



## Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N

## Optimización estadística y efecto de la miel de mezquite y el líquido residual alcalino de maíz (nejayote) como sustratos para la producción de biomasa celular y la biosíntesis de polihidroxibutirato por *Bacillus cereus* 4N

Raul Enrique Martínez-Herrera, Yessica Nallely Juárez-Ibarra, Verónica Almaguer-Cantú & María Elizabeth Alemán-Huerta\*

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

\*Corresponding author

E-mail address: elialeman@yahoo.com; maria.alemanhr@uanl.edu.mx (M. E. Alemán-Huerta)

Article history:

Received: 16 October 2019 / Received in revised form: 17 March 2020 / Accepted: 20 March 2020 / Published online: 1 April 2020.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.51>

### ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a bacterial biopolymer with interesting features that make it useful in diverse areas of human development. The problem around this biomaterial is its high production cost, so researchers have focused their attention on the search of economic substrates to be used in the fermentation process. The present work is focused on designing a formulation based on mesquite honey and nejayote for cellular biomass and PHB generation by *Bacillus cereus* 4N, relying on the central compounds design and factorial design as statistical tools. The substrates employed were characterized by bromatological analysis and the biopolymer obtained from the fermentation process was analyzed by FT-IR. These results show that mesquite honey at 15 g/L influence a high cellular biomass

generation and PHB production. On the other hand, the substrates characterization revealed its nutritional content; which was relevant to corroborate the use of this honey. FT-IR analyses confirmed the structure of the polymer as PHB. It is suggested that the present formulation is suitable to produce PHB and can be improved using an economical source of organic nitrogen.

**Keywords:** *Bacillus*, bioplastics, polyhydroxyalkanoates, *Prosopis spp.*

## RESUMEN

El polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero bacteriano con propiedades interesantes que lo hacen útil en diversas áreas del desarrollo humano. El problema en torno a este biomaterial es su alto costo de producción, por lo que los investigadores han centrado su atención en la búsqueda de sustratos económicos para el proceso de fermentación. Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en diseñar una formulación a base de miel de mezquite y nejayote para la producción de biomasa celular y PHB por *Bacillus cereus* 4N, apoyándose en el diseño de compuestos centrales y el diseño factorial como herramientas estadísticas. Los sustratos empleados fueron caracterizados por análisis bromatológicos y el biopolímero obtenido del proceso de fermentación fue analizado por FT-IR. Los resultados indican que la miel de mezquite a 15 g/L influye en una alta producción de biomasa celular y producción de PHB. Por otro lado, la caracterización de los sustratos reveló su contenido nutricional; el cual fue relevante para corroborar el aprovechamiento de ésta miel. Los análisis por FT-IR del biopolímero confirman que éste es PHB. Por lo tanto, se sugiere que la presente formulación es adecuada para la producción de PHB y puede ser mejorada empleando una fuente económica de nitrógeno orgánico.

**Palabras clave:** *Bacillus*, bioplásticos, polihidroxialcanatos, *Prosopis spp.*

## 1. INTRODUCCIÓN

En años recientes la búsqueda de bioplásticos que puedan sustituir los plásticos de origen petroquímico ha sido una prioridad en la investigación, esto debido al incremento de la contaminación ambiental que ha afectado la flora y fauna de diversos ecosistemas (Albuquerque & Malafaia, 2018). Una alternativa a este problema ecológico es la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs), los cuales son biopolímeros producidos a manera de gránulos citoplasmáticos por una amplia variedad de cepas microbianas expuestas a condiciones desbalanceadas de nutrientes (Brandon & Criddle, 2019).

Los PHAs han llamado la atención debido a sus características biodegradables, biocompatibles y termoresistentes que los convierten en alternativas importantes para sustituir el polipropileno y polietileno en diversas áreas de aplicación (Li *et al.*, 2016). De los 150 tipos de PHAs, el más caracterizado es el polihidroxibutirato

(PHB), el cual es un tipo de PHA de cadena corta que presenta de 3-5 átomos de carbono y ha sido reportado para distintas aplicaciones industriales como material para empaque de alimentos, consumibles de uso diario, aditivos para biocombustibles y recubrimiento de papel. En medicina, este biomaterial ha sido empleado para la producción de válvulas cardíacas, injertos para regeneración de tejidos, guías nerviosas, síntesis de fármacos de liberación controlada, hilos para suturas y algodón quirúrgico. Asimismo, en agricultura el PHB se ha informado para la producción de pesticidas de acción prolongada y la manufactura de bolsas para composta (Keshavarz & Roy, 2010; Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Actualmente el PHB es producido y comercializado por diversas empresas internacionales como: PHB Industrial S.A. (Brasil), Metabolix (E.U.A), Biomatera (Canadá), PolyFerm (Canadá), Bio-On Srl. (Italia), Biomer (Alemania), Tianjin GreenBio Material Co. (China), etc. (Kourmentza *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a los altos costos de producción se ha limitado su venta en el mercado; dado que, el 50% de la inversión está dirigida a los componentes del medio de cultivo, por lo que una alternativa a este problema es emplear sustratos económicos durante el proceso de fermentación (Akaraonye *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2016). A pesar de que aún no hay empresas mexicanas dedicadas a la producción de este biopolímero, existe ya un importante avance en la investigación sobre el uso de sustratos económicos que pueden disminuir el costo de fermentación (Flores-Sánchez *et al.*, 2017), puesto que se han estudiado una amplia variedad de sustratos regionales con el potencial de ser utilizados para la producción de PHB; entre estos, las mieles y jarabes vegetales ricos en azúcares fermentables, tal es el caso de la miel derivada de las vainas del árbol de mezquite (*Prosopis spp.*); el cual es un árbol abundante de las regiones áridas de México que se aprovecha principalmente para la producción de carbón y alimento para ganado (García-Andrade *et al.*, 2013). Sin embargo, la miel derivada de este árbol no ha sido reportada para la producción de PHB, por lo que este es un sustrato novedoso y económico que puede ser empleado para la producción de este biopolímero bacteriano. Otro sustrato interesante para el proceso de fermentación bacteriana es el nejayote, el cual es un subproducto obtenido a partir de la nixtamalización (proceso usado en México para la producción de tortillas). Este líquido alcalino presenta un alto contenido de compuestos orgánicos (Castro-Muñoz *et al.*, 2017) y del cual se ha reportado la búsqueda de materiales con valor agregado (polifenoles, gomas y componentes de calcio) para la industria (Díaz-Montes *et al.*, 2016), así como el aislamiento de bacterias con la capacidad de resistir altas concentraciones de ácido ferúlico para la producción de aromas (Baqueiro-Peña *et al.*, 2019). Por lo tanto, este subproducto podría ser utilizado para complementar un medio de cultivo económico destinado a este proceso biotecnológico. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la miel de mezquite y el nejayote como sustratos para la producción de biomasa celular y PHB por *B. cereus* 4N, así como su respectiva concentración óptima en un medio de cultivo, empleando el análisis de compuestos centrales y el diseño factorial como herramientas estadísticas para dichas evaluaciones. Además, se realizó la caracterización de estos sustratos mediante análisis bromatológicos y el biopolímero obtenido bajo la influencia de la formulación óptima fue analizado mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos y sustratos empleados**

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, Missouri, E.U.A). La miel de mezquite y el nejayote fueron obtenidos en establecimientos comerciales y tortillerías locales de Apodaca, Nuevo León, México. Estos sustratos fueron almacenados en frascos de cristal a condiciones de refrigeración (4 °C).

### **2.2. Caracterización de sustratos**

Se realizaron estudios bromatológicos (humedad, sólidos totales, ceniza, proteína, grasa, fibra cruda y carbohidratos totales) a la miel de mezquite, el nejayote y el medio de cultivo considerado óptimo antes y después del proceso de fermentación. Esto de acuerdo con las técnicas descritas por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales – AOAC (Cunniff, 1995).

### **2.3. Cepa bacteriana**

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI GenBank: MH404097.1), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros tipo PHB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C para evitar variabilidad genética (Harrold *et al.*, 2011).

### **2.4. Condiciones de cultivo para la producción de biomasa celular y biosíntesis de PHB**

Para evaluar el efecto de la miel de mezquite y el nejayote sobre la producción de biomasa celular y la producción de PHB, se empleó un medio de cultivo compuesto de glucosa - 15 g/L, peptona - 2.0 g/L, extracto de levadura - 2.5 g/L y NaCl - 1.25 g/L (Masood *et al.* 2017) y se añadió miel de mezquite (en sustitución de la glucosa) a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 g/L. Asimismo, para cada concentración de miel de mezquite se estudió el efecto del nejayote (en sustitución de la peptona), a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L.

Las fermentaciones se realizaron partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la formulación a evaluar (pre-inóculo), este fue inoculado con 100 µL (10<sup>8</sup> UFC/mL) de la solución de esporas reactivada mediante un choque térmico. Posteriormente fue incubado con agitación continua (incubadora MaxQ4000, Thermo Scientific) a condiciones de pH 6, 30 °C, 150 rpm

durante 24 h. Después, se realizó un escalamiento a matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma formulación. Los matraces de escalamiento fueron inoculados con un volumen del 2% (v/v) del pre-inóculo y se incubaron con agitación continua (incubadora MaxQ8000, Thermo Scientific), a condiciones de pH 6, 30 °C, 150 rpm durante 48 h.

## **2.5. Determinación de la producción de biomasa celular, producción de PHB y porcentaje de acumulación**

Después del periodo de incubación se tomó una muestra de 10 mL del medio de cultivo, la cual fue distribuida en microtubos de 2 mL previamente secos y pesados. Dichos microtubos fueron centrifugados a 8,000 rpm en una microcentrífuga TM22R (Beckman Coulter). El sobrenadante fue descartado y el paquete celular obtenido fue enjuagado con agua destilada estéril, posteriormente fue secado a 60 °C durante 24 h. La biomasa celular obtenida fue calculada como gramos de biomasa sobre litro de medio de cultivo (g/L).

La extracción del biopolímero fue llevada a cabo mediante la técnica de digestión con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) y suspensión en cloroformo (Hernández-Núñez *et al.*, 2019). El extracto polimérico obtenido se colocó en cajas de Petri de cristal previamente secas y pesadas dejándose reposar durante 24 h. El biopolímero extraído fue calculado como gramos de PHB sobre litro de medio de cultivo (g/L).

El porcentaje de acumulación (%PHB) se calculó como la relación de la cantidad de biopolímero obtenido (g/L) sobre la biomasa celular generada (g/L) (Masood *et al.*, 2017; Pagliano *et al.*, 2017) mediante la siguiente fórmula:

$$\%PHB = \left[ \frac{PHB (g/L)}{Biomasa\ celular (g/L)} \right] * 100$$

## **2.6. Análisis estadísticos para la determinación de concentraciones óptimas y evaluación del efecto y aprovechamiento de sustratos**

Las concentraciones óptimas de miel de mezquite y nejayote en el medio de cultivo para la producción de biomasa celular y PHB fueron determinadas mediante un diseño de superficie de respuesta (diseño de compuestos centrales), analizando un total de 20 formulaciones por triplicado. Primero, se realizó una evaluación de las variables dependientes mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se llevó a cabo el cálculo del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para evaluar la bondad de ajuste. El modelo matemático empleado fue seleccionado de acuerdo con la bondad de ajuste que más se acercará a una  $r^2 = 1$ .

Las curvas de análisis de respuesta 3D fueron realizadas para determinar las concentraciones óptimas de los sustratos y un diagrama de Pareto para determinar el efecto de ambos sustratos sobre la producción de biomasa celular y

PHB. Todo esto con el software STATISTICA v9. Además, un diseño factorial y una prueba posterior de Tukey fueron realizados para determinar los grupos de homogeneidad y por ende las concentraciones de sustrato con una alta producción de biomasa celular, biosíntesis de PHB y %PHB. Asimismo, un análisis de varianza (ANOVA) y prueba posterior de Tukey fue realizado para la producción de biomasa celular, PHB y %PHB en un control negativo (extracto de levadura - 2.5 g/L y NaCl - 1.25 g/L), control positivo (glucosa - 15 g/L, peptona - 2.0 g/L, extracto de levadura - 2.5 g/L y NaCl - 1.25 g/L), y la formulación óptima; esto con el fin de evaluar el aprovechamiento de los sustratos por la cepa bacteriana en estudio. Dichos análisis fueron llevados a cabo con el software IBM SPSS v20, tomando como significativos los valores con una  $p \leq 0.05$ .

## 2.7. Caracterización del biopolímero

La estructura química del biopolímero extraído de *B. cereus* 4N bajo la influencia de la formulación con mejor producción fue caracterizada mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), utilizando un espectrofotómetro Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Scientific), escaneando en rangos de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Se empleó una muestra de PHB comercial (Sigma-Aldrich) como control.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Caracterización de la miel de mezquite y nejayote

La Tabla 1 muestra el contenido nutricional de los sustratos evaluados en el presente trabajo. La miel de mezquite presenta un mayor contenido de carbohidratos en comparación con el nejayote. Sin embargo, ambos sustratos carecen de grasa y fibra mientras que el contenido proteico es similar.

**Table 1.** Bromatological analysis of the substrates tested.  
**Tabla 1.** Análisis bromatológico de los sustratos empleados.

Determinación	Miel de Mezquite	Nejayote
Humedad	9.19%	97.79%
Sólidos totales	90.81%	2.21%
Ceniza	0.18%	0.35%
Proteína	0.25%	0.27%
Grasa	0.0%	0.0%
Fibra cruda	0.0%	0.0%
Carbohidratos totales	90.38%	1.59%

Contenido nutricional expresado en %.

### 3.2. Optimización y análisis estadístico del efecto de la miel de mezquite y nejayote como sustratos

La optimización estadística de las variables dependientes (producción de biomasa celular y biosíntesis de PHB) y el efecto de las variables independientes (concentración de miel de mezquite y nejayote) fueron analizados mediante un diseño de compuestos centrales empleando el modelo lineal cuadrático de dos vías, debido a que con este modelo las variables dependientes presentaron una mayor  $r^2$  de 0.97512 con un ajuste de 0.95307 (biomasa celular) y 0.96221 con un ajuste de 0.94049 (PHB), demostrando una respuesta confiable. El análisis de varianza (ANOVA) realizado para ambas variables dependientes demostró diferencia significativa solo con la miel de mezquite (Tabla 2).

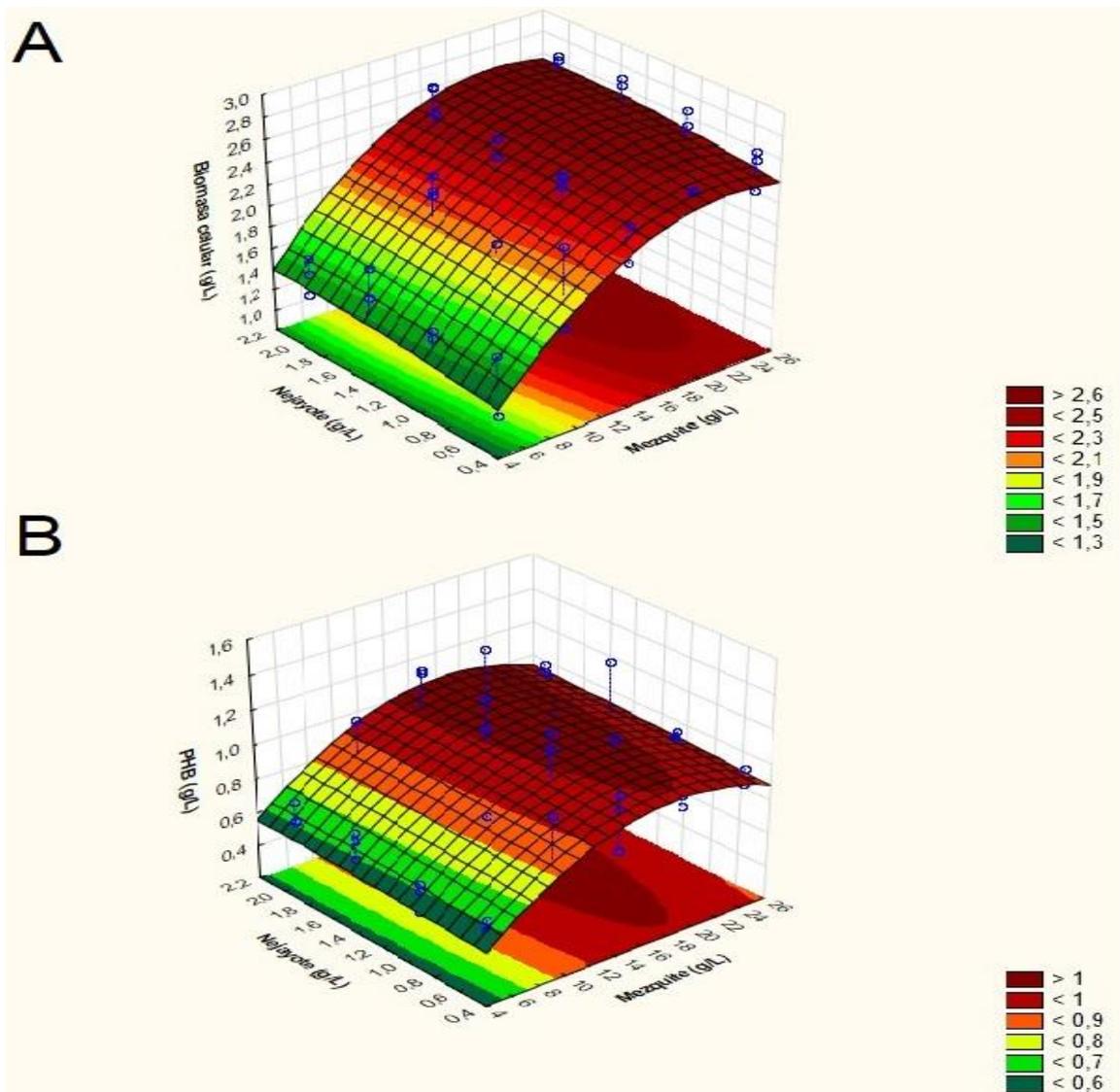
**Table 2.** Variance Analysis and coefficient of determination ( $r^2$ ).

**Tabla 2.** Análisis de varianza y coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Biomasa celular					
Factor	Suma de cuadrados (SS)	df	Cuadrado medio (MS)	Valor F	Valor $p^*$
(A) Miel de mezquite	7.89794	1	7.89794	143.10044	0.00000
(B) Nejayote	0.14079	1	0.14079	2.55098	0.11640
(AB)	0.00004	1	0.00004	0.00068	0.97934
Error	2.81477	51	0.05592		
Total SS	12.51657	56			
$r^2$	0.97512				
$r^2$ ajustada	0.95307				
PHB					
Factor	Suma de cuadrados (SS)	df	Cuadrado medio (MS)	Valor F	Valor $p^*$
(A) Miel de mezquite	0.84627	1	0.84627	26.72711	0.00000
(B) Nejayote	0.01268	1	0.01268	0.40039	0.52971
(AB)	0.00015	1	0.00015	0.00466	0.94585
Error	1.61483	51	0.03166		
Total SS	3.00273	56			
$r^2$	0.96221				
$r^2$ ajustada	0.94049				

\*Valores  $p \leq 0.05$  son considerados estadísticamente significativos.

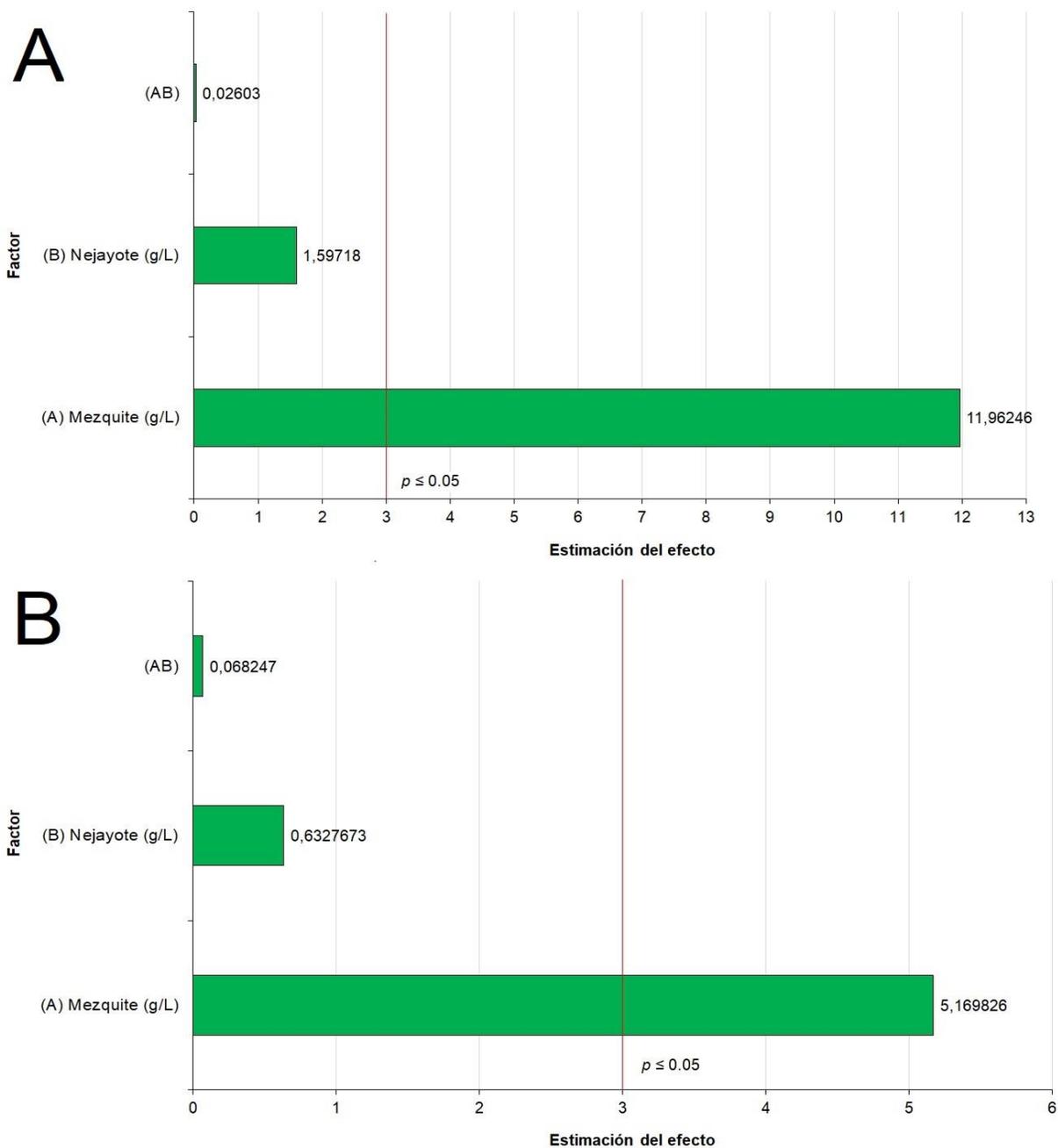
Las curvas de análisis de respuesta 3D demuestran que una concentración superior a los 15 g/L de miel de mezquite produce un incremento en la producción de biomasa celular y la biosíntesis de PHB (Fig. 1). Sin embargo, la concentración de nejayote en el medio de cultivo no produce un aparente efecto significativo sobre las variables dependientes evaluadas.



**Fig. 1.** 3D response analysis curves of the dependent variables: (A) cell biomass production and (B) PHB biosynthesis.

**Fig. 1.** Curvas de análisis de respuesta 3D de las variables dependientes: (A) producción de biomasa celular y (B) biosíntesis de PHB.

El efecto de los sustratos evaluados sobre las variables dependientes fue confirmado con un diagrama de Pareto, el cual indicó que la miel de mezquite influye sobre el crecimiento de *B. cereus* 4N y la biosíntesis de PHB, en cambio el nejayote y la interacción entre sustratos son estadísticamente no significativos (Fig. 2).



**Fig. 2.** Pareto chart of the effect of mesquite honey, nejayote and the interaction of both substrates on: (A) production of cellular biomass and (B) PHB biosynthesis. Values above the red line are statistically significant ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 2.** Diagrama de Pareto del efecto de la miel de mezquite, nejayote y la interacción de ambos sustratos sobre: (A) producción de biomasa celular y (B) biosíntesis de PHB. Valores por encima de la línea roja son estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Análisis de producción mediante diseño factorial y prueba posterior de Tukey

El estudio estadístico de las formulaciones evaluadas fue reforzado mediante un diseño factorial y una prueba posterior de Tukey, los cuales demostraron que la miel de mezquite a concentraciones de 15, 20 y 25 g/L permiten una mayor producción de biomasa celular de hasta 2.58 g/L, mientras que una concentración de 15 g/L permite la mayor biosíntesis de PHB de hasta 1.10 g/L y un mayor %PHB de 44.84 %. Por otra parte, se corrobora que el nejayote no influye en ambas variables dependientes, puesto que no hay diferencias significativas bajo la influencia de este sustrato (Tabla 3).

**Table 3.** Analysis of homogeneity groups.

**Tabla 3.** Análisis de los grupos de homogeneidad.

Miel de mezquite (g/L)	Biomasa celular (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
5	1.44 <sup>c</sup>	0.62 <sup>c</sup>	43.32 <sup>a</sup>
10	2.05 <sup>b</sup>	0.77 <sup>c,b</sup>	38.59 <sup>b</sup>
15	2.47 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	44.84 <sup>a</sup>
20	2.38 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a,b</sup>	39.50 <sup>b</sup>
25	2.58 <sup>a</sup>	0.97 <sup>a</sup>	37.79 <sup>b,c</sup>
Nejayote (g/L)	Biomasa celular (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
0.5	2.13 <sup>a</sup>	0.86 <sup>a</sup>	41.39 <sup>a</sup>
1.0	2.13 <sup>a</sup>	0.88 <sup>a</sup>	41.01 <sup>a</sup>
1.5	2.26 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	39.97 <sup>a</sup>
2.0	2.25 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	41.42 <sup>a</sup>

Grupos de homogeneidad (a-c) obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. Aprovechamiento de los sustratos evaluados en el medio de cultivo

La Tabla 4 indica una reducción en el contenido de sólidos totales, proteína y carbohidratos después del proceso de fermentación llevado a cabo por *B. cereus* 4N, lo cual es debido al aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo para la producción de biomasa celular y la biosíntesis de PHB. Dicho aprovechamiento fue comprobado al realizar una evaluación de la producción de biomasa celular (g/L), PHB (g/L) y %PHB en el control negativo (medio de cultivo sin glucosa y peptona), control positivo (medio de cultivo adicionado con glucosa y

peptona) y la formulación óptima obtenida en el presente estudio (miel de mezquite - 15 g/L, extracto de levadura - 2.5 g/L y NaCl - 1.25 g/L) (Fig. 3).

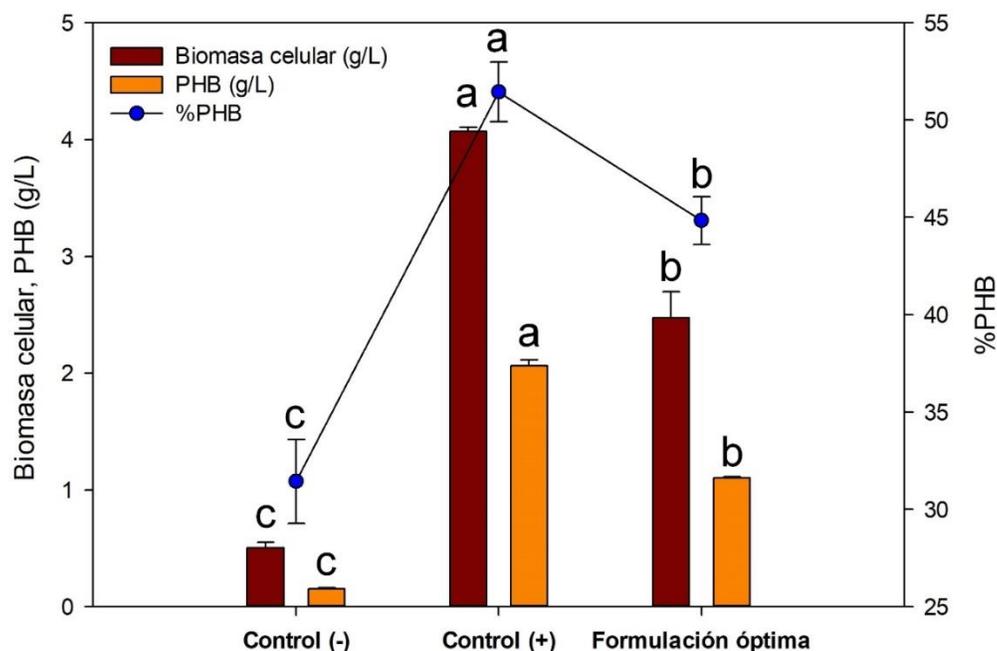
Los resultados demuestran que la cepa bacteriana empleada en este estudio presentó un aumento en la producción de biomasa celular y PHB en contraste con el control negativo. Sin embargo, los resultados son estadísticamente menores en comparación con el control positivo.

**Table 4.** Bromatological analysis of the optimal culture medium before and after of the fermentation process.

**Tabla 4.** Análisis bromatológico del medio de cultivo óptimo antes y después del proceso de fermentación.

<b>Determinación</b>	<b>Medio de cultivo (antes de la fermentación)</b>	<b>Medio de cultivo (después de la fermentación)</b>
Humedad	98.02%	98.03%
Sólidos totales	1.98%	1.41%
Ceniza	0.18%	0.19%
Proteína	0.38%	0.17%
Grasa	0.0%	0.0%
Fibra cruda	0.0%	0.0%
Carbohidratos totales	1.44%	1.05%

Proceso de fermentación: 30° C a 150 rpm durante 48 h. Contenido nutricional expresado en %.



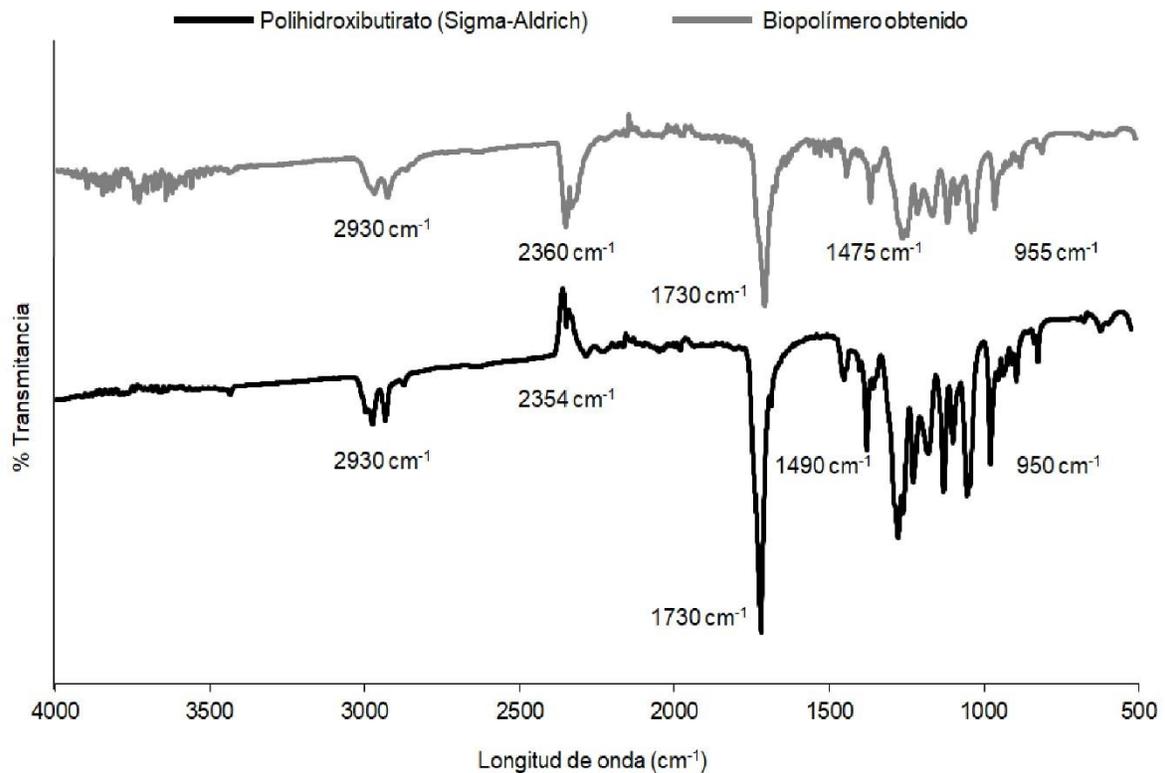
**Fig. 3.** Production of cellular biomass (g/L), production of PHB (g/L) and percentage of accumulation (% PHB) of the bacterial strain *B. cereus* 4N under the influence of the negative control, positive control and the optimal formulation tested in the present study. The data was plotted according to the mean of three replicates and the vertical lines indicate the standard deviation. The homogeneity groups (a-c) were obtained using the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 3.** Producción de biomasa celular (g/L), producción de PHB (g/L) y porcentaje de acumulación (%PHB) de la cepa bacteriana *B. cereus* 4N bajo la influencia del control negativo, control positivo y la formulación óptima determinada en el presente estudio. Los datos fueron representados de acuerdo con la media de tres repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-c) fueron obtenidos mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.5. Caracterización del biopolímero obtenido mediante espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FT-IR (Fig. 4) demuestra una estructura química similar al PHB empleado como control. Mostrando bandas en la región de  $950$  y  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a las fases amorfas y cristalinas del material. Asimismo, es mostrada una banda muy intensa a la longitud de  $1730 \text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a los enlaces éster carbonilo (C=O). Igualmente, se presentaron bandas en la región de  $2350$  y  $2930 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales indican la presencia de enlaces O-H y grupos  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , respectivamente.

Cabe destacar una diferencia en la intensidad de las bandas, lo cual indica que el biomaterial obtenido a partir de la formulación con la miel de mezquite presenta un menor peso molecular y cristalinidad, esto en contraste con el PHB comercial. Por lo que es necesario realizar una caracterización más exhaustiva del biopolímero obtenido para detallar las características fisicoquímicas de este biomaterial.



**Fig. 4.** FT-IR spectrum of the biopolymer produced by *B. cereus* 4N under the influence of the tested formulation and commercial PHB (Sigma-Aldrich).

**Fig. 4.** Espectro FT-IR del biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de la formulación evaluada y PHB comercial (Sigma-Aldrich).

#### 4. DISCUSIONES

La modificación de medios de cultivo suplementados con sustratos económicos son alternativas para el abaratamiento de la producción de bioplásticos tipo polihidroxicanoato (Lopez-Arenas *et al.*, 2017). Actualmente en este aspecto se está estudiando el empleo de sustratos ricos en azúcares como las melazas, mieles, jarabes y jugos, así como el empleo de sustratos lignocelulósicos como el bagazo de caña, pajas de arroz, sorgo y cáscaras de frutas o verduras. También el uso de subproductos de la industria láctea y aceitera han sido reportados para este objetivo (Nielsen *et al.*, 2017; Koller & Braunegg, 2018). Las melazas, mieles y jarabes son fuentes de carbono económicas que favorecen la biosíntesis de PHB en el género *Bacillus* debido a la disposición de carbohidratos fermentables

(Sathya *et al.*, 2018), los cuales son metabolizados a través de la glicolisis y la vía de la pentosa fosfato donde las moléculas resultantes de acetil-CoA son redirigidas del ciclo de Krebs a la ruta biosintética de acumulación de PHAs. Esto debido al incremento de los poderes reductores (NADPH) que inhiben la actividad de las enzimas previas al ciclo de Krebs: Coenzima A y Citrato sintasa (Mohapatra *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2018). Cabe destacar que la acumulación de este biopolímero por cepas de *Bacillus* se realiza mediante mecanismos asociados al crecimiento (acumulación de PHB durante la fase exponencial) y no asociados al crecimiento (acumulación de PHB durante la fase estacionaria), lo cual influye en una mayor productividad durante el desarrollo bacteriano (Borah *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2013).

La miel de mezquite aún no ha sido reportada para la producción de PHB, siendo este el primer reporte en utilizarla como fuente de carbono. Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran el uso potencial de esta miel como un sustrato regional económico con un alto contenido de sacarosa y trazas menores de glucosa, manosa, xilosa y arabinosa (Bravo *et al.*, 1998). En este caso, el contenido de carbohidratos de la miel de mezquite fue aprovechado por *B. cereus* 4N para la producción de biomasa celular y la biosíntesis de PHB; en comparación con el nejayote, el cual debido a su bajo contenido de nutrientes (Tabla 1) y las bajas concentraciones analizadas en este estudio presentó un efecto estadísticamente no significativo sobre las variables dependientes evaluadas. Cabe señalar que, el nejayote puede presentar composición variable debido a las diferentes formulaciones empleadas para el proceso de nixtamalización y a la naturaleza compleja de los polisacáridos presentes (arabinoxilanos), que disminuyen el desarrollo celular (Morales-Ortega *et al.*, 2013; Salazar-Magallon *et al.*, 2015). Sin embargo, se proponen alternativas para el uso este subproducto, tales como el empleo de cepas bacterianas alcalófilas para llevar a cabo estos procesos de fermentación (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011), el pretratamiento del nejayote mediante hidrólisis para una mayor disposición de nutrientes (Ramírez-Romero *et al.*, 2013) y el aumento de su concentración en el medio de cultivo.

La producción documentada en este estudio (biomasa celular: 2.47 g/L, PHB: 1.10 g/L y %PHB: 44.84%) bajo la influencia de la formulación óptima es superior al reportado con otras cepas de *B. cereus*; tal es el caso de *B. cereus* CFR06, cuya producción influenciada por glucosa (10 g/L) y almidón (20 g/L) como fuentes de carbono en un medio mineral fue de 1.0 y 0.48 g/L con %PHB de 46.0 y 48.0%, respectivamente (Halami, 2008). Asimismo, la producción informada es mayor a la obtenida con *B. cereus* PW3A, cuya producción fue influenciada con glucosa (50 g/L) en un medio mineral, obteniendo una cantidad máxima de PHB de 0.33 g/L (Babruwad *et al.*, 2015). Por lo tanto, la cepa empleada en este trabajo presenta un buen potencial biotecnológico para la producción de PHB. Mientras que el medio de cultivo formulado: miel de mezquite (15 g/L), extracto de levadura (2.5 g/L) y NaCl (1.25 g/L) es una formulación simple, económica y novedosa que puede ser aprovechada para este objetivo.

Sin embargo, al haber una menor producción de biomasa y biopolímero en comparación con el control positivo (medio suplementado con glucosa y peptona), la formulación diseñada en este reporte puede ser mejorada evaluando distintas fuentes de nitrógeno orgánico rico en aminoácidos (harinas de soya y pescado, hidrolizados de plumas y semillas, extracto de carne, urea, licor de maíz, etc.) que complementen el uso del extracto de levadura; puesto que el nitrógeno orgánico reduce la fase de adaptación del cultivo incrementando la producción de biomasa catalíticamente activa y estimula un incremento en los ratios de NADPH / NADP<sup>+</sup>, lo cual como se había mencionado anteriormente, reduce la actividad de las enzimas previas al ciclo de Krebs promoviendo una mayor acumulación de PHB (Borah *et al.*, 2002; Benesova *et al.*, 2017; Koller & Braunegg, 2018).

Los análisis por FT-IR corroboran que el biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de la formulación óptima es de tipo PHB, el cual es el tipo de PHA más común producido por cepas bacterianas del género *Bacillus* (Narayanan & Ramana, 2012). La importancia en la producción de PHB radica en su potencial aplicación como material para suturas, andamios para hueso, nervios y válvulas cardíacas. Esto debido a que es un biomaterial compatible y no tóxico que puede ser procesado mediante electrohilado, lo cual permite generar estructuras 3D con aplicaciones en medicina regenerativa (Özgören *et al.*, 2018).

Con base a lo anterior, se considera que la formulación obtenida en este estudio es adecuada para la producción de PHB con cepas del género *Bacillus* y la biosíntesis de este biopolímero puede incrementarse adicionando una fuente económica de nitrógeno orgánico, así como realizando estudios de escalamiento a mayores volúmenes de fermentación. Una caracterización más exhaustiva del PHB producido es necesario para seguir buscando nuevas aplicaciones y hacerlo más competente en el mercado mundial de los bioplásticos.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a manera de beca nacional (Raul Enrique Martínez-Herrera es beneficiario de la beca número 468278).

## **REFERENCIAS**

Akaraonye E., Moreno C., Knowles J. C., Keshavarz T. & Roy I. 2011. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. *Biotechnology Journal*. 7(2): 293–303.

Albuquerque P. B. S. & Malafaia C. B. 2018. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 107: 615–625.

Babruwad P. R., Prabhu S. U., Upadhyaya K. P. & Hungund B. S. 2015. Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology*. 6(3): 990–995.

Baqueiro-Peña I., Contreras-Jácquez V., Kirchmayr M. R., Mateos-Díaz J. C., Valenzuela-Soto E. M. & Asaff-Torres A. 2019. Isolation and Characterization of a New Ferulic-Acid-Biotransforming *Bacillus megaterium* from Maize Alkaline Wastewater (Nejayote). *Current Microbiology*. 76(10): 1215–1224.

Benesova P., Kucera D., Marova I. & Obruca S. 2017. Chicken feather hydrolysate as inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. *Letters in Applied Microbiology*. 65: 182–188.

Borah B., Thakur P. S. & Nigam J. N. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*. 92(4): 776–783.

Brandon A. M. & Criddle C. S. 2019. Can biotechnology turn the tide on plastics? *Current Opinion in Biotechnology*. 57: 160–166.

Bravo L., Grados N. & Saura-Calixto F. 1998. Characterization of Syrups and Dietary Fiber Obtained from Mesquite Pods (*Prosopis pallida* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(5): 1726–1733.

Castro-Muñoz R., Fíla V. & Durán-Páramo E. 2017. A Review of the Primary By-product (Nejayote) of the Nixtamalization During Maize Processing: Potential Reuses. *Waste and Biomass Valorization*. 10(1):13–22.

Cunniff, P. 1995. Official methods of analysis of AOAC international 16th ed. Association of Official Analytical Chemistry. Washington. D.C., USA. pp 685.

Díaz-Montes E., Castro-Muñoz R. & Yáñez-Fernández J. 2016. An overview of nejayote, a nixtamalization by product. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*. 8(2): 41–60.

Flores-Sánchez A., López-Cuellar M. del R., Pérez-Guevara F., Figueroa López U., Martín-Bufájer J. M. & Vergara-Porras B. 2017. Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 Using Mexican Avocado (*Persea americana*) Oil as a Carbon Source. *International Journal of Polymer Science*. 2017: 1–10.

García-Andrade M., González-Laredo R. F., Rocha-Guzmán N. E., Gallegos-Infante J. A., Rosales-Castro M. & Medina-Torres L. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*. 44: 336–342.

Gómez Cardozo J. R., Mora Martínez A. L., Yepes Pérez M. & Correa Londoño G. A. 2016. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science*. 2016: 1–12.

Halami P. M. 2008. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(6): 805–812.

Harrold Z. R., Hertel M. R. & Gorman-Lewis D. 2011. Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. *Journal of Microbiological Methods*. 87(3): 325–329.

Hernández-Núñez E., Martínez-Gutierrez C., López-Cortés A., Aguirre-Macedo M., Tabasco-Novelo C., González-Díaz M. & García-Maldonado J. 2019. Physico-chemical Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat. *Journal of Polymers and the Environment*. 1–7.

Keshavarz T. & Roy I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13(3): 321–326.

Koller M. & Braunegg G. 2018. Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. *Bioprocess Engineering*. 2(2): 89–103.

Kourmentza C., Plácido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala H. N. & Reis M. A. M. 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*. 4(2): 1–43.

Kumar P., Patel S. K. S., Lee J. K. & Kalia V. C. 2013. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 31(8): 1543–1561.

Li Z., Yang J. & Loh X. J. 2016. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. 8(4): 1–20.

Ling C., Qiao G. Q., Shuai B. W., Olavarria K., Yin J., Xiang R. J., Song K. N., Shen Y. H., Guo Y. & Chen G. Q. 2018. Engineering NADH/NAD<sup>+</sup> Ratio in *Halomonas bluephagenesis* for Enhanced Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA). *Metabolic Engineering*. 49: 275–286.

Lopez-Arenas T., González-Contreras M., Anaya-Reza O. & Sales-Cruz M. 2017. Analysis of the fermentation strategy and its impact on the economics of the production process of PHB (polyhydroxybutyrate). *Computers and Chemical Engineering*. 107: 140–150.

Masood F., Abdul-Salam M., Yasin T. & Hameed A. 2017. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11. *3 Biotech*. 7(87): 1–9.

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.

Morales-Ortega A., Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Gardea-Béjar A., Torres-Chávez P., López-Franco Y., Rascón-Chu A. & Lizardi-Mendoza J. 2013. Los arabinoxilanos ferulados de cereales. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36: 439–446.

Możejko-Ciesielska J. & Kiewisz R. 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 192: 271–282.

Narayanan A. & Ramana K. V. 2012. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. *3 Biotech*. 2(4): 287–296.

Nielsen C., Rahman A., Rehman A. U., Walsh M. K. & Miller C. D. 2017. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology*. 10(6): 1338–1352.

Özgören T., Pinar O., Bozdağ G., Denizci A. A., Gündüz O., Çakır Hatır P. & Kazan D. 2018. Assessment of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from a novel obligate alkaliphilic *Bacillus marmarensis* and generation of its composite scaffold via electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*. 119: 982–991.

Pagliano G., Ventrino V., Panico A. & Pepe O. 2017. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: A review of microbial processes. *Biotechnology for Biofuels*. 10(1):1–24.

Ramírez-Romero G., Reyes-Velazquez M. & Cruz-Guerrero A. 2013. Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3):463–471.

Salazar-Magallon J. A., Hernandez-Velazquez V. M., Alvear-Garcia A., Arenas-Sosa I. & Peña-Chora G. 2015. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology*. 68: 103–109.

Sanchez-Gonzalez M., Blanco-Gamez A., Escalante A., Valladares A. G., Olvera C. & Parra R. 2011. Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus flexus* strains from maize processing wastewater (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*. 52(4): 413–419.

Sathya A. B., Sivasubramanian V., Santhiagu A., Sebastian C. & Sivashankar R. 2018. Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*. 26(9): 3995–4012.