environment, sustainable development and health. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters that have gained great popularity as they can be fully synthesized using bacteria, algae and fungi. PHAs are produced as granules in the cytoplasm of the cell when the nutrient supply is limited. However, the substrates used are expensive, so the search for low-cost raw materials is necessary. Furthermore, the identification of suitable medium components and culture conditions are of great importance for the optimal production of biomass and biopolymer. The present research aimed to optimize the production of PHA by the strains *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* using pectin as a renewable carbon source. The *Bacillus thuringiensis* strain under optimal conditions (2% pectin, 0.2% yeast extract, 2.2 g/L Na₂HPO₄, 0.5 g/L KH₂PO₄, pH 7 and 30°C) produced a total of 1,607 g/L of PHA with a yield of 58.29%. In contrast, although the *Bacillus cereus* strain exhibited the ability to degrade pectin and use it as a carbon source, the production of PHA was very poor or null. The biopolymer obtained from the two microorganisms, regardless of the carbon source used, was identified as poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) based on FTIR, GC-MS and one-dimensional and two-dimensional NMR analyses. Thus, under optimal conditions, a 1.5 times higher production and lower production costs were obtained, since pectin is an inexpensive substrate, compared to glucose. Therefore, the possibility of obtaining polyhydroxyalkanoates with *Bacillus thuringiensis* from agro-industrial waste could be studied, thus contributing to the circular bioeconomy.

*Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Full academic title of highest rank: Doctor in Chemistry

Introducción

La elevada producción de polímeros a partir de recursos fósiles es una seria amenaza para los medios marinos y terrestres, ya que traen como consecuencia la contaminación del ambiente, desencadenando riesgos para la salud en general. La resistencia a la degradación y alta durabilidad de este tipo de plásticos como el polietileno, el polipropileno, el poliestireno, el poli(cloruro de vinilo) y el poli(tereftalato de etileno) han hecho que se conviertan en un desecho muy difícil de eliminar. Actualmente, la mayoría de los productos plásticos de consumo se encuentran diseñados para un solo uso, por lo cual, su posibilidad de reciclar es limitada, lo que ha producido un mayor aumento en la producción y consumo a nivel mundial, lo que ha dado lugar a una contaminación plástica generalizada (Lau et al., 2020). De acuerdo con Walker y Fequet (2023), a nivel mundial aproximadamente el 9% de los residuos plásticos se ha reciclado alguna vez, el 12% se ha incinerado y el 79% restante se ha acumulado en ecosistemas naturales, además se estima que por año entre 19 y 23 Mt de desechos plásticos generados han ingresado a los ecosistemas acuáticos y se prevé que alcance hasta 53 Mt anuales para 2030.

Una posible solución a la contaminación por plásticos se encuentra en el uso de macromoléculas biológicas tales como almidón, celulosa, quitina, lignina y poliésteres de origen microbiano, que pueden utilizarse para la producción de bioplásticos (Muneer et al., 2021). Entre éstos, los polihidroxicanoatos (PHA) son utilizados como excelentes materiales para la producción sostenible y ecológica de bioplásticos, ya que presentan propiedades termoplásticas y elastoméricas similares a las del polipropileno (Singh et al., 2015). Son producidos por una amplia gama de organismos procariotas, como las bacterias, las cuales lo acumulan en forma de gránulos dentro del citoplasma de las células, cuyo tamaño oscila entre 0,2-0,5 μm (F. Muneer et al., 2020).

El estrés nutricional junto con un exceso de una fuente de carbono, son factores claves para que estos microorganismos produzcan inclusiones de PHA, el cual funciona como una reserva de energía y cuya principal función es ayudar a la célula a sobrevivir a las situaciones de desequilibrio y condiciones de estrés del medio ambiente (Obruca et al., 2018). Actualmente, en la naturaleza se han estudiado más de 300 microorganismos productores de polihidroxicanoatos, que sintetizan compuestos como el poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), el polihidroxi-valerato (PHV), el poli-4-hidroxi-butirato (P4HB) y sus copolímeros como el poli(hidroxi-butirato- co- hidroxi-valerato) (PHB- co -HV) y el poli-3-hidroxi-butirato- co -3-hidroxi-valerato (P3(HB- co -HV)), todos estos son materiales no tóxicos, biodegradables y ecológicos (Foong et al., 2019).

Sin embargo, el potencial uso de este tipo de poliésteres a nivel industrial se ve opacado, por sus altos costos de producción; relacionados principalmente por factores como: (i) el elevado costo de la fuente de carbono utilizada, (ii) el bajo crecimiento celular y (iii) los procesos adicionales involucrados en la producción a gran escala. Con relación al primero, es posible disminuir el impacto económico en la producción de estos materiales a través de cambios en la composición del medio de cultivo o seleccionando una fuente de carbono económica y asequible, incluso, renovable (Brojanigo et al., 2020).

Entre las fuentes de carbono que cumplen con estas características favorables para la producción de PHA se encuentra la pectina, la cual es considerada uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, ya que hace parte de la pared celular primaria y la laminilla media de frutas y verduras (Muzzarelli et al. 2012); no obstante, es necesario aclarar que, no todos los microorganismos que producen PHA son capaces de utilizar pectina como fuente de carbono. Por tanto, en el presente trabajo de investigación se evaluó el uso de pectina como una fuente de carbono aprovechable para la producción de bioplástico por dos microorganismos PHA positivos

aislados y caracterizados en el grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) e identificados como *Bacillus thuringensis* (C01) y *Bacillus cereus* (C02). Los resultados de esta investigación contribuyen en la generación de nuevo conocimiento en pro de utilizar esta macromolécula biológica para la producción de polihidroxicanoatos y, además, con una tendencia hacia la investigación en el aprovechamiento de biomasa derivada de residuos agroindustriales, los cuales son ricos en pectina, para ser utilizados como fuentes económicas y rentables para el propósito del que trata el presente estudio.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Producir bioplástico tipo polihidroxicanoatos (PHA) a partir de microorganismos capaces de degradar de pectina y utilizarla como fuente de carbono

1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la tasa de degradación de pectina por parte de los microorganismos *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*
2. Comparar el rendimiento en la producción de PHA bajo condiciones óptimas de fermentación utilizando pectina y glucosa como fuente de carbono
3. Identificar, cuantificar y caracterizar el tipo de monómero (s) del PHA obtenido como producto de la fermentación microbiana

2. Marco teórico

2.1 Plásticos sintéticos

Se acuñó la palabra plástico a partir de la palabra griega “*Plastikos*”, que significa que se puede formar. El plástico es un polímero sintético obtenido por la polimerización de monómeros extraídos de productos petroquímicos que además se combinan con otros productos químicos (Torres-Agullo et al., 2021). Los monómeros son las unidades que se repiten en los polímeros de cadena larga, están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, unidos por enlace covalente. Actualmente los monómeros livianos más utilizados en la fabricación de plásticos son el etileno y el propileno (Pilapitiya & Ratnayake, 2024).

Los plásticos se dividen en dos tipos, termoplásticos y plásticos termoestables. Los primeros tienen la capacidad de ablandarse y endurecerse repetidamente al ser calentados y enfriados, ya que están conformados por largas cadenas de carbono lineales o ramificadas, que son independientes, por lo cual son resistentes a la degradación y a la escisión hidrolítica de sus enlaces químicos, debido a esto son considerados plásticos no biodegradables (Howard, 2002). Por otra parte, en los plásticos termoestables el proceso de cambio de estado de líquido a sólido es irreversible, ya que poseen una estructura altamente reticulada, donde las cadenas moleculares están unidas entre sí por numerosos enlaces covalentes y su cadena principal se encuentra conformada por heteroátomos (Yüksel & Büyükgüngör, 2000).

Teniendo en cuenta las características descritas anteriormente los termoplásticos son utilizados ampliamente en la fabricación de botellas y envoltorios. Los materiales que más destacan de esta categoría son polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno de baja densidad (LDPE), polipropileno

(PP), poliestireno (PS) y otras resinas. Mientras que los principales plásticos termoestables incluyen al poliéster, al tereftalato de polietileno (PET), y el poliuretano (PUR) (Ghosh *et al.*, 2004).

2.2 Biopolímeros

El prefijo “bio” hace referencia a que son polímeros que se producen exclusivamente a partir de materia viva. De esta manera, los biopolímeros pueden estar formados por moléculas estructuradas en forma de cadena, ya sea lineal o ramificada. Generalmente, sus unidades monoméricas consisten en moléculas provenientes de ácidos nucleicos o nucleótidos, proteínas de aminoácidos o sacáridos derivados de azúcares (Ashter, 2016).

El desarrollo de estos biopolímeros ha ocasionado una competencia con sus homólogos obtenidos de combustibles fósiles en términos de sus propiedades y el precio de fabricación. Entre estos biopolímeros destacan los polihidroxicanoatos, ya que son biocompatibles, bioabsorbibles y biodegradables, por lo cual, a la fecha, no se les ha determinado ningún efecto negativo sobre el medio ambiente o para el ser humano (Riaz *et al.*, 2021).

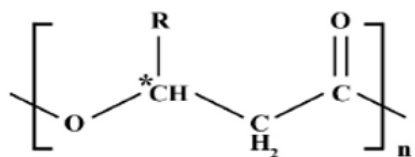
2.3 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de ácidos hidroxicanoicos que son producidos por cierto tipo de bacterias, arqueas, y microalgas. Estos biopoliésteres naturales se acumulan intracelularmente para ser utilizado como fuente de carbono y de energía de reserva. Los polímeros de PHA están compuestos por monómeros de ácido (*R*)-hidroxicanoico (HA). La cadena lateral alquílica (*R*) de estos monómeros puede variar en el número de carbono, y esto es responsable de la amplia variedad de PHA (figura 1). Por lo general su masa molecular se encuentra entre 50 kDa y 100 kDa, dependiendo del microorganismo productor (Vicente *et al.*, 2023).

Una molécula de PHA usualmente se encuentra formada por 600 a 35000 unidades monoméricas de ácidos (*R*)-hidroxialcanóicos. Se clasifican principalmente en tres grupos: (i) PHA de cadena corta (short chain length, PHA-scl) cuya estructura monomérica está conformada de 3 a 5 átomos de carbono, (ii) PHA de cadena media (medium chain length, PHA-mcl) con unidades monoméricas entre 6 a 14 átomos de carbono y (iii) PHA de cadena larga (long chain length, PHA-lcl) los cuales poseen entre 17 y 18 átomos de carbono. A medida que aumenta la longitud de la cadena lateral, el polímero producido se vuelve más elástico con una cristalinidad y una temperatura de fusión relativamente bajas (Saravanan et al., 2022).

La mayoría de los productores bacterianos de PHA reportados muestran una mayor biosíntesis de polímeros bajo limitación de nutrientes (por ejemplo, nitrógeno, fósforo, oxígeno y magnesio) y exceso de fuente de carbono. Sin embargo, bacterias como *Alcaligenes lactus* han demostrado no necesitar limitaciones de nutrientes para producir PHA (Muneer et al., 2020).

Figura 1. Estructura y nomenclatura de los polihidroxialcanoatos. *Traducido y modificado de (Khanna & Srivastava, 2005).*

**Poli(3-hidroxiálcanoato)**

Grupo R	Carbono N°	Polímero PHA
Metilo	C ₄	Poli(3-hidroxi-butirato)
Etilo	C ₅	Poli(3-hidroxi-valerato)
Propilo	C ₆	Poli(3-hidroxi-hexanoato)
Butilo	C ₇	Poli(3-hidroxi-heptanoato)
Pentilo	C ₈	Poli(3-hidroxi-octanoato)
Hexilo	C ₉	Poli(3-hidroxi-nonanoato)
Heptilo	C ₁₀	Poli(3-hidroxi-decanoato)
Octilo	C ₁₁	Poli(3-hidroxi-undecanoato)
Nonilo	C ₁₂	Poli(3-hidroxi-dodecanoato)
Decilo	C ₁₃	Poli(3-hidroxi-tridecanoato)
Undecilo	C ₁₄	Poli(3-hidroxi-tetradecanoato)
Dodecilo	C ₁₅	Poli(3-hidroxi-pentadecanoato)
Tridecilo	C ₁₆	Poli(3-hidroxi-hexadecanoato)

Por otra parte, los polihidroxiálcanoatos se almacenan dentro de los microorganismos como inclusiones celulares, estos gránulos generalmente tienen tamaños entre 0,2 y 0,5 μm , llegando a tener cada uno de ellos alrededor de 103 a 104 cadenas poliméricas y para observación se puede emplear técnicas de microscopía óptica, de fluorescencia o electrónica (Koller & Rodríguez-Contreras, 2015). Se sabe que los microorganismos tienen la capacidad de sintetizar diferentes PHA según su metabolismo y la polimerasa de PHA (PhaC), otro factor de gran importancia es la composición del medio de cultivo, ya que también puede influir significativamente en la composición final de PHA (Park., et al 2024).

2.4 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los polihidroxiálcanoatos

Los polihidroxiálcanoatos presentan ciertas similitudes con las propiedades físicas y mecánicas de los polímeros de origen petroquímico, como el polipropileno. Sin embargo, las

característicos de los PHA varían de acuerdo con la bacteria que se utilice para la producción del biopolímero y de las condiciones de fermentación que se empleen. De esta manera se tiene que los PHA de cadena corta (scl-PHA) son altamente cristalinos (alrededor del 55 y 80%), es decir, poseen un alto grado de ordenamiento de sus cadenas monoméricas, generalmente se determina por difracción de rayos X (DRX). Su grado de cristalinidad provoca que sean relativamente quebradizos y rígidos, además poseen una alta temperatura de fusión, oscila entre 173°C y 180°C y baja temperatura de transición vítrea (Tg) la cual se encuentra entre 5°C y 9 °C, esto indica que por debajo de esta temperatura el polímero se comporta como un sólido rígido y frágil (Meereboer et al., 2020). Estas características son de gran importancia a la hora de definir las aplicaciones que se le darán al PHA, por esto, son más deseables los copolímeros de cadena corta ya que poseen menor punto de fusión y son menos cristalinos, lo que los hace más fáciles de moldear y que sean más resistentes, como por ejemplo el poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato [P(3HB-co-3HV)]. En la tabla 1 se presentan las propiedades de los polihidroxi-alcanoatos de cadena media y corta (Tan et al., 2014).

Tabla 1. Comparación de propiedades físicas y mecánicas de scl-PHA, mcl-PHA y sus copolímeros con polipropileno.

	Homopolímero	Homopolímero	Copolímero	Copolímero	Polipropileno
	scl-PHA	mcl-PHA	P(3HB- co - 3HV)	P(3HB- co - 6%3HD)	
Temperatura de fusión (°C)	179	80	137–170	130	176

Temperatura de transición vítrea (°C)	4	-40	10 a -6	-8	-10
Módulo de Young (GPa)	3.5	-	0,7-2,9	-	1.7
Alargamiento a la rotura (%)	40	300	30-38	680	38
Resistencia a la tracción (Mpa)	5	20	hasta 690	17	400

Nota. scl-PHA: polihidroxialcanoatos de cadena corta; mcl-PHA: polihidroxialcanoatos de longitud de cadena media; poli(3-hidroxi butirato-co-6% 3-hidroxidecanoato) P(3HB-co-6%3HD).

Sin embargo, los homopolímeros tienen la desventaja de ser frágiles y tener una ventana de procesabilidad estrecha si se comparan con los plásticos sintéticos. En cuanto a las propiedades mecánicas, dependiendo del monómero presente en la estructura, pueden presentar una resistencia a la tracción de 32 - 36 Mpa, lo que significa que esta es la fuerza máxima que puede soportar cuando se estira hasta el punto de fractura. Por otra parte, la medida de su elasticidad longitudinal (módulo de Young), se encuentra en un rango muy variado ya que puede ir desde 900 MPa hasta 2000 Mpa y en estos polímeros se determina mediante el ensayo de tracción (Ten et al., 2015).

Con base en las propiedades que presentan los polihidroxialcanoatos se les considera materiales prometedores, especialmente en el área biomédica, por lo cual en la actualidad son aptos para la fabricación de productos cardiovasculares (válvulas cardiacas e injertos vasculares), en

administración de fármacos (tabletas y micro portadores para terapia contra el cáncer), en el tratamiento de heridas (suturas) y en ortopedia (placas óseas y cajas espinales). Esto es gracias a que presentan alta inmunotolerancia, baja toxicidad y biodegradabilidad, siendo los homopolímeros P(3HB) y el copolímero P(3-HB-co-3HV) los de mayor importancia (Lomas *et al.*, 2013).

De acuerdo con Muhammadi *et al.* (2015), todos los polihidroxicanoatos producidos por microorganismos sin importar la longitud de la cadena carbonada se caracterizan por (i) ser compuestos elastoméricos que pueden procesarse con los mismos equipos que se utilizan en la industria de manufactura de plásticos sin perder su capacidad de biodegradarse; (ii) presentan resistencia a degradación hidrolítica, siendo insolubles en agua, (iii) altamente cristalinos y presentan un alto grado de polimerización; y (iv) son ópticamente activos y no tóxicos

Sin embargo, la propiedad más importante de los polihidroxicanoatos es su posibilidad de degradación, ya que, al ser poliésteres naturales, su degradación es bastante sencilla gracias a la acción de enzimas bacterianas y fúngicas, además, se puede dar tanto en ambientes aeróbicos (suelo, océano, compost) como en ambientes anaeróbicos (lodos de depuradora, digestores, vertederos) (Turco *et al.*, 2021).

2.5 Biosíntesis de PHA

Los polihidroxicanoatos son fundamentales en la preparación de los microorganismos para sobrevivir al estrés en condiciones de escasez de nutrientes, ya que funcionan como reserva de energía y carbono. Además, estas bacterias productoras de PHA ya sean esporulantes o no esporulantes, muestran una mayor tolerancia a alteraciones ambientales transitorias, como radiación ultravioleta (UV), calor y shock osmótico (Obruca *et al.*, 2021).

De esta manera, las vías para la biosíntesis del PHA se encuentran altamente relacionados con las vías metabólicas centrales de la bacteria, entre ellas se encuentran el ciclo de Krebs, la β -oxidación, la síntesis *de novo* de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, el ciclo de Calvin y la vía de la serina (Tappel *et al.*, 2009). Gran cantidad de intermediarios comunes se comparten también entre estas vías metabólicas y el PHA, siendo el más importante el acetil-CoA, ya que en microorganismos productores como el *Cupriavidus necator*, *Chromatium vinosum* y *Pseudomonas aeruginosa*, el flujo metabólico de acetil-CoA a polihidroxialcanoato depende de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Tsuge, 2016). De esta forma, en condiciones ricas de nutrientes, se produce gran cantidad de coenzima A en el ciclo de Krebs, esto bloquea la síntesis de PHA, ya que inhibe la 3-cetotiolasa (PhaA) y así, la acetil-CoA se canaliza hacia el ciclo de Krebs para el crecimiento celular y producción de energía, por tanto el rendimiento en la producción es directamente proporcional a la concentración de las coenzimas NADH y NAD⁺ (Samrot *et al.*, 2021)

Por el contrario, si la bacteria se encuentra en condiciones desequilibradas de nutrientes, es decir, hay un exceso de fuente de carbono, pero déficit de un nutriente esencial como el nitrógeno y el fósforo, los niveles de coenzima A no logran ser inhibidores, por lo cual el acetil-CoA se dirige a las vías biosintéticas de PHA (Guimarães *et al.*, 2022). Esto les permite a los microorganismos maximizar los recursos y adaptarse a las condiciones del entorno.

En la figura 2 se muestran las diversas rutas para la síntesis de scl-PHA (vías de A a la J) y la síntesis de mcl-PHA (vías de J a la M), asimismo, en la tabla 2 se encuentra un resumen de las enzimas involucradas en estos procesos.

Figura 2. Vías biosintéticas de PHA. Traducido y modificado de (Tan *et al.*, 2014)

10	Semialdehído deshidrogenasa succínico	SucD	<i>Clostridium kluyveri</i>
11	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	4HbD	<i>Clostridium kluyveri</i>
12	4-hidroxibutirato-CoA: CoA transferasa	Orfz	<i>Clostridium kluyveri</i>
13	Alcohol deshidrogenasa(putativo)*	-	<i>Aeromonas hidrofila</i> 4AK4
14	Hidroxiacil-CoA sintasa(putativa)*	-	Mutantes y recombinantes de <i>Cupriavidus necator</i>
15	Metilmalonil-CoA mutasa	Sbm	<i>Escherichia coli</i> W3110
16	Racemasa de metilmalonil-CoA	-	<i>Nocardia coralina</i>
17	Metilmalonil-CoA descarboxilasa	ygfg	<i>Escherichia coli</i> W3110
18	Cetotiolasa(putativa)*	-	-
19	3-cetotiolasa	BktB	<i>Cupriavidus necator</i>
20	Cetotiolasa(putativa)*	-	-
21	Acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH	-	<i>Rhizobio (Cicer)</i> sp. CC 1192
22	Acil-CoA sintetasa	moda	<i>Pseudomonas putida</i> CA-3 y <i>Escherichia coli</i> MG1655
23	(R)-enoil-CoA hidratasa	PhaJ	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
24	3-cetoacil-CoA tiolasa	Fada	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442
25	3-Hidroxiacil-ACP:CoA transacilasa	fag	<i>Pseudomonas mendocina</i>
26	Ciclohexanol deshidrogenasa	ChnA	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
27	Ciclohexanona monooxigenasas	ChnB	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
28	Caprolactona hidrolasa	CHNC	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
29	6-hidroxihexanoato deshidrogenasa	ChnD	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU

30	6-oxohexanoato deshidrogenasa	CHNE	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
31	Lactonasa(putativa)*	-	Mutantes y recombinantes de <i>Cupriavidus necator</i>

Nota. (*) significa que se sospecha que hacen parte de la biosíntesis del PHA, pero hasta la fecha no ha sido confirmado experimentalmente.

2.6 Microorganismos productores de PHA

La propiedad de acumular PHA se encuentra extendido entre los diferentes dominios de bacterias y arqueas, encontrándose en más de 70 géneros. Estos microorganismos poseen la capacidad de acumular los polihidroxicanoatos en forma de gránulos de lípidos intracelulares, y al actuar como biocatalizadores, permite el acoplamiento de una gran variedad de vías catabólicas de carbono junto con vías anabólicas de PHA. Gracias a esto, pueden alimentarse de diversas fuentes de carbono, que incluyen sacáridos (fructosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, *etc.*), *n*-alcanos (hexano, octano, dodecano, *etc.*), ácidos *n*-alcanóicos (ácido acético, ácido propiónico, ácidos butíricos, ácido valérico, ácido láurico, ácido oleico, *etc.*), *n*-alcoholes (metanol, etanol, octanol, glicerol, *etc.*) y gases (metano y dióxido de carbono) (Verlinden *et al.*, 2007). Actualmente, se encuentra una gran cantidad de información acerca de la genética y bioquímica de los microorganismos productores de PHA, lo que permite seleccionar el adecuado, dependiendo de la fuente de carbono que se vaya a utilizar en el medio de cultivo.

2.6.1 Arqueas

Actualmente solo se ha descubierto la producción de PHA en especies de haloarqueas, los cuales son miembros extremadamente halófilos del dominio archaea y requieren de altas concentraciones de sal (hasta 6M de NaCl) para realizar su actividad enzimática normal. Se encuentran reportados los siguientes géneros como PHA positivos *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*,

Halorhabdus, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* y *Natronorubrum* (Han *et al.*, 2010).

2.6.2 Bacterias Gram-negativas

En esta categoría destacan especies como *Azohidromonas*, *Burkholderia* y *Cupriavidus*, las cuales tienen la capacidad de producir entre un 50 a 80% de masa seca celular de poli(3-hidroxi-butirato), a partir de diferentes azúcares (Prados & Maicas, 2016). Su principal productor es *Cupriavidus necator*, el cual cuando se le administran aceites vegetales como sustrato llega a tener un rendimiento de hasta el 95% (Jiang *et al.*, 2018).

2.6.3 Bacterias Gram-positivas

Se caracterizan por producir principalmente scl-PHA y se ha reportado en los géneros *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* (Tsuge *et al.*, 2015). Entre las cuales se destacan:

2.6.3.1 *Bacillus cereus*

Es una bacteria Gram-positiva, aerobia, anaerobia facultativa (tiene la capacidad de sobrevivir y crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno), formadora de esporas y mesófila. Tiene la capacidad de crecer con temperaturas de 10 a 48 °C, sin embargo, su crecimiento es óptimo cuando se encuentra entre 28 y 35 °C. Es una especie ubicua (distribuida en una amplia variedad de hábitats), vive como saprófito del suelo pero que también se encuentra en alimentos de origen vegetal y animal, particularmente productos lácteos (Duport *et al.*, 2016)

Además, esta especie posee interesantes propiedades metabólicas y genéticas que le permiten la producción de polihidroxicanoatos no tóxicos y biocompatibles, características que los hacen adecuados para fines biomédicos (Mohandas *et al.*, 2018). Además, *B. cereus* tiene la

capacidad de utilizar diferentes sustratos como fuente de carbono para crecer y reproducirse (Martínez-Herrera et al., 2021).

2.6.3.2 *Bacillus thuringiensis*

Suele habitar en el suelo y forma esporas durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, dichas esporas contienen cristales que contienen proteínas conocidas como δ -endotoxinas, que poseen propiedades insecticidas (Bravo et al., 2011). Fue aislada por primera vez en 1903 por Ishiwata, quién informó que causaba daños en la industria de la seda en Japón, y la denominó *Bacillus sotto*, que significa blando. Sin embargo, en Alemania, Berliner la aisló en las larvas de la polilla *Ephestia kuehniella*, y la identificó como *Bacillus thuringiensis*, nombre con el que se conoce actualmente (De Almeida Melo et al., 2014).

En cuanto a su morfología y fisiología celular, es una bacteria Gram-positiva con forma de bastón de 1.0-1,2 de ancho y 3,0-5,0 μm de largo. Poseen flagelos peritrico (se encuentran distribuidos alrededor de toda la superficie de la bacteria), lo que les permite unirse a células de insectos y son importantes en la virulencia. Las esporas producidas tienen forma elipsoidal y mayoritariamente cilíndrica, se localizan en la región central cuando se encuentran dentro de la célula madre (Rabinovitch et al., 2017).

Bacillus thuringiensis tiene dos fases distintas durante su desarrollo celular: división celular y formación de esporas. La formación de las esporas implica siete diferentes etapas: (i) fase I: formación de filamentos axiales; (ii) fase II: formación del septo de la forespora, (iii) fase III: primera aparición de cristales y formación de una forespora; (iv) fases IV a VI: formación de la exospora, la pared celular primordial y transformación del nucleoide de la espora; y (v) fase VII: maduración de las esporas y lisis celular (Ibrahim et al., 2010). La principal característica de estas esporas es la presencia de las delta-endotoxinas o proteínas Cry, que se sintetizan después de la

etapa II de esporulación y se acumula dentro de la célula en forma de cristal, puede representar hasta el 25% del peso seco de las bacterias. Los cristales pueden tener pesos moleculares entre 30kDa y 140 kDa, y se convierten en péptidos tóxicos luego de la ingestión por plagas objetivo (Salazar-Marroquín et al., 2016).

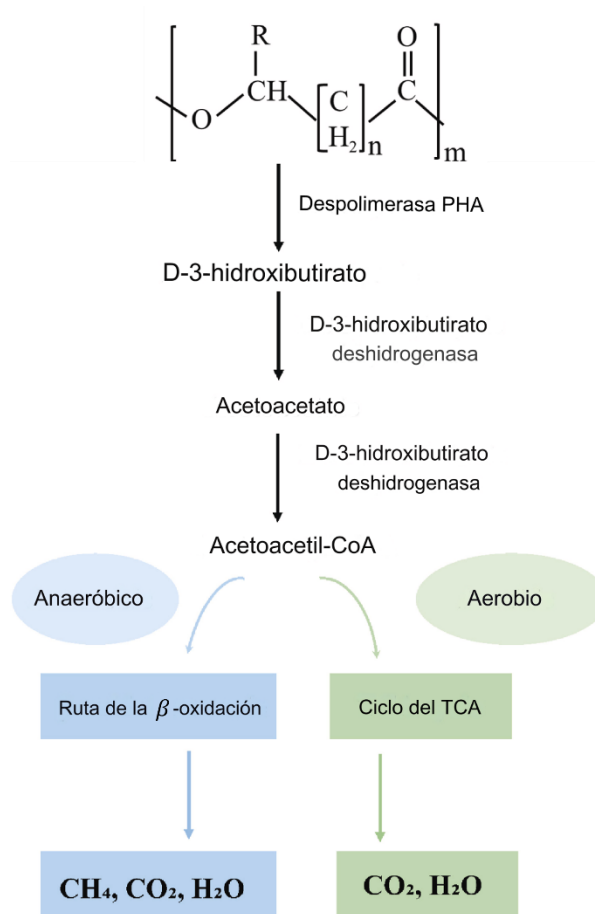
2.7 Biodegradación de PHA

Como se mencionó anteriormente, la composición monomérica de las cadenas de polihidroxialcanoatos es muy variada, lo cual determina sus características físicas y químicas además de su susceptibilidad a ser biodegradados (Meereboer et al., 2020). Se ha reportado una amplia variedad de microorganismos capaces de degradar PHA en diferentes ecosistemas, llevándolos hasta dióxido de carbono o metano, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Para que se dé la biodegradación de las moléculas de PHA, primero se hidrolizan las cadenas correspondientes a hidroxiaácidos, para que puedan atravesar la membrana celular, ya que si no se hidrolizan antes, por su gran tamaño no podrían ingresar al interior de la célula (Alshehrei, 2017).

La velocidad de la biodegradación depende de diferentes factores, los cuales incluyen el área superficial del biopolímero, actividad microbiana, pH, temperatura, humedad y la presencia de algunos nutrientes (Kleerebezem & Van Loosdrecht, 2007). El proceso comienza con la colonización de los bioplásticos por parte de los microorganismos, para luego mediante enzimas despolimerasas hidrolizar los enlaces éster de los PHA conduciendo a la generación oligómeros, que posteriormente son llevados a monómeros por la acción de enzimas “hidrolasas de oligómeros”, por ejemplo, el poli(3-hidroxibutirato) es convertido hasta monómeros de 3-hidroxibutirato. Estos monómeros pasan a través de la membrana microbiana semipermeable y son metabolizados por β -oxidación y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, convirtiéndolos en

condiciones aeróbicas en dióxido de carbono y agua (Meereboer *et al.*, 2020), mientras que en condiciones anaeróbicas también se da la producción de metano (Gómez & Michel, 2013).

Figura 3. Representación simplificada de la degradación extracelular de PHA en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. *Traducido y modificado de (Zhou et al., 2023)*



2.8 Comparación de la vida útil del PHA y los plásticos convencionales

Para determinar el tipo de plástico adecuado para industrias como la ingeniería, embalaje, cirugía, higiene, se debe tener en cuenta la vida útil, ya que no es recomendable utilizar polímeros de larga duración en estas aplicaciones que tienen una duración más corta. Por lo tanto, la vida útil del plástico en condiciones ambientales es de gran importancia, para así controlar los problemas relacionados con la acumulación de desechos que estos puedan generar. Se debe tener en cuenta

que los plásticos convencionales presentan gran resistencia a la degradación química y biótica, tanto aeróbica como anaeróbica (Zhang et al., 2021).

Generalmente, la degradación de los plásticos convencionales comienza con la fotodegradación, esta reacción se encuentra mediada por radicales libres e inicia por la irradiación solar de alta energía UV-B (290-315 nm) y de media energía (315-400 nm), los radicales libres reaccionan con el oxígeno presente en las impurezas del plástico, para así producir radicales peroxi, que por abstracción de hidrógeno se convierten en peróxido. Estas reacciones producen la escisión de la cadena del polímero (Liu et al., 2019). La degradación biótica de este tipo de plásticos es aún más compleja, ya que las macromoléculas de los polímeros no pueden ser utilizadas directamente por mis microorganismos, por lo que requieren de enzimas extracelulares que inicien la descomposición en productos de menor tamaño para la absorción celular y posterior metabolización (Chen et al., 2019).

Mientras que los PHA producidos por microorganismos pueden tener una vida útil más corta o larga, dependiendo del polímero del que esté compuesto. Por ejemplo, una botella de 31,90 g, con una composición de 92% poli-3-hidroxi butirato y 8% poli-3-hidroxi valerato, tiene una tasa de degradación de 10 mg/día, que significa una vida útil de 5 a 10 años sumergida en un lago de 85 m de profundidad en condiciones naturales (Brandl & Puchner, 1992). Actualmente la norma ASTM D6954-18, establece los estándares de biodegradación y se divide en 3 niveles: (i) degradación abiótica hasta un peso molecular de 5.000 Da o menos, los productos obtenidos varían dependiendo de la polaridad del polímero y el tipo de agente iniciador (Meereboer et al., 2020). Por ejemplo, la oxidación de moléculas no polares produce radicales libres, mientras que el tratamiento con UV (ultravioleta) o calor produce moléculas hidrolizadas con grupos funcionales; (ii) degradación biótica en el entorno elegido, puede ser compost, suelo o vertedero acelerado. En

el suelo ocurre cuando los materiales biodegradables se exponen a los microbiomas del suelo y se encuentran lo suficientemente cerca de la superficie para estar en un ambiente aerobio, se rige por la norma ASTM D5988-18; la biodegradación en compostaje es la más popular (ASTM D5338-15), los materiales están expuestos a una mezcla de materiales descompuestos a temperaturas más altas que las que se encuentran en el suelo, las condiciones iniciales se optimizan de modo que el entorno sea estable; la biodegradación acelerada en vertederos es la menos deseada debido a la producción de metano descontrolada en condiciones anaeróbicas que se libera al medio ambiente, implica un contenido de sólidos en el lodo gestado (material con alto contenido orgánico) de 35 % o más, se rige por las normas ASTM D5526-18 y ASTM D7475-20; (iii) medida de residuo tóxico, depende del método de degradación empleado (Meereboer et al., 2020).

2.9 Aplicaciones biomédicas de los PHA

Los PHA poseen la capacidad de degradarse en condiciones fisiológicas en metabolitos naturales como el 3-hidroxi butirato y la hidroxiaxil-coenzima A, esta es la razón por la que los polihidroxicanoatos no son inmunogénicos, son biocompatibles y exhiben una excelente biorreabsorción, estas características les permite que fácilmente se incorporen en los sistemas biológicos (Basnett *et al.*, 2013).

Debido a esto, los PHA son utilizados en una amplia gama de aplicaciones biomédicas que se puede clasificar en cuatro subgrupos principales:

2.9.1 Ingeniería de tejido blando

Los mcl-PHA como el poli(3-hidroxi octanoato) y el poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi decanoato) pueden ser sintetizados por cepas como *Pseudomonas mendocina* cuando se utiliza octanoato de sodio como única fuente de carbono con un exceso de la fuente de carbono y

limitación de nitrógeno. Estos polímeros se utilizan principalmente en parches cardíacos, injertos vasculares, válvulas cardíacas, reconstrucciones auriculares, suturas y apósitos de para heridas, conductos nerviosos y tejido cartilaginoso (Bagdadi *et al.*, 2017).

2.9.2 Ingeniería de tejidos duros

Los defectos óseos son causados por diversos procesos patológicos o traumatismos, y su tratamiento es especialmente complicado. El tejido óseo tiene la capacidad de regenerarse por sí mismo, como en la curación de fracturas. Sin embargo, se requieren de injertos óseos para mejorar las condiciones de curación. Los PHB se han convertido en materiales ideales para este propósito, debido a su alto grado de cristalinidad, biorreabsorción, rápida metabolización y no toxicidad, lo convierten en un agente apropiado para la reparación de tejidos óseos, incluido el tratamiento por daños de osteoporosis (Ding *et al.*, 2016). La poli(caprolactona) (PCL) es un biopolímero biodegradable, semicristalino y biocompatible, que al mezclar con polihidroxibutirato produjo un andamio híbrido electrohilado, que se utilizó en un estudio con células similares a osteoblastos MG-63 y demostró que este andamio híbrido no solo favoreció la adhesión de las células MG-63, sino que también aumentó ligeramente la viabilidad celular y mejoró significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (Dhanial *et al.*, 2022).

2.9.3 Administración de fármacos

Esta propiedad tiene gran cantidad de ventajas, ya que se pueden adaptar para liberar el fármaco durante periodos de tiempo específicos y se pueden modificar para llegar a las áreas elegidas del cuerpo (Elmowafy *et al.*, 2019). En una investigación realizada por (Elmowafy *et al.*, 2019), se estudiaron los polímeros P(HB-co-HV) y PHB, para la administración de antibióticos y fármacos como tetraciclina, rifampicina, sulbactam-cefoperazona, gentamicina, sulperazona, rubomicina, isotiocianato de rodamina B, en diferentes periodos de tiempo que van desde 15 a 60

días. Observaron que los periodos de liberación de la molécula de fármaco son directamente proporcionales al peso molecular de los polímeros utilizado, además, el tiempo depende también de el porcentaje de hidroxivinilo (HV) en los copolímeros.

2.9.4 Dispositivos médicos

Se han realizado estudios *in vivo* en los cuales se ha implantado gran cantidad de constructos de PHA en mamíferos de diferentes tamaños como ratones, conejos, cerdos, ovejas e incluso primates. De esto, se ha obtenido como resultados respuestas inmunes mínimas (pequeñas inflamaciones) ya que sus productos de degradación, como el ácido hidroxibutírico, no son tóxicos y pueden ser metabolizados fácilmente por el cuerpo (Shrivastav *et al.*, 2013).

En Estados Unidos la empresa TEPHA Inc., ha estado desarrollando PHA específicamente para aplicaciones médicas y obtuvo la aprobación de la FDA para comercializar suturas hechas de poli(4-hidroxibutirato) [P(4HB)] bajo la marca TephaFLEX® Absorbable Suture. (Williams *et al.*, 2013)

2.10 Fuentes de carbono utilizadas en la biosíntesis de PHA

Los sustratos generalmente utilizados para la síntesis de polihidroxicanoatos son moléculas pequeñas, que puedan atravesar fácilmente la membrana celular, ya que las moléculas poliméricas de mayor tamaño no pueden ingresar al interior de la célula sin antes una transformación por un proceso químico o por parte de un microorganismo (Matias & De Andrade Rodrigues, 2011).

De esta manera, se pueden dividir las fuentes de carbono en tres grupos: azúcares simples, triacilglicerol e hidrocarburos. En general, la mayoría de los microorganismos PHA positivos son capaces de utilizar monosacáridos, mientras que el triacilglicerol solo se ha reportado en ciertos microorganismos (Argiz *et al.*, 2020). El metabolismo de los hidrocarburos es menos común, y se

encuentra prácticamente limitado a la especie de bacterias *Pseudomonas* (Jiang et al., 2016). Asimismo, se puede hacer uso de ácidos orgánicos y alcoholes para la biosíntesis de copolímeros. Por ejemplo, se han producido terpolímeros (constituidos por 3 monómeros diferentes) de poli(3-hidroxi-butirato- co -3-hidroxi-valerato- co- 3-hidroxi-heptanoato) a partir de heptanoato de sodio, mediante una cepa recombinante de *A. eutrophus*, el rendimiento de la producción del polímero fue del 57% y con una composición de 44% 3HB (3-hidroxi-butirato), 53% 3HV (3-hidroxi-valerato) y 3% HHP (3-hidroxi-heptanoato) (Anjum et al., 2016).

El costo de la fuente de carbono utilizada es de gran importancia, ya que representa alrededor del 50% del costo global del proceso de producción de PHA (Khosravi-Darani et al., 2013). A continuación, se presentan las fuentes de carbono sostenibles para la biosíntesis de PHA:

2.10.1 Carbohidratos

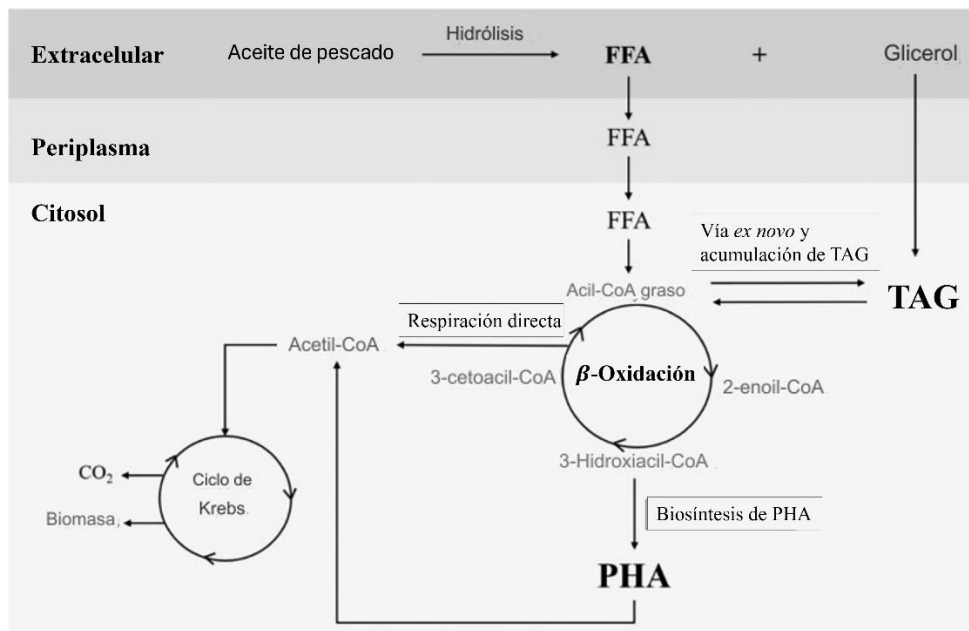
Se clasifican en monosacáridos, polisacáridos y oligosacáridos; estos dos últimos se pueden hidrolizar en azúcares más simples. Entre los polisacáridos más estudiados se encuentran almidón, celulosa, hemicelulosa, lactosa y pectina, los cuales se deben hidrolizar antes de la fermentación (Favaro et al., 2018).

2.10.2 Triacilgliceroles

Los triacilgliceroles están compuestos por un glicerol como cadena principal, con tres ácidos grasos unidos y se encuentran principalmente en las grasas animales y aceites vegetales. Para que puedan ser utilizados directamente como fuente de carbono, se necesita de bacterias capaces de secretar lipasas en el medio de fermentación. De esta manera, se liberará ácidos grasos presentes en los triacilgliceroles que son transportados al interior de la célula y se catabolizan por β -oxidación (Winnacker, 2019). En la figura 4 se aprecia como el aceite de pescado se puede

utilizar como fuente de carbono para la producción de PHA a través de la vía *ex novo* (Argiz et al., 2020).

Figura 4. Vía metabólica simplificada que describen la producción de TAG y PHA a partir de lípidos en cultivos microbianos. Los ácidos grasos libres (FFA) producidos después de la hidrólisis del sustrato pueden catabolizarse (respiración directa) o acumularse como materiales de reserva (TAG o PHA producidos por las vías de biosíntesis *ex novo* o de PHA, respectivamente). *Traducido y modificado de (Argiz et al., 2020).*



2.10.3 Hidrocarburos

Algunos microorganismos pueden utilizar *n*-alcanos, *n*-alquenos gaseosos e hidrocarburos parafínicos de cadena larga, hasta de 44 carbonos. Sin embargo, no todos los microorganismos que utilizan esta fuente de carbono son capaces de acumular PHA y en los organismos que si son capaces de hacerlo, la acumulación tiende a ser baja, por lo cual no son una buena opción para su producción (Chayabutra & Ju, 2001). En una investigación realizada por (Ni et al., 2010), utilizaron la cepa *Pseudomonas fulva* TY16 cultivada con compuestos aromáticos volátiles que

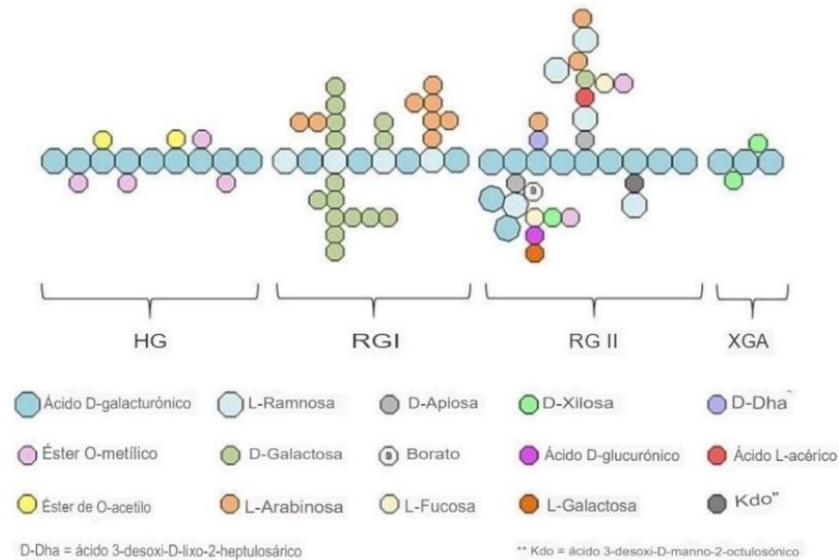
incluían benceno, tolueno y etilbenceno como único sustrato de carbono, de esta manera obtuvieron un polímero que consistía principalmente en 3-hidroxidecanoato (55,2%) y 3-hidroxi octanoato (26,8%) con componentes menores siendo 3-hidroxi hexanoato (3,7%), 3-hidroxi dodecanoato (8,2%) y 3-hidroxi dodecanoato (6,1%). El rendimiento en la producción del polímero pasadas 48 horas de fermentación fue de 58,9 %.

2.11 Pectina

La pectina es un polisacárido y estructuralmente es la más compleja en la naturaleza. Constituye el 35 % de las paredes primarias en dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, entre el 2 y el 10% de las paredes primarias de pasto y hasta el 5% de las paredes en el tejido leñoso (O'Neill *et al.*, 1990).

Asimismo, su estructura está compuesta por subdominios, denominados ramnogalacturonano I (RGI), ramnogalacturonano II (RGII) y xilogalacturonano (XG), unidos al esqueleto de homogalacturonano (HG), y con más de un 65% de ácido galacturónico (GaIA), como se muestra en la figura 5 (Max *et al.*, 2020). La relación entre las unidades de GaIA esterificadas con metilo y el total de unidades de GaIA en el esqueleto de HG indica el grado de esterificación (degree of esterification, por sus siglas en inglés DE) (Yang *et al.*, 2018).

Figura 5. Estructura química de la molécula de pectina. *Traducido y modificado de (Maxwell et al., 2012),*



De esta manera, las pectinas se clasifican de acuerdo con su grado de esterificación, alto grado de esterificación (HM) si posee un DE > 50% o de bajo grado de esterificación (LM) si es $DE \leq 50\%$, esto hace que tengan distintas propiedades y diversas aplicaciones en la industria (Wang *et al.*, 2018). Las pectinas HM tienen la capacidad de formar geles cuando se encuentran en soluciones con alta concentración de sólidos solubles y en medio ácido ($pH < 3,5$), y se estabilizan mediante puentes de hidrógeno intermoleculares y enlaces hidrofóbicos entre ésteres metílicos, este tipo de pectina se utiliza generalmente para la elaboración de jaleas, dulces y postres. Por otra parte, las pectinas LM forman geles en un amplio margen de pH (2,0 a 6,0) con la concentración adecuada de iones de calcio o cationes multivalentes (Martau *et al.*, 2019). La pectina utilizada en este estudio fue de alto grado de esterificación (HM), con un DE de 60% y tamaño máximo de partícula 0,3 mm (Laboratorios León SA, Bucaramanga, Colombia) (ficha técnica Apéndice A).

2.12 Degradación microbiana de la pectina

Las pectinasas son las enzimas que catalizan la degradación de polímeros pécticos y pertenecen a la familia de las polisacaridasas (Prathyusha y Suneetha, 2011). Se clasifican de

acuerdo a su modo de acción contra la cadena principal de las pectinas, compuesta de galacturonano (polisacárido compuesto de monómeros de ácido galacturónico). A grandes rasgos, se pueden dividir en dos grupos: las enzimas desesterificantes y las enzimas despolimerizantes. Además, también se pueden clasificar según el pH óptimo para su funcionamiento, de esta manera, se tiene pectinasas ácidas y alcalinas (Kavuthodi & Sebastian, 2018).

La producción de estas enzimas por microorganismos como hongos, bacterias y levaduras ha sido ampliamente estudiado y documentado; a continuación, se describe brevemente las pectinasas en estos organismos.

2.12.1 Producción de pectinasas por hongos

Los hongos filamentosos son los principales productores de enzimas pectinolíticas extracelulares, las cuales son capaces de descomponer la lámina media de las plantas, para que así puedan extraer los nutrientes presentes en los tejidos vegetales. La especie *Aspergillus niger*, es comúnmente utilizada para su producción de manera industrial (Pedrolli & Carmona, 2014).

2.12.2 Producción de pectinasas en levaduras

Solo unas pocas especies poseen la capacidad de producir estas enzimas. Luh y Phaff (1951), encontraron que solo seis especies (*Saccharomyces fragilis*, *S. fragilis* var. no. 351, *S. thermantitonus*, *Torulopsis kefyri*, *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa* y *Candida pseudotropicalis*) causaron un cambio significativo en la estructura de la pectina, obteniendo pecto-oligosacáridos. Posteriormente Alimardani-Theuil et al. (2011), adicionaron a esta lista las siguientes especies: *Cryptococcus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula dairenensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum klebahnii*, *Wickerhamomyces anomalus*.

2.12.3 Producción bacteriana de pectinasas

Las pectinasas bacterianas son producidas principalmente por bacterias que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Erwinia* (Chesson, 1980) y son de gran importancia para la producción a nivel industrial. Las cepas bacterianas productoras son preferidas a las fúngicas debido a la facilidad de producción mediante la fermentación; además, se ha demostrado que tienen la capacidad de producir pectinasas resistentes a cambios de pH (entre 5 a 10) y temperatura moderadamente elevada (hasta 50°C).

Las especies de *Bacillus spp.* constituyen más del 50% del mercado total de enzimas, ya que no tienen requisitos nutricionales exigentes, son fáciles de cultivar, manipular y conservar (Sohail & Latif, 2016). Asimismo, estas cepas son los principales productores por muchas razones más, las cuales incluyen: (i) poseen la capacidad de producir todas las clases de enzimas pectinolíticas, como lo son las hidrolasas pécticas (despolimerasas que rompen los enlaces α -(1,4)-glicosídicos de los monómeros galacturónicos por escisión hidrolítica), las liasas o trans-eliminadas (rompe los enlaces α -(1,4)-glicosídicos por trans eliminación, y se obtiene el éster galacturónido con doble enlace entre C-4 y C-5 en el extremo no reductor), las esterasas (hidrolizan el éster acetílico del homogalacturonano, para formar ácido péctico y acetato) y las propectinasas (pectinasas solubles en agua), (ii) el tiempo de fermentación es relativamente corto, (iii) se pueden utilizar desechos agrícolas como sustratos económicos, para disminuir el costo de producción, (iv) la información genética de muchas de sus especies se encuentra disponible en gran cantidad de bases de datos de secuencias de nucleótidos (Kavuthodi & Sebastian, 2018).

3. Estado del Arte

Los polihidroxicanoatos son una familia de poliésteres sintetizados por varios microorganismos, descubierto por primera vez por Lemoine en 1926 (Anderson et al., 1990).

Desde entonces los PHA han sido de interés comercial y de investigación, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, diversidad química y su fabricación a partir de recursos de carbono renovables (Shah et al., 2008). Por tanto, con la finalidad de conocer las investigaciones que hasta el momento se han desarrollado relacionadas con los polihidroxicanoatos, sus propiedades, síntesis y métodos de extracción, se utilizó la base de datos Scopus para realizar la búsqueda bibliográfica. De esta manera, se usó la palabra clave “polyhydroxyalkanoates” y se encontró que desde el año 1989 hasta la fecha (12 de septiembre de 2024) se han publicado 3700 artículos, 613 revisiones y 258 capítulos de libros. A continuación, se mencionan algunos de los recientes estudios.

M. Koller (2018) describió las propiedades materiales de los polihidroxicanoatos e identificó que estas dependen del tipo y la distribución de sus componentes en la cadena polimérica, por lo cual sus características van desde polímeros elastoméricos hasta polímeros semicristalinos similares a los termoplásticos. Asimismo, Raza et al. (2018) reportaron que, actualmente, existen más de 150 monómeros constituyentes de PHA y aún se desconoce la configuración enantiomérica de monómeros obtenidos principalmente de cepas microbianas recombinantes.

Por su parte, Favaro et al. (2019) estudió el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de PHA y también respecto al crecimiento celular, el potencial redox, el metabolismo celular, la productividad, la masa molecular, la calidad y la composición del polímero.

Otros estudios realizados enfatizan como la selección y el costo de la fuente de carbono se deben considerar como el parámetro principal para la producción del PHA a escala comercial (Bhatia et al., 2017). Debido a esto, en todo el mundo se han hecho investigaciones relacionadas con la valorización de diferentes tipos de fuentes de carbono para la síntesis microbiana de

polihidroxicanoatos, de modo que sea más rentable y ecológica (Saratale et al., 2021). De esta manera, un número creciente de empresas en diversas regiones han comenzado la producción de estos biopolímeros a escala comercial para posteriormente procesarlos y mediante moldeo por inyección o impresión 3D realizar artículos comerciales (Meereboer et al., 2020). Entre estas empresas se destaca Biomer, con sede en Schwalbach, Alemania, ya que fue uno de los primeros productores industriales de P(3HB) utilizando la cepa *Azohydromonas australica* a partir de sacarosa como materia prima de carbono (Patente alemana de 1983 N° 379.613). Biomer comercializa P(3HB) puro en forma de polvo para mezclarlo con otros polímeros de base biológico y su capacidad de producción es de 900 t por año (Koller & Mukherjee, 2022).

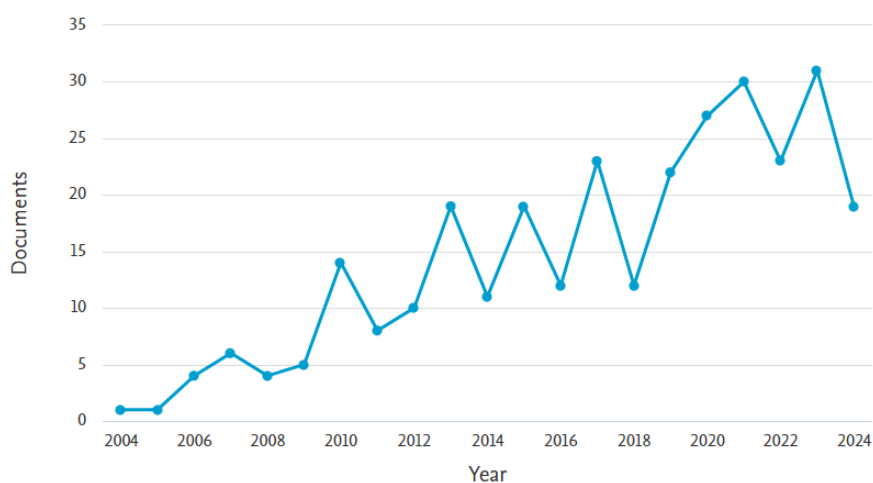
De acuerdo con Thomas et al. (2023) los avances en las tecnologías de producción de polihidroxicanoatos continúan mejorando, haciendo uso de desechos orgánicos como materia prima, para contribuir a un enfoque sostenible y circular. Además, la fermentación microbiana para la obtención de bioplásticos es un área actualmente activa en investigación y desarrollo. Asimismo, es importante tener en cuenta que la biodegradabilidad depende de diversos factores como lo son la composición del material y las condiciones a las que se encuentra expuesto (Meereboer et al., 2020).

Por otra parte, según la información obtenida de Scopus, en los últimos 20 años se ha observado un gran aumento en el número de publicaciones que involucran los términos “*Bacillus*” y “polihidroxicanoatos” (figura 6). Esto indica que, el género *Bacillus*, cada vez está ganando más importancia en esta línea de investigación. De acuerdo con Mohapatra et al. (2017), estos microorganismos presentan una alta tasa de crecimiento y altos rendimientos de producción de PHA, cuando se encuentra en un medio con nutrientes restringidos y fuentes de carbono de bajo costo. Algunas de estas especies poseen la capacidad de producir heteropolímeros de PHA libres

(no se encuentran unidos a ninguna otra molécula dentro del microorganismo), dependiendo del sustrato utilizado en la fermentación. Otra de las propiedades relevantes de las especies de *Bacillus* es que por su conveniencia para la modificación genética y sus ciclos de fermentación cortos, son adecuados para la ingeniería genética (Cai et al., 2019). Por estas razones, *Bacillus spp.* son los candidatos ideales para la producción de PHA a nivel industrial.

Entre los *Bacillus*, *Bacillus cereus* es muy buen candidato para la biosíntesis de PHA, debido a su gran diversidad ecológica, ya que se encuentra en diferentes nichos, lo que le permite exhibir diferentes propiedades adaptativas y productivas (Evangeline & Sridharan, 2019). De manera similar, *Bacillus thuringiensis* es un microorganismo agrícola muy conocido por su producción de esporas, que contienen una proteína cristalina conocida como Cry (δ -endotoxinas), la cual es altamente tóxica para una amplia variedad de insectos. Del mismo modo, su rasgo más significativo es su capacidad de producir PHA en diversas muestras de ambiente, como suelo, lodos, sedimentos marinos, entre otros (Ponnusamy et al., 2019).

Figura 6. Tendencia creciente en las publicaciones que involucran el género *Bacillus* como productor de polihidroxicanoatos (PHA).



De acuerdo con Odeniyi & Adeola (2017), la cepa *Bacillus thuringiensis* mostró la capacidad de acumular PHA cuando se les suministró sustratos renovables de carbono como salvado de maíz, mazorca y salvado de trigo, en condiciones óptimas de fermentación (pH 7,0, temperatura 37°C y 48 horas de incubación) encontraron que el rendimiento era de 21,05%, 30,0% y 44,96%, respectivamente. Por otra parte, Tello-Cruzado et al (2024), realizaron una investigación con esta misma cepa acerca de cómo utilizar los residuos agroindustriales de espárragos, como una fuente de carbono potencial para la producción de biopolímeros del tipo PHA. Al suministrar 47% del sustrato hidrolizado y realizar el proceso a 30°C, agitación de 125 rpm durante 72 horas, obtuvieron 0,138 g/L como máxima producción de PHA.

También se ha documentado la capacidad de la cepa *Bacillus cereus* para producir polihidroxialcanoatos con cáscara de uva pre-tratada como única fuente de carbono, logrando una acumulación de PHB de 18,79% (*p/p*), correspondiente a 0,53 g/L de PHB después de 72 horas de fermentación (Anderl et al., 2021). Del mismo modo, Grigary & Umesh (2023) realizaron un estudio para el aprovechamiento de residuos florales como materia prima en la síntesis de polihidroxialcanoatos con la bacteria *Bacillus cereus*. El medio de cultivo estuvo compuesto por hidrolizado de desechos de jazmín, glucosa (1,2 % *p/v*), extracto de levadura (0,15 % *p/v*), NaCl (5,0 % *p/v*) y período de incubación (60 h), con estas condiciones lograron un rendimiento máximo de PHA de 1,13 g/L.

Otro tópico de gran importancia son los métodos de extracción del biopolímero sintetizado, Rodríguez et al. (2022) reportaron que el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) producido a escala piloto por un cultivo microbiano mixto, se logró extraer mediante digestión de la masa celular de PHA. Las condiciones óptimas para la digestión con NaOH (0,3 M, 4,8 h) y NaClO (9,0 %, 3,4 h) dieron como resultado polímeros con una pureza de PHA del 99 % y una recuperación

de aproximadamente el 90%. Asimismo, se han presentado otros métodos de extracción con solventes no halogenados como la acetona, Bartels et al. (2020) encontraron que al utilizar la acetona con una fracción de 2-propanol de hasta un 30% se logra extraer con éxito hasta el 95% del polímero poli(3-hidroxi butirato- co -3-hidroxi hexanoato) (P(HB- co -HHx)). En cuanto a la caracterización de los polímeros se han estudiado diferentes métodos como lo son espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS), para determinar la estructura química del PHA producido y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), para complementar la caracterización química (Patil et al., 2024). Por su parte, Bano et al. (2024) reportaron como opciones viables para la caracterización, técnicas como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), ya que es un método eficaz y no destructivo que permite analizar la composición, la microestructura y la secuencia de monómeros de PHA.

En las investigaciones presentadas anteriormente se evidencia la importancia que tienen los microorganismos productores de polihidroxialcanoatos, en especial los pertenecientes al género *Bacillus*, así como la necesidad de estudiar diversas fuentes de carbono que permitan su crecimiento. Para de esta manera mitigar la dependencia de los plásticos de origen fósil ya que los PHA ofrecen enormes ventajas como polímeros biodegradables y biocompatibles.

4. Metodología

Se aplicó la siguiente metodología para la optimización de la producción de polihidroxialcanoatos a partir de pectina como fuente de carbono, y su posterior extracción y caracterización.

Etapa 1: Determinación de la tasa de degradación de pectina por parte de los microorganismos *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*

4.1.1 Preparación de medios de cultivos sólidos para el crecimiento de los microorganismos

Se utilizaron las bacterias *Bacillus thuringiensis* (C01) y *Bacillus cereus* (C02), las cuales fueron previamente aisladas, caracterizadas e identificadas en el grupo de investigación GIBIM (uso del permiso Marco de recolección IDB0398, publicados en el Sistema de Información sobre Biodiversidad en Colombia – SiB Colombia; https://ipt.biodiversidad.co/permisos/resource?r=microorganismos_pha_suelos_santander) (Mier, 2022), las cuales fueron repicadas en un medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB) (composición: triptona 1% *p/v*, extracto de levadura 0,5% *p/v*, NaCl 1% *p/v* y agar-agar 15 g/L) siguiendo la metodología reportada por Berezina (2013). Este medio fue preparado con agua tipo I y posteriormente autoclavado durante 30 minutos en una autoclave automática (modelo 2020, JP Inglobal, Colombia). Esta solución se dejó enfriar hasta 45 °C, para luego en la cabina de flujo laminar servir de 15 a 17 mL en cajas de Petri y dejar solidificar. Al siguiente día se verificó si había algún tipo de contaminación, y se procedió a realizar la siembra por agotamiento con un asa bacteriológica metálica, previamente esterilizada utilizando un bacto-incinerador (modelo SKU HY800, MIULAB, China). Los medios de cultivos sembrados se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 29,5 °C (modelo BD 56, BINDER GmbH, Alemania).

4.1.2 Evaluación semicuantitativa de la actividad pectinolítica

Para cada bacteria se prepararon tres cajas Petri con medio de cultivo sólido suplementado con pectina con la siguiente composición: 3 g/L de KH_2PO_4 , 6 g/L de Na_2HPO_4 , 2 g/L de NH_4Cl , 5 g/L de NaCl, 0.1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 15 g/L de agar-agar y 2 g/L de pectina cítrica rápida

con 60% de grado de metoxilación (Laboratorios León SA, Bucaramanga, Colombia) (Apéndice A). El pH se ajustó a 7,0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl), ambas de concentración 1 M.

La semi-cuantificación se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Kabir y Tasmim (2019). Brevemente, en un vial de vidrio de 10 mL previamente esterilizado, se adicionaron 3 mL de agua tipo I y con un asa bacteriológica metálica se le transfirió una colonia bacteriana desde el medio LB sólido, seguidamente se incubó durante 24 horas. Pasado este tiempo, se ajustó la población bacteriana del vial utilizando como estándar de turbidez la escala de McFarland N° 1 ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL) (Apéndice A) (McFarland, 1907). Seguidamente se tomaron 10 μ L del inóculo correspondiente a cada cepa bacteriana y se depositó en el centro de los medios de cultivos sólidos suplementados con pectina preparados anteriormente, y estos se llevaron a incubación durante 72 horas a 30,0 °C.

Se preparó una solución de Lugol al 5% p/v, disolviendo 5 g de I₂ y 10 g de KI en 85 mL de agua destilada (Hernández & Arambarri, 2019) y, una vez finalizadas las 72 horas de incubación, se adicionó 2 mL de la solución de Lugol sobre las colonias de cada cepa bacteriana. La formación de un halo traslúcido es prueba positiva de hidrólisis de pectina; el resultado se expresó en términos del diámetro del halo formado (en mm) para cada ensayo.

4.1.3 Preparación del inóculo para los experimentos de fermentación

Se siguió la metodología reportada por (Arcos *et al.*, 2004). La activación de cada microorganismo se llevó a cabo en medio de cultivo líquido (20 mL en un vial de vidrio) con la siguiente composición: peptona 17 g/L, glucosa 2 g/L, NaCl 5g/L y K₂HPO₄ 2,5 g/L, luego se esterilizó en autoclave automática durante 30 minutos a una temperatura entre 112-121°C. Posteriormente, a cada uno de los viales se les transfirió una colonia de cada cepa bacteriana desde

el medio LB sólido, y se dejó incubar durante 24 horas a 29,5 °C y 150 rpm en la incubadora (Orbital Digital JPSHID40, JP inglobal, Colombia) (Arroyave *et al.*, 2013).

Luego de este tiempo, se cuantificó la concentración del inóculo utilizando la escala McFarland como referencia, la cual se basa en comparar la turbidez de diferentes soluciones de BaCl₂ y H₂SO₄, midiendo su absorbancia a 595 nm (Apéndice A) (McFarland, 1907). Para esto, se utilizó como blanco 200 µL del medio de cultivo de activación sin inóculo y 200 µL del medio de cultivo con inóculo como muestra, se depositaron en una microplaca de 96 pozos de fondo plano y se midió la densidad óptica (595 nm) en un lector de microplacas (EPOCHH, Agilent Technologies, USA). La absorbancia corregida se determinó restando el blanco a la absorbancia de la muestra. Posteriormente, se prepararon diluciones del inóculo hasta obtener una absorbancia correspondiente a la concentración del estándar McFarland N°2 (equivalente a 6.0 x 10⁸ UFC/mL)

4.1.4 Curva de crecimiento de los microorganismos utilizando glucosa y pectina como fuente de carbono

A partir del inóculo que se preparó anteriormente, se adicionó 3 mL en matraces Erlenmeyer con 150 mL de medio de cultivo líquido (estéril) mínimo de sales (1,0 g/L (NH₄)₂SO₄, 1,5 g/L KH₂PO₄, 9 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, 1 mL/L de la solución de metales; la solución de metales (por litro): 10 g FeSO₄ · 7 H₂O, 2,25 g ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g MnSO₄ · 5 H₂O, 2 g CaCl₂ · 2 H₂O, y 1 g CuSO₄ · 5 H₂O) (Wang *et al.*, 2014) suplementado con: 10 g/L de pectina como fuente de carbono (Experimento 1) y, 10 g/L de pectina como fuente de carbono principal y 0.5 g/L de glucosa como fuente de carbono complementaria (Experimento 2).

Los cultivos microbianos se incubaron durante 72 horas a 29,5 °C y 150 rpm (Riedel *et al.*, 2015). El crecimiento bacteriano se midió a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación, tomando 200 µL del medio y midiendo su absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas (EPOCHH, Agilent

Technologies, USA). Asimismo, se tomaron 2 mL de muestra en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 8000 rpm durante 8 minutos (modelo Microspin 12, Boeco, Germany) y se realizó los siguientes ensayos que se describen a continuación:

4.1.5 Monitoreo de la degradación de pectina

La concentración de pectina presente en los medios de cultivo se determinó utilizando solución de Lugol 1% (p/v). Para esto, se construyó una curva de calibración con concentraciones de pectina entre 0,1 a 20 g/L (Apéndice B), la cual dio como resultado para la regresión lineal de los datos la siguiente ecuación: $y = 0,0052x + 0,0361$, y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9992$, donde “y” es la absorbancia de la muestra y “x” es la concentración.

Posterior a la centrifugación de las muestras (cada 24 horas), se tomó 500 mL del sobrenadante y se adicionó 25 μ L de Lugol, y se dejó reaccionar para que tuviera lugar la despolimerización de la pectina durante 2 minutos. Luego, se transfirió 200 μ L a una microplaca de fondo plano y se midió la absorbancia a 680 nm en el lector de microplacas (EPOCHH, Agilent Technologies, USA) (Cubero-Agüero et al., 2021).

4.1.6 Cuantificación de azúcares reductores

Para esto se utilizó el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) reportado por (Gil et al., 2006). Este reactivo se preparó disolviendo 8 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 200 mL de agua destilada, seguidamente se adicionó lentamente y con agitación 150 g de tartrato de sodio-potasio y se completó hasta 400 mL con agua destilada, luego se agregó 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se adicionaron nuevamente 100 mL de agua y se dejó en agitación durante 12 horas.

La curva de calibración para esta prueba se realizó utilizando concentraciones de glucosa en un rango de 0,2 a 1,0 g/L (Apéndice C). De esta manera se obtuvo como ecuación de la regresión lineal $y = 0,082x + 0,0464$, y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9994$.

De esta manera, se tomó 167 μL del sobrenadante de cada una de las muestras centrifugadas y se adicionó en tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio, se adicionó también 167 μL del reactivo de DNS, posteriormente se calentó en un recipiente con agua a 92 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, la reacción se detuvo colocando los tubos de ensayo en agua fría durante 1 minuto, y se añadió 1666 μL de agua tipo I. Se transfirieron 200 μL desde los tubos de ensayo a una microplaca de fondo plano y se midió su absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas (EPOCHH, Agilent Technologies, USA) (Burgos, 2018).

4.1.6 Cuantificación de proteínas

Se realizó el ensayo de Bradford (Noble & Baile, 2009), para cuantificar las proteínas totales producidas. Para esto, en primer lugar se preparó el reactivo de Bradford, disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95% (v/v), seguidamente se adicionaron 100 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% (v/v), y se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada.

Las soluciones patrón se prepararon con albúmina de suero bovino (BSA) con concentraciones de 0,1 a 1,0 g/L y se obtuvo la siguiente ecuación para la regresión lineal $y = 0,2515x + 0,2002$, y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9985$.

Luego, se tomaron 5 μL del sobrenadante de cada muestra centrifugada y se mezclaron con 250 μL del reactivo de Bradford, pasados 2 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas (EPOCHH, Agilent Technologies, USA).

Etapa 2: Comparación del rendimiento en la producción de PHA bajo condiciones óptimas de fermentación utilizando pectina como fuente de carbono para las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*

4.2.1 Optimización clásica de un factor a la vez de las condiciones de fermentación: Diseño de Plackett-Burman.

Se siguió metodología reportada por Rond’ošová et al. (2022). La optimización se basó en aumentar el porcentaje de producción de PHA con respecto a la biomasa seca obtenida en la fermentación, haciendo variaciones en un solo factor mientras los demás se mantenían constantes. En todos los experimentos se utilizó como inóculo bacteriano 3 mL con una concentración de $6,0 \times 10^8$ UFC/mL que se adicionaron en un matraz con 150 mL de medio líquido mínimo de sales. Se llevaron a incubación durante 72 horas a 30 °C y velocidad de agitación de 150 rpm. La población bacteriana se midió a las 0, 24, 48 y 72 horas, con la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas (EPOCHH, Agilent Technologies, USA). Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos se compararon con base en el peso celular seco al final de la fermentación (sección 4.2.2) y la cuantificación del porcentaje de biopolímero (sección 4.3.1). Cada una de las pruebas de optimización se realizó por triplicado y se les calculó el promedio y la desviación estándar.

4.2.1.1 Efecto de la concentración de pectina

Como fuente de carbono se estudió dos concentraciones de pectina cítrica rápida con 60% de grado de metoxilación (Laboratorios León SA, Bucaramanga, Colombia) (Apéndice A). Las concentraciones utilizadas fueron 10 y 20 g/L.

4.2.1.2 Efecto de la concentración y fuente de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno son de gran importancia para la producción de PHA. Por tanto, como fuente de nitrógeno se utilizó peptona, extracto de levadura y sulfato de amonio

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, cada una en una concentración de 0,2 % (p/v) y una combinación de extracto de levadura (0,1 % p/v) con sulfato de amonio (0,1 % p/v) (Alsafadi et al., 2020).

Luego de seleccionar la mejor fuente de nitrógeno, se realizó el mismo procedimiento experimental evaluando las concentraciones de 0,2%, 0,4% y 0,6% p/v para identificar la concentración óptima de fuente de nitrógeno, para de esta manera estudiar el efecto de la limitación de nitrógeno (Muneer et al., 2022).

4.2.1.3 Efecto del pH

El ajuste de pH se realizó con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M y con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M. Se estudió el efecto del pH ácido (6,0), neutro (7,0) y básico (8,0) en el crecimiento bacteriano y acumulación de PHA (Desouky et al., 2014).

4.2.1.4 Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo

De acuerdo con Yadav et al. (2017), se analizó el efecto del fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) con las siguientes concentraciones: 7,0 g/L, 4,5 g/L y 2,2 g/L. Mientras que el efecto del fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) se estudió con concentraciones de 2,0 g/L, 1,25 g/L y 0,5 g/L.

4.2.1.5 Efecto de la temperatura de incubación

El efecto de esta variable física en la incubación se estudió en un rango de 23 a 37 °C para encontrar la temperatura óptima para la producción de PHA.

4.2.2 Determinación de la biomasa seca

Pasadas las 72 horas de incubación, se tomó una muestra de 10 mL de forma aséptica de cada uno de los experimentos en tubos Falcon de 15 mL. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 6.000 rpm a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. El pellet celular

obtenido se lavó dos veces con 15 mL de gua tipo I (estéril), en cada uno de los lavados se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el líquido sobrenadante para eliminar los residuos del medio de cultivo.

La biomasa fresca fue resuspendida en 1 mL de agua tipo I (estéril) y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL previamente secado y pesado. Las muestras se secaron en un termobloque con agitador (modelo HM100-Pro, Dlab, China) durante 48 horas a 55 °C y se pesaron en una balanza (modelo HR-259, A&D Company Limited, Japón) para determinar la biomasa seca presente en la muestra (Getachew & Woldesenbet, 2016).

Etapas 3: Cuantificación, identificación y caracterización del tipo de monómero del PHA obtenido como producto de la fermentación microbiana

4.3.1 Cuantificación y extracción del PHA producido por el aislado bacteriano

Para la cuantificación y extracción del bipolímero se empleó la metodología propuesta por Ojha y Das (2020). Pasado el tiempo de incubación (72 h) se centrifugó el medio de cultivo bacteriano (150 mL) en tubos Falcon de 50 mL en una centrifuga (modelo Z-206-A, Hermle Labortechnik, Alemania) durante 10 minutos a 6000 rpm y temperatura ambiente. Los pellets celulares se lavaron dos veces con 20 mL de agua tipo I (estéril) y se retiró el líquido sobrenadante. Posteriormente las muestras se suspendieron en 1,5 mL de agua tipo I (estéril), y se traspasaron a un tubo Eppendorf de 2 mL. La biomasa se secó en el termobloque con agitador (modelo HM100-Pro, Dlab, China) a 55 °C, durante 48 horas para retirar toda la humedad presente.

Se tomó una muestra de 25 mg de biomasa celular seca y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se le añadió 300 µL de hipoclorito de sodio (4%) y 700 µL de cloroformo (99,8% pureza, Merck). Esta mezcla se llevó a un vortex (modelo Vortexer, Heathrow Scientific, USA) y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Luego de esto, a la muestra se le realizó un baño de

ultrasonido (modelo Elmasonic Easy 10H, Elma Schmidbauer GmbH, Alemania) durante 10 minutos a 30 °C.

Después, se centrifugó 5 minutos a 8000 rpm, para obtener tres fases separadas. Se descartó la primera fase, la segunda fase (correspondiente a biomasa celular) se conservó para la siguiente extracción (se realizaron dos extracciones adicionales) y la tercera, correspondiente a la fase orgánica – cloroformo - se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL; la fase orgánica fue recuperada de cada extracción. Para precipitar el polímero, se adicionó lentamente 2,8 mL de metanol frío (grado HPLC, Merck) a la fase orgánica obtenida (cloroformo), formándose un precipitado de color blanco correspondiente al biopolímero de PHA.

El resultado de esta precipitación se centrifugó durante 20 minutos a 6000 rpm y se decantó la mezcla de cloroformo y metanol. El precipitado (biopolímero de PHA) se resuspendió nuevamente en 1 mL de cloroformo, se filtró (con un filtro de PTFE 0,22 µm) y se adicionó en un Eppendorf previamente pesado y seco. El biopolímero purificado se secó y pesó hasta obtener una masa constante.

El rendimiento de producción de PHA en la biomasa celular se expresó en términos de porcentaje como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de producción de PHA (\%)} = \frac{\text{Peso seco del PHA extraído}}{\text{Peso de la Biomasa celular seca}} \times 100$$

4.3.1.1 Análisis estadístico

A menos de que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizaron por triplicado. De modo tal que los resultados se expresaron en términos de media aritmética \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los grupos de análisis se probaron mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Asimismo, en los grupos que se

observó un nivel de significancia $p \leq 0,05$, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples por pares utilizando la prueba de *t-student* y la prueba del rango múltiple.

Se utilizó Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) para procesar todos los datos iniciales obtenidos, Origin2024b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) para graficar los resultados y Statgraphics Centurion 19 (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA) para el análisis estadístico de los datos experimentales.

4.3.2 Determinación del punto de fusión del PHA obtenido

Para la caracterización del punto de fusión se utilizó un fusiómetro (modelo Mel-Temp 1201D, Barnstead International, USA), con resolución de temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$. La muestra pulverizada de los biopolímeros producidos por las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*, se adicionaron en un capilar con diámetro de 1,75 mm y se compactó. Posteriormente, se calentó el capilar desde 30°C hasta 180°C , se realizaron tres réplicas de la medición y se representó por el promedio con la desviación estándar.

4.3.3 Caracterización del biopolímero mediante FTIR

Se utilizó un espectrómetro (FT/IR-4X, Jasco Inc, Japón) con un rango espectral de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ para registrar los espectros infrarrojo. Para el análisis se empleó una resolución de 4 cm^{-1} y 20 barridos durante un tiempo estimado de 01:20 min. Los espectros obtenidos se visualizaron en el software Spectra Manager Ver. 2.5 (Jasco Inc, Japón).

4.3.4 Caracterización del biopolímero mediante GC/MS

Para este análisis, se requirió derivatizar la muestra a estudiar. Para esto, se empleó la metodología descrita por Paula R (2024). Brevemente, se pesó 100 mg de biomasa bacteriana (sin secar) en un tubo Falcon de 15 mL, y se adicionó 1 mL de agua tipo I (estéril), se agitó en vortex

(modelo Vortexer, Heathrow Scientific, USA) por 10 minutos y posteriormente se llevó a un baño de ultrasonido (modelo Elmasonic Easy 10H, Elma Schmidbauer GmbH, Alemania) por 10 minutos más a 25 °C. Seguido a esto, se agregó 1 mL de cloroformo (99,8 % de pureza, Merck), se agitó en vortex y se llevó a ultrasonido por 10 minutos más. Esta solución se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm (modelo Z-206-A, Hermle Labortechnik, Alemania), para así obtener la fase acuosa, la fase orgánica con el polímero disuelto y los residuos celulares. Se recolectaron 600 μL de la fase orgánica y se transfirió a un vial de reacción de vidrio G10, se adicionó 400 μL de cloroformo, más 1 mL de solución derivatizante (metanol 95% v/v y ácido sulfúrico 5% v/v).

La reacción de derivatización se realizó en un reactor de microondas (Monowave 200, Anton Para, Austria) durante 7 minutos a 160 °C. Terminada la reacción se agregó 1 mL de carbonato de sodio al 3% (v/v) para neutralizar el ácido sulfúrico, se agitó durante 10 minutos en vortex y se decantó la fase acuosa (solución acuosa de carbonato de sodio, ubicada en la parte superior), la fase orgánica (cloroformo con el biopolímero disuelto) se conservó y se le realizaron nueve lavados más con la solución de carbonato de sodio siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, para el análisis por GC-MS, se utilizaron 100 μL de la fase orgánica y se diluyó con 100 μL de cloroformo (99,8 % de pureza, Merck); de esta dilución, se transfirió 50 μL a un vial ámbar de 1,5 mL y se adicionó 950 μL de cloroformo (99,8 % de pureza, Merck) para el respectivo análisis cromatográfico.

La muestra preparada anteriormente, se llevó a análisis en un cromatógrafo de gases (modelo 7890B, Agilent Technologies, USA) con una columna capilar apolar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) acoplado a un espectrofotómetro de masas (modelo 5977B, Agilent Technologies, USA) flujo de 1 mL/min de helio (99% pureza), inyección de muestra 1 μL , en modo splitless con una temperatura inicial de 35 °C y con una rampa de temperatura de 10 °C/min hasta 250 °C. Los

cromatogramas se analizaron en el software Qualitative Analysis MassHunter Workstation Version B.07.00 (Agilent Technologies, Inc, California, USA).

4.3.5 Análisis por resonancia magnética nuclear

El protocolo reportado por Iza Radecka et al. (2016) fue utilizado en el estudio. Se disolvieron 10 mg de muestra de biopolímero en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3) y se midieron en un equipo Bruker de 400,00 MHz. Se realizó la toma de los espectros de ^1H , ^{13}C y los bidimensionales COSY, HMBC y HSQC. Los espectros obtenidos se analizaron utilizando el software Mestre Nova 15 (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, España).

5. Resultados y discusión

Etapa 1: Determinación de la tasa de degradación de pectina por parte de los microorganismos *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*

5.1.1 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática

Se evidenció que las bacterias *Bacillus thuringiensis* (C01) y *Bacillus cereus* (C02) formaron halos translucidos de hidrólisis como indicativo de la degradación de pectina (figura 7) en medio sólido. Los diámetros promedio de degradación fueron de $3,8 \pm 0,2$ cm y $3,1 \pm 0,1$ cm respectivamente, lo cual indica que la bacteria *Bacillus thuringiensis* posee mayor actividad pectinolítica.

Las pectinasas son las enzimas que catalizan la degradación de los polímeros pécticos. De acuerdo con Kavuthodi y Sebastian (2018), las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son los principales productores de pectinasas alcalinas, estos microorganismos en condiciones óptimas de fermentación tienen la capacidad de producir de 20-25 g/L de enzimas extracelulares. Los *Bacillus*

spp. tienen la capacidad de producir todas las clases de enzimas pectinasas, como lo son las hidrolasas pécticas (despolimerasas que rompen los enlaces α -(1,4)- glicosídicos de los monómeros galacturónicos por escisión hidrolítica), las liasas o *trans*-eliminadas (rompe los enlaces α -(1,4)- glicosídicos por eliminación *trans*, y se obtiene el éster galacturónico con doble enlace entre C-4 y C-5 en el extremo no reductor), las esterasas (hidrolizan el éster acetílico del homogalacturonano, para formar ácido péctico y acetato) y las propectinasas (pectinasas solubles en agua).

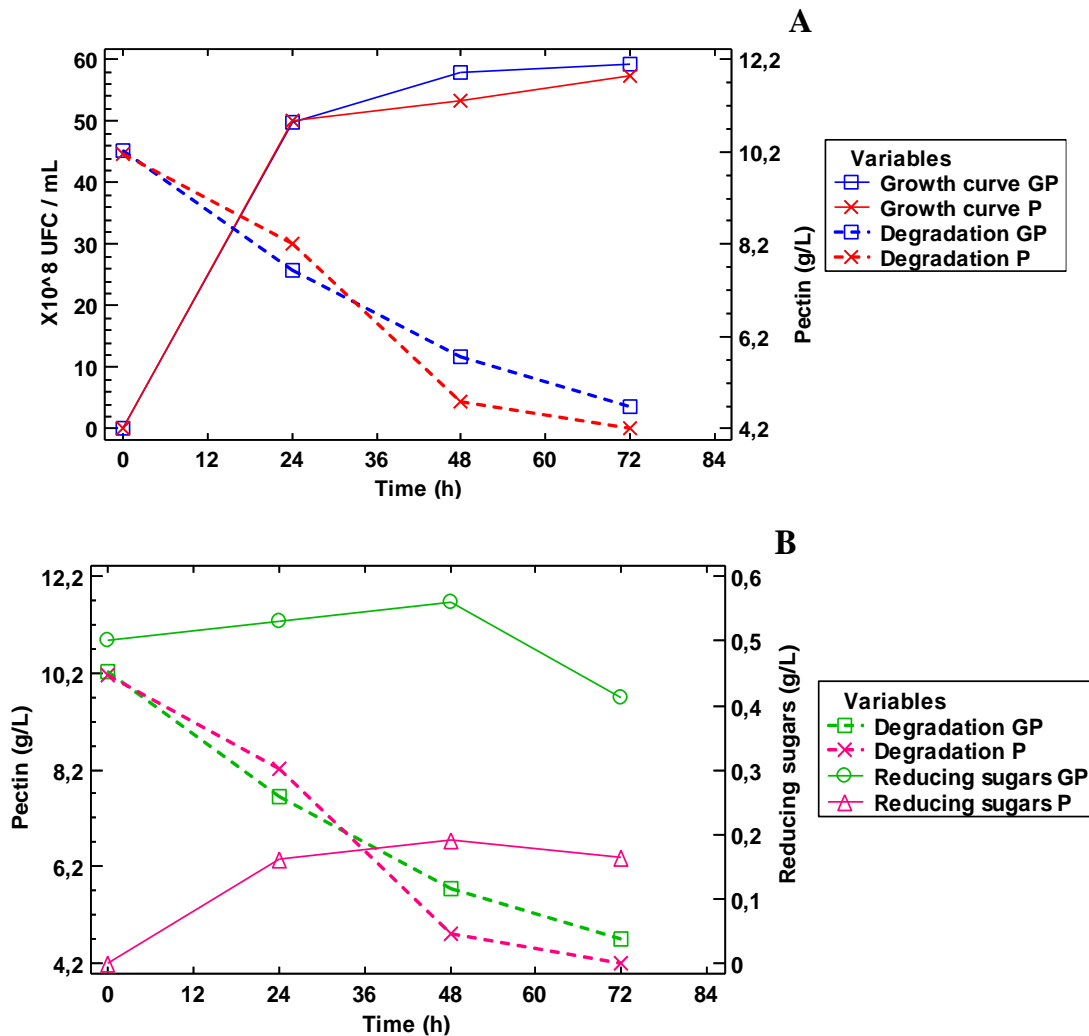
Figura 7. Halo de degradación de pectina formado por las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*.



5.1.2 Análisis del crecimiento con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria

Al realizar la fermentación con la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con glucosa y pectina (GP) y sin glucosa (P) como fuente de carbono complementaria, se determinó que el crecimiento bacteriano pasadas las 72 horas era de $59,2 \pm 2,6 \times 10^8$ UFC/mL en el medio suplementado con glucosa y pectina, mientras que en el medio con solo pectina fue de $57,4 \pm 3,7 \times 10^8$ UFC/mL. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos experimentales, como se muestra en la figura 8, ya que el valor de *p* para las dos colas fue de 0,6751, siendo mucho mayor al nivel de significancia utilizado (prueba *t* de *student*, $p > 0,05$) (Apéndice F)

Figura 8. (A) Curva de crecimiento bacteriano y degradación de pectina durante la fermentación para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria: Glucosa y pectina (GP), solo pectina (P). (B) Degradación de pectina y cuantificación de azúcares reductores en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria.

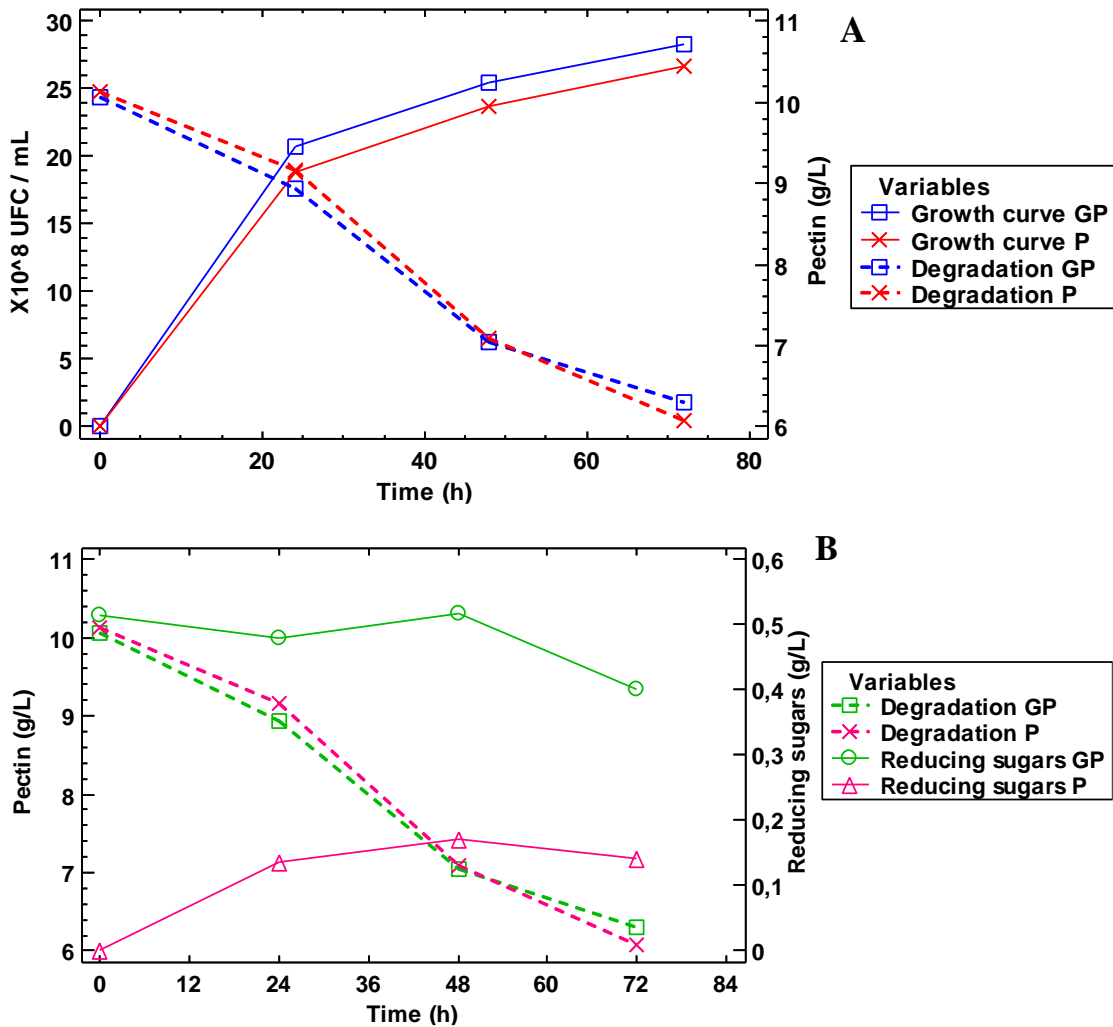


Por otra parte, resultados similares se determinaron para la bacteria *Bacillus cereus*; con la presencia de glucosa, se determinó $28,3 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/mL, mientras que con solo pectina fue de $26,6 \pm 0,5 \times 10^8$ UFC/mL (figura 7). Si bien se observa una tasa de crecimiento bacteriano

ligeramente mayor con el medio GP, al realizar el análisis estadístico se determinó que si existen diferencias significativas entre los dos tratamientos, ya que el valor de p fue de 0,00163 (prueba *t-student*, $p < 0,05$) (Apéndice G).

De esta manera, los resultados aquí reportados están en correspondencia con lo reportado por Rodríguez (2018), donde sugiere que al adicionar glucosa como fuente de carbono suplementaria en el medio de cultivo mínimo de sales, se podría potenciar el crecimiento microbiano y su actividad metabólica durante los periodos de fermentación. Asimismo, de acuerdo con Sirotek et al. (2004), los microorganismos tienden a utilizar glucosa en su fase inicial de crecimiento (fase de latencia, periodo de adaptación del microorganismo) como fuente de carbono, para luego, degradar las macromoléculas de pectina mediante las enzimas pectato liasas y pectinasas.

Figura 9. (A) Curva de crecimiento bacteriano y degradación de pectina durante la fermentación para la bacteria *Bacillus cereus*, en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria: Glucosa y pectina (GP), solo pectina (P). (B) Degradación de pectina y cuantificación de azúcares reductores en el medio de cultivo con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria.



5.1.3 Monitoreo de la degradación de pectina

La medición de la tasa de consumo de la fuente de carbono utilizada durante la fermentación bacteriana es un parámetro crucial, ya que permite controlar y optimizar el proceso. En este caso, se monitoreó la degradación de pectina, como se observa en la figura 8. De esta manera, para la bacteria *Bacillus thuringiensis* se encontró que la concentración de pectina en el medio GP disminuyó de 10,07 g/L (concentración inicial) a $4,7 \pm 0,26$ g/L en 72 horas de fermentación. Por otra parte, en el medio suplementado únicamente con pectina (P) se encontró que la concentración disminuyó de 10,12 g/L (concentración inicial) a $4,2 \pm 0,09$ g/L. Se realizó el

análisis estadístico a la concentración final de ambos experimentos y se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.00046$) (Apéndice I).

De igual forma, la degradación de la pectina con la bacteria *Bacillus cereus* fue de 10,05 a $6,30 \pm 0,25$ g/L luego de 72 horas en el medio con glucosa (GP), mientras que con solo pectina (P) disminuyó desde 10,13 hasta $6,07 \pm 0,11$ g/L (ver figura 9), los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Apéndice I).

Los resultados observados en la figura 8 y 9 demuestran la disminución significativa de la concentración de pectina en todos los casos estudiados. Resultados similares fueron reportados por Fontana y Silveira (2019), donde mencionan que la glucosa posee un efecto inductor sobre la producción de enzimas pectinasas, especialmente las endo y exopoligalacturonasa, lo cual explica por qué en ambas bacterias, la disminución de la concentración de pectina fue mayor en los medios que se complementaron con glucosa. Por otra parte, Dušková y Marounek (2001) encontraron que dos sustratos pueden ser utilizados como fuente de carbono simultáneamente para el crecimiento bacteriano, y esto podría llegar a ser beneficioso para la adaptación del microorganismo.

5.1.4 Cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo

En la figura 8 se observa que la concentración máxima de azúcares reductores en el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* se obtuvo después de 48 horas de incubación, y fue de $0,19 \pm 0,01$ g/L y $0,56 \pm 0,01$ g/L en el medio que contenía únicamente pectina (P) y pectina más glucosa (GP) como fuente de carbono, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la concentración final entre ambos experimentos ($p < 0.001$) (Apéndice K).

El mismo comportamiento se encontró con la bacteria *Bacillus cereus*, ya que en ambos experimentos la concentración máxima de azúcares reductores se obtuvo a las 48 horas de

fermentación. Siendo con solo pectina (P) de $0,14 \pm 0,03$ g/L de azúcares reductores y $0,40 \pm 0,01$ g/L en el medio suplementado con glucosa (GP) (ver figura 9). Los resultados del análisis estadístico indican que la concentración final de ambos experimentos difiere significativamente ($p = 0.00036$) (Apéndice K).

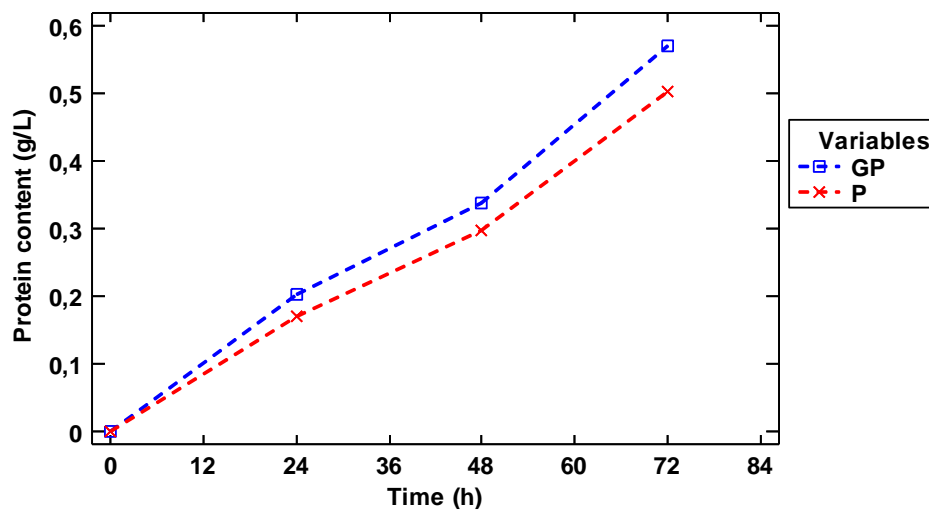
Rodríguez (2018) sugiere que el adicionar glucosa al medio de cultivo microbiano, se podría potenciar el metabolismo durante el periodo de incubación. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos experimentalmente, ya que ambas bacterias fueron capaces de degradar simultáneamente las dos fuentes de carbono suministradas (glucosa y pectina). Para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, luego de 72 horas de fermentación, la degradación de pectina fue de 54,4% y la producción de azúcares reductores de 21,2 % en el medio de cultivo GP, mientras que en el medio P, la degradación de pectina aumentó ligeramente, siendo de 58,7 %, sin embargo, en el caso de los azúcares reductores se identificó que en las primeras 48 horas se produjeron 0,12 g/L, debido a la hidrólisis de la pectina, y a las 72 horas se evidenció un porcentaje de degradación de estos azúcares de 14,2% con respecto a la concentración a las 48 horas. En el caso de la bacteria *Bacillus cereus*, en el medio GP el porcentaje de degradación de pectina fue de 37,4 % y la producción de azúcares reductores de 21,6 %, este último muy similar al reportado para la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Por otra parte, en el medio de cultivo P, la degradación de pectina aumentó a 40,08% y en las primeras 48 horas de incubación se produjeron 0,137 g/L de azúcares reductores y de estos, el 20,9 % se degradaron a las 72 horas.

5.1.5 Cuantificación de proteínas en el medio de cultivo

En cuanto a la producción de proteínas en el medio de cultivo de fermentación se encontró la producción máxima a las 72 horas. Para la bacteria *Bacillus thuringiensis* fue de $0,569 \pm 0,029$ g/L en el medio con glucosa y pectina (GP), mientras que con solo pectina (P) fue de $0,503 \pm 0,031$

g/L (figura 10). Al aplicar una prueba t de *student* para muestras independientes, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones finales de ambos experimentos ($p = 0,0080$) (Apéndice M), esto sugiere que las condiciones experimentales influyeron de manera diferencial en la concentración de proteínas.

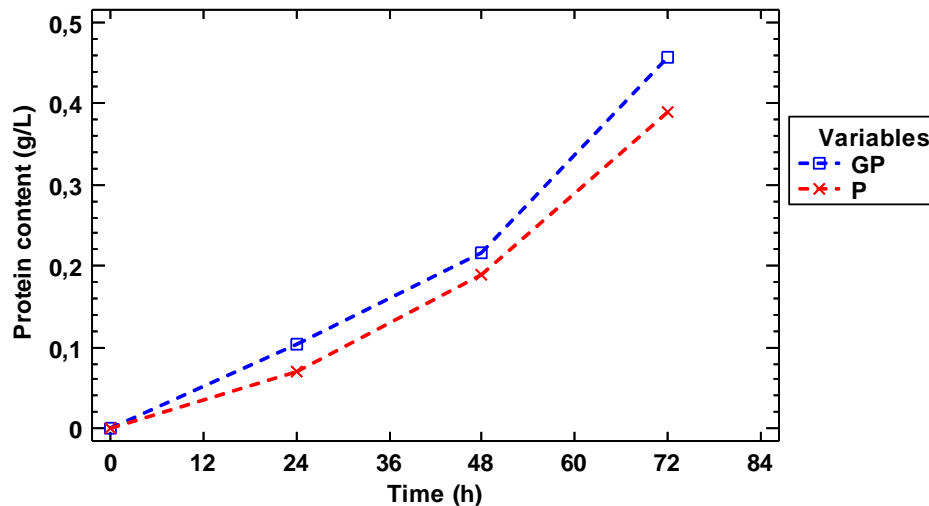
Figura 10. Concentración de proteínas en el medio de cultivo con bacteria *Bacillus thuringiensis*. Medio con pectina y glucosa (GP), medio con solo pectina (P).



La bacteria *Bacillus cereus* produjo un máximo de proteínas de $0,457 \pm 0,022$ g/L en el medio con glucosa y pectina (GP), mientras que con solo pectina (P) fue de $0,389 \pm 0,036$ g/L (figura 11). El análisis estadístico confirmó que existen diferencias significativas en la producción de proteínas ($p=0,0310$) (Apéndice M). Es probable que las proteínas que se cuantificaron en el medio de cultivo correspondan a las enzimas hidrolasa exopectato extracelular y la liasa endopectato extracelular, las cuales son producidas por los microorganismos durante la degradación de las moléculas de pectina, por lo que son parte esencial de su metabolismo (Sirotek et al., 2004). Además, lo encontrado en este estudio concuerda con lo expuesto por Fontana y Silveira (2019), los cuales sugieren que la glucosa, al ser un sustrato energético fácilmente

utilizable, podría aumentar la actividad metabólica de los microorganismos y, por ende, la producción de proteínas en el medio de cultivo.

Figura 11. Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria *Bacillus cereus*. Medio con pectina y glucosa (GP), medio con solo pectina (P).

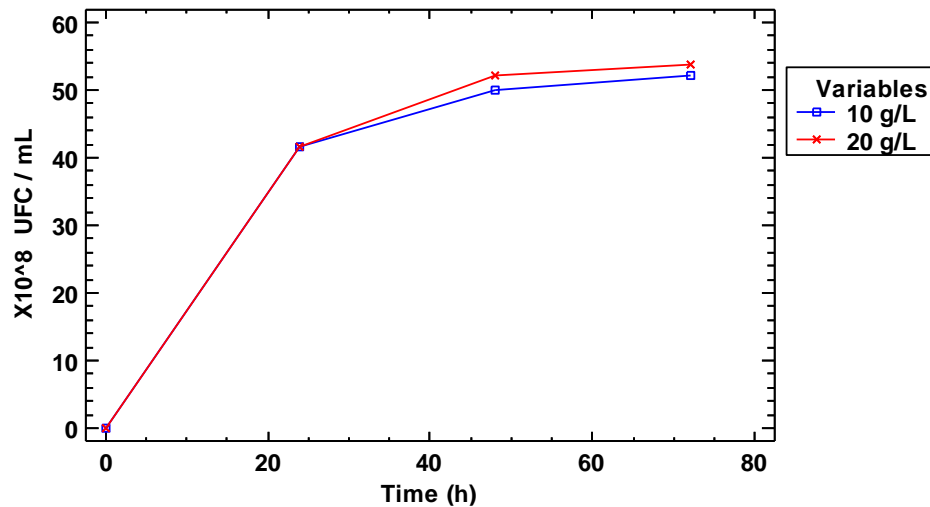


Etapas 2: Optimización clásica de un factor a la vez de las condiciones de fermentación para las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*: Diseño de Plackett-Burman

5.2.1 Efecto de la concentración de pectina como fuente de carbono

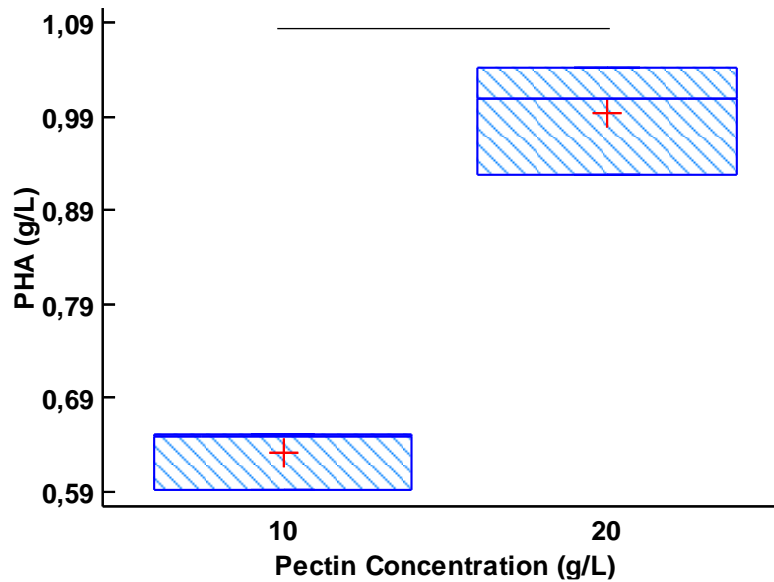
Se analizaron dos concentraciones de pectina en el medio de cultivo, 10 g/L y 20 g/L. Transcurridas las 72 horas de la fermentación con la bacteria *Bacillus thuringiensis* se observó que el crecimiento bacteriano con la concentración de pectina de 10 g/L era de $52,2 \pm 2,2 \times 10^8$ UFC/mL, mientras que para 20 g/L fue de $53,8 \pm 2,0 \times 10^8$ UFC/mL (figura 12). Al realizar la prueba t de *student* se determinó que no existían diferencias significativas entre las variables, ya que el valor de significancia (p) fue de 0,0601 (Apéndice T.1).

Figura 12. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con 10 y 20 g/L de pectina como fuente de carbono.



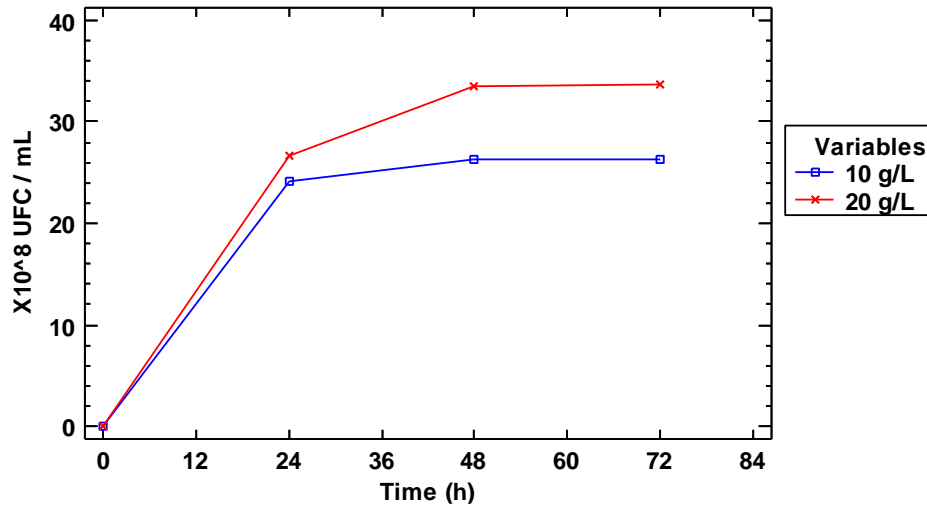
Por otra parte, en cuanto a la producción de PHA, se obtuvo una cantidad de $0,631 \pm 0,075$ g/L (rendimiento del $42,71 \pm 0,96\%$), y $0,992 \pm 0,081$ g/L (rendimiento de $60,94 \pm 0,98\%$) para los tratamientos con 10 y 20 g/L, respectivamente (figura 13). Lo anterior demuestra que, al aumentar la concentración del sustrato de carbono, no se afecta significativamente el crecimiento bacteriano, sin embargo, la biosíntesis del polímero si se ve beneficiada con este incremento, ya que mediante la prueba t de *student* se determinó que existían diferencias significativas en la producción ($p=0,0135$) (Apéndice U.1). De acuerdo con Muneer et al. (2022), esto se puede explicar porque con la mayor concentración de sustrato, aumenta el recuento de células bacterianas en el medio de cultivo, lo que produce condiciones de estrés metabólico, que en la cepa estudiada dieron como resultado un incremento en la acumulación de PHA como fuente de carbono de almacenamiento.

Figura 13. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA con 10 y 20 g/L de pectina para la bacteria *Bacillus thuringiensis* ($p=0,0135$)



Para el caso de la bacteria *Bacillus cereus*, el crecimiento con ambas concentraciones de sustrato fue inferior al evidenciado con la cepa anterior (figura 14). De esta manera, se encontró que pasadas las 72 horas de fermentación, el crecimiento con 10 g/L de pectina para esta cepa fue de $26,4 \pm 0,3 \times 10^8$ UFC/mL, y con 20 g/L de $33,7 \pm 1,0 \times 10^8$ UFC/m; al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los crecimientos reportados (Apéndice T.2). Sin embargo, para la extracción del polímero se encontró que esta bacteria no sintetizó PHA con ninguna de las 2 concentraciones de sustrato suministradas. Al consultar información al respecto se encontró que Agboola (2023), realizó la fermentación con diferentes cepas bacterianas productoras de PHA, y encontró que el microorganismo *Bacillus cereus*, cuando utilizan pectina como fuente de carbono, producen una acumulación de PHA muy baja, por lo cual es muy difícil de ser extraído, se presume que esto fue lo ocurrido en la presente investigación.

Figura 14. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus* con 10 y 20 g/L de pectina como fuente de carbono.

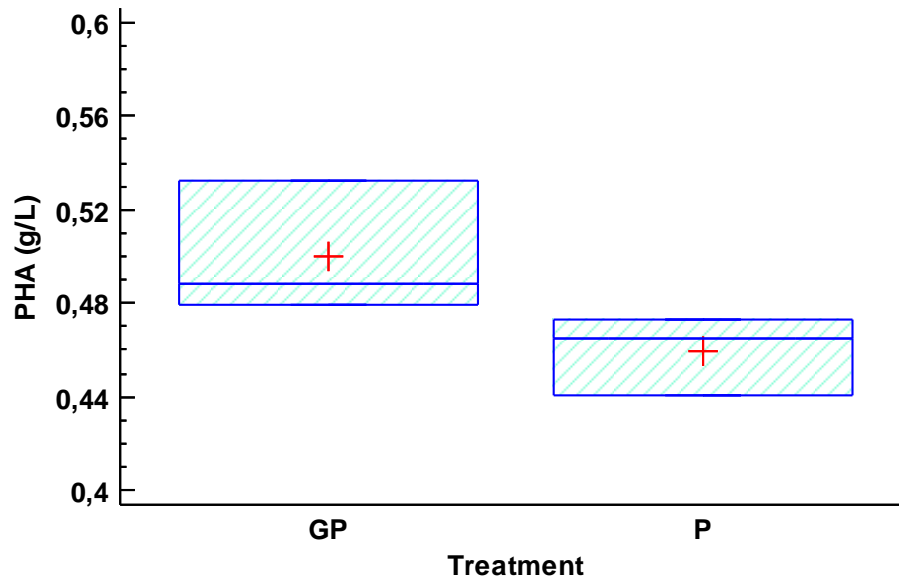


5.2.2 Efecto de la glucosa como fuente de carbono complementaria

La presencia de glucosa en el medio de cultivo favoreció el crecimiento de ambas cepas microbianas como se observa en la figura 8 y 9. Asimismo, también se vio ligeramente favorecida la producción de PHA en la cepa *Bacillus thuringiensis*, ya que con solo pectina el rendimiento fue del $42,71 \pm 3,65\%$ (correspondiente a 0,460 g/L de PHA), mientras que con pectina y glucosa fue de $43,65 \pm 2,35\%$ (0,490 g/L de PHA). Sin embargo, los resultados del análisis inferencial, mediante una prueba t, evidencian que no existe diferencia significativa en la producción del biopolímero al utilizar o no glucosa como fuente de carbono complementaria ($p=0,5210$) (figura 15) (Apéndice U.2).

En cuanto a la bacteria *Bacillus cereus*, nuevamente no se observó producción de PHA o su concentración fue tan baja que no se logró detectar y aislar mediante la metodología aquí utilizada.

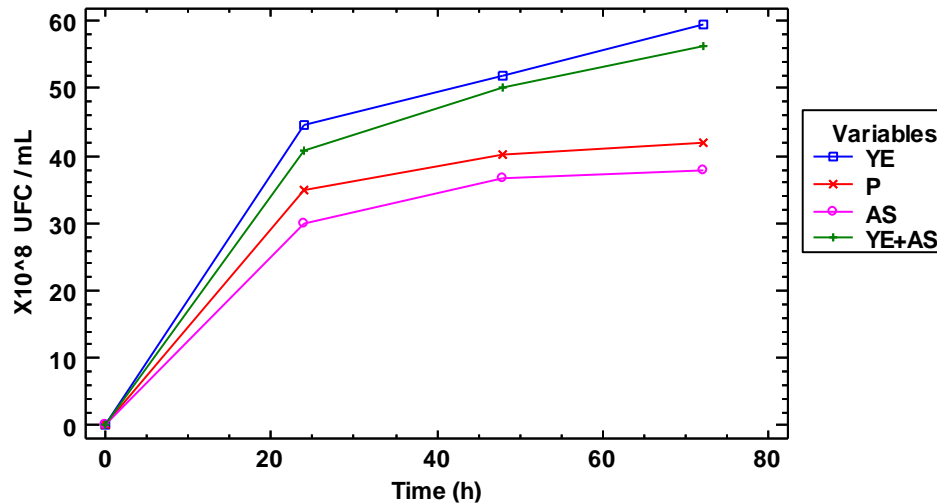
Figura 15. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA con y sin glucosa como fuente de carbono complementaria para la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Medio con pectina y glucosa (GP), medio con solo pectina (P) ($p=0,5210$)



5.2.3 Efecto de la fuente de nitrógeno

Otro factor de gran importancia para el crecimiento de los microorganismos y la producción de PHA es la fuente de nitrógeno empleada, ya que es esencial para la acumulación del biopolímero. Por lo tanto, la selección de una fuente de nitrógeno económica y óptima es esencial para disminuir los costos de producción. En este caso, se utilizaron tres fuentes de nitrógeno a saber, extracto de levadura (yeast extract, YE), sulfato de amonio (ammonium sulfate, AS), peptona (peptone, P) y una combinación de ellas (YE + AS) para suplementar el medio de cultivo. De esta manera, como se muestra en la figura 16, el mayor crecimiento se dio con extracto de levadura, siendo de $59,5 \pm 1,3 \times 10^8$ UFC/mL, seguido por una combinación de extracto de levadura y sulfato de amonio con $56,3 \pm 2,6 \times 10^8$ UFC/mL, en tercer lugar la peptona con un crecimiento de $41,861 \pm 0,810 \times 10^8$ UFC/mL y por último el sulfato de amonio con $36,596 \pm 3,162 \times 10^8$ UFC/mL. En la tabla 3 se encuentran las diferencias significativas entre los grupos de estudio, con un valor de significancia (p) de 0,00019 (Apéndice T.3).

Figura 16. Curva de crecimiento bacteriano para *Bacillus thuringiensis* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (YE)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (AS)* y *la combinación extracto de levadura más sulfato de amonio (YE + AS)*.



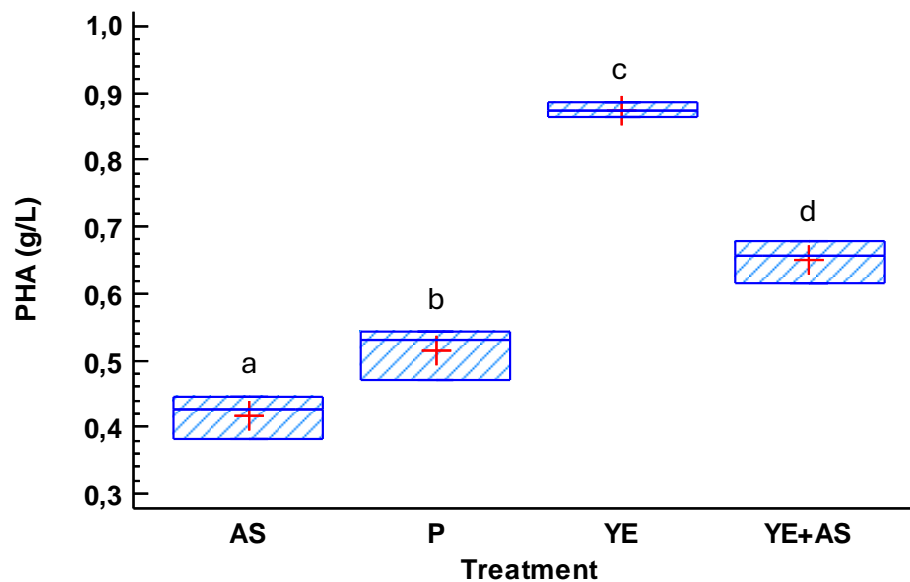
En cuanto a la producción de PHA, también fue mayor con solo extracto de levadura con un porcentaje de rendimiento del $46,70 \pm 0,87$ % sobre el valor de la biomasa seca, lo cual indica una producción total de PHA de 0,875 g/L, seguido por la combinación de extracto de levadura y sulfato de amonio con $42,71 \pm 0,96$ %, lo cual son 0,766 g/L de PHA, el sulfato de amonio produjo $38,81 \pm 2,31$ % que son 0,418 g/L de PHA, y por último la peptona $29,28 \pm 1,57$ % y 0,513 g/L de PHA (Figura 19).

Mediante un análisis ANOVA de un factor y la prueba de rango múltiple (Apéndice U.3) se determinó que entre todos los grupos de estudio existen diferencias significativas, como se observa en la figura 17 ($p= 0,00002$). Lo anterior demuestra la importancia de una selección adecuada de la fuente de nitrógeno para la producción de PHA, ya que este es uno de los principales nutrientes para el crecimiento de la población bacteriana y además, afecta fuertemente el rendimiento de la producción del biopolímero. En este caso, para la cepa *Bacillus thuringiensis*, la mejor opción como fuente de nitrógeno orgánico es utilizar el extracto de levadura, el cual es rico

en diferentes aminoácidos, vitaminas y otros compuestos estimulantes del crecimiento (Hakobyan et al., 2012).

Por su parte, Mahishi et al. (2003) sostiene que el extracto de levadura como fuente de nitrógeno tienen la capacidad de potenciar la degradación del sustrato con el que se suplementa el medio, para así maximizar la síntesis del polímero, lo cual se podría explicar por la degradación de aminoácidos residuales a acetyl CoA, que es el sustrato utilizado para la síntesis de los polihidroxialcanoatos.

Figura 17. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (YE)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (AS)*.

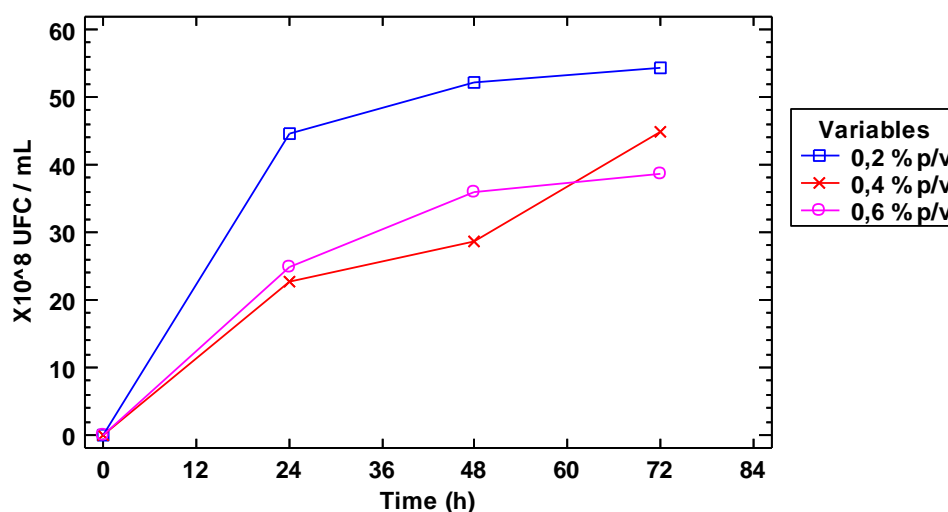


Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Asimismo, después de identificar la fuente de nitrógeno adecuada (extracto de levadura), se estudió el efecto de sus diferentes concentraciones en el crecimiento y producción de PHA, para así determinar los efectos de la limitación de nitrógeno.

Los tratamientos analizados en la presente investigación permiten determinar una correlación inversa entre las variables “concentración de fuente de nitrógeno” versus “crecimiento microbiano” (Figura 18). Aquí, con una concentración de YE de 0,2% *p/v* el crecimiento bacteriano fue de $54,3 \pm 1,3 \times 10^8$ UFC/mL, para 0,4% *p/v* de $44,7 \pm 2,4 \times 10^8$ UFC/mL y para 0,6% *p/v* de $38,5 \pm 2,3 \times 10^8$ UFC/mL. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de todos los grupos ($p = 0,0002$) (Apéndice T.4).

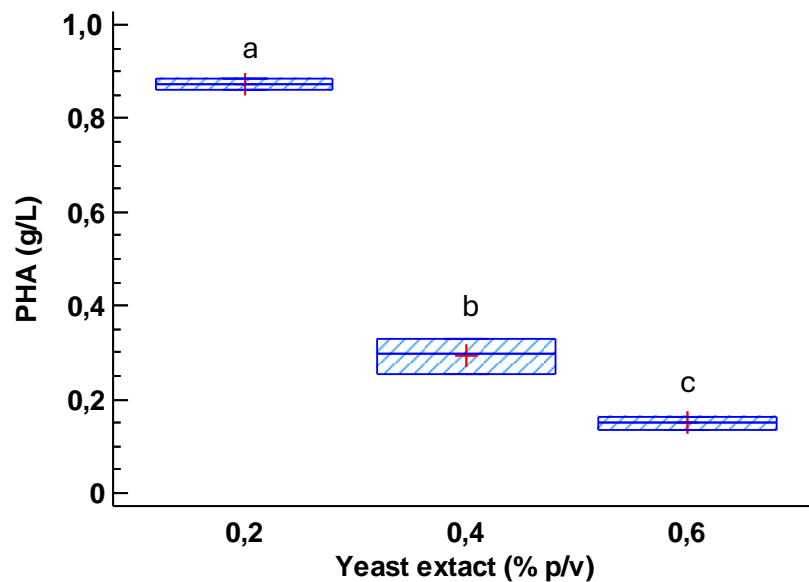
Figura 18. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis* con extracto de levadura como fuente de nitrógeno en concentraciones de 0,2% *p/v*; 0,4% *p/v* y 0,6% *p/v*.



Por otra parte, el rendimiento de la biosíntesis de PHA disminuyó significativamente con el aumento de la concentración del extracto de levadura (figura 19). Siendo con 0,2% *p/v* de $46,70 \pm 0,87$ % ($0,875 \pm 0,060$ g/L de PHA), con 0,4% *p/v* de $26,62 \pm 2,24$ % ($0,293 \pm 0,056$ g/L de PHA) y con 0,6% *p/v* de $15,58 \pm 1,37$ % ($0,150 \pm 0,017$ g/L de PHA). Mediante el ANOVA, se determinó que existen diferencias significativas entre todos los grupos, con un valor de significancia $p=0,00003$ (Apéndice U.4). Según lo expuesto por Muneer et al. (2022), el nitrógeno puede inhibir la síntesis de este biopolímero, por lo que con una menor concentración el rendimiento será mayor. Además, Bengtsson et al. (2008) demostró que limitar los nutrientes

presentes en el medio de cultivo, en especial el nitrógeno, condujo a un aumento en la productividad del almacenamiento de polímero. Obruca et al. (2011) también encontraron en su estudio sobre la acumulación de polihidroxicanoatos a partir de fuentes de carbono económicas que al aumentar la concentración de extracto de levadura por encima de 1 g/L, se podría inhibir el crecimiento bacteriano y la producción del polímero debido a la alta presión osmótica.

Figura 19. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con extracto de levadura como fuente de nitrógeno en concentraciones de: 0,2% p/v; 0,4% p/v y 0,6% p/v.

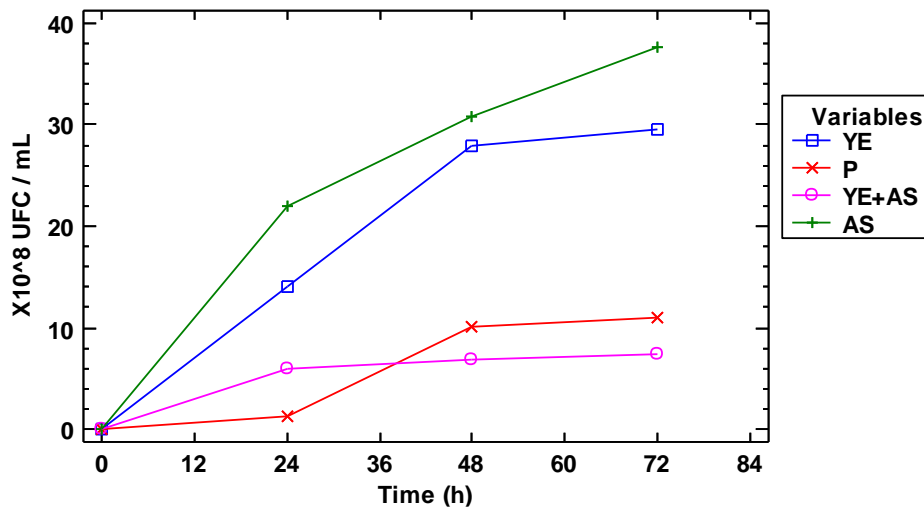


Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Por otra parte, al realizar el ensayo con la cepa *Bacillus cereus* y diferentes fuentes de nitrógeno, se encontró que el crecimiento fue superior al suministrar sulfato de amonio (AS), siendo de $37,6 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/mL, seguido por extracto de levadura (YE) con $29,5 \pm 2,0 \times 10^8$ UFC/mL, peptona (P) $11,0 \pm 0,5 \times 10^8$ UFC/mL y por último, extracto de levadura y sulfato de amonio (YE+AS) $7,4 \pm 0,5 \times 10^8$ UFC/mL. Con base en el análisis estadístico se confirmó que existen diferencias significativas entre todos los grupos en estudio y su valor de significancia fue

de $p=0,00001$ (Apéndice T.5). Sin embargo, en cuanto a la producción de PHA, nuevamente no se obtuvieron resultados favorables, ya que no se logró extraer. Por lo que no se continuó con la optimización de parámetros para esta bacteria, ya que los factores que se estudiaron anteriormente son los de mayor importancia.

Figura 20. Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus* con las siguientes fuentes de nitrógeno: *extracto de levadura (EL)*, *peptona (P)*, *sulfato de amonio (SA)*.

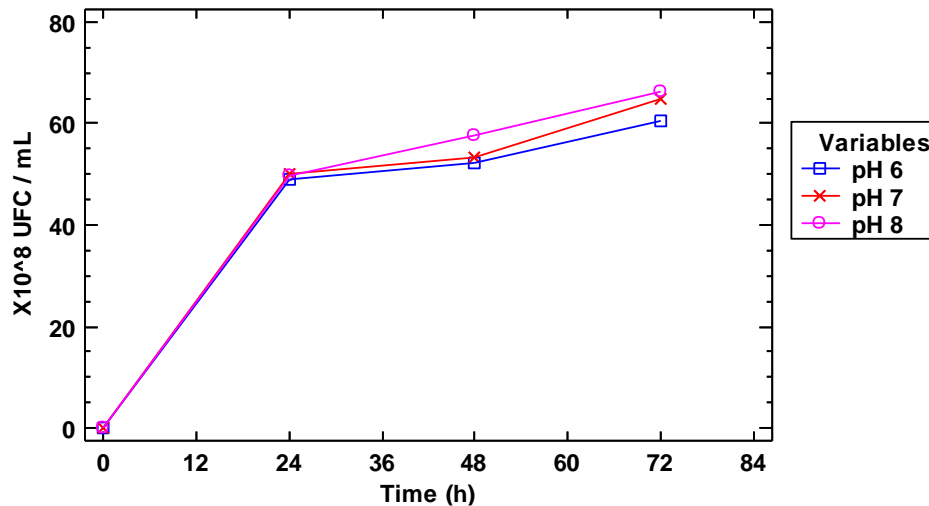


5.2.4 Efecto del pH inicial

El pH es otro factor crucial para el crecimiento bacteriano, y varía en gran medida dependiendo de los microorganismos utilizados para producir PHA. Por lo cual también se optimizó para la producción de PHA con la bacteria *Bacillus thuringiensis*, esta mostró un aumento en su crecimiento a medida que se incrementaba el pH, con un máximo a pH 8 (figura 21). Siendo para pH ácido de $60,3 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/mL, con pH neutro de $64,8 \pm 0,2 \times 10^8$ UFC/mL y para pH básico de $66,3 \pm 2,9 \times 10^8$ UFC/mL. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de rango múltiple, revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los

grupos ($p = 0.0144$) (Apéndice T.6), lo cual demuestra la capacidad de este aislado para crecer y adaptarse al pH del medio en el que se encuentra.

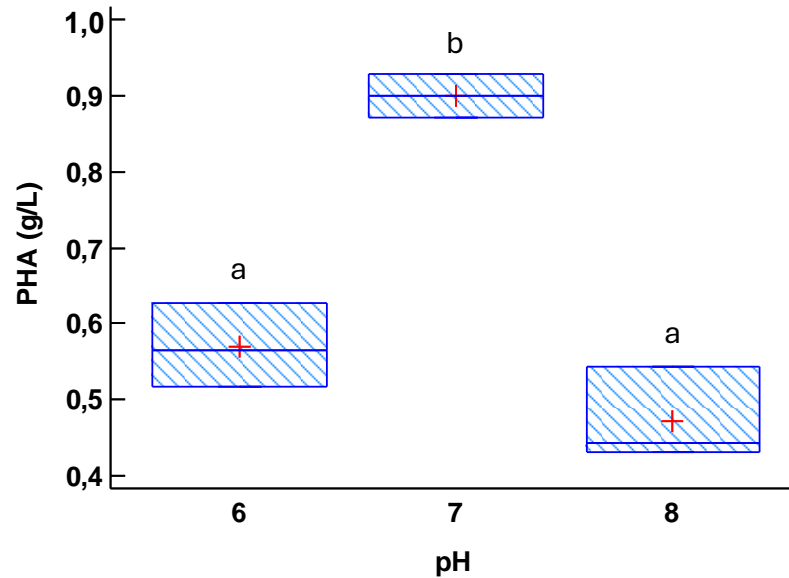
Figura 21. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferente pH: ácido (6), neutro (7) y básico (8).



Por su parte, la síntesis del biopolímero también se vio afectada por el cambio del pH. De modo tal que el pH óptimo resultó ser neutro (7), con un rendimiento de $51,88 \pm 0,81$ % ($0,900 \pm 0,040$ g/L de PHA), mientras que con pH ácido fue $31,75 \pm 2,79$ % ($0,569 \pm 0,054$ g/L de PHA) y el rendimiento con pH básico fue de $30,97 \pm 3,40$ % ($0,472 \pm 0,062$ g/L de PHA). El análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre utilizar pH básico o ácido, ya que con ambos se disminuyó de igual manera la producción de PHA (figura 22) (Apéndice U.5).

El resultado obtenido en este experimento concuerda con lo expuesto por Desouky et al. (2014), el cual indica que el pH óptimo para *Bacillus thuringiensis*, se encuentre entre 7 a 7,5. Ya que con pH superiores o inferiores tiende a inhibirse el proceso de síntesis de PHA.

Figura 22. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con pH ácido (6), neutro (7) y básico (8).

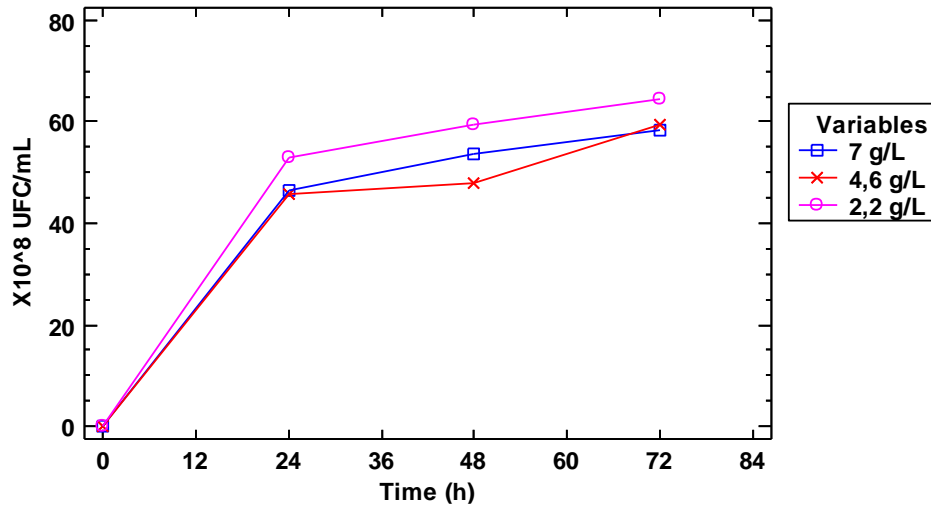


Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

5.2.5 Efecto de la concentración del fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)

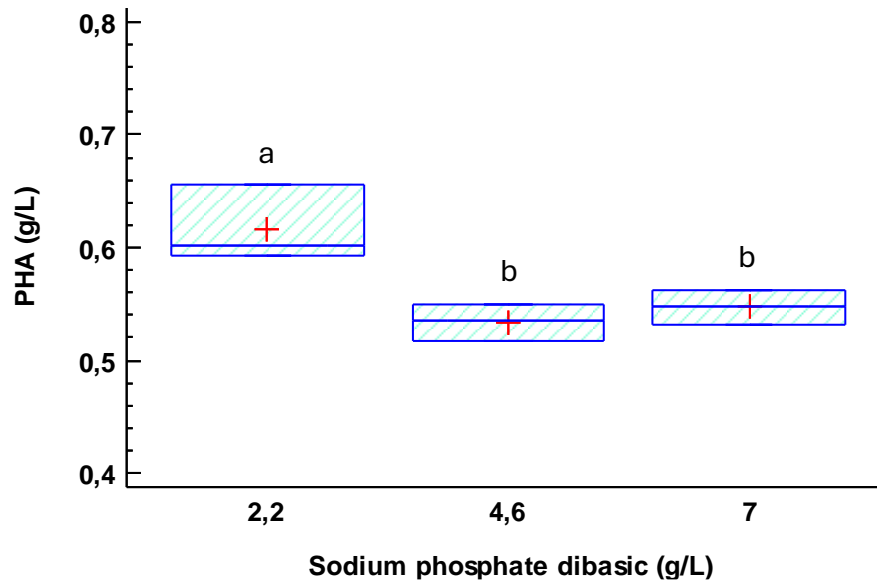
Como se aprecia en la figura 25, la concentración del fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en el medio de fermentación no afectó de manera relevante el crecimiento bacteriano. Para la concentración de 7 g/L se obtuvo $58,4 \pm 0,3 \times 10^8$ UFC/mL, para 4,6 de $59,3 \pm 2,5 \times 10^8$ UFC/mL y para 2,2 g/L de $62,5 \pm 2,0 \times 10^8$ UFC/mL. Mediante el análisis estadístico se confirmó que existen diferencias significativas en los crecimientos con las tres concentraciones de Na_2HPO_4 estudiadas, y se encontró un valor de significancia de 0,0001 (Apéndice T.7).

Figura 23. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 : 7 g/L, 4,6 g/L y 2,2 g/L.



Por otro lado, se evidenció que al disminuir la concentración de Na_2HPO_4 , se favorecía la síntesis de PHA. Como se indica en la figura 24, el mejor rendimiento se obtuvo con la concentración de 2,2 g/L, siendo de $40,01 \pm 3,24 \%$ ($0,603 \pm 0,048$ g/L de PHA), mientras que para 4,6 g/L y 7 g/L se obtuvieron resultados sin diferencias estadísticamente significativas, $37,76 \pm 2,18 \%$ ($0,526 \pm 0,016$ g/L de PHA) y $36,88 \pm 1,56 \%$ ($0,532 \pm 0,012$ g/L de PHA), respectivamente. El análisis de varianza, complementado con una prueba de comparación múltiple, mostró que las medias de los grupos difieren significativamente ($p < 0,05$), indicando que la concentración óptima en este estudio fue de 2,2 g/L de Na_2HPO_4 (Apéndice U.6). Un resultado similar a este fue confirmado por Basak et al. (2011), en el que expone que limitar los nutrientes presentes en el medio de cultivo conducen a un mayor contenido de PHA y mejores rendimientos.

Figura 24. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 : 7 g/L, 4,6 g/L y 2,2 g/L.

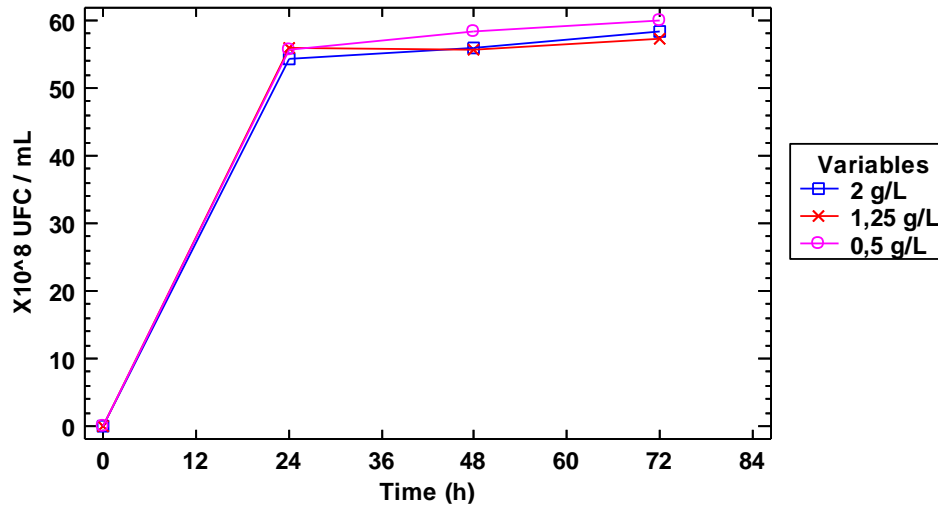


Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2.6 Efecto de la concentración del fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

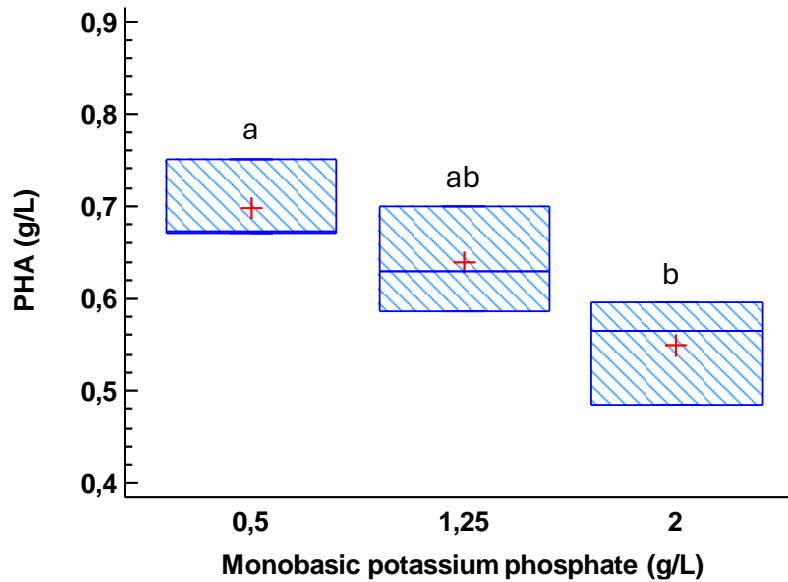
La figura 25 muestra que para 2 g/L de KH_2PO_4 el crecimiento fue de $56,0 \pm 0,4 \times 10^8$ UFC/mL, para 1,25 g/L de $55,7 \pm 2,6 \times 10^8$ UFC/mL y para 0,5 g/L de $58,2 \pm 1,1 \times 10^8$ UFC/mL. Mediante el ANOVA se encontró que no existen diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias al disminuir la concentración de potasio en el medio ($p = 0,2318$) (Apéndice T.8).

Figura 25. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 : 2 g/L, 1,25 g/L y 0,5 g/L.



En cuanto a la producción de PHA, al disminuir la concentración del fosfato de potasio monobásico, se aumentó el rendimiento (figura 26). Pasando de $47,78 \pm 0,68$ % ($0,549 \pm 0,058$ g/L de PHA) con 2 g/L, a $57,0,1 \pm 2,05$ % ($0,696 \pm 0,041$ g/L de PHA) con 0,5 g/L. El análisis estadístico demostró que solo existen diferencias significativas entre las concentraciones de 0,5 g/L y 2 g/L ($p=0,0397$) (Apéndice U.7). Esto concuerda con investigaciones anteriores donde *Bacillus* sp. mostraron una producción máxima de PHA en condiciones de deficiencia de potasio, ya que se necesita de una elevada cantidad de energía para mantener una alta concentración intracitoplasmática de potasio, la disminución de este elemento aumenta la producción del polímero como material de reserva de energía (Suguna et al., 2020).

Figura 26. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 : 2 g/L, 1,25 g/L y 0,5 g/L.

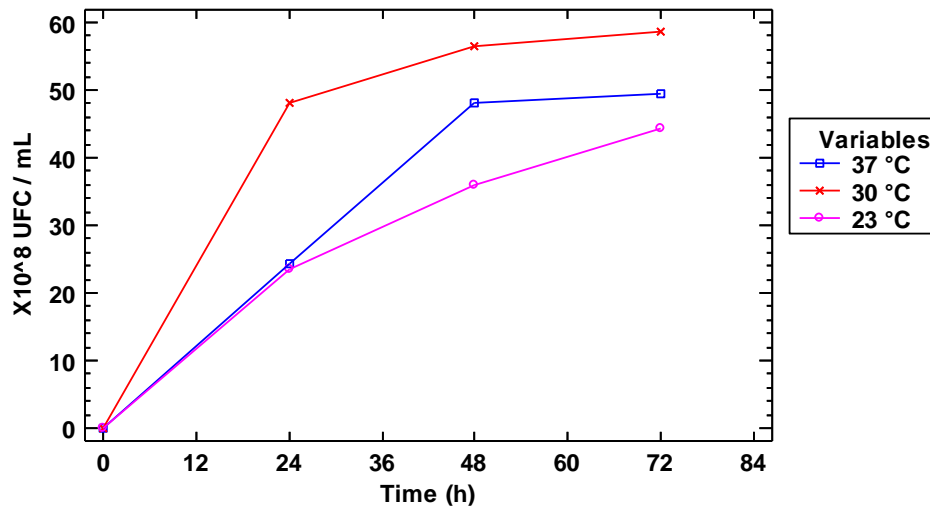


Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2.7 Efecto de la temperatura de incubación

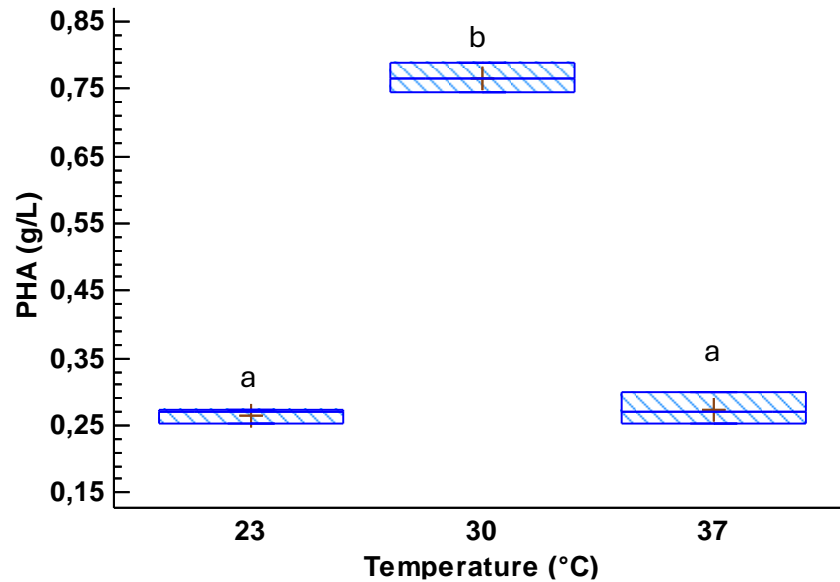
Como se aprecia en la figura 27, aumentar o disminuir la temperatura afecta de manera negativa el crecimiento de la población bacteriana, por lo cual la temperatura óptima fue de 30 °C con un crecimiento de $58,6 \pm 2,6 \times 10^8$ UFC/mL, mientras que para 37°C fue de $49,5 \pm 0,8 \times 10^8$ UFC/mL y para 23°C de $44,4 \pm 1,1 \times 10^8$ UFC/mL. Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p = 0,0002$) (Apéndice T.9)

Figura 27. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes temperaturas: 37 °C, 30 °C Y 23 °C.



Igualmente, en cuanto a la producción de PHA se observaron diferencias significativas entre las temperaturas de 23 °C con 30 °C y 37 °C con 30 °C y un valor de significancia de $p=0,00004$ (Apéndice U.8). De modo tal que se produjo la mayor cantidad de polímero a 30°C, con un rendimiento de $42,71 \pm 0,96 \%$ ($0,766 \pm 0,022$ g/L de PHA). Por el contrario el rendimiento con 37 °C y 23 °C fueron similares, de $27,29 \pm 2,15 \%$ ($0,274 \pm 0,023$ g/L de PHA) y $23,81 \pm 1,04 \%$ ($0,265 \pm 0,010$ g/L de PHA), respectivamente. Esto indica la capacidad de la cepa *Bacillus thuringiensis* de crecer y acumular PHA en un rango de temperatura de 23-37 °C. Sin embargo, la mejor producción se encontró a las 72 horas a 30°C. Un resultado similar fue reportado por Ubong et al. (2019), mencionaron que la temperatura óptima para la mayoría de las especies de *Bacillus* varía entre 30 °C y 35 °C. Por su parte, Yasin y Al-Mayaly (2021) no observaron producción de PHA a 25 y 40 °C, por lo que las temperaturas extremas no se consideran factibles para el desarrollo de esta cepa.

Figura 28. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes temperaturas: 37 °C, 30 °C Y 23 °C.



Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

5.2.8 Verificación de las condiciones de cultivo optimizadas

De acuerdo con los resultados de la optimización de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, fuente de nitrógeno, entre otros) para el cultivo de la cepa *Bacillus thuringiensis*, se realizó nuevamente la fermentación con los siguientes parámetros:

- Fuente de carbono: 20 g/L de pectina cítrica rápida (60% metoxilación).
- Fuente de nitrógeno: 0,2 % *p/v* de extracto de levadura.
- Concentración del fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4): 2,2 g/L.
- Concentración de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4): 0,5 g/L
- pH: 7,0
- Temperatura: 30°C

Pasadas las 72 horas de fermentación se encontró que la población bacteriana era de $74,3 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/mL y el rendimiento de la producción de PHA de $58,29 \pm 2,64$ % ($1,607 \pm 0,063$ g/L de PHA). Los resultados de la optimización muestran un incremento

significativo si se compara el rendimiento de producción de PHA con los reportados previamente en el estudio, del cual fue de $38,81 \pm 2,31$ % que son $0,418 \pm 0,031$ g/L de PHA. Asimismo, se comparó también con el rendimiento de producción del polímero, cuando se empleó el medio de cultivo con 10g/L de glucosa, y este fue de $53,75 \pm 2,53$ % ($1,044 \pm 0,048$ g/L de PHA).

Figura 29. Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, en condiciones de cultivo optimizadas.

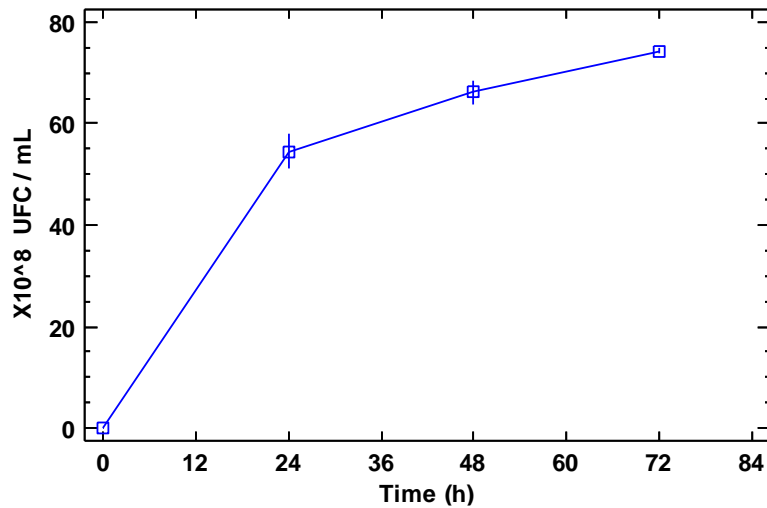
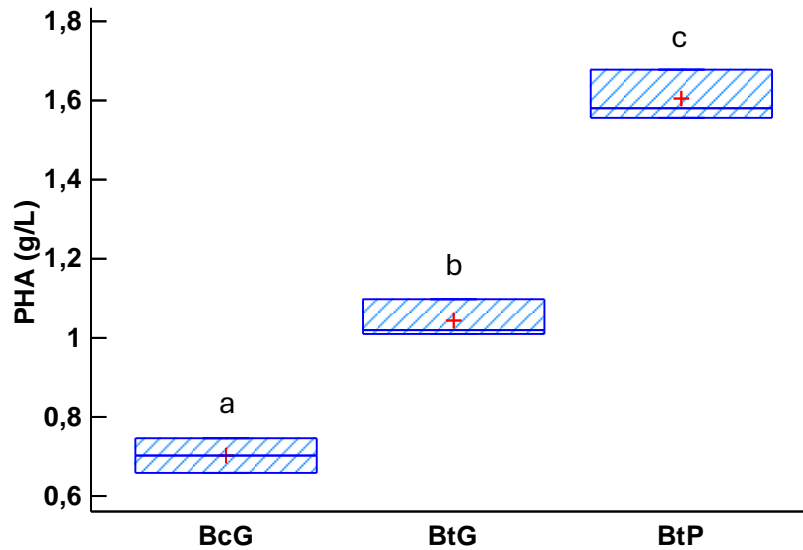


Figura 30. Diagrama de caja y bigotes para la producción de PHA por la bacteria *Bacillus thuringiensis* con pectina en condiciones óptimas (BtP), con glucosa (BtG) y, para la bacteria *Bacillus cereus* con glucosa (BcG).



Nota. Los grupos con letras diferentes tienen medias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Lo anterior muestra que fue mejor la producción del biopolímero con pectina bajo las condiciones óptimas de cultivo, que con glucosa como sustrato en condiciones sin optimizar. Esto representa una disminución significativa en los costos de producción, ya que además de ser la pectina una fuente de carbono mucho más económica que la glucosa, también se disminuyeron la cantidad sales que se adicionaron al medio de cultivo. Odeniyi y Adeola (2017) sostiene que la bacteria *B. thuringiensis* SBC4 utilizando como sustrato salvado de maíz tiene un rendimiento de producción de PHA de 30,0%, (0,33 g/L de PHA) mientras que en condiciones óptimas (pH 7,0, temperatura 37 °C y 48 h de incubación) aumentó a 44,96%, (0,495 g/L) lo cual es equivalente a un incremento del 50%. Por su parte, Castilla-Marroquín et al. (2024) determinaron el potencial de *Bacillus thuringiensis* para producir PHA como fuentes de carbono azúcar comercial, melaza y panela y determinaron que en condiciones óptimas la producción era de 61,6% PHAs/peso seco de biomasa (2,28 g/L de PHA) con melaza, 61,5% PHAs/peso seco de biomasa (1,08 g/L de PHA) con sacarosa y por último, 25,8 %PHAs/peso seco de biomasa (0,4 g/L de PHA) con panela. Al comparar los resultados obtenidos por diversos autores con los encontrados en esta investigación

se encontró que la pectina es una buena opción como fuente de carbono de bajo costo, ya que el rendimiento en la producción de PHA cuando es utilizada en condiciones óptimas es muy similar al que se obtiene con otros sustratos.

De este modo, utilizando pectina como fuente de carbono y condiciones óptimas de cultivo el precio de producción de un gramo de PHA disminuyó aproximadamente hasta un 79,14 %, los cálculos de los costos de producción se realizaron en base al costo de los reactivos reportados en el sitio web de Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Sin embargo, con la cepa *Bacillus cereus* no se obtuvo producción de PHA cuando la pectina se utilizó como sustrato, por lo que no se considera un microorganismo viable para la síntesis del polímero con esta opción de sustrato. Al realizar la fermentación pero esta vez con glucosa, el rendimiento en la producción de PHA fue de $39,36 \pm 3,15$ % ($0,705 \pm 0,043$ g/L de PHA).

Etapas 3: Identificación y caracterización del tipo de monómero del PHA obtenido como producto de la fermentación microbiana

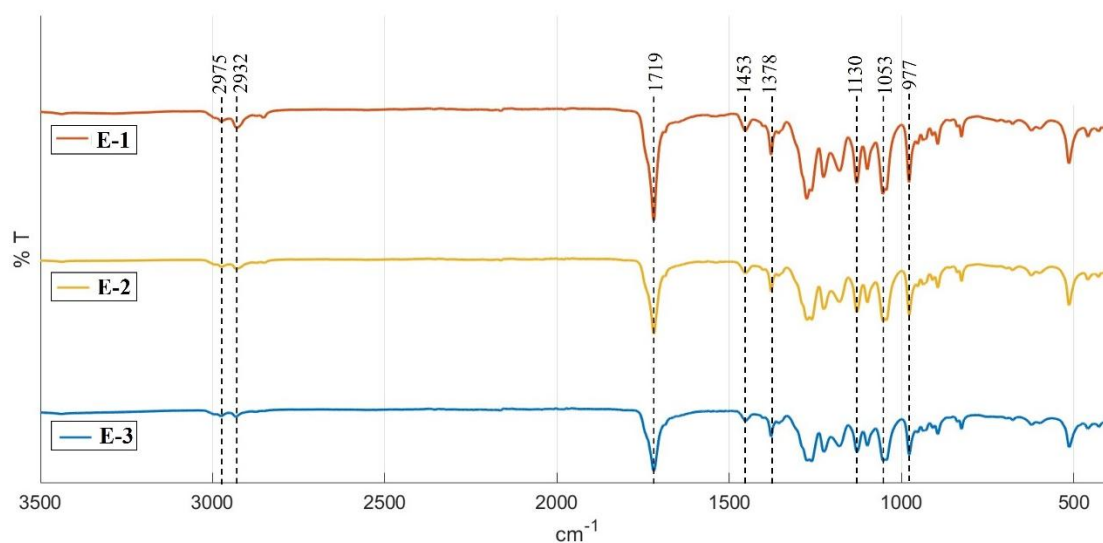
5. 3.1 Caracterización mediante análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los análisis de FTIR del biopolímero obtenido de ambas cepas *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* mostraron las mismas bandas, lo cual indicó que el biopolímero obtenido era el mismo, poli-3-hidroxibutirato (P3HB) (figura 33). Esto significa que la variación en el sustrato de carbono no afectó la composición del polihidroxialcanoato, ya que se obtuvo el mismo con glucosa y pectina. La transmitancia y los números de onda en el espectro representan enlaces carbono a

carbono; carbono a hidrógeno y grupo hidroxilo. El análisis de infrarrojo se realizó al polímero obtenido en cada una de las 3 extracciones, como se observa en la figura 33.

El polímero mostró bandas prominentes a 2975 cm^{-1} y 2932 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de estiramiento CH del grupo metilo (Bhuwal et al., 2014). Los picos de transmitancia más altos se encontraron en los números de onda de 1719 cm^{-1} , el cual representa el estiramiento carbonilo del grupo éster de la estructura cristalina (C=O), mientras que de acuerdo con Sawant et al. (2017), los picos de 1453 cm^{-1} y el 1378 cm^{-1} indican un estiramiento -CH asimétrico y simétrico del grupo metileno. Asimismo, a 1130 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} y 977 cm^{-1} se observan las bandas características de los enlaces C-O, -OH y C-C respectivamente (Muneer et al., 2022).

Figura 31. Espectro infrarrojo del biopolímero extraído producido por la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Primera extracción (E-1), segunda extracción (E-2) y tercera extracción (E-3).



5.3.2 Temperatura de fusión del polímero

La temperatura de fusión para el polímero producido por la cepa *Bacillus thuringiensis*, utilizando pectina como fuente de carbono se encontró en el rango de $176\text{--}178\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con glucosa

fue de 176-177 °C. Por otra parte, el punto de fusión del polímero sintetizado por la bacteria *Bacillus cereus* con glucosa como sustrato fue de 172-174°C.

Varios autores, entre ellos Matsusaki et al. (2000), afirman que la composición monomérica de los polímeros PHA afectan en gran medida sus propiedades físicas y térmicas, las cuales disminuyen a medida que aumenta la concentración molar de las subunidades de 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxihexanoato (3HHx) y 3-hidroxi octanoato (3HO). Asimismo, Bengtsson et al. (2010) expuso que para el poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) el punto de fusión es de 179 °C, lo cual indica que es posible que el polihidroxi alcanoato obtenido con el aislado *Bacillus cereus*, no sea solo P3HB, sino que contenga en baja cantidad monómeros de 3HV. De acuerdo con Babel et al. (2001), el copolímero P(3HB-co-3HV) con 3 mol % HV, posee un punto de fusión de 170 °C.

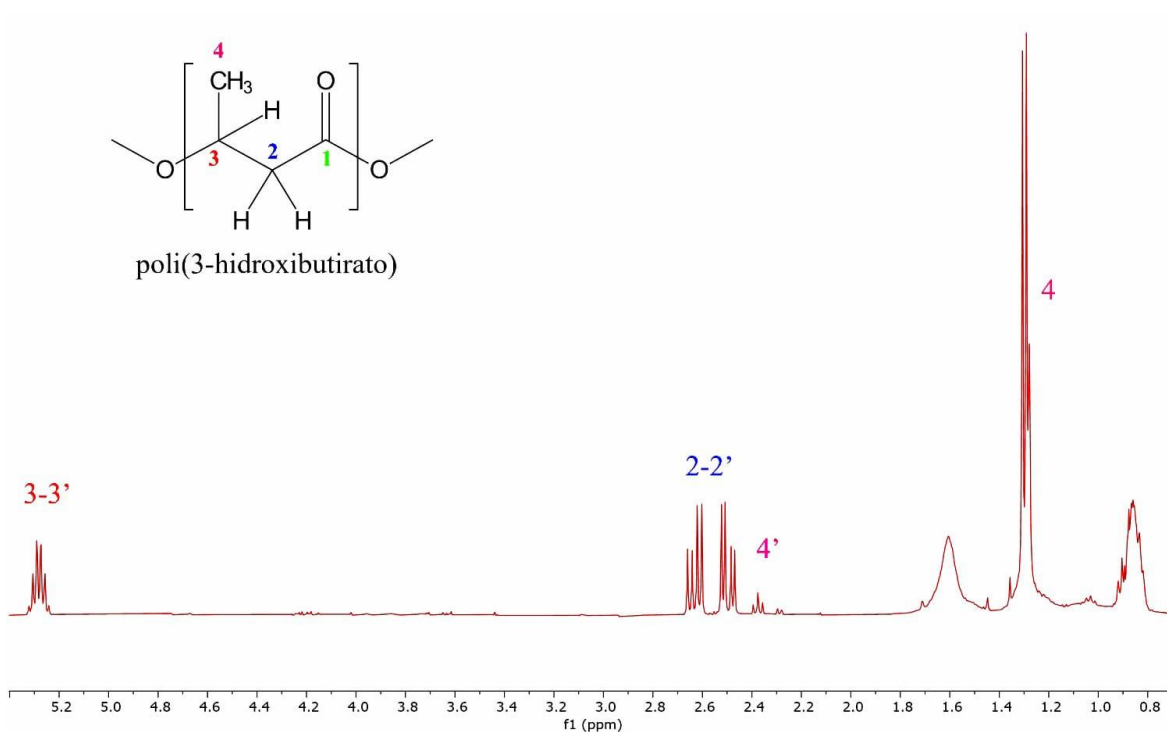
5.3.4 Caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN)

Para confirmar que el polímero extraído por los dos aislados era poli-3-hidroxibutirato (P3HB) mayoritariamente, se realizó un estudio por resonancia magnética nuclear. En la figura 34 se encuentra el espectro de protones (^1H) de los tres polihidroxi alcanoatos obtenidos en la sección 5.2.8. El doblete que se presenta en 1,30 ppm surge del acoplamiento de los hidrógenos del cuarto carbono (-CH₃) con los hidrógenos del tercer carbono (-CH). Por su parte, el doblete de cuadruplete que se observa en 2,57 ppm es causada por el acoplamiento de los hidrógenos del segundo carbono (-CH₂) con los del tercer carbono. Asimismo, la señal en 5,48 ppm es un multiplete de 6 picos, y se origina por el acoplamiento del hidrógeno del tercer carbono con los del cuarto carbono y con los del segundo.

De acuerdo con la literatura, a 0,87 ppm se presentan señales relacionadas con los acoplamientos de los hidrógenos presentes en el metilo (-CH₃) de cadenas laterales de otros

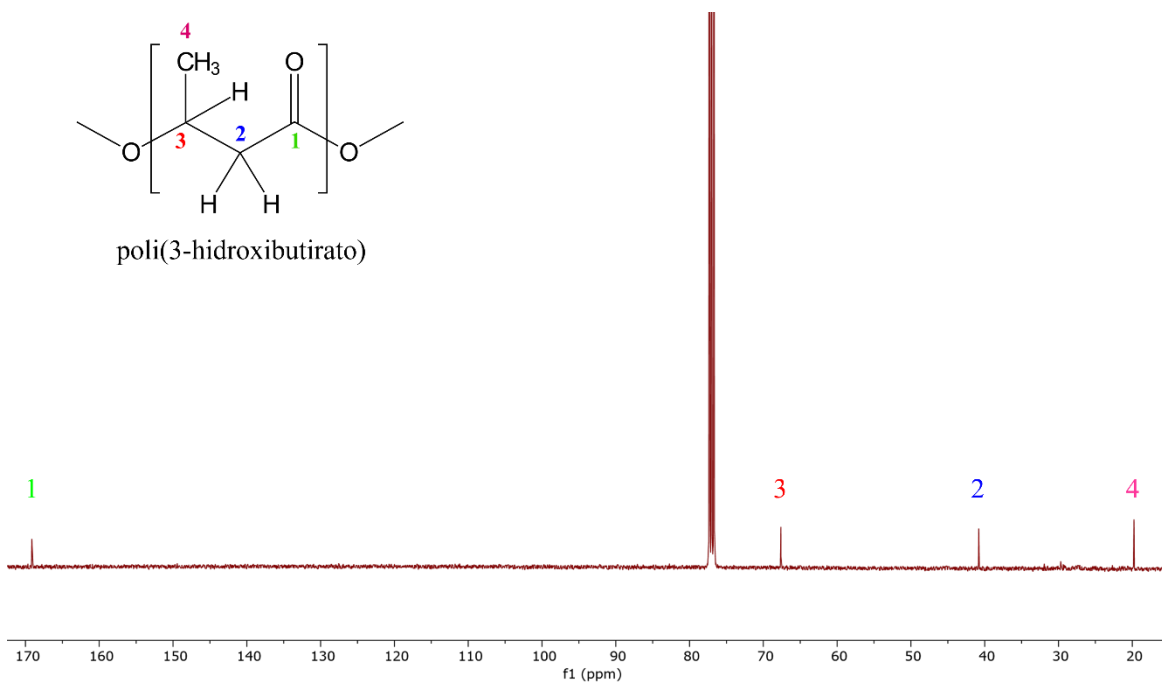
monómeros, y en 2,37 ppm las del metileno (-CH₂) también de cadenas de otros monómeros (Suguna et al., 2020).

Figura 32. Espectro de protones ¹H del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono.



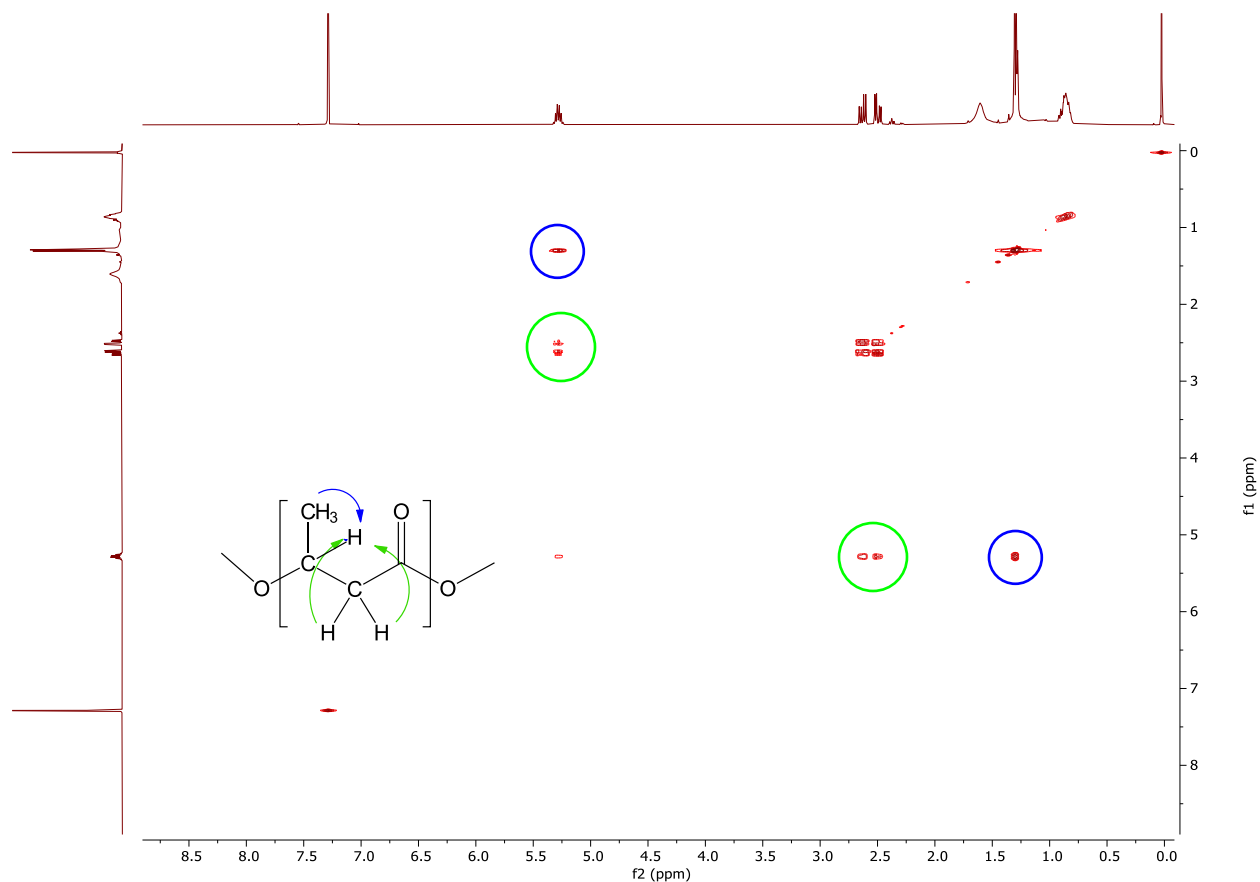
En el espectro de ¹³C (figura 35), la primera señal se ubica en 19,78 ppm y representa al carbono del -CH₃. La segunda señal a 40,81, es característica del carbono correspondiente al grupo -CH₂, mientras que la señal a 67,62 ppm es del carbono del -CH. Por último, la señal del carbonilo (-C=O) se ubicó en 169,14 ppm, ya que por estar unido por un doble enlace a un oxígeno se produce una disminución en su densidad electrónica (Ivanova et al., 2009).

Figura 33. Espectro de carbono ¹³C del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono.



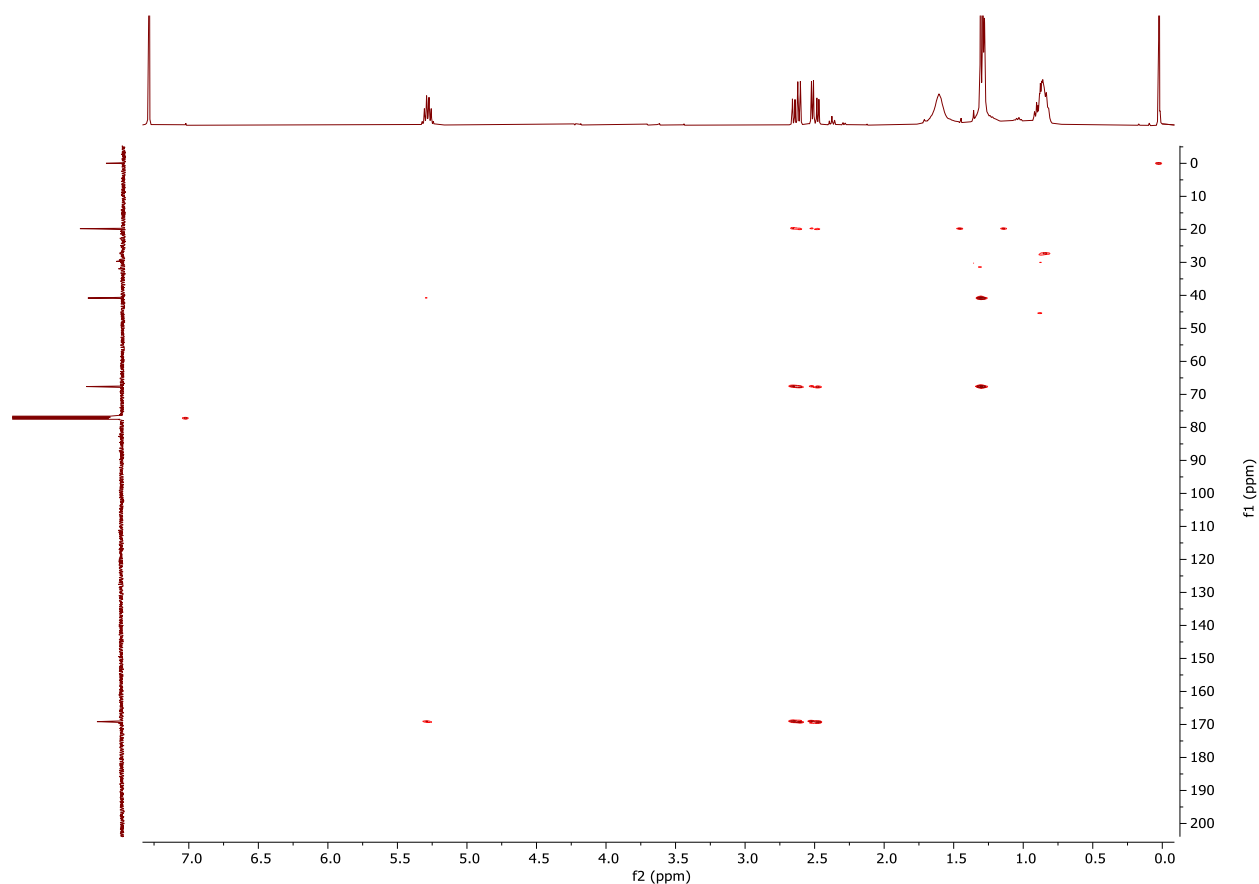
Con base en la información expuesta, se llegó a la conclusión que el polímero era el poli-3-hidroxi-3-butirato (P3HB). Sin embargo, para confirmar se realizaron los análisis bidimensionales. Para observar el acoplamiento de los hidrógenos vecinos se analizó el polímero mediante la espectroscopia de correlación (COSY). De esta manera, se encontró que la señal presente en las coordenadas (1,31)(5,28) ppm se relaciona con la señal en (5,28)(1,31) ppm, y se origina por el acoplamiento de los hidrógenos del $-\text{CH}_3$ con el del $-\text{CH}$. Seguidamente, la señal en (2,62)(5,29) ppm se relaciona con (5,29)(2,62) ppm y se produce por el acoplamiento de los hidrógenos del grupo $-\text{CH}_2$ con los del $-\text{CH}$.

Figura 34. Espectro bidimensional de correlación (COSY) del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono.



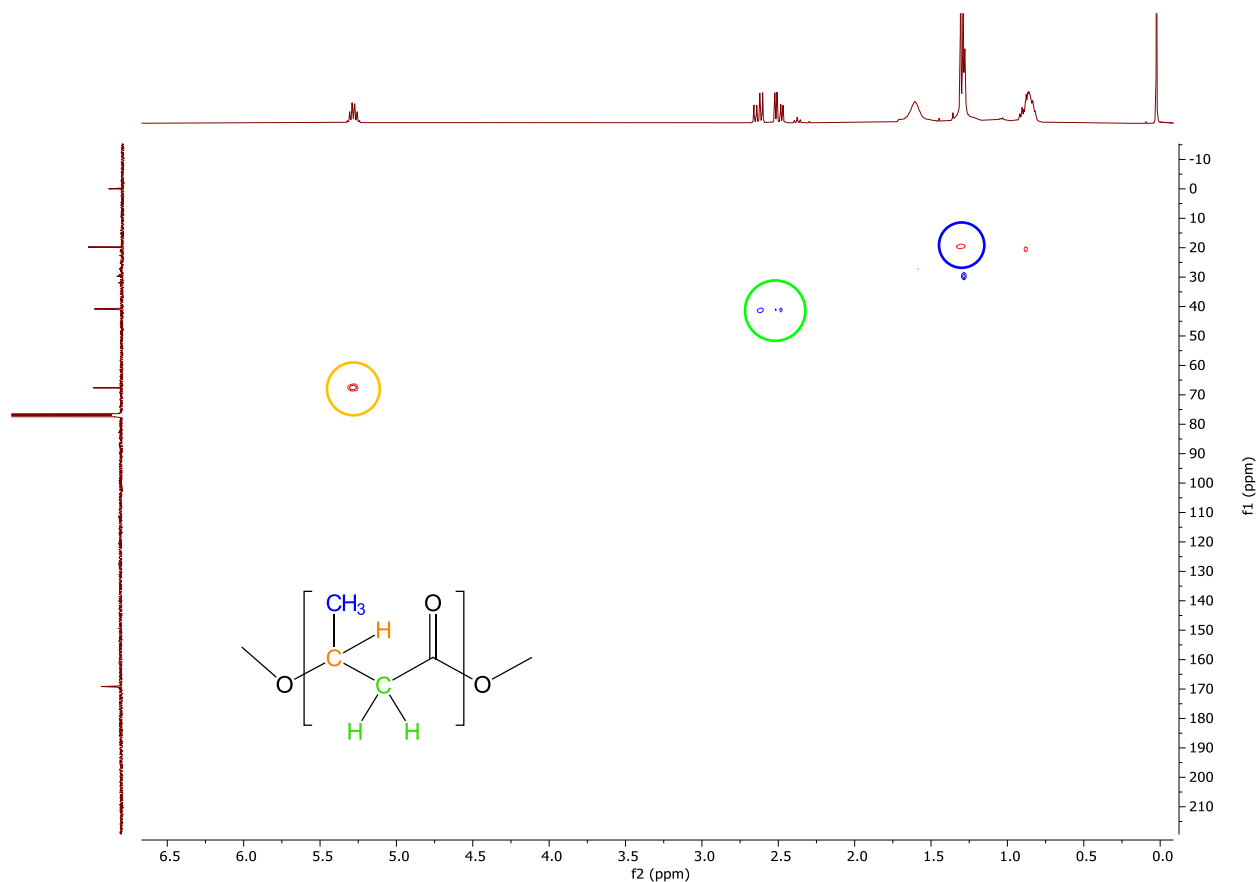
Además, se analizó el espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC), ya que es muy importante conocer la conectividad a larga distancia. De esta manera, se observan las señales características de este tipo de polímero. La primera señal se ubica en (1,27)(41,69) ppm y es causada por la interacción entre el segundo carbono y los hidrógenos del cuarto. La señal en (1,30)(67,57) ppm es por la relación entre el tercer carbono y los hidrógenos del cuarto. Por otra parte, en (2,61)(67,81) ppm se encuentra la señal de interacción del tercer carbono y los hidrógenos del segundo. La señal en (2,61)(169,05) ppm se debe a la relación entre el primer carbono y los hidrógenos del segundo. La señal en (1,46)(19,75) ppm es por la interacción entre los hidrógenos del cuarto carbono. La señal en (5,29)(40,75) ppm es por la interacción entre el segundo carbono y el hidrógeno del tercero. Por último, la señal en (5,28)(169,69) ppm se origina por la interacción entre el primer carbono y el hidrogeno del tercero (Bossu et al., 2020).

Figura 35. Espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC), del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono.



Para finalizar, el espectro bidimensional de espectroscopia de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC), indicó la relación directa entre los protones y carbono unidos por enlace simple (figura 38). La primera señal se ubicó en la coordenada (1,30)(19,75) ppm y corresponde al cuarto carbono (-CH₃). Por su parte la señal del segundo carbono (-CH₂) se ubicó en (2,62)(40,75) y (2,46)(40,75) ppm, se dividió en dos porque estos hidrógenos no son geminales. La señal en (5,28)(67,34) ppm corresponde al tercer carbono (-CH), el cuarto carbono no presentó señal por no estar enlazado a ningún hidrógeno (Bossu et al., 2020).

Figura 36. Espectro de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC), del polímero sintetizado por la cepa *Bacillus thuringiensis*, con pectina como fuente de carbono.



5.3.5 Caracterización mediante análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

Posterior a la derivatización del biopolímero, se realizó el análisis por cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS). En la figura 37 se muestra el perfil cromatográfico del biopolímero producido por la bacteria *Bacillus thuringiensis* utilizando pectina como fuente de carbono y en el apéndice Y los perfiles cromatográficos del biopolímero producido con glucosa por *Bacillus thuringiensis* y por *Bacillus cereus*, en los tres cromatogramas se encontraron las mismas señales. De esta manera, se identificaron cada una de las señales registradas en el cromatograma. La primera señal se ubicó en un tiempo de retención de 1,928 min y de acuerdo con la base de datos (NIST MS Program, Maryland, Estados Unidos) con una similitud de 61,1 % corresponde al compuesto (*E*)-2-butenato de metilo, lo cual se confirmó al analizar su espectro

de masas. Este compuesto posee su ion molecular en m/z 100 y el ion pico base se encuentra en m/z 69 ($-C_4H_5O^+$) (figura 38) y se presume que es producido por la deshidratación intramolecular del ácido β -hidroxibutírico, esta reacción suele llevarse a cabo en presencia de un agente deshidratante, como el ácido sulfúrico y se cataliza mediante calor (Carey et al., 2013). Asimismo, la señal en 3,018 min se identificó como (*R/S*)-metil-3-hidroxibutirato con una similitud de 91,1 % (NIST MS Program, Maryland, Estados Unidos), su ion molecular es de m/z 118, mientras que el fragmento del ion pico base se observó en m/z 43 ($-C_2H_3O^+$) (figura 39), este compuesto pertenece al grupo de ésteres de hidroxialcanoatos, y se polimeriza para la formación de polihidroxialcanoatos, además se encuentra presente en la cetosis de los lípidos cuando se utilizan cetonas como el β -hidroxibutirato como fuente de carbono alternativa (Otero et al., 2013). La última señal en 3,442 min, se identificó como 3-metoxibutanoato de metilo con similitud de 96,9 % (NIST MS Program, Maryland, Estados Unidos), este es un compuesto orgánico con ion molecular de m/z 132, y fragmento de pico base de m/z 59 ($-C_2H_3O^+$) (figura 40). Se obtuvo a partir de la hidrólisis selectiva de los enlaces éster y su posterior metilación por acción del metanol presente en la derivatización, asimismo, la estructura de este compuesto permite su polimerización gracias a su grupo éster ($-COOCH_3$) y su grupo metoxi ($-OCH_3$), por lo cual es un monómero importante para la síntesis de polímeros. Estas 3 señales nuevamente confirman que el biopolímero producido por las bacterias en esta investigación es poli-3-hidroxibutirato (P3HB).

Figura 37. (A) Perfil cromatográfico del biopolímero de PHA extraído de *Bacillus thuringiensis* utilizando pectina como fuente de carbono. (B) Ruta de formación de los compuestos obtenidos.

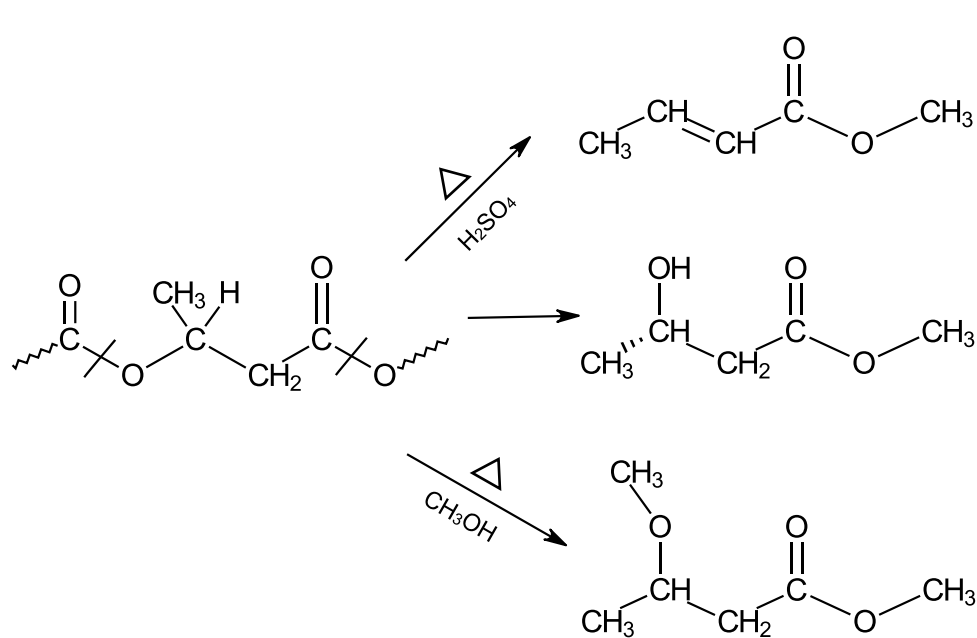
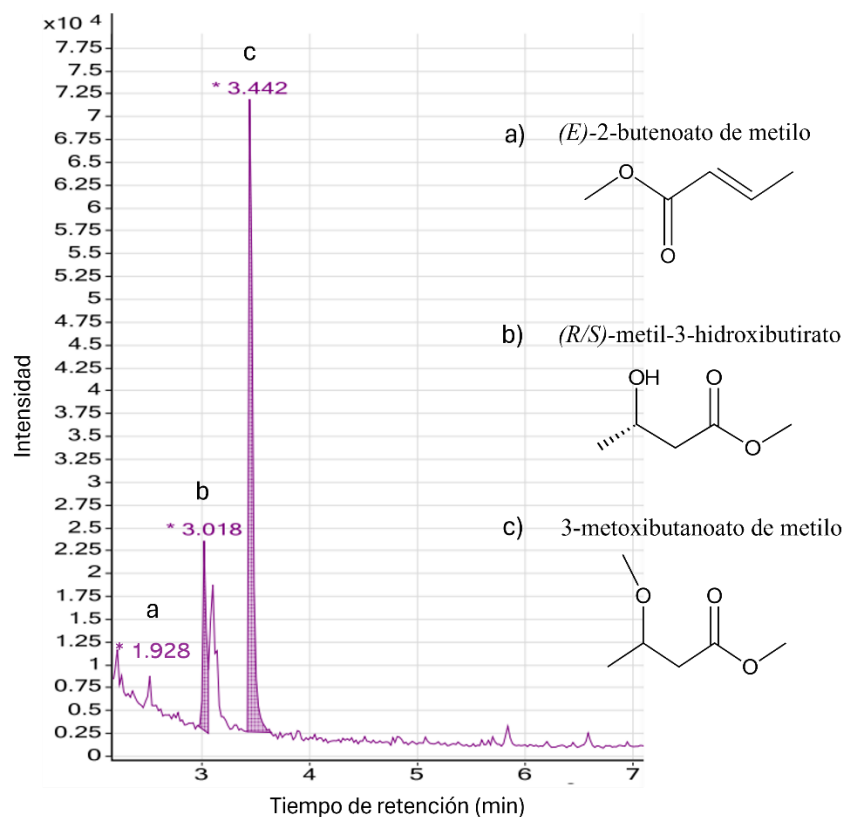


Figura 38. (A) Espectro de masas experimental del compuesto *(E)*-2-butenoato de metilo ($t_R = 1,928 \text{ min}$); (B) Espectro de masas reportado en la NIST para el compuesto *(E)*-2-butenoato de metilo.

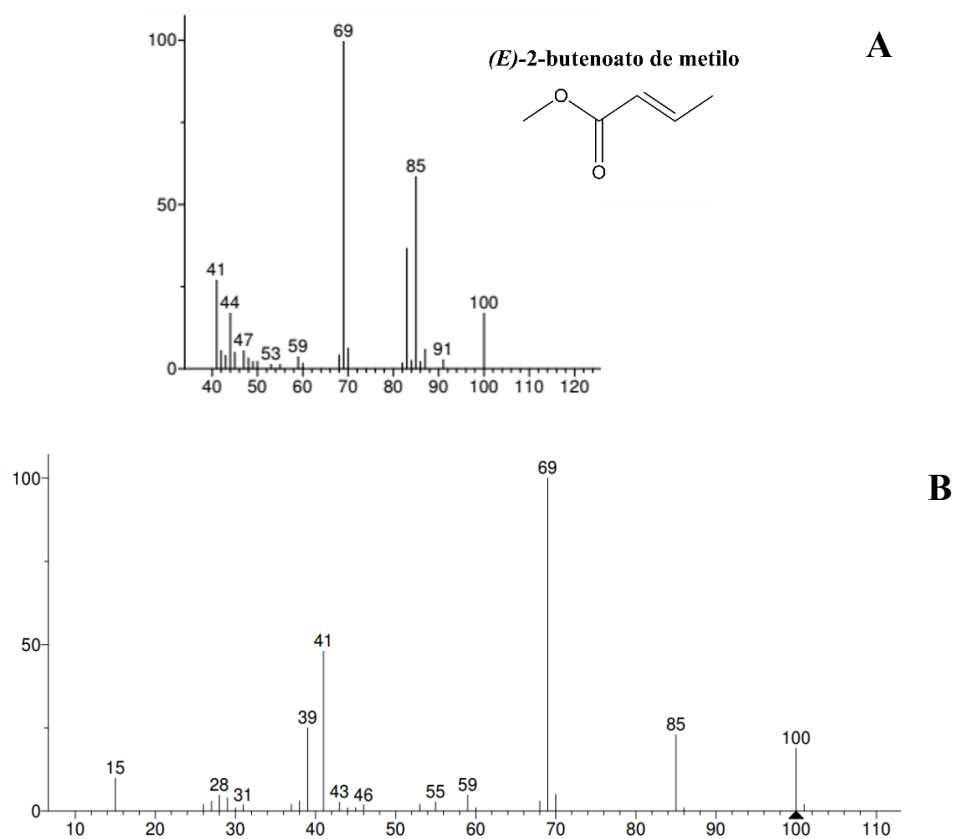
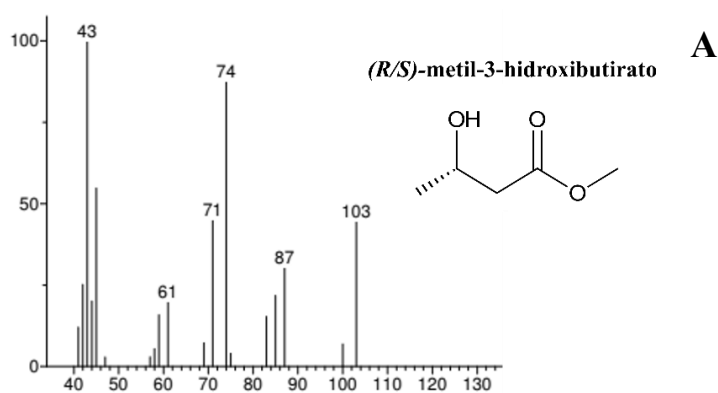


Figura 39. (A) Espectro de masas experimental del compuesto (*R/S*)-metil-3-hidroxitirato ($t_R=3,018$ min); (B) Espectro de masas reportado en la NIST para el compuesto (*R/S*)-metil-3-hidroxitirato.



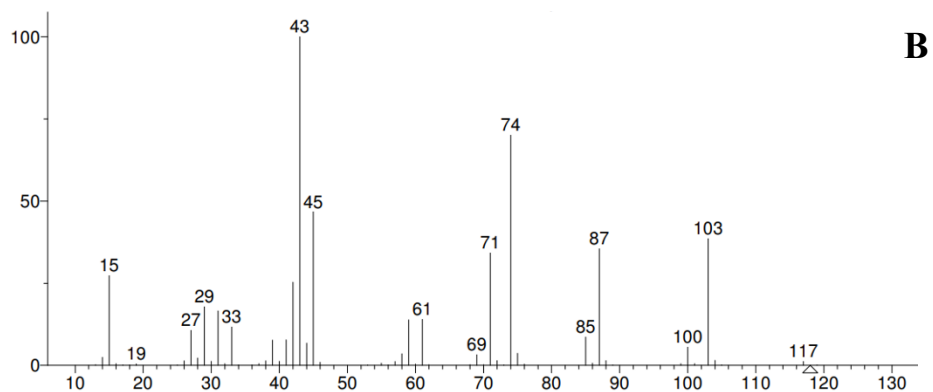
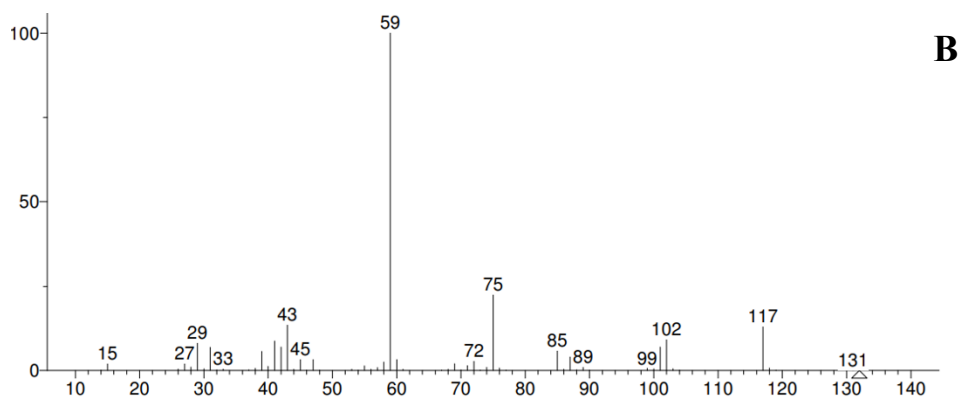
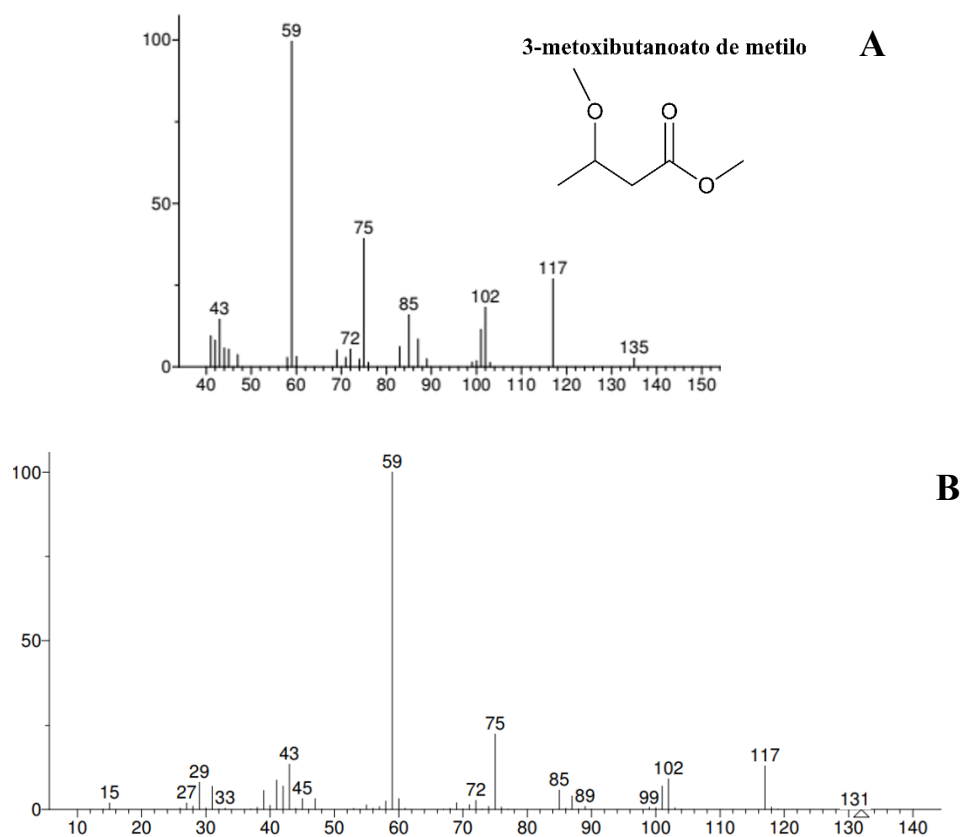


Figura 40. (A) Espectro de masas experimental del compuesto 3-metoxibutanoato de metilo ($t_R=3,442$ min); (B) Espectro de masas reportado en la NIST del compuesto 3-metoxibutanoato de metilo.



6. Conclusiones

El objetivo de la investigación fue optimizar la composición del medio de cultivo para maximizar la producción de polihidroxialcanoatos. Los valores óptimos de las variables seleccionadas para la cepa *Bacillus thuringiensis* fueron los siguientes: 20 g/L de pectina como única fuente de carbono, 0,2% de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, 2,2 g/L de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), 0,5 g/L de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), pH 7 y temperatura de incubación de 30°C. Este enfoque dio como resultado un rendimiento en la producción del polímero de $58,29 \pm 2,64$ %, lo cual es 1,5 veces superior al que se tenía en el medio original, lo que se traduce en menores costos de producción, ya que la pectina es un sustrato de menor costo. Sin embargo, la cepa *Bacillus cereus*, se identificó como un microorganismo no viable para la producción de PHA con esta fuente de carbono, ya que la acumulación es tan baja que no permite su posterior extracción. Mediante análisis de FTIR, GC/MS y RMN, se identificó el biopolímero obtenido en la fermentación como poli-3-hidroxi-butirato (P3HB).

7. Bibliografía

- A, U., New, C., Chai, L., A, N. F., K, N. H., Nishibuchi, M., & R, S. (2019b). Impact of temperature on *Bacillus cereus* spore germination in ultra-high temperature chocolate milk. *Food Research*, 808-813. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).193](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).193)
- Agboola, F. O. (2023). Microbiological production of polyhydroxybutyrate and pectinase from agricultural wastes (Order No. 30691502). Available from ProQuest One Academic. (2892483852). Retrieved from <https://www.proquest.com/dissertations-theses/microbiological-production-polyhydroxybutyrate/docview/2892483852/se-2>
- Aldor, I. S., Kim, S., Prather, K. L. J., & Keasling, J. D. (2002). Metabolic engineering of a novel Propionate-Independent pathway for the production of Poly(3-Hydroxybutyrate- co -3-Hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(8), 3848-3854. <https://doi.org/10.1128/aem.68.8.3848-3854.2002>
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., & Duchiron, F. (2011). Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46(8), 1525-1537. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.010>
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 8–19. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-2>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5), 363-408. <https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10>

- Anderson, A. J., & Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, 54(4), 450-472. <https://doi.org/10.1128/mr.54.4.450-472.1990>
- Andler, R., Pino, V., Moya, F., Soto, E., Valdés, C., & Andreeßen, C. (2021). Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. *International Journal Of Biobased Plastics*, 3(1), 98-111. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 89, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 60-63. https://doi.org/10.21930/rcta.vol5_num1_art:26
- Argiz, L., González-Cabaleiro, R., Del Río, Á. V., González-López, J., & Mosquera-Corral, A. (2020). A novel strategy for triacylglycerides and polyhydroxyalkanoates production using waste lipids. *The Science Of The Total Environment*, 763, 142944. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142944>
- Arroyave, A. L., Cardona, M., & Agudelo, L. (2013). Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxialcanoatos -(phas) en lodos activados. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1):69-76, November 2013. Number: 1. 68, 69, 73.

- Ashter, S. A. (2016). Overview of biodegradable polymers. Introduction to bioplastics engineering, 19.
- Babel W. y Steinbüchel A. (2001) Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng. Biotechnology. 1st. ed. Springer Verlag. Berlin, Alemania, 342 pp.
- Bagdadi, A. V., Safari, M., Dubey, P., Basnett, P., Sofokleous, P., Humphrey, E. J., Locke, I. C., Edirisinghe, M., Terracciano, C. M., Boccaccini, A. R., Knowles, J. C., Harding, S. E., & Roy, I. (2017). Poly(3-hydroxyoctanoate), a promising new material for cardiac tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(1), e495-e512. <https://doi.org/10.1002/term.2318>
- Bano, S., Aslam, A. A., Khan, A., Shabbir, A., Qayyum, F., Wahab, N., Jabar, A., Islam, I. U., & Ng, S. L. (2024). A mini-review on polyhydroxyalkanoates: Synthesis, extraction, characterization, and applications. *Process Biochemistry*, 146, 250-261. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.07.033>
- Bartels, M., Gutschmann, B., Widmer, T., Grimm, T., Neubauer, P., & Riedel, S. L. (2020). Recovery of the PHA Copolymer P(HB-co-HHx) With Non-halogenated Solvents: Influences on Molecular Weight and HHx-Content. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00944>
- Basak, B., Ince, O., Artan, N., Yagci, N., & Ince, B. K. (2011). Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, 34(8), 1007-1016. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0551-x>
- Basnett, P., Ching, K. Y., Stolz, M., Knowles, J. C., Boccaccini, A. R., Smith, C. L., Locke, I. C., Keshavarz, T., & Roy, I. (2013). Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-

- hydroxybutyrate) blends for medical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 73(10), 1340-1348. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.03.019>
- Behera, S., Priyadarshane, M., Vandana, N., & Das, S. (2022). Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere*, 294, 133723. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133723>
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XL(2), 45-50.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509-516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>
- Bhatia, S. K., Kim, J. H., Kim, M. S., Kim, J., Hong, J. W., Hong, Y. G., Kim, H. J., Jeon, J., Kim, J. S., Ahn, J., Lee, H., & Yang, Y. H. (2017). Production of (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymer from coffee waste oil using engineered *Ralstonia eutropha*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 229-235. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1861-4>
- Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V., & Yadav, A. (2014). Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. *Bioresources And Bioprocessing*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0009-5>
- Bossu, J., Angellier-Coussy, H., Totee, C., Matos, M., Reis, M., & Guillard, V. V. (2020). Effect of the Molecular Structure of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-3HV))

- Produced from Mixed Bacterial Cultures on Its Crystallization and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 21(12), 4709-4723. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00826>
- Brandi, H., Bachofen, R., Mayer, J., & Wintermantel, E. (1995). Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Canadian Journal Of Microbiology*, 41(13), 143-153. <https://doi.org/10.1139/m95-181>
- Brandl, H., & Puchner, P. (1992). Biodegradation of plastic bottles made from ?Biopol? in an aquatic ecosystem under in situ conditions. *Biodegradation*, 2(4), 237-243. <https://doi.org/10.1007/bf00114555>
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 41(7), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Brojanigo, S., Parro, E., Cazzorla, T., Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2020). Conversion of starchy waste streams into polyhydroxyalkanoates using *Cupriavidus necator* DSM 545. *Polymers*, 12(7), 1496. <https://doi.org/10.3390/polym12071496>
- Burgos, M. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1), 57-66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>.
- Byrom, D. (1992). Production of poly-Î2-hydroxybutyrate: poly-Î2-hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2-4), 247-250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05844.x>

- Cai, D., Rao, Y., Zhan, Y., Wang, Q., & Chen, S. (2019). Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. *Journal Of Applied Microbiology*, 126(6), 1632-1642. <https://doi.org/10.1111/jam.14192>
- Caruso, G. (2019). Microplastics as vectors of contaminants. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 921-924. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.052>
- Castilla-Marroquín, J., Pacheco, N., Herrera-Corredor, J., Hernández-Rosas, F., Jiménez-Morales, K., Benítez-Salamanca, M., & Hernández-Martínez, R. (2024). Polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus thuringiensis* HA1 using sugarcane molasses as carbon source. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 23(3), 1-19. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio24352>
- Chayabutra, C., & Ju, L. (2001). Polyhydroxyalkanoic Acids and Rhamnolipids Are Synthesized Sequentially in Hexadecane Fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Biotechnology Progress*, 17(3), 419-423. <https://doi.org/10.1021/bp010036a>
- Chen, G., & Jiang, X. (2017). Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion In Biotechnology*, 53, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.008>
- Chen, X., Xiong, X., Jiang, X., Shi, H., & Wu, C. (2019). Sinking of floating plastic debris caused by biofilm development in a freshwater lake. *Chemosphere*, 222, 856-864. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.015>
- Chesson, A. (1980) A Review: Maceration in Relation to the Post-harvest Handling and Processing of Plant Material. *J Appl Bacteriol*, 48(1): 1-45.

- Ciesielski, S., Możejko, J. y Pisutpaisal, N. (2015). Los aceites vegetales como sustratos prometedores para la producción de polihidroxicanoatos. *Revista de Producción Más Limpia*, 106, 408-421.
- Cubero-Agüero, D., Brenes-Guillén, L., -Barahona, D. V., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 178-195. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40845>
- Dawes, E. A., & J. P., Senior. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. En *Advances in Microbial Physiology* (pp. 135-266). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60088-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60088-0)
- De Almeida Melo, A. L., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews In Biotechnology*, 36(2), 317-326. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- Desouky, S., El-Shiekh, H., Elabd, M., & Shehab, A. (2014). Screening, Optimization and Extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Bacillus thuringiensis*. *Journal Of Advances In Biology & Biotechnology*, 1(1), 40-54. <https://doi.org/10.9734/jabb/2014/12286>
- Dhania, S., Bernela, M., Rani, R., Parsad, M., Grewal, S., Kumari, S., & Thakur, R. (2022). Scaffolds the backbone of tissue engineering: Advancements in use of polyhydroxyalkanoates (PHA). *International Journal Of Biological Macromolecules*, 208, 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.030>
- Ding, Y., Li, W., Müller, T., Schubert, D. W., Boccaccini, A. R., Yao, Q., & Roether, J. A. (2016). Electrospun Polyhydroxybutyrate/Poly(ϵ -caprolactone)/58S Sol-Gel Bioactive Glass

- Hybrid Scaffolds with Highly Improved Osteogenic Potential for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(27), 17098-17108. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03997>
- Duport, C., Jobin, M., & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Frontiers In Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>
- Dušková, D., & Marounek, M. (2001). Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 159-163. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00970.x>
- Elmowafy, E., Abdal-Hay, A., Skouras, A., Tiboni, M., Casettari, L., & Guarino, V. (2019). Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Review Of Medical Devices*, 16(6), 467-482. <https://doi.org/10.1080/17434440.2019.1615439>
- Evangeline, S., & Sridharan, T. (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>
- Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2018). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels Bioproducts And Biorefining*, 13(1), 208-227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>
- Fontana, R. C., & Silveira, M. M. (2012). Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. *Brazilian*

- Journal Of Chemical Engineering, 29(4), 683-690. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322012000400001>
- Foong, C. P., Higuchi-Takeuchi, M., & Numata, K. (2019). Optimal iron concentrations for growth-associated polyhydroxyalkanoate biosynthesis in the marine photosynthetic purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* under photoheterotrophic condition. PLoS ONE, 14(4), e0212654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212654>
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. BMC Research Notes, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- Ghosh, R. N., & Ray, B. C. (2004). Optimized print properties on starch blended and surface grafted polyethylene films for biodegradable packaging. Journal of Polymer Materials, 21(4), 425-437.
- Gómez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Netto, C. L. B., De Oliveira, M. S., & Da Silva, L. F. (1996). Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 45(6), 785-791. <https://doi.org/10.1007/s002530050763>
- Grigary, S., & Umesh, M. (2023). Floral waste as a potential feedstock for polyhydroxyalkanoate production using halotolerant *Bacillus cereus* TS1: optimization and characterization studies. Biomass Conversion And Biorefinery. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05003-0>
- Guimarães, T. C., Araújo, E. S., Hernández-Macedo, M. L., & López, J. A. (2022). Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis from Alternative Carbon Sources and Analytic

- Methods: A Short Review. *Journal Of Polymers And The Environment*, 30(7), 2669-2684.
<https://doi.org/10.1007/s10924-022-02403-7>
- Gupta, S., Kumawat, S., & Singh, G. P. (2021). Validation and Analysis of Metabolic Pathways Using Petri Nets. En *Advances in intelligent systems and computing* (pp. 361-374).
https://doi.org/10.1007/978-981-16-1740-9_30
- Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J., & Xiang, H. (2010). Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7811-7819.
<https://doi.org/10.1128/aem.01117-10>
- Hernández, M. P., & Arambarri, A. M. (2019). Variación estacional de la densidad de granos de almidón en rizomas de *Canna glauca* y *C. indica* (Cannaceae). *Lilloa*, 37-46.
<https://doi.org/10.30550/j.lil/2019.56.2/3>
- Howard, G. T. (2002). Biodegradation of Polyurethane: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(4), 245-252. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(02)00051-3)
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31-50. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- Ivanova, G., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Reis, M. A. M., & Cabrita, E. J. (2009). Influence of feeding strategies of mixed microbial cultures on the chemical composition and microstructure of copolyesters P(3HB-co-3HV) analyzed by NMR and statistical analysis. *Magnetic Resonance In Chemistry*, 47(6), 497-504.
<https://doi.org/10.1002/mrc.2423>

- Iza Radecka, Victor Irorere, Guozhan Jiang, David Hill, Craig Williams, Grazyna Adamus, Michal Kwiecień, Adam A. Marek, Jan Zawadiak, Brian Johnston, and Marek Kowalczyk. Oxidized Polyethylene Wax as a Potential Carbon Source for PHA Production. 9(5):E367.
- Jaeger, K., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. Annual Review Of Microbiology, 53(1), 315-351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., & Radecka, I. (2016). Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. International Journal Of Molecular Sciences, 17(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Jung, Y., & Lee, Y. (2000). Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly-β-hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia Eutropha*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 90(3), 266-270. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)80080-8](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)80080-8)
- Kabir, M. S., & Tasmim, T. (2019). Isolation of Pectinase Producing Bacteria from the Rhizosphere of *Andrographis paniculata*; Nees and 16S rRNA Gene Sequence Comparison of Some Potential Strains. Advances In Microbiology, 09(01), 1-13. <https://doi.org/10.4236/aim.2019.91001>
- Kadouri, D. E., Jurkevitch, É., Okon, Y., & Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. Critical Reviews in Microbiology, 31(2), 55-67. <https://doi.org/10.1080/10408410590899228>

- Kavuthodi, B., & Sebastian, D. (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(1), 18-30. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/4>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40 (2), 607-619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Khosravi-Darani, K., Mokhtari, Z., Amai, T., & Tanaka, K. (2013). Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97(4), 1407-1424. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4649-0>
- Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. (2007). Mixed Culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>
- Koller, M., & Mukherjee, A. (2022). A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters. *Bioengineering*, 9(2), 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074>
- Koller, M., & Obruča, S. (2022). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from glycerol: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102333. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102333>
- Koller, M., & Rodríguez-Contreras, A. (2015). Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering In Life Sciences*, 15(6), 558-581. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400228>
- Lamparelli, E. P., Marino, M., Szychlinska, M. A., Della Rocca, N., Ciardulli, M. C., Scala, P., D'Auria, R., Testa, A., Viggiano, A., Cappello, F., Meccariello, R., Della Porta, G., &

- Santoro, A. (2023). The Other Side of Plastics: Bioplastic-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems in the Brain. *Pharmaceutics*, 15(11), 2549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112549>
- Liu, H., Kumar, V., Jia, L., Sarsaiya, S., Kumar, D., Juneja, A., Zhang, Z., Sindhu, R., Binod, P., Bhatia, S. K., & Awasthi, M. K. (2021). Biopolymer poly-hydroxyalkanoates (PHA) production from apple industrial waste residues: A review. *Chemosphere*, 284, 131427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131427>
- Liu, K., Wang, Z., Zhang, Y., Xu, D., Gao, J., Ma, Z., & Wang, Y. (2019). Vapour-liquid equilibrium measurements and extractive distillation process design for separation of azeotropic mixture (dimethyl carbonate + ethanol). *The Journal Of Chemical Thermodynamics*, 133, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.01.027>
- Lomas, A., Webb, W. R., Han, J., Chen, G., Sun, X., Zhang, Z., Haj, A. J. E., & Forsyth, N. R. (2013). Poly (3-Hydroxybutyrate-CO-3-Hydroxyhexanoate)/Collagen hybrid scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part C-methods*, 19(8), 577-585. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0457>
- Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226-248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>
- Luh, B., & Phaff, H. (1951). Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 33(2), 212-227. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90100-2)

- Mahishi, L., Tripathi, G., & Rawal, S. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 158(1), 19-27. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00161>
- Marenda, F. R. B., Mattioda, F., Demiate, I. M., De Francisco, A., De Oliveira Petkowicz, C. L., Canteri, M. H. G., & De Mello Castanho Amboni, R. D. (2019). Advances in studies using vegetable wastes to obtain pectic substances: a review. *Journal of Polymers and The Environment*, 27(3), 549-560. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1355-8>
- 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>
- Matias, F., & De Andrade Rodrigues, M. F. (2011). New PHA products using unrelated carbon sources. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 42(4), 1354-1363. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822011000400017>
- Maxwell, E. G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Morris, V. J. (2012). Pectin – an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science and Technology*, 24(2), 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.002>
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc*, 49, 1176-1178. [10.1001/jama.1907.25320140022001f](https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f)

- Meereboer, K. W., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2020). Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*, 22(17), 5519-5558. <https://doi.org/10.1039/d0gc01647k>
- Mohandas, S. P., Balan, L., Jayanath, G., Anoop, B., Philip, R., Cubelio, S. S., & Singh, I. B. (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>
- 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>
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Morlino, M. S., García, R., Savio, F., Zampieri, G., Morosinotto, T., Treu, L., & Campanaro, S. (2023). *Cupriavidus Necator* as a platform for PHA production: An Overview of strains, metabolism, and modeling approaches. *Biotechnology Advances*, 69, 108264. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>
- Muhammadi, N., Shabina, N., 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>

- Müller, R., Kleeberg, I., & Deckwer, W. (2001). Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal Of Biotechnology*, 86(2), 87-95. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00407-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00407-7)
- Muneer, F., Rasul, I., Azeem, F., Siddique, M. H., Zubair, M., & Nadeem, H. (2020). Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *Journal Of Polymers And The Environment*, 28(9), 2301-2323. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>
- Muneer, N. F., Nadeem, H., Arif, A., & Zaheer, W. (2021). Bioplastics from Biopolymers: An Eco-Friendly and Sustainable Solution of Plastic Pollution. *Polymer Science Series C*, 63(1), 47-63. <https://doi.org/10.1134/s1811238221010057>
- Ni, Y., Kim, D. Y., Chung, M. G., Lee, S. H., Park, H., & Rhee, Y. H. (2010). Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technology*, 101(21), 8485-8488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.033>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. In R. Burgess, & P. Deutscher (Eds.) *Methods in enzymology* (pp. 73-95). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- O'Neill, M. A., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in plant biochemistry* (pp. 415-441). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461012-5.50018-5>

- Obruca, S., Marova, I., Melusova, S., & Mravcova, L. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals Of Microbiology*, 61(4), 947-953. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0218-5>
- Obruca, S., Sedlacek, P., & Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology*, 326, 124767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124767>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 36(3), 856-870. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>
- Odeniyi, O. A., & Adeola, O. J. (2017). Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 104, 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.041>
- Ojha, N., & Das, N. (2020). Process optimization and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymers produced by marine *Pichia kudriavzevii* VIT-NN02 using banana peels and chicken feather hydrolysate. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 27, 101616. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101616>
- Pais, J., Serafím, L. S., Freitas, F., & Reis, M. A. (2016). Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax Mediterranei*. *New Biotechnology*, 33(1), 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.06.001>

- Park, H., He, H., Yan, X., Liu, X., Scrutton, N. S., & Chen, G.-Q. (2024). PHA is not just a bioplastic! *Biotechnology Advances*, 108320. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108320>
- Patil, T. D., Ghosh, S., Agarwal, A., Patel, S. K. S., Tripathi, A. D., Mahato, D. K., Kumar, P., Slama, P., Pavlik, A., & Haque, S. (2024). Production, optimization, scale up and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers utilizing dairy processing waste. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52098-0>
- Pedrolli, D. B., & Carmona, E. C. (2014). Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* Able to Release Unsaturated Monogalacturonate during Pectin Degradation. *Enzyme Research*, 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/353915>
- Ponnusamy, S., Viswanathan, S., Periyasamy, A., & Rajaiah, S. (2019). Production and characterization of PHB-HV copolymer by *Bacillus thuringiensis* isolated from *Eisenia foetida*. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 66(3), 340-352. <https://doi.org/10.1002/bab.1730>
- Prados, E., & Maicas, S. (2016). Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Universal Journal Of Microbiology Research*, 4(1), 23-30. <https://doi.org/10.13189/ujmr.2016.040104>
- Prathyusha, K., & Suneetha, V. (2011) Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review. *J Phytol*, 3(6).
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology,

- Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. En Springer eBooks (pp. 1-18).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_1
- Ratledge, C., & Kristiansen, B. (Eds.). (2001). Basic biotechnology. Cambridge University Press.
- Rodrigues, A. M., Franca, R. D. G., Dionísio, M., Sevrin, C., Grandfils, C., Reis, M. A. M., & Lourenço, N. D. (2022). Polyhydroxyalkanoates from a Mixed Microbial Culture: Extraction Optimization and Polymer Characterization. *Polymers*, 14(11), 2155.
<https://doi.org/10.3390/polym14112155>
- Rodríguez, E. (2018). Mejoramiento de un proceso de fermentación de almidón de yuca a escala de laboratorio [Tesis de pregrado, Universidad Icesi].
https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83840/1/TG01986.pdf
- Rond'ošová, S., Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M., & Miertuš, S. (2022). Optimization of Growth Conditions to Enhance PHA Production by *Cupriavidus necator*. *Fermentation*, 8(9), 451. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090451>
- Rueda Ruiz, Paula Andrea. (2024). Evaluación de extractos de raíz y fruto de la palma de iraca (*Carludovica palmata*) como fuentes de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA). Universidad Industrial de Santander.
<https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/42588>
- S., Rhee, K., & Park, S. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): biopolymers for biofuel and biorefineries. *Polymers*, 13(2), 253. <https://doi.org/10.3390/polym13020253>
- Salazar-Marroquín, E. L., Galán-Wong, L. J., Moreno-Medina, V. R., Reyes-López, M. Á., & Pereyra-Alfárez, B. (2016). Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities

- and potential applications. *Reviews In Medical Microbiology*, 27(3), 95-101.
<https://doi.org/10.1097/mrm.0000000000000076>
- Samrot, A.V.; Samanvitha, S.K.; Shobana, N.; Renitta, E.R.; Senthilkumar, P.; Kumar, S.S.; Abirami, S.; Dhiva, S.; Bavanilatha, M.; Prakash, P.; et al. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers* 2021, 13, 3302. <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- Saratale, R. G., Cho, S., Kadam, A. A., Ghodake, G. S., Kumar, M., Bharagava, R. N., Kumar, G., Kim, D. S., Mulla, S. I., & Shin, H. S. (2021). A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams. *Bioresource Technology*, 325, 124685.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124685>
- Sawant, S., Salunke, B., Taylor, L., & Kim, B. (2017). Enhanced Agarose and Xylan Degradation for Production of Polyhydroxyalkanoates by Co-Culture of Marine Bacterium, *Saccharophagus degradans* and Its Contaminant, *Bacillus cereus*. *Applied Sciences*, 7(3), 225. <https://doi.org/10.3390/app7030225>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3), 246-265.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shrivastav, A., Kim, H., & Kim, Y. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International*, 2013, 1-12.
<https://doi.org/10.1155/2013/581684>

- Singh, M., Kumar, P., Ray, S., & Kalia, V. C. (2015). Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal Of Microbiology*, 55(3), 235-249. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0528-6>
- Sirotek, K., Slovakova, L., Kopecny, J., & Marounek, M. (2004). Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bacteroides caccae*. *Letters In Applied Microbiology*, 38(4), 327-332. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01492.x>
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 422-426. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>
- Sohail, M., & Latif, Z. (2016). Phylogenetic Analysis of Polygalacturonase-Producing *Bacillus* and *Pseudomonas* Isolated From Plant Waste Material. *Jundishapur Journal Of Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.5812/jjm.28594>
- Steinbüchel, A., & Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. En *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (pp. 81-123). https://doi.org/10.1007/3-540-40021-4_3
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/s0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6700(00)00035-6)
- Suguna, P. P., Saranya, V. V., Abirami, P. P., & Shenbagarathai, R. R. (2020). Optimization and Characterization of PHA (SCL-SCL) Copolymer by Indigenous *Bacillus thuringiensis* A102 Strain for Biomedical Applications. *Current Microbiology*, 77(12), 3978-3989. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02221-x>

- Tan, G. A., Chen, C., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Yu, M., & Wang, J. (2014). Start research on Biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Tello-Cruzado, B. K., Azañedo-Vargas, M., Quiñones-Cerna, C. E., Fuentes-Olivera, A., Rodríguez-Soto, J. C., Quezada-Alvarez, M. A., & Cruz-Monzon, J. A. (2024). Use of Enzymatic Hydrolysate from Agroindustrial Asparagus Waste as Substrate for the Production of Polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Research Engineering And Management*, 80(2), 8-16. <https://doi.org/10.5755/j01.arem.80.2.34237>
- Ten, E., Jiang, L., Zhang, J., & Wolcott, M. (2015). Mechanical performance of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based biocomposites. En Elsevier eBooks (pp. 39-52). <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-373-7.00008-1>
- Thomas, A. P., Kasa, V. P., Dubey, B., Sen, R., & Sarmah, A. K. (2023). Synthesis and Commercialization of Bioplastics: Organic waste as a sustainable feedstock. *Science of The Total Environment*, 904, 167243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167243>
- Tsuge, T. (2016). Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal*, 48(11), 1051-1057. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.78>
- Tsuge, T., Hyakutake, M., & Mizuno, K. (2015). Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(15), 6231-6240. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6777-9>

- Turco, R., Santagata, G., Corrado, I., Pezzella, C., & Di Serio, M. (2021). In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the properties of PHB-Based Materials: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.619266>
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Vicente, D., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2023). The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 20(4), 2959. <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>
- Wang, F., & Lee, S. Y. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4765-4769. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4765-4769.1997>
- Wang, W., Chen, W., Zou, M., Lv, R., Wang, D., Hou, F., Feng, H., Ma, X., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018). Applications of Power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: a review. *Journal of Food Engineering*, 234, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.016>
- Williams, S. F., Rizk, S., & Martin, D. P. (2013). Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 58(5). <https://doi.org/10.1515/bmt-2013-0009>
- 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. K. (2021). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresource Technology Reports*, 16, 100846. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100846>

Yüksel, O., & Büyükgüngör, H. (2000). Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), 49-55. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(00\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(00)00048-2)

Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J. K., Wu, C., & Lam, P. K. (2021). Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution*, 274, 116554.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554>

8. Apéndices

Apéndice A. Ficha técnica de la pectina cítrica utilizada.

FICHA TECNICA PECTINA CITRICA RAPIDA

1. DESCRIPCION:

Polvo fino de color marfil.

2. ESPECIFICACIONES:

- SOLUBILIDAD: Completamente soluble en 25 partes de agua a 70°C con adecuada agitación.
- pH (Solución 3%): 3.0
- GRADO DE ESTERIFICACION: 60%
- TAMAÑO DE PARTICULA: máximo 0.3 mm
- METALES PESADOS:
 - As: 3 mg/Kg máximo
 - Zn: 25 mg/Kg máximo
 - Pb: 10 mg/Kg máximo
 - Cu y Zn: 50mg/Kg máximo

3. USOS

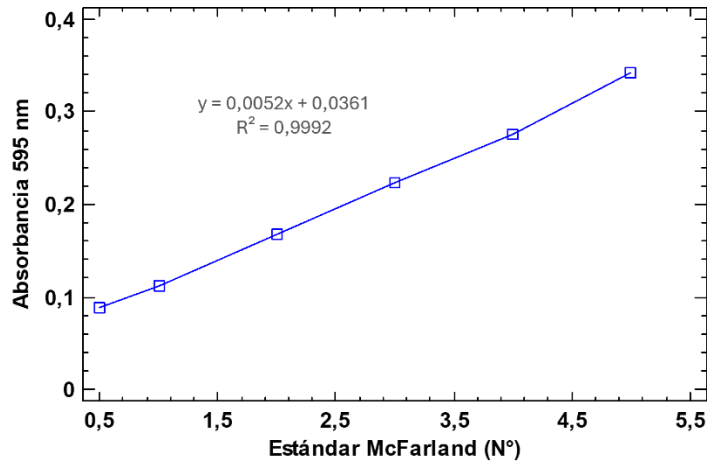
- Medicina: Protector de valor en el tratamiento de la diarrea en lactante y niños.
- Como agente farmacéutico reemplaza como emulsivo y espesante.

4. PRESENTACION COMERCIAL:

- LIBRA
- KILO

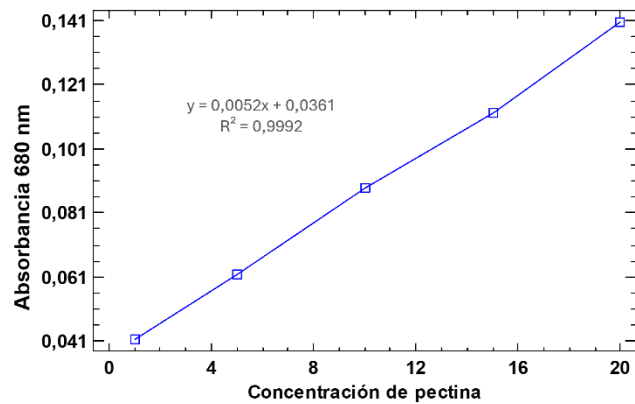
Apéndice B. Escala de soluciones de MacFarland y curva de McFarland.

Estándar McFarland	BaCl ₂ (mL)	H ₂ SO ₄ (mL)	Absorbancia	UFC/mL
0,5	5	995	0,088	1.5 x 10 ⁸
1	10	990	0,111	3x 10 ⁸
2	20	980	0,168	6 x 10 ⁸
3	30	970	0,223	9 x 10 ⁸
4	40	960	0,275	12 x 10 ⁸
5	50	950	0,342	15 x 10 ⁸



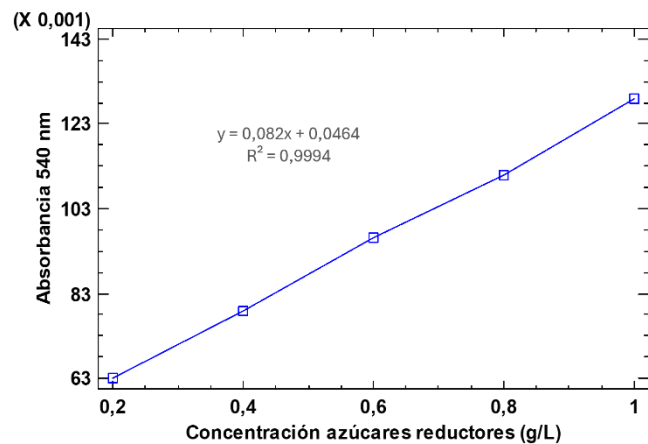
Apéndice C. Curva de calibración para la cuantificación de pectina utilizando solución Lugol 5%

Pectina (g/L)	Absorbancia (680 nm)
1	0,0414
5	0,0617
10	0,089
15	0,1121
20	0,1406



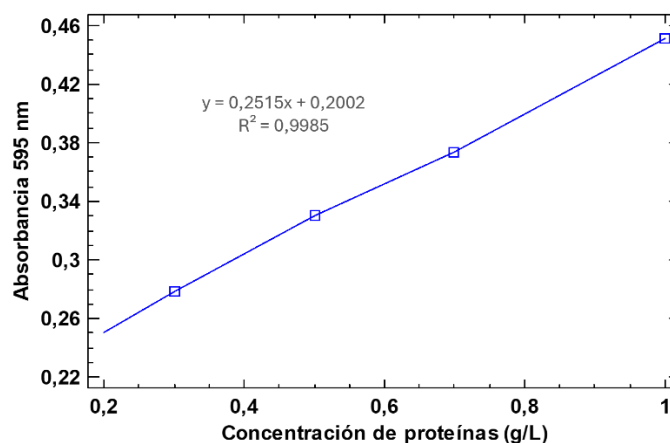
Apéndice D. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo.

Glucosa [g/L]	Absorbancia (540 nm)
0,2	0,063
0,4	0,079
0,6	0,096
0,8	0,111
1	0,129



Apéndice E. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Proteínas (g/L)	Absorbancia (595 nm)
0,1	0,2219
0,3	0,278
0,5	0,3304
0,7	0,3735
1	0,451



Apéndice F. Absorbancia obtenida a 595nm para determinar el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

- **Apéndice F.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Glucosa+ Pectina (GP)					
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,192	0,192	0,185	0,190	0,004
24	1,066	1,072	1,075	1,071	0,005
48	1,190	1,220	1,252	1,220	0,031
72	1,191	1,288	1,256	1,245	0,049
Pectina (P)					
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,123	0,123	0,129	0,125	0,004
24	1,100	1,033	1,085	1,072	0,035
48	1,163	1,117	1,124	1,135	0,025
72	1,281	1,143	1,212	1,212	0,069

- **Apéndice F.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Glucosa+ Pectina (GP)					
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar

0	0,177	0,157	0,169	0,168	0,010
24	0,497	0,481	0,506	0,495	0,013
48	0,555	0,605	0,584	0,581	0,025
72	0,630	0,626	0,647	0,634	0,011
	Pectina (P)				
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,161	0,179	0,153	0,164	0,013
24	0,445	0,467	0,471	0,461	0,014
48	0,548	0,575	0,524	0,549	0,026
72	0,601	0,598	0,615	0,605	0,009

Apéndice G. Análisis estadístico para el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

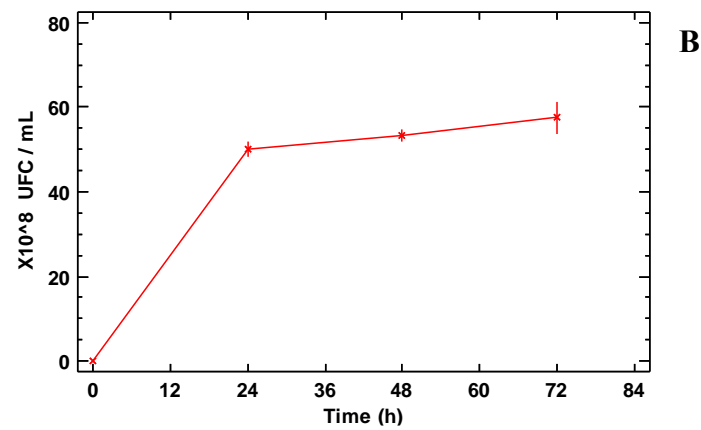
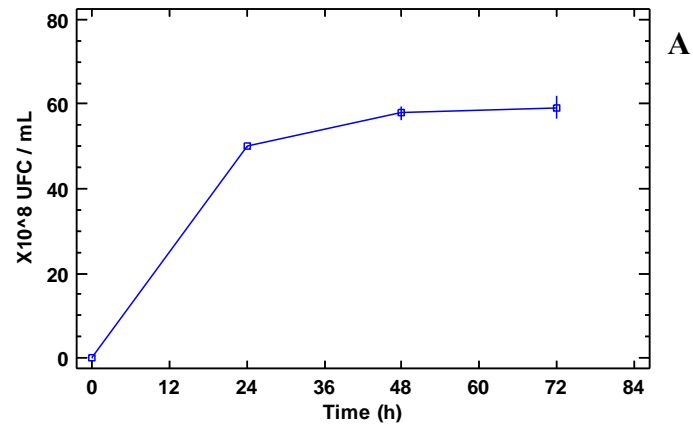
- **Apéndice G.1.** Prueba t de *student* para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*.

	P	GP
Media	57,46607143	59,2375
Varianza	13,76279656	6,952452168
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,981080243	
Estadístico t	-0,485679271	
P(T<=t) una cola	0,33759668	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,67519336	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

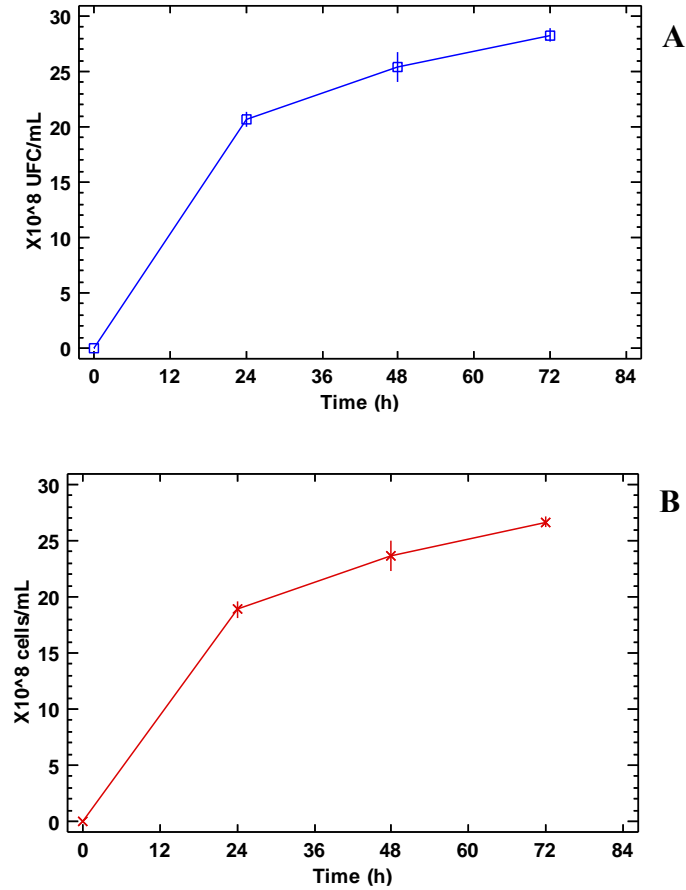
- **Apéndice G.2.** Prueba t de *student* para el crecimiento de *Bacillus cereus*.

	P	GP
Media	26,66245487	28,26895307
Varianza	0,241434138	0,364594873
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999898238	
Estadístico t	-24,68415873	
P(T<=t) una cola	0,000818589	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,001637178	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

- **Apéndice G.3.** (A) Curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con glucosa y pectina (GP); (B) Curva de crecimiento con pectina (P).



- **Apéndice G.4.** (A) Curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus cereus* en medio de cultivo con glucosa y pectina (GP); (B) Curva de crecimiento con pectina (P).



Apéndice H. Absorbancia obtenida a 680 nm para el monitoreo de la degradación de pectina en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

- **Apéndice H.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0893	0,0904	0,0881	0,0893	0,0012
24	0,0785	0,0737	0,0758	0,0760	0,0024
48	0,0660	0,0679	0,0644	0,0661	0,0017
72	0,0616	0,0628	0,0606	0,0617	0,0011
Tiempo (h)	Pectina (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0889	0,0865	0,0914	0,0889	0,0024
24	0,0769	0,0810	0,0789	0,0789	0,0021
48	0,0641	0,0608	0,0581	0,0610	0,0030
72	0,0579	0,0590	0,0571	0,0580	0,0009

- **Apéndice H.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0885	0,0872	0,0897	0,0884	0,0013
24	0,0816	0,0825	0,0835	0,0825	0,0009
48	0,0724	0,0731	0,0729	0,0728	0,0003
72	0,0692	0,0678	0,0694	0,0688	0,0009

Tiempo (h)	Pectina (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0888	0,0902	0,0874	0,0888	0,0014
24	0,0832	0,0838	0,0845	0,0838	0,0007
48	0,0724	0,0732	0,0736	0,0731	0,0006
72	0,0667	0,0681	0,0675	0,0674	0,0007

Apéndice I. Análisis estadístico de la degradación de pectina en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

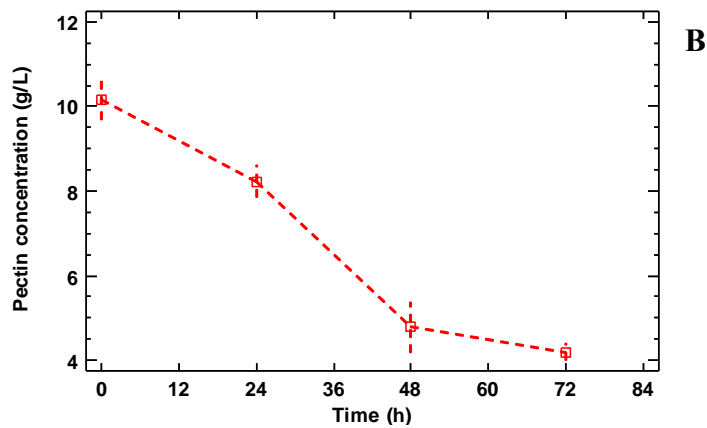
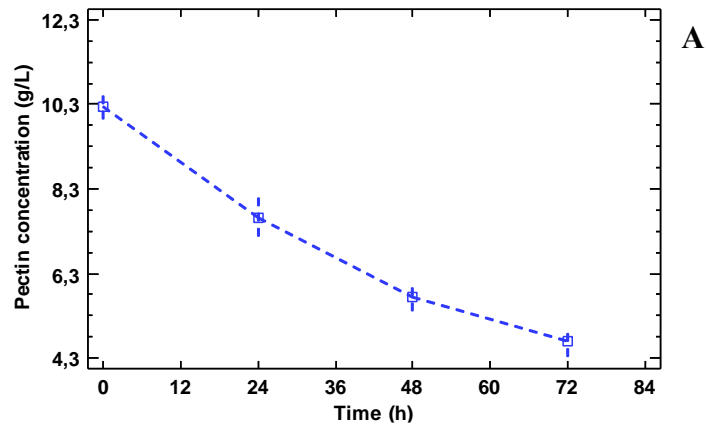
- **Apéndice I.1.** Prueba t de *student* para la degradación de pectina por parte de *Bacillus thuringiensis*.

	P	GP
Media	4,916666667	4,206666667
Varianza	0,044133333	0,034433333
Coefficiente de correlación de Pearson	0,998731366	
Estadístico t	46,48041062	
P(T<=t) una cola	0,000231275	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,00046255	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

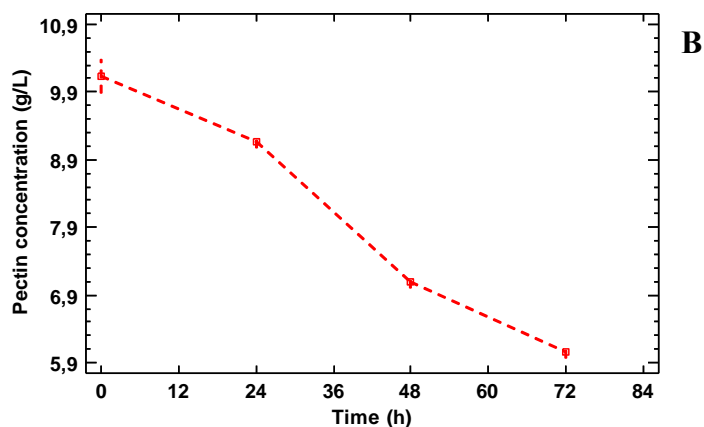
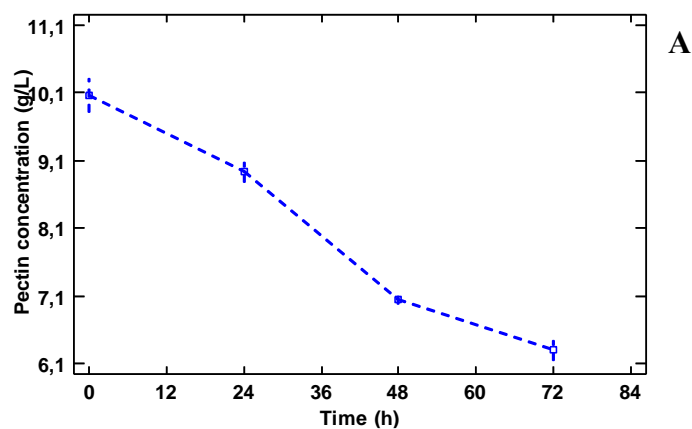
- **Apéndice I.2.** Prueba t de *student* para la degradación de pectina por parte de *Bacillus cereus*.

	P	GP
Media	6,29	6,026666667
Varianza	0,0304	0,019733333
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,751243635	
Estadístico t	1,546939389	
P(T<=t) una cola	0,130970029	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,261940058	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

- **Apéndice I.3.** (A) Degradación de pectina durante la fermentación con la bacteria *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con glucosa y pectina (GP); (B) Degradación de pectina durante la fermentación en medio de cultivo con pectina.



- **Apéndice I.4.** (A) Degradación de pectina durante la fermentación con la bacteria *Bacillus cereus* en medio de cultivo con glucosa y pectina (GP); (B) Degradación de pectina durante la fermentación en medio de cultivo con pectina.



Apéndice J. Absorbancia obtenida a 540 nm para el monitoreo de la producción de azúcares reductores en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

- **Apéndice J.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0875	0,0884	0,0888	0,0882	0,0007
24	0,0901	0,0904	0,0893	0,0899	0,0006
48	0,0924	0,0929	0,0925	0,0926	0,0003
72	0,0800	0,0804	0,0803	0,0802	0,0002

Tiempo (h)	Pectina (P)			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0499	0,0496	0,0496	0,0497	0,0002
24	0,0596	0,0596	0,0597	0,0596	0,0001
48	0,0621	0,0620	0,0628	0,0623	0,0004
72	0,0598	0,0594	0,0596	0,0596	0,0002

- **Apéndice J.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0885	0,0893	0,0899	0,0892	0,0007
24	0,0856	0,0827	0,0870	0,0851	0,0022
48	0,0875	0,0885	0,0891	0,0884	0,0008
72	0,0788	0,0798	0,0793	0,0793	0,0005

Tiempo (h)	Pectina (P)			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0508	0,0491	0,0497	0,0499	0,00083
24	0,0582	0,0576	0,0571	0,0576	0,00054
48	0,0608	0,0601	0,0610	0,0606	0,00047
72	0,0582	0,0587	0,0582	0,0584	0,00030

Apéndice K. Análisis estadístico de la producción máxima de azúcares reductores a las 48 horas de fermentación en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

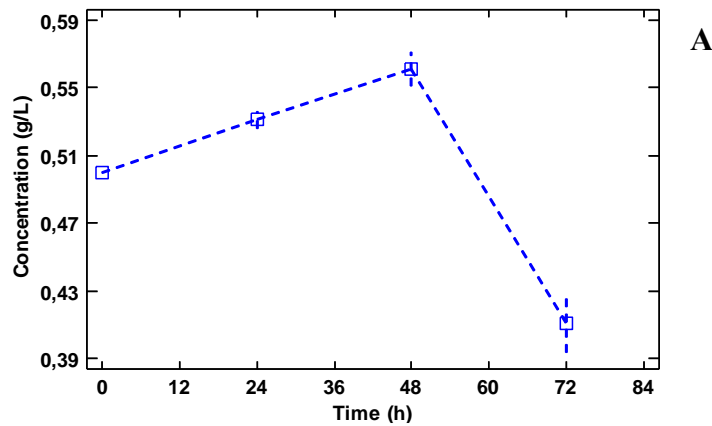
- **Apéndice K.1.** Prueba t de *student* para la producción máxima de azúcares reductores por parte de *Bacillus thuringiensis*.

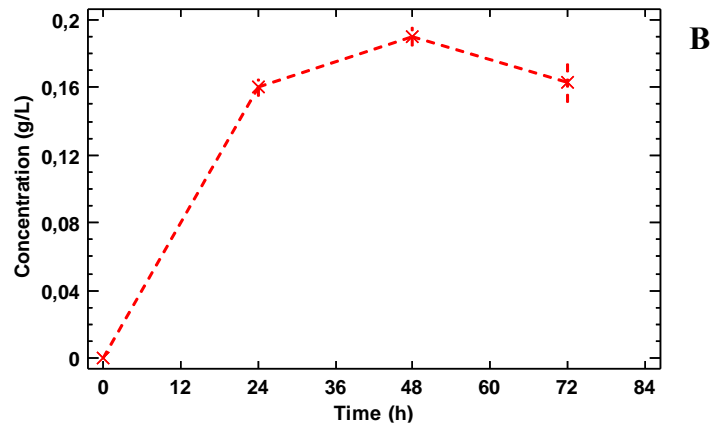
	P	GP
Media	0,563333333	0,1942
Varianza	1,03333E-05	3,504E-05
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,451956028	
Estadístico t	80,82565754	
P(T<=t) una cola	7,65194E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,000153039	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

- **Apéndice K.2.** Prueba t de *student* para la producción máxima de azúcares reductores por parte de *Bacillus cereus*.

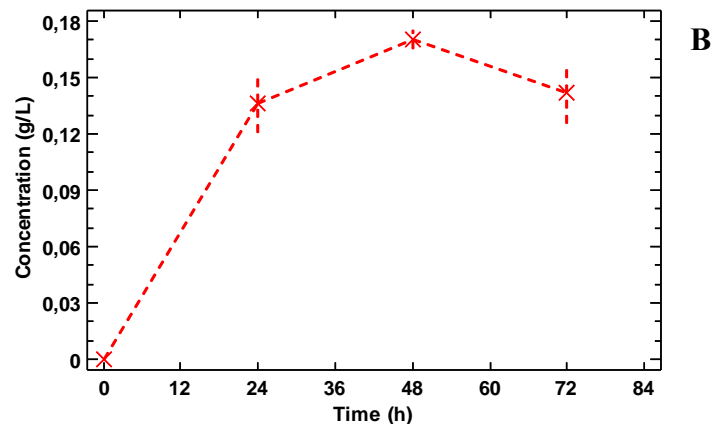
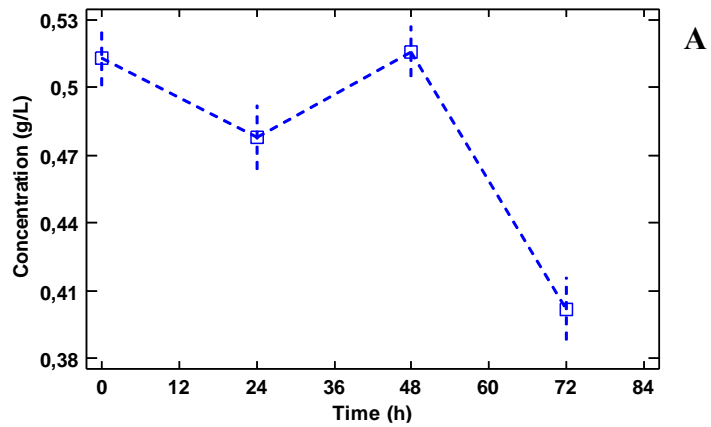
	P	GP
Media	0,088384	0,060613333
Varianza	6,92572E-07	2,17409E-07
Coefficiente de correlación de Pearson	0,095305692	
Estadístico t	52,6064859	
P(T<=t) una cola	0,000180574	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,000361149	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

- **Apéndice K.3.** (A) Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo producidos por parte de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Medio con *pectina* y *glucosa* (GP); (B) Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo producidos por parte de la bacteria *Bacillus thuringiensis* medio con solo *pectina* (P).





- Apéndice K.4.** (A) Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo producidos por parte de la bacteria *Bacillus cereus*. Medio con pectina y glucosa (GP); (B) Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo producidos por parte de la bacteria *Bacillus cereus* medio con solo pectina (P).



Apéndice L. Absorbancia obtenida a 595 nm para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

- **Apéndice L.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,2173	0,2142	0,2151	0,2155	0,0016
24	0,2502	0,2583	0,2450	0,2512	0,0067
48	0,2917	0,2850	0,2759	0,2842	0,0079
72	0,3383	0,3428	0,3483	0,3431	0,0050
Tiempo (h)	Pectina (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,2112	0,2168	0,2147	0,2143	0,0028
24	0,2422	0,2347	0,2528	0,2432	0,0091
48	0,2862	0,2734	0,2528	0,2708	0,0169
72	0,3192	0,3287	0,3325	0,3268	0,0069

- **Apéndice L.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Tiempo (h)	Glucosa+ Pectina (GP)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0518	0,0511	0,0510	0,0513	0,0005
24	0,0581	0,0549	0,0517	0,0549	0,0032
48	0,0637	0,0657	0,0620	0,0638	0,0018
72	0,0821	0,0853	0,0837	0,0837	0,0016
Tiempo (h)	Pectina (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0508	0,0519	0,0515	0,0514	0,00056
24	0,0507	0,0526	0,0535	0,0523	0,00141
48	0,0645	0,0615	0,0592	0,0617	0,00267
72	0,0753	0,0817	0,0779	0,0783	0,00326

Apéndice M. Análisis estadístico de la cuantificación de proteínas a las 72 horas de fermentación en medio de cultivo con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

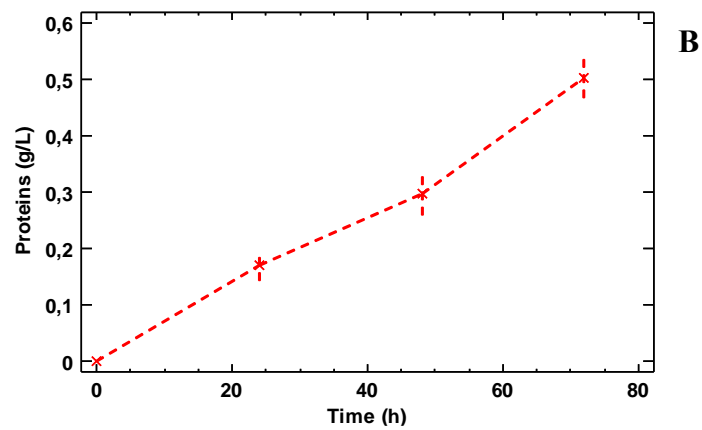
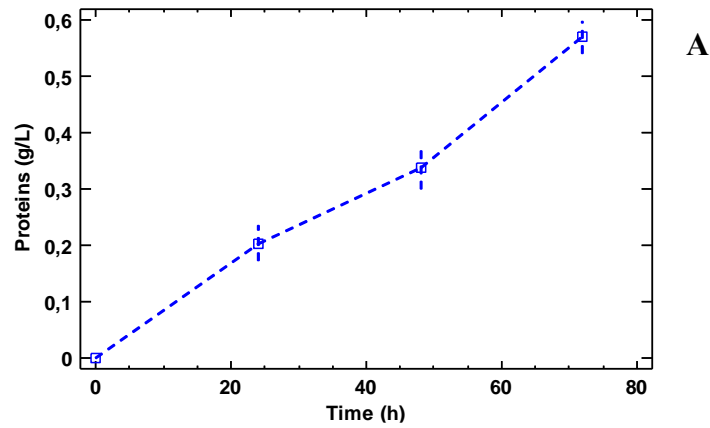
- **Apéndice M.1.** Prueba t de *student* para la producción máxima de proteínas por parte de *Bacillus thuringiensis*.

	P	GP
Media	0,503333	0,568333
Varianza	0,000746	0,000401
Coefficiente de correlación de Pearson	0,954396	
Estadístico t	-11,093162	
P(T<=t) una cola	0,004014	
Valor crítico de t (una cola)	2,919986	
P(T<=t) dos colas	0,008029	
Valor crítico de t (dos colas)	4,302653	

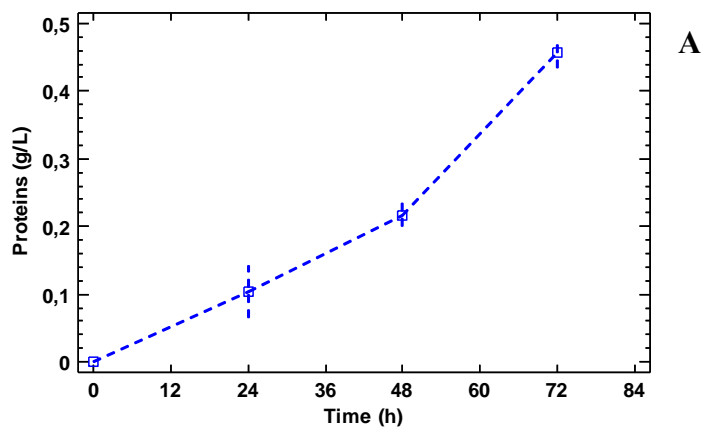
- **Apéndice M.2.** Prueba t de *student* para la producción máxima de proteínas por parte de *Bacillus cereus*.

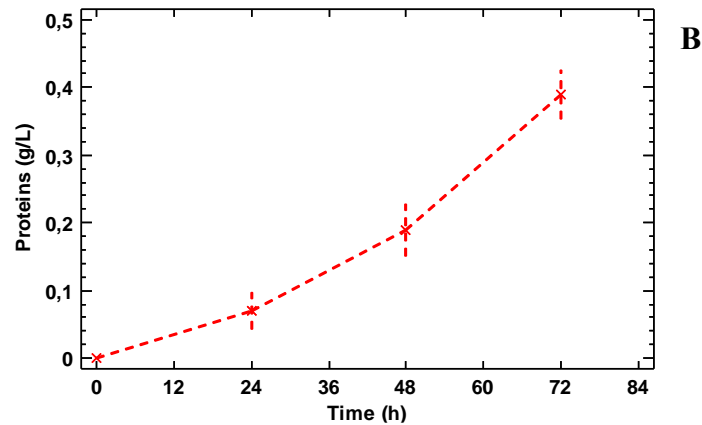
	P	GP
Media	0,389000	0,454667
Varianza	0,001579	0,000380
Coefficiente de correlación de Pearson	0,992323	
Estadístico t	-5,541058	
P(T<=t) una cola	0,015530	
Valor crítico de t (una cola)	2,919986	
P(T<=t) dos colas	0,031060	
Valor crítico de t (dos colas)	4,302653	

- **Apéndice M.3.** (A) Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Medio con *pectina* y *glucosa* (GP); (B) Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Medio con solo *pectina* (P).



- **Apéndice M.4.** (A) Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria *Bacillus cereus*. Medio con pectina y glucosa (GP); (B) Concentración de proteínas en el medio de cultivo con la bacteria *Bacillus cereus*. Medio con solo pectina (P).





Apéndice N. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con 10 g/L y 20 g/L de pectina.

- **Apéndice N.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Tiempo (h)	10 g/L pectina				D. Estándar
	1	2	3	Promedio	
0	0,1866	0,1749	0,1885	0,1833	0,0074
24	1,0004	1,0488	1,0224	1,0239	0,0242
48	1,0803	1,2486	1,2093	1,1794	0,0880
72	1,2032	1,2746	1,1811	1,2196	0,0489

Tiempo (h)	20 g/L pectina				D. Estándar
	1	2	3	Promedio	
0	0,1980	0,1871	0,1850	0,1900	0,0070
24	1,0004	1,0488	1,0224	1,0239	0,0242
48	1,2032	1,2746	1,1811	1,2196	0,0489
72	1,2446	1,2899	1,2155	1,2500	0,0375

- **Apéndice N.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Tiempo (h)	10 g/L pectina				D. Estándar
	1	2	3	Promedio	
0	0,1771	0,1579	0,1699	0,1683	0,0097
24	0,5505	0,5330	0,5860	0,5565	0,0270
48	0,6020	0,5945	0,6001	0,5989	0,0039
72	0,6046	0,5943	0,5985	0,5991	0,0052

Tiempo (h)	20 g/L pectina			
------------	----------------	--	--	--

	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,2555	0,2361	0,2611	0,2509	0,01312
24	0,5919	0,6125	0,6121	0,6055	0,01178
48	0,7275	0,7208	0,7489	0,7324	0,01468
72	0,7296	0,7193	0,7546	0,7345	0,01815

Apéndice O. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano en medio de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno.

- **Apéndice O.1.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Tiempo (h)	Extracto de levadura (EL)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1127	0,1089	0,1070	0,1095	0,0029
24	1,0020	0,9303	1,0688	1,0004	0,0693
48	1,1413	1,1232	1,1498	1,1381	0,0136
72	1,2530	1,2952	1,2940	1,2807	0,0240

Tiempo (h)	Peptona (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,0994	0,1007	0,1063	0,1021	0,0037
24	0,8230	0,8172	0,8265	0,8222	0,0047
48	0,9146	0,9336	0,9178	0,9220	0,0102
72	0,9340	0,9636	0,9542	0,9506	0,0151

Tiempo (h)	Ext. Levadura + Sulfato de Amonio (EL+SA)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1866	0,1749	0,2385	0,2000	0,0339
24	1,0004	1,0488	1,0224	1,0239	0,0242
48	1,0803	1,2486	1,2093	1,1794	0,0880
72	1,2032	1,2746	1,1811	1,2196	0,0489

Tiempo (h)	Sulfato de Amonio (SA)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1920	0,1908	0,1873	0,1900	0,0024
24	0,6668	0,7714	0,7525	0,7302	0,0557
48	0,8775	0,8729	0,8730	0,8745	0,0026
72	0,8317	0,8064	0,9189	0,8523	0,0590

Tiempo (h)	0,2% Extracto de levadura
-------------------	----------------------------------

	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1127	0,1089	0,1070	0,1095	0,0029
24	1,0020	0,9303	1,0688	1,0004	0,0693
48	1,1413	1,1232	1,1498	1,1381	0,0136
72	1,1530	1,1952	1,1940	1,1807	0,0240
0,4% Extracto de levadura					
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1160	0,0920	0,1000	0,1027	0,0122
24	0,5780	0,5770	0,6200	0,5917	0,0245
48	0,7010	0,6780	0,7270	0,7020	0,0245
72	1,0370	1,0160	0,9510	1,0013	0,0448
0,6% Extracto de levadura					
Tiempo (h)	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1050	0,0960	0,1070	0,1027	0,0059
24	0,5920	0,6780	0,6160	0,6287	0,0444
48	0,9300	0,8270	0,7590	0,8387	0,0861
72	0,9150	0,9060	0,8360	0,8857	0,0432

- **Apéndice O.2.** Absorbancia obtenida con la bacteria *Bacillus cereus*.

Tiempo (h)	Extracto de levadura (EL)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1180	0,1140	0,1100	0,1140	0,0040
24	0,4020	0,3880	0,3810	0,3903	0,0107
48	0,6470	0,6080	0,6890	0,6480	0,0405
72	0,6850	0,6370	0,7110	0,6777	0,0375
Tiempo (h)	Peptona (P)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1220	0,1370	0,1310	0,1300	0,0075
24	0,2300	0,3140	0,2480	0,2640	0,0442
48	0,3320	0,3100	0,3070	0,3163	0,0137
72	0,3420	0,3270	0,3270	0,3320	0,0087
Tiempo (h)	Ext. Levadura + Sulfato de Amonio (EL+SA)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1300	0,1260	0,1200	0,1253	0,0050
24	0,2360	0,2180	0,2600	0,2380	0,0211
48	0,2530	0,2500	0,2630	0,2553	0,0068
72	0,2750	0,2580	0,2620	0,2650	0,0089
Tiempo (h)	Sulfato de Amonio (SA)				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar

0	0,1110	0,1120	0,1220	0,1150	0,0061
24	0,4490	0,5810	0,5770	0,5357	0,0751
48	0,7620	0,6710	0,6750	0,7027	0,0514
72	0,8340	0,8170	0,8360	0,8290	0,0104

Apéndice P. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con diferentes pH.

Tiempo (h)	pH 6			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0938	0,0920	0,0921	0,0926	0,0010
24	1,0134	1,0897	1,0876	1,0636	0,0435
48	1,1649	1,0651	1,1363	1,1221	0,0514
72	1,2640	1,2884	1,2778	1,2767	0,0122
Tiempo (h)	pH 7			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0917	0,0927	0,0964	0,0936	0,0025
24	1,0165	1,0980	1,1379	1,0841	0,0619
48	1,1054	1,1684	1,1730	1,1489	0,0378
72	1,3557	1,3632	1,3618	1,3602	0,0040
Tiempo (h)	pH 8			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,1063	0,1055	0,1010	0,1043	0,0029
24	1,0137	1,0666	1,1460	1,0754	0,0666
48	1,2154	1,1998	1,2569	1,2240	0,0295
72	1,3333	1,4442	1,3870	1,3882	0,0555

Apéndice Q. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con diferentes concentraciones de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).

Tiempo (h)	7g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0690	0,0710	0,1070	0,0823	0,0214
24	0,9880	0,9970	1,0688	1,0179	0,0443

48	1,1390	1,1160	1,1498	1,1349	0,0173
72	1,2200	1,2130	1,1940	1,2090	0,0135
Tiempo (h)	4,6 g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0700	0,0740	0,0810	0,0750	0,0056
24	0,9670	0,9950	0,9870	0,9830	0,0144
48	1,0370	1,0010	1,0350	1,0243	0,0202
72	1,2060	1,2070	1,2870	1,2333	0,0465
Tiempo (h)	2,2 g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0710	0,0730	0,0730	0,0723	0,0012
24	1,1850	1,0720	1,0850	1,1140	0,0618
48	1,3090	1,2720	1,1370	1,2393	0,0905
72	1,5270	1,5130	1,5040	1,5147	0,0116

Apéndice R. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)

Tiempo (h)	2 g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0650	0,0640	0,0570	0,0620	0,0044
24	1,1380	1,1110	1,1720	1,1403	0,0306
48	1,2230	1,2280	1,2000	1,2170	0,0149
72	1,1810	1,1650	1,1720	1,1727	0,0080
Tiempo (h)	1,25 g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,0660	0,0690	0,0620	0,0657	0,0035
24	1,1130	1,2630	1,1340	1,1700	0,0812
48	1,2460	1,2000	1,1430	1,1963	0,0516
72	1,1380	1,2260	1,1390	1,1677	0,0505
Tiempo (h)	0,5 g/L			Promedio	D. Estándar
	1	2	3		
0	0,1380	0,1270	0,1190	0,1280	0,0095
24	1,1230	1,1150	1,2620	1,1667	0,0827
48	1,2690	1,2290	1,2350	1,2443	0,0216
72	1,2230	1,2280	1,1900	1,2137	0,0206

Apéndice S. Absorbancia obtenida a 595 nm para monitorear el crecimiento bacteriano de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo con diferentes temperaturas.

Tiempo (h)	23,0 °C				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1866	0,1749	0,2385	0,2000	0,0339
24	0,5390	0,4640	0,6940	0,5657	0,1173
48	0,7650	0,8010	0,8300	0,7987	0,0326
72	0,9760	0,9340	0,9550	0,9550	0,0210
Tiempo (h)	30,0 °C				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1866	0,1749	0,2385	0,2000	0,0339
24	1,0004	1,0488	1,0224	1,0239	0,0242
48	1,0803	1,2486	1,2093	1,1794	0,0880
72	1,2032	1,2746	1,1811	1,2196	0,0489
Tiempo (h)	37 °C				
	1	2	3	Promedio	D. Estándar
0	0,1353	0,1233	0,1202	0,1263	0,0080
24	0,5430	0,6010	0,5980	0,5807	0,0327
48	0,9873	1,0591	1,0311	1,0258	0,0362
72	1,0401	1,0675	1,0417	1,0498	0,0154

Apéndice T. Análisis estadístico del crecimiento bacteriano al optimizar las condiciones de cultivo.

- **Apéndice T.1.** Prueba t de *student* para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con 10 g/L y 20 g/L de pectina.

	10 g/L	20 g/L
Media	52,207	53,834
Varianza	6,854	4,034
Coefficiente de correlación de Pearson	0,986	
Estadístico t	-3,893	
P(T<=t) una cola	0,030	
Valor crítico de t (una cola)	2,920	
P(T<=t) dos colas	0,060	

Valor crítico de t (dos colas) 4,303

- **Apéndice T.2.** Prueba t de *student* para el crecimiento de *Bacillus cereus* con 10 g/L y 20 g/L de pectina.

	10 g/L	20 g/L
Media	26,363	33,693
Varianza	0,079	0,966
Coefficiente de correlación de Pearson	0,181	
Estadístico t	-13,058	
P(T<=t) una cola	0,003	
Valor crítico de t (una cola)	2,920	
P(T<=t) dos colas	0,006	
Valor crítico de t (dos colas)	4,303	

- **Apéndice T.3.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes fuentes de nitrógeno: peptona (P), extracto de levadura (YE), extracto de levadura y sulfato de amonio (YE+AS), sulfato de amonio (AS).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1104,62	3	368,206	76,85	0
Within groups	38,3298	8	4,79123		
Total (Corr.)	1142,95	11			

Contrast	Count	Mean	Homogeneous Groups
AS	3	36,5963	A
P	3	41,8607	B
YE+AS	3	56,2732	C
YE	3	59,5464	C

	Test	P-Value
Levene's	2,84238	0,1055

Tests for Normality for YE		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,771314	0,0477114

Tests for Normality for P		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,957491	0,603386

Tests for Normality for AS		
----------------------------	--	--

Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,908378	0,41269	
Tests for Normality for YE+AS			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,915194	0,435643	
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
YE - YE+AS		3,27	4,12
YE - P	*	17,69	4,12
YE - SA	*	22,95	4,12
YE+AS - P	*	14,41	4,12
YE+AS - AS	*	19,68	4,12
P - AS	*	5,26	4,12

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.4.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus cereus* con diferentes fuentes de nitrógeno: peptona (P), extracto de levadura (YE), extracto de levadura y sulfato de amonio (YE+AS), sulfato de amonio (AS).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1899,04	3	633,013	527,41	0
Within groups	9,6019	8	1,20024		
Total (Corr.)	1908,64	11			
Factor	Count	Mean	Homogeneous Groups		
YE+AS	3	7,41967	A		
P	3	11,009	B		
YE	3	29,527	C		
AS	3	37,634	D		
Test		P-Value			
Levene's	3,53939	0,0679			
Tests for Normality for YE					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,971371	0,675287			
Tests for Normality for P					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,75	-8,5715E-07			
Tests for Normality for YE+AS					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,914481	0,433202			

Tests for Normality for AS			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,82787	0,182928	
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
AS - P	*	-0,10	0,06
AS - YE	*	-0,46	0,06
AS - YE+AS	*	-0,23	0,06
P - YE	*	-0,36	0,06
P - YE+AS	*	-0,14	0,06
YE - YE+AS	*	0,23	0,06

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.5.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes concentraciones de extracto de levadura (YE): 0,2% p/v, 0,4% p/v y 0,6% p/v.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	380,635	2	190,318	44,63	0,0002
Within groups	25,5874	6	4,26456		
Total (Corr.)	406,223	8			
YE	Count	Mean	Homogeneous Groups		
0,6	3	38,5267	A		
0,4	3	44,7233	B		
0,2	3	54,334	C		
		Test	P-Value		
Levene's		1,08092	0,3973		
Tests for Normality for 0,2					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,997691	0,908182			
Tests for Normality for 0,4					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,997253	0,899849			
Tests for Normality for 0,6					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,994109	0,853267			
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits		
0,2 - 0,4	*	9,61	4,13		
0,2 - 0,6	*	15,81	4,13		
0,4 - 0,6	*	6,20	4,13		

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.6.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes valores de pH.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	57,886	2	28,943	9,33	0,0144
Within groups	18,6046	6	3,10077		
Total (Corr.)	76,4907	8			

Ph	Count	Mean	Homogeneous Groups
6	3	60,3446	A
7	3	64,8179	B
8	3	66,3143	B

Test	P-Value
Levene's	2,98424

Tests for Normality for 6		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,99443	0,857328

Tests for Normality for 7		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	1	0,999999

Tests for Normality for 8		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,829337	0,186646

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
6 – 7	*	-4,47	3,52
6 – 8	*	-5,97	3,52
7 – 8		-1,50	3,52

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.7.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes concentraciones de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	447,532	2	223,766	84,48	0,0001
Within groups	13,244	5	2,64879		
Total (Corr.)	460,776	7			

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
---------------	-------	------	--------------------

7	2	58,3925	A
4,6	3	59,2947	A
2,2	3	74,3663	B
Test		P-Value	
Levene's	7,5615	0,0308	
Tests for Normality for 7			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,918627	0,447519	
Tests for Normality for 4,6			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,75933	0,0207067	
Tests for Normality for 2,2			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,984471	0,761385	
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
2,2 - 4,6	*	15,07	3,42
2,2 - 7	*	15,97	3,82
4,6 - 7		0,90	3,82

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.8.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10,9668	2	5,48341	1,88	0,2318
Within groups	17,4666	6	2,9111		
Total (Corr.)	28,4334	8			
Concentration	Count	Mean	Homogeneous Groups		
1,25	3	55,777	A		
2	3	56,0447	A		
0,5	3	58,241	A		
Test		P-Value			
Levene's	7,3979	0,024			
Tests for Normality for 2					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,994831	0,862565			
Tests for Normality for 1,25					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,758431	0,0186996			
Tests for Normality for 0,5					

Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,846792	0,231906	
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
0,5 - 1,25		2,46	3,41
0,5 - 2		2,20	3,41
1,25 - 2		-0,27	3,41

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

- **Apéndice T.9.** ANOVA y prueba de rango múltiple para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con diferentes temperaturas (23, 30 y 37 °C)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	309,542	2	154,771	52,77	0,0002
Within groups	17,5962	6	2,9327		
Total (Corr.)	327,138	8			
Temperature	Count	Mean	Homogeneous Groups		
23	3	44,384	A		
37	3	49,461	B		
30	3	58,5603	C		
Test	P-Value				
Levene's	3,10457	0,1187			
Tests for Normality for 37 °C					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,793778	0,0997279			
Tests for Normality for 30 °C					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	0,915194	0,435643			
Tests for Normality for 23 °C					
Test	Statistic	P-Value			
Shapiro-Wilk W	1	0,999999			
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits		
23 - 30	*	-14,18	3,42		
23 - 37	*	-5,08	3,42		
30 - 37	*	9,10	3,42		

Nota. (*) indica una diferencia estadísticamente significativa.

Apéndice U. Análisis estadístico del rendimiento de la producción de PHA por parte de la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

- **Apéndice U.1.** Prueba t de *student* para la producción de PHA con 10 g/L y 20 g/L de pectina.

	10 g/L	20 g/L
Media	0,6307	0,9927
Varianza	0,0011	0,0036
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,1861	
Estadístico t	-8,5037	
P(T<=t) una cola	0,0068	
Valor crítico de t (una cola)	2,9200	
P(T<=t) dos colas	0,0135	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3027	

- **Apéndice U.2.** Prueba t de *student* para la producción de PHA con pectina (P) y glucosa y pectina (GP).

	P	GP
Media	0,6735	0,6503
Varianza	0,0004	0,0012
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,8089	
Estadístico t	0,7718	
P(T<=t) una cola	0,2605	
Valor crítico de t (una cola)	2,9200	
P(T<=t) dos colas	0,5210	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3027	

- **Apéndice U.3.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes fuentes de nitrógeno: peptona (P), extracto de levadura (EL), extracto de levadura y sulfato de amonio (EL+SA), sulfato de amonio (SA).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,353	3	0,1177	131,14	0
Within groups	0,007	8	0,0009		
Total (Corr.)	0,360	11			

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	3	0,418	A

3	3	0,514	B
4	3	0,650	C
2	3	0,875	D
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
1 - 2	*	-0,457	0,056
1 - 3	*	-0,096	0,056
1 - 4	*	-0,232	0,056
2 - 3	*	0,361	0,056
2 - 4	*	0,225	0,056
3 - 4	*	-0,136	0,056
Test	P-Value		
Levene's	1,466	0,295	
Tests for Normality for AS			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,939	0,522	
Tests for Normality for YE			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,998	0,908	
Tests for Normality for P			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,880	0,325	
Tests for Normality for YE+AS			
Test	Statistic	P-Value	
Shapiro-Wilk W	0,978	0,718	

- **Apéndice U.4.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes concentraciones de extracto de levadura (EL): 0,2% p/v, 0,4% p/v y 0,6% p/v.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,884	2	0,4420	713,99	0
Within groups	0,004	6	0,0006		
Total (Corr.)	0,888	8			
EL	Count	Mean	Homogeneous Groups		
0,6	3	0,150	A		
0,4	3	0,294	B		
0,2	3	0,875	C		
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits		
0,2 - 0,4	*	0,581	0,050		
0,2 - 0,6	*	0,725	0,050		
0,4 - 0,6	*	0,144	0,050		

	Test	P-Value
Levene's	1,638	0,271
Tests for Normality for 0,2		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,998	0,908
Tests for Normality for 0,4		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,997	0,900
Tests for Normality for ANOVA.0,6		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,994	0,853

- **Apéndice U.5.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes valores de pH.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,301	2	0,1507	60,32	0,0001
Within groups	0,015	6	0,0025		
Total (Corr.)	0,316	8			

pH	Count	Mean	Homogeneous Groups
8	3	0,472	A
6	3	0,570	A
7	3	0,900	B

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
6 – 7	*	-0,330	0,100
6 – 8		0,097	0,100
7 – 8	*	0,428	0,100

	Test	P-Value
Levene's	1,232	0,356
Tests for Normality for 6		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,994	0,857
Tests for Normality for 7		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	1,000	1,000
Tests for Normality for 8		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,829	0,187

- **Apéndice U.6.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes concentraciones de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,011	2	0,0057	8,49	0,0247
Within groups	0,003	5	0,0007		
Total (Corr.)	0,015	7			

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
4,6	3	0,534	A
7	2	0,547	A
2,2	3	0,616	B

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
2,2 - 4,6	*	0,083	0,054
2,2 - 7	*	0,069	0,061
4,6 - 7		-0,013	0,061

	Test	P-Value
Levene's	2,092	0,219

Tests for Normality for 7 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,999	0,948

Tests for Normality for 4,6 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,995	0,862

Tests for Normality for 2,2 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,853	0,249

- **Apéndice U.7.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes concentraciones de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,033	2	0,0167	5,79	0,0397
Within groups	0,017	6	0,0029		
Total (Corr.)	0,051	8			

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	3	0,549	A
1,25	3	0,639	AB
0,5	3	0,697	B

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
0,5 - 1,25		0,059	0,107
0,5 - 2	*	0,148	0,107
1,25 - 2		0,090	0,107

	Test	P-Value
Levene's	0,089	0,916

Tests for Normality for 2 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,942	0,537

Tests for Normality for 1,25 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,979	0,719

Tests for Normality for 0,5 g/L		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,769	0,042

- **Apéndice U.8.** ANOVA y prueba de rango múltiple para la producción de PHA con diferentes temperaturas (23, 30 y 37 °C)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,493	2	0,2466	641,72	0
Within groups	0,002	6	0,0004		
Total (Corr.)	0,495	8			

Temperature	Count	Mean	Homogeneous Groups
23	3	0,265	A
37	3	0,274	A
30	3	0,766	B

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
23 - 30	*	-0,501	0,039
23 - 37		-0,008	0,039
30 - 37	*	0,492	0,039

	Test	P-Value
Levene's	0,785	0,498

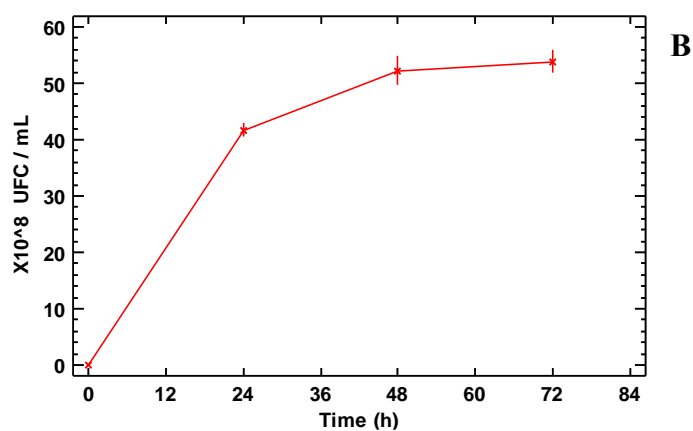
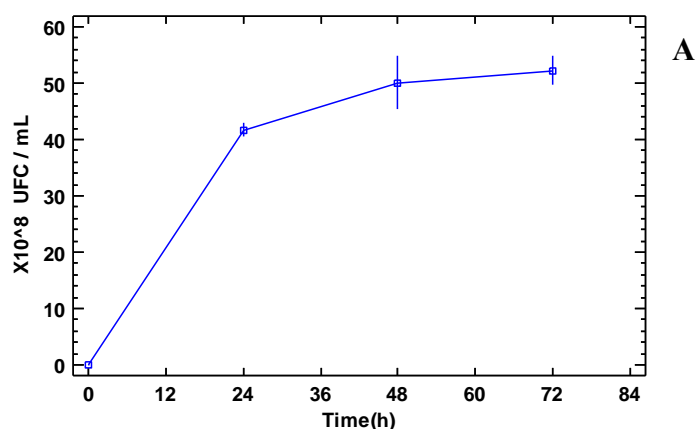
Tests for Normality for 37°		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,970	0,668

Tests for Normality for 30°		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,999	0,927

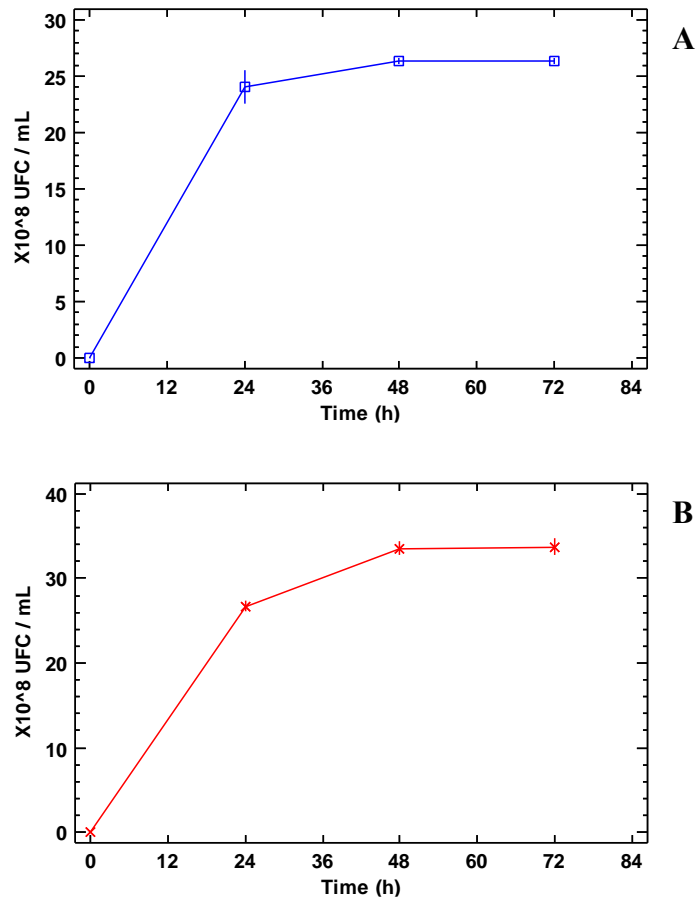
Tests for Normality for 23°		
Test	Statistic	P-Value
Shapiro-Wilk W	0,900	0,384

Apéndice V. Curvas de crecimiento bacteriano al optimizar los parámetros de incubación.

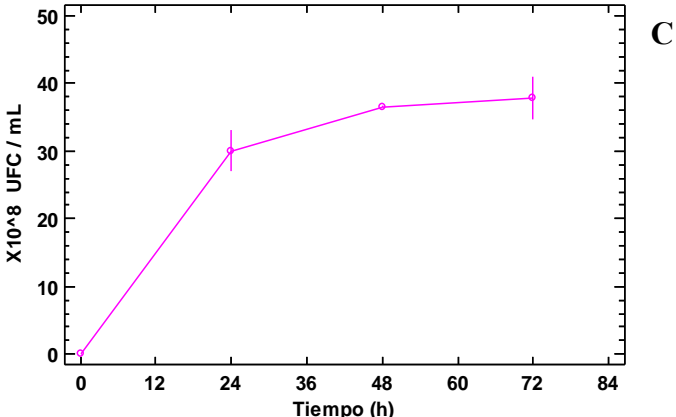
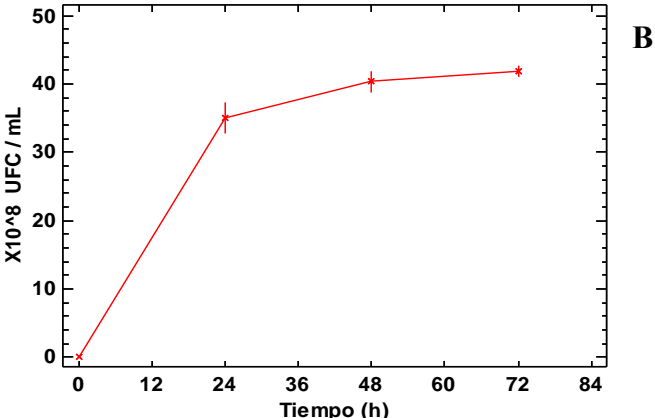
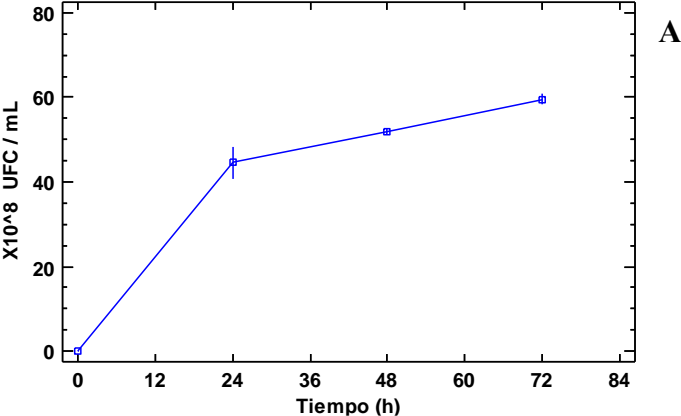
- **Apéndice V.1.** (A) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con 10 g/L de pectina como fuente de carbono. (B) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con 20 g/L de pectina como fuente de carbono.

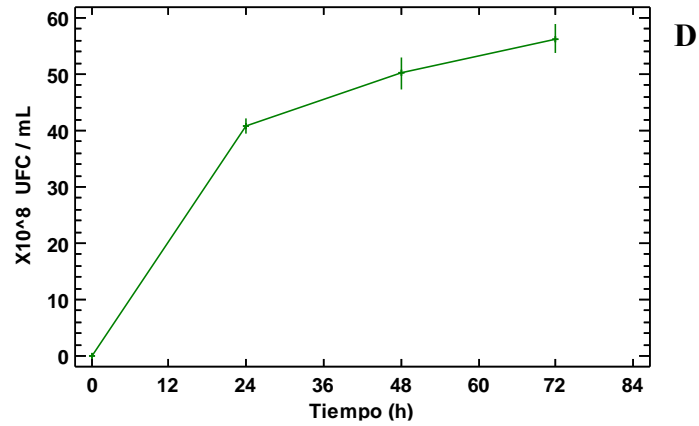


- **Apéndice V.2.** (A) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con 10 g/L de pectina como fuente de carbono. (B) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con 20 g/L de pectina como fuente de carbono.

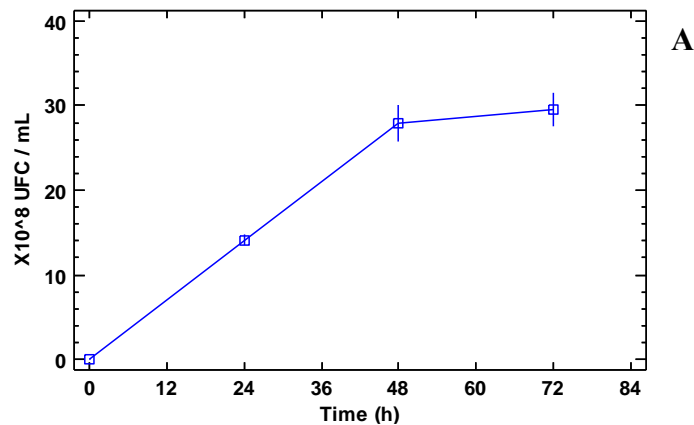


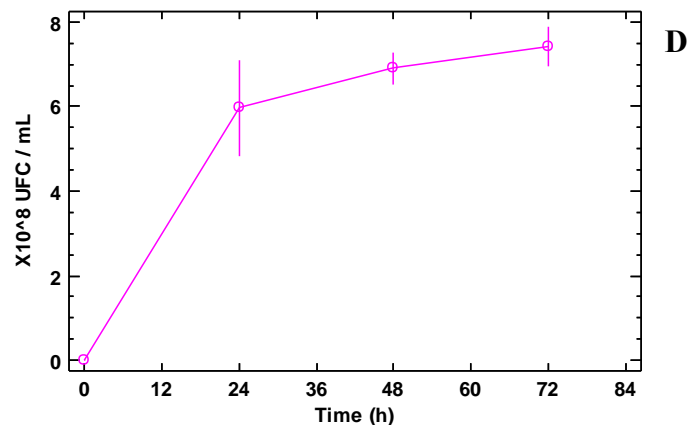
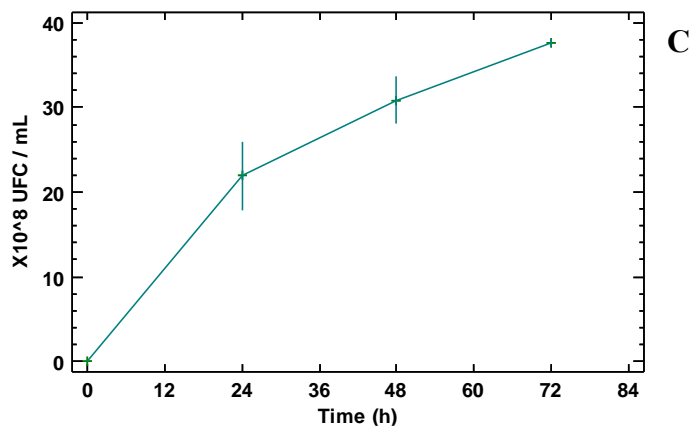
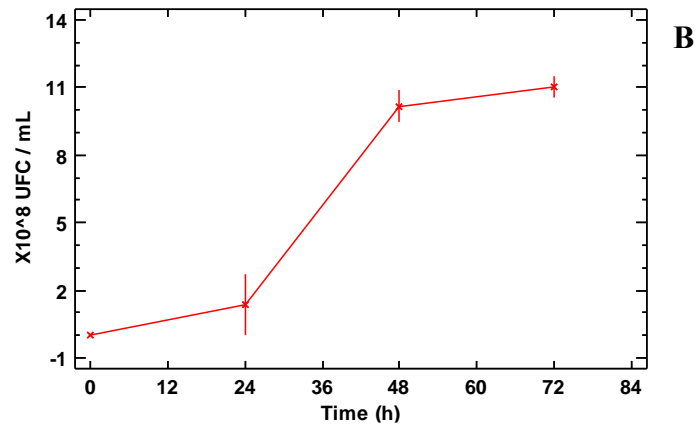
- **Apéndice V.3.** (A) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con extracto de levadura (YE) como fuente de nitrógeno; (B) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con peptona (P); (C) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con sulfato de amonio (AS); (D) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con la combinación extracto de levadura más sulfato de amonio (YE + AS).





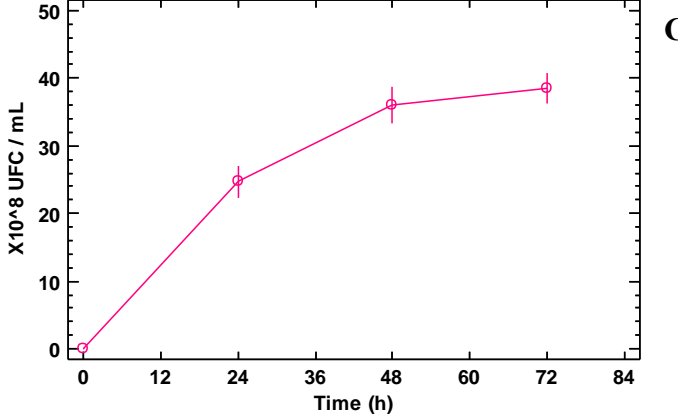
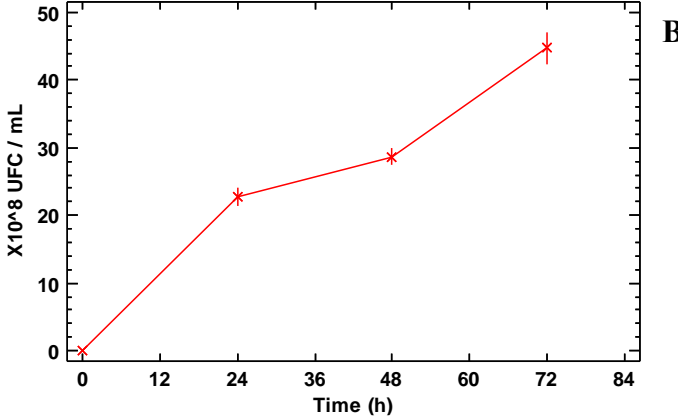
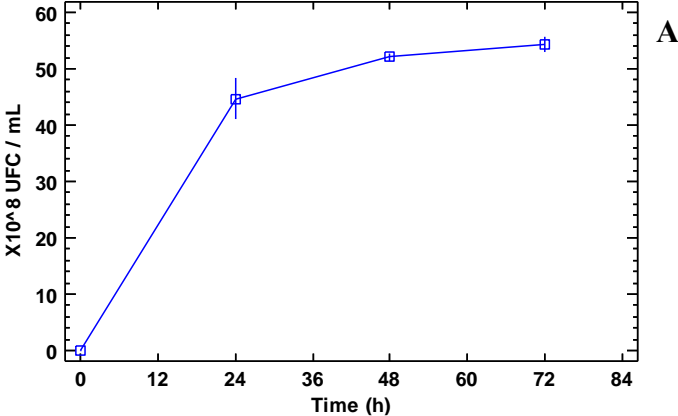
- **Apéndice V.4.** (A) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con extracto de levadura (YE) como fuente de nitrógeno; (B) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con peptona (P); (C) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con sulfato de amonio (AS); (D) Curva de crecimiento bacteriano para la bacteria *Bacillus cereus*, con la combinación extracto de levadura más sulfato de amonio (YE + AS).



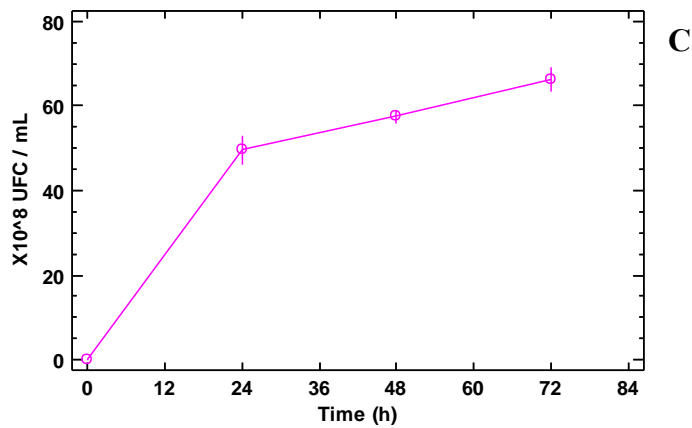
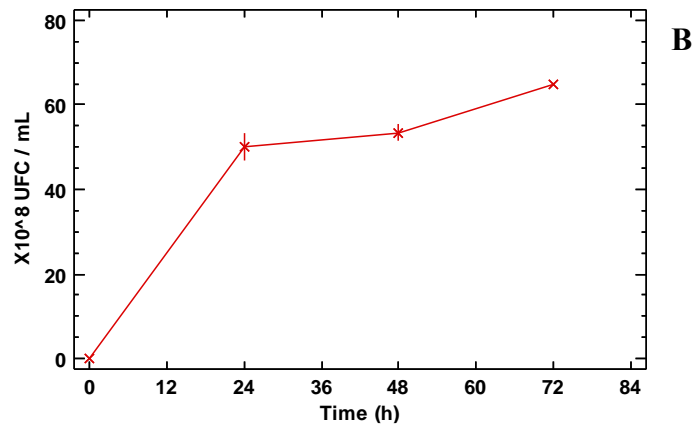
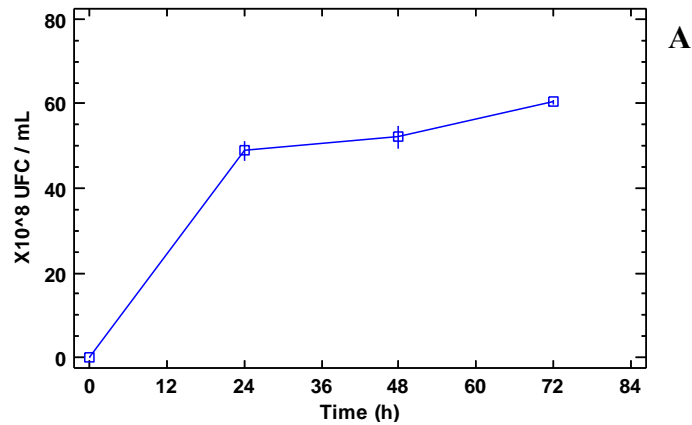


- **Apéndice V.5.** (A) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con extracto de levadura 0,2% p/v como fuente de nitrógeno; (B) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con extracto de levadura 0,4% p/v como fuente de

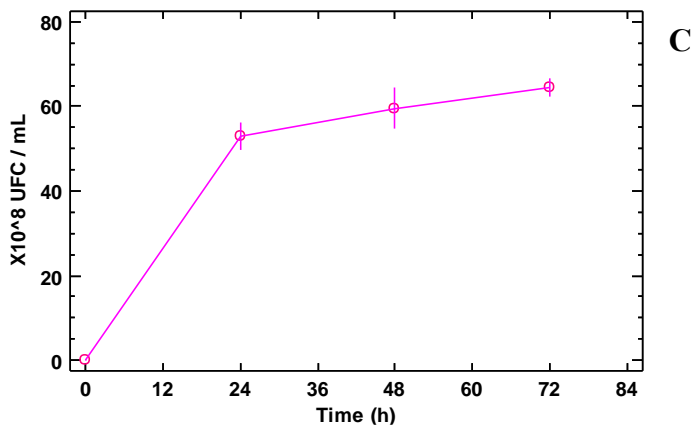
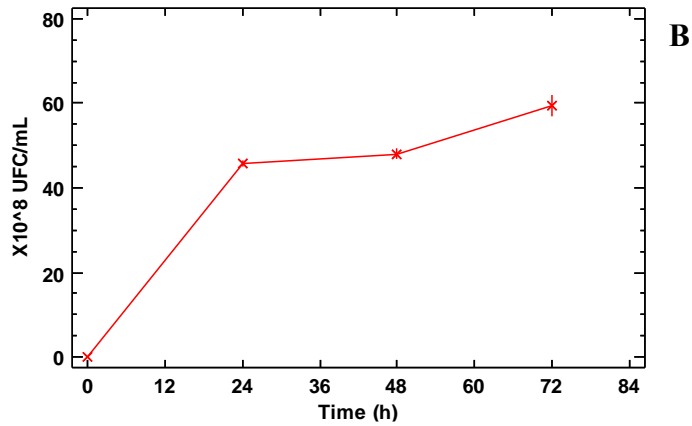
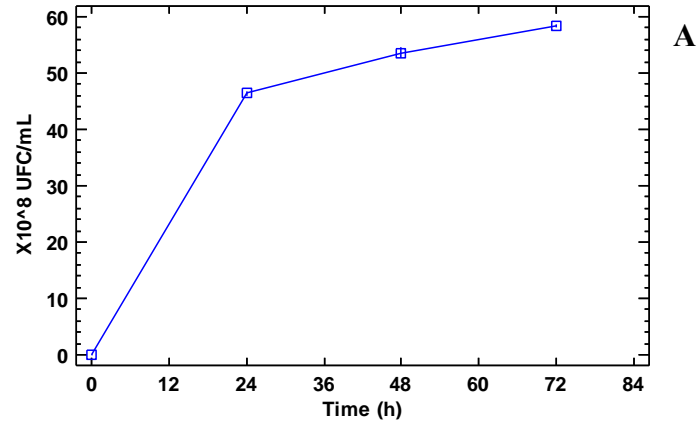
nitrógeno; (C) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con extracto de levadura 0,6% p/v como fuente de nitrógeno.



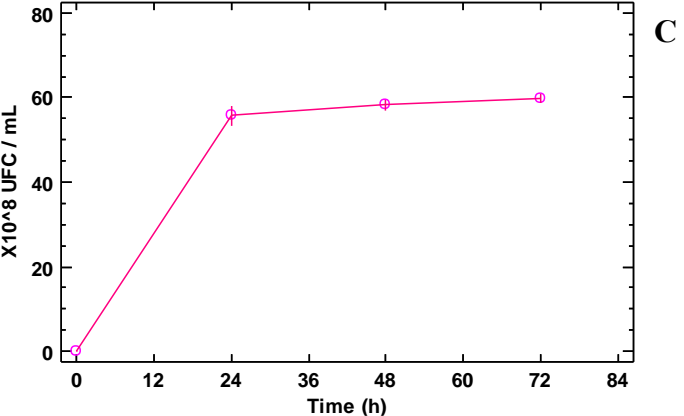
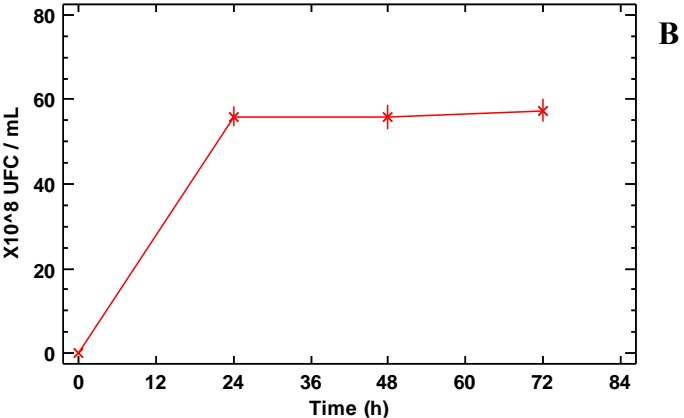
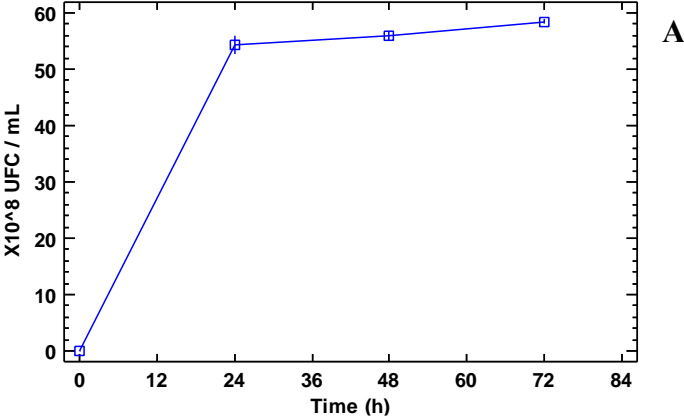
- **Apéndice V.6.** (A) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, pH ácido 6; (B) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, pH neutro 7; (C) Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, pH básico 8.



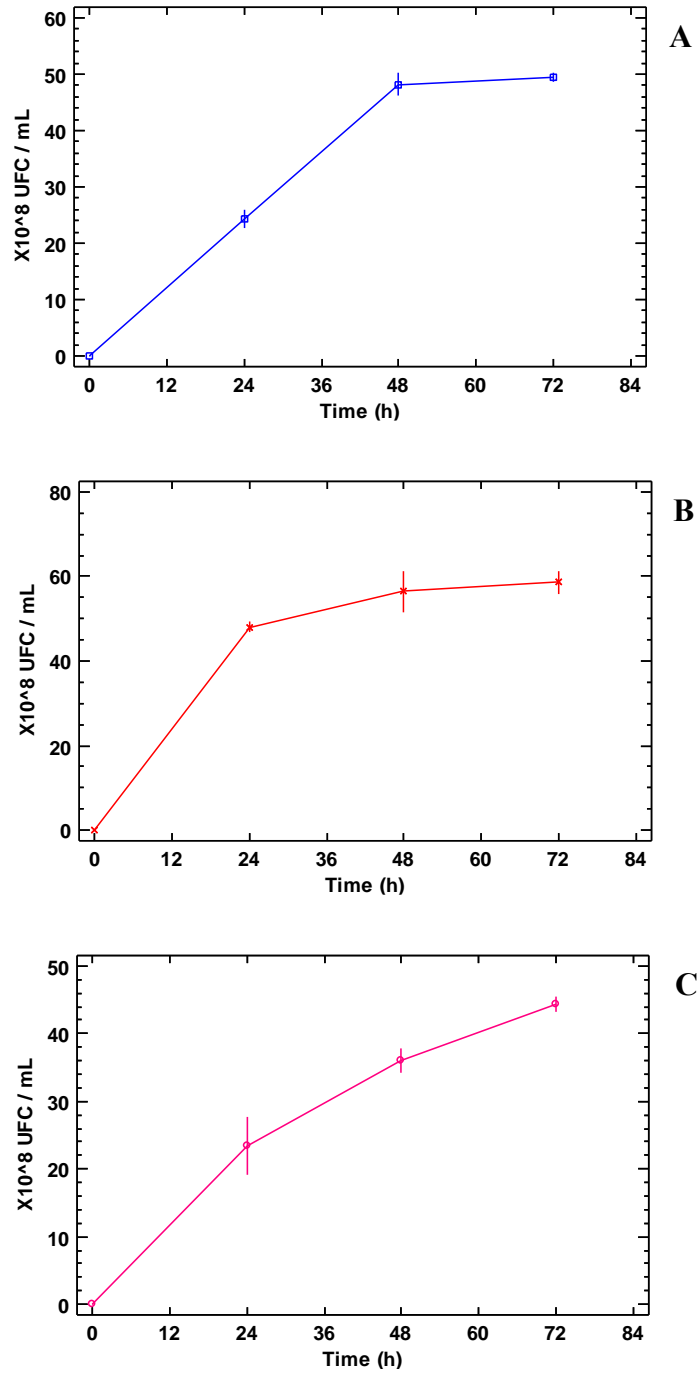
- **Apéndice V.7.** Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de Na_2HPO_4 : 7 g/L (A), 4,6 g/L (B) y 2,2 g/L (C).



- **Apéndice V.8.** Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 : 2 g/L (A), 1,25 g/L (B) y 0,5 g/L (C).

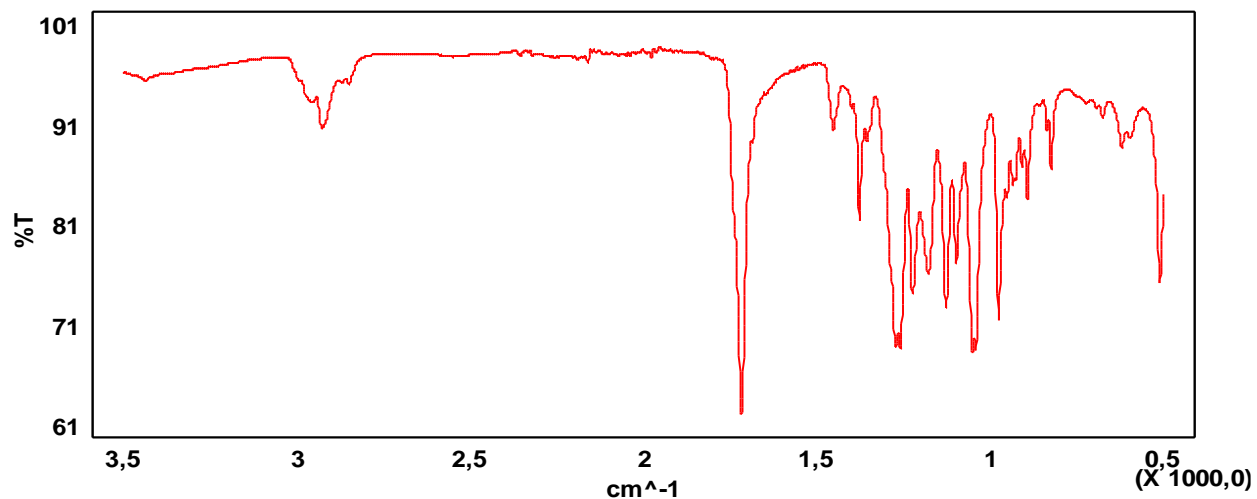


- **Apéndice V.9.** Curva de crecimiento para la bacteria *Bacillus thuringiensis*, con diferentes temperaturas: 37 °C (A), 30 °C (B) y 23 °C (C).

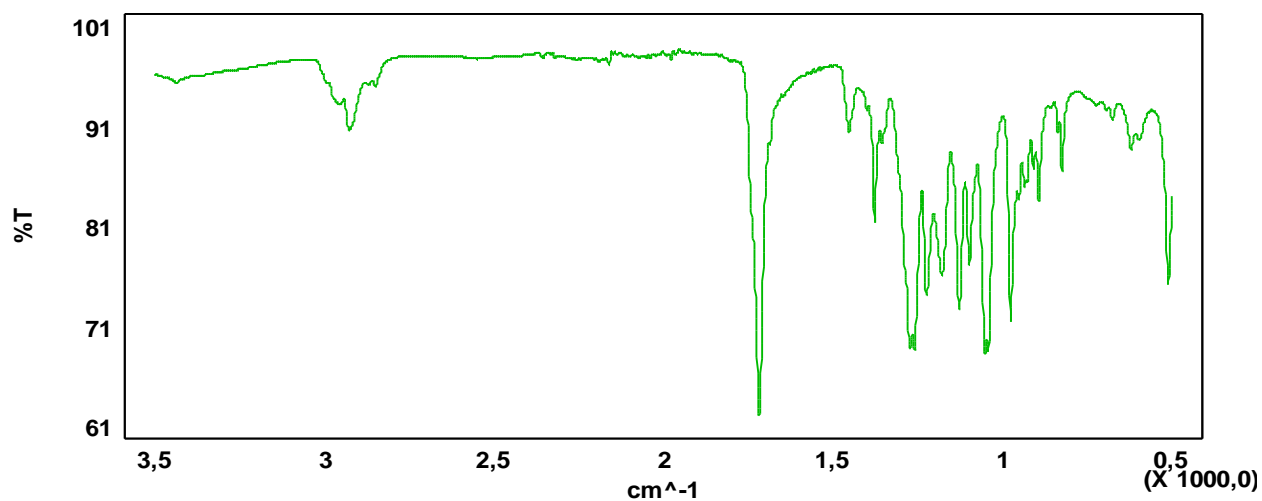


Apéndice W. Espectro de FTIR del biopolímero extraído.

- **Apéndice W.1.** Biopolímero obtenido utilizando glucosa como fuente de carbono por la cepa *Bacillus thuringiensis*.

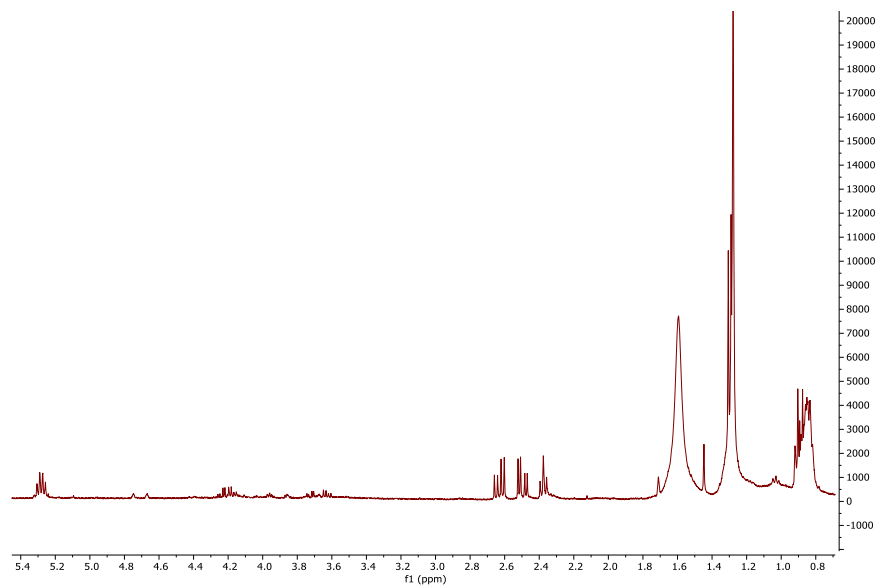


- **Apéndice W.2.** Biopolímero obtenido utilizando glucosa como fuente de carbono por la bacteria *Bacillus cereus*.

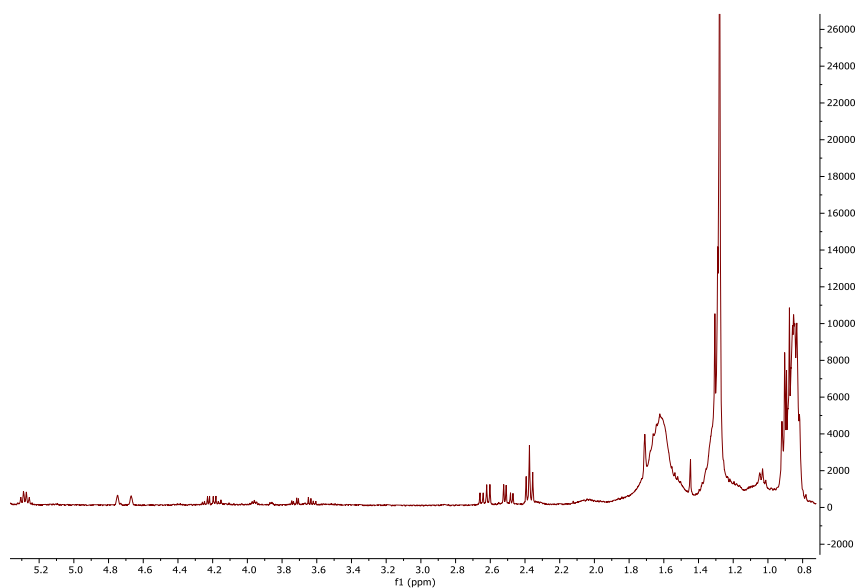


Apéndice X. Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)

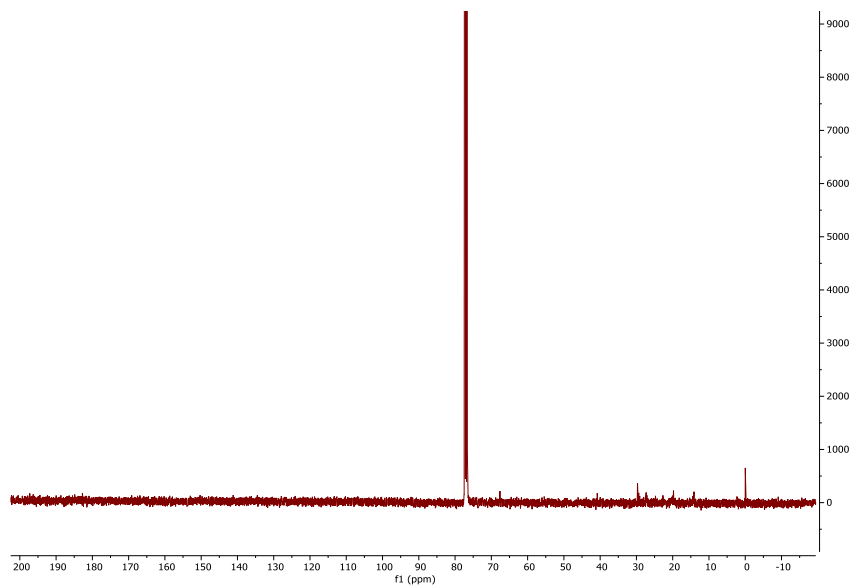
- **Apéndice X.1.** Espectro de protones ¹H del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.



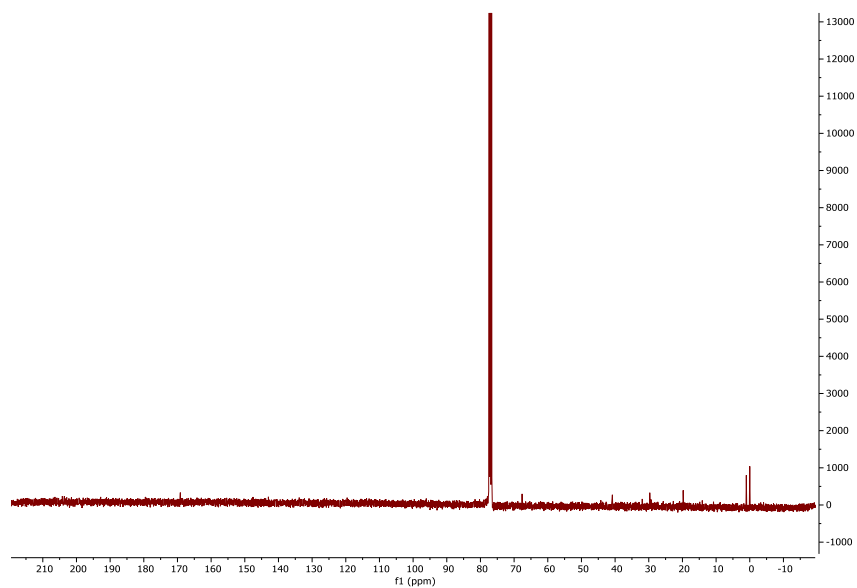
- **Apéndice X.2.** Espectro de protones ^1H del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.



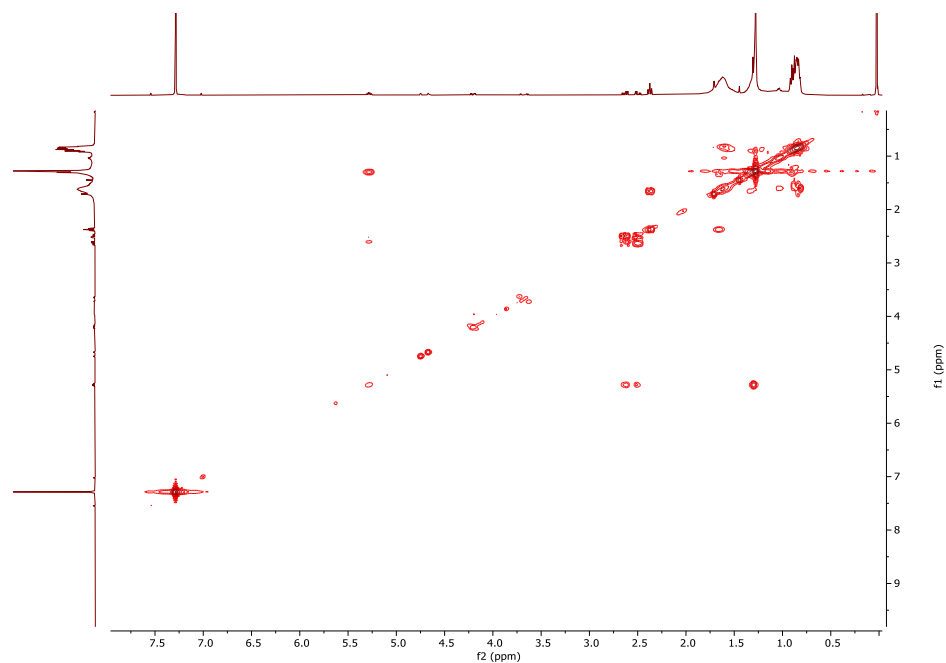
- **Apéndice X.3.** Espectro de carbonos ^{13}C del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.



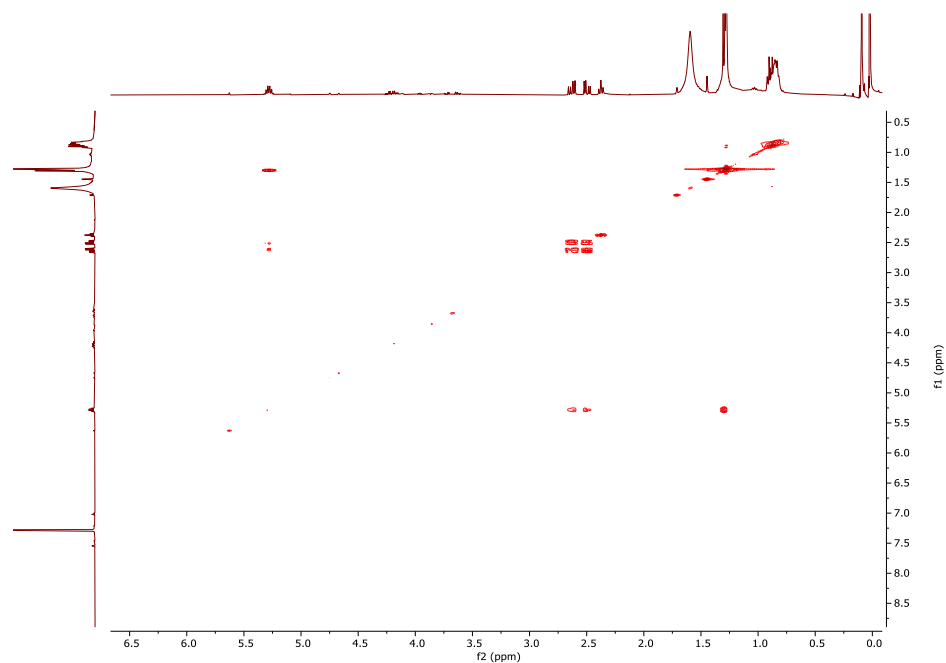
- **Apéndice X.4.** Espectro de carbonos ^{13}C del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.



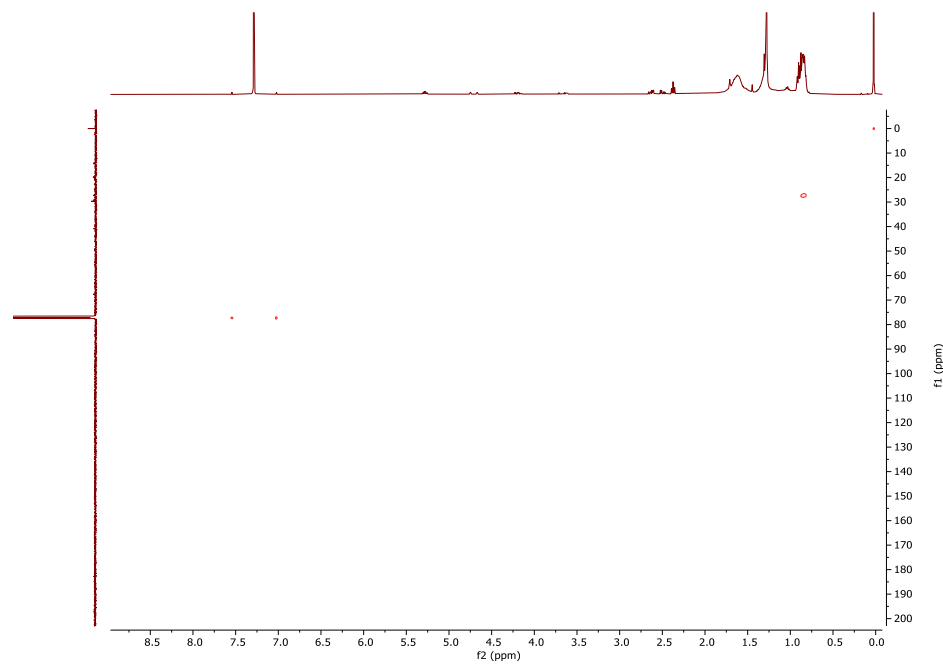
- **Apéndice X.5.** Espectro COSY del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.



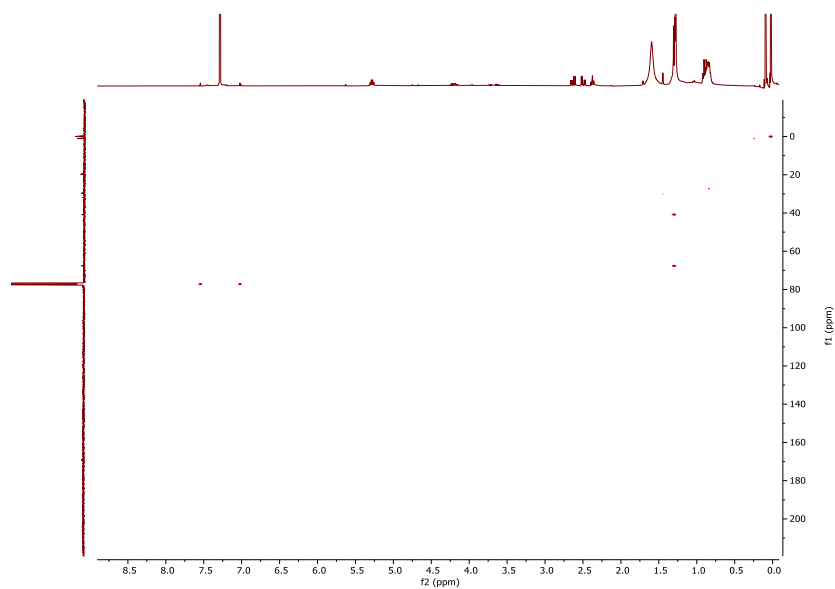
- **Apéndice X.6.** Espectro COSY del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.



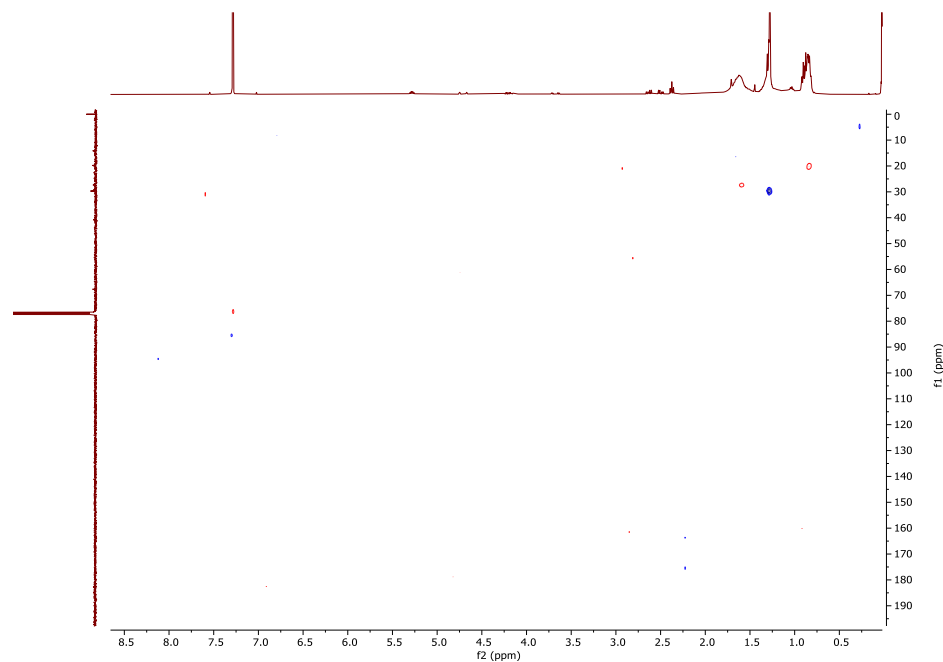
- **Apéndice X.7.** Espectro HMBC del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.



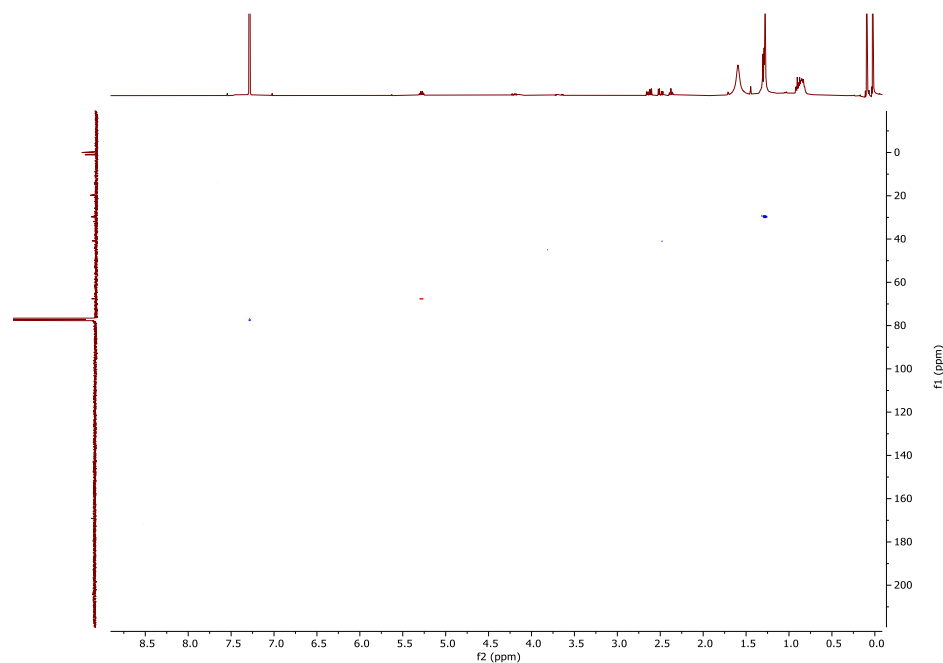
- **Apéndice X.8.** Espectro HMBC del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.



- **Apéndice X.9.** Espectro HSQC del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.

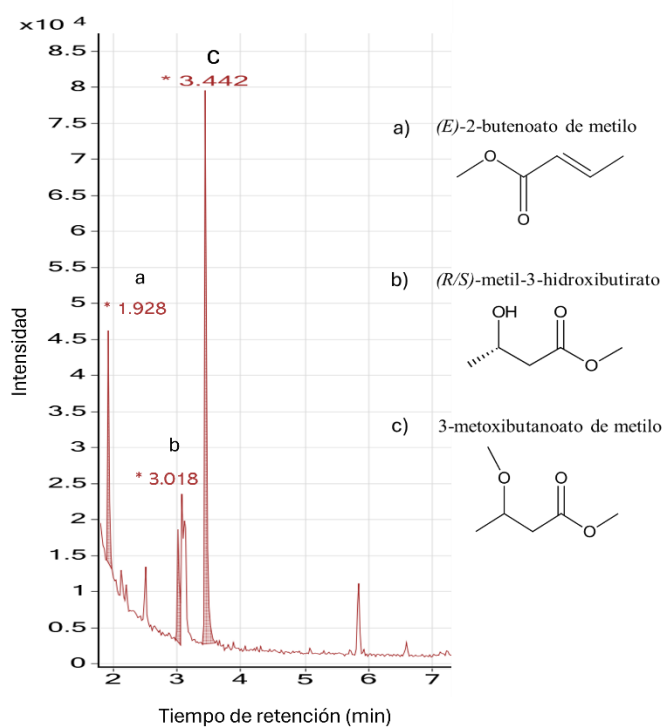


- **Apéndice X.10.** Espectro HSQC del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.



Apéndice Y. Perfiles cromatográficos del biopolímero extraído.

- **Apéndice Y.1.** Perfiles cromatográficos del biopolímero producido por *Bacillus thuringiensis* con glucosa como fuente de carbono.



- **Apéndice Y.2.** Perfiles cromatográficos del biopolímero producido por *Bacillus cereus* con glucosa como fuente de carbono.

