

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

“Evaluación de co-sustratos en la producción de Poli (3-hidroxibutirato- co-3-hidroxivalerato) (PHBV) por *Burkholderia thailandensis* E264”

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.I JONATHAN URIEL HERNÁNDEZ ALONSO

Matricula: 2223801850

uriel.alonso1998@gmail.com

Directora:

Dra. Lilia Arely de Jesús Prado Barragán

Co-director:

Dr. Luis Víctor Rodríguez Duran

Asesor:

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Jurado

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretaria: Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal: Dr. Roberto Olayo Gonzales

Vocal: Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández

Iztapalapa, Ciudad de México, 21 de febrero del 2025



“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la SECIHTI (Becario 1255323)





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 18/02/2025

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA del alumno JONATHAN URIEL HERNANDEZ ALONSO, matrícula 2223801850, quien cumplió con los 140 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintiuno de febrero del 2025 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

Evaluación de co-sustratos
en la producción de Poli
(3-hidroxibutirato-co-3-
hidroxivalerato) (PHBV) por
Burkholderia thailandensis
E264.

Cabe mencionar que la aprobación del Examen de Grado tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 180 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

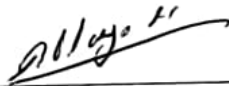
Presidente


DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Secretaría


DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Vocal


DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

Vocal


DR. OLIVERIO SANTIAGO RODRIGUEZ
FERNANDEZ

Ciudad de México a 21 de febrero de 2025

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Evaluación de co-sustratos en la producción de Poli (3-hidroxibutirato- co -3-
hidroxivalerato) (PHBV) por *Burkholderia thailandensis* E264

Que presentó

M.B. Jonathan Uriel Hernández Alonso

Directora:

Dra. Lilia Arely de Jesús Prado Barragán



Jurado

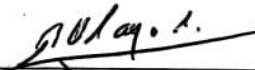
Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa



Secretaria: Dra. Angélica Román Guerrero



Vocal: Dr. Roberto Olayo Gonzáles



Vocal: Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández



Dedicatoria

A mi abuelo José Luis Alonso Huerta (Q.E.P.D.) y a mis padres, por brindarme su apoyo y las ganas de seguir preparándome profesionalmente.

Agradecimientos

-Agradezco a mi familia por ser un soporte en mi vida y siempre estar en los momentos difíciles.

-Quiero agradecer a la Dra. Lilia Arely Prado Barragán, mi directora de tesis a quien, con su guía y apoyo constante, me ha ayudado a crecer tanto profesional como personalmente durante este proceso.

-Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Luis Víctor Rodríguez Duran, mi co-director de tesis por su disposición para guiarme en cada etapa del proceso y ser un gran mentor.

-Quiero agradecer al Dr. Sergio Huerta Ochoa por fomentar en mi un espíritu crítico siendo su ejemplo una motivación fundamental para mi crecimiento académico.

-Quiero agradecer al Dr. G. Saucedo-Castañeda por su valiosa disposición al proporcionarme la cepa utilizada en esta investigación.

-Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández por su gran apoyo, disposición y por la facilidad brindada en el apoyo de análisis fundamentales en este proyecto. Aprecio mucho su tiempo y conocimientos brindados.

-Quiero agradecer a la Dra. Angélica Román Guerrero por brindarme su disposición en el uso de equipos y el espacio brindado. De igual forma al compañero Anthony Martín Ortiz de León por brindarme su apoyo.

-Quiero agradecer a la M.B. María Alejandra Pichardo Sánchez por su disposición y tiempo al compartir conocimientos y técnicas las cuales fueron clave para alcanzar los objetivos propuestos.

-Quiero agradecer al Dr. Humberto Vázquez Torres, así como al Dr. Roberto Olayo González y al Dr. Roberto Olayo Valles, por su valiosa atención, enseñanza y orientación en el campo de los polímeros y biomateriales siendo su influencia fundamental en mi formación académica.

-Expreso mi agradecimiento a todos los integrantes de la Planta Piloto 4 en Fermentación en Medio Sólido, por siempre buscar y compartir, un momento, una experiencia y una sonrisa pese a ser una persona reservada en algunos aspectos.

Resumen

El PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)) es un biopolímero termoplástico que pertenece a la familia de los polihidroxialcanoatos (PHA's). Este material ha despertado un gran interés debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo que lo hace valioso en áreas como la biomedicina, la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y el envasado de alimentos. En consecuencia, el PHBV desempeña un papel crucial en los avances tecnológicos y la conservación del medio ambiente, destacando su importancia tanto en la investigación actual como en la futura. El objetivo principal de la tesis fue evaluar el efecto de los ácidos levulínico (AL), valérico (AV) y el propionato de sodio (PrS) como co-sustratos en la síntesis del monómero 3-hidroxivalerato (3HV) para la formación del co-polímero PHBV utilizando *Burkholderia thailandensis* (BtE264). Así como, proponer aplicaciones potenciales en base a las propiedades térmicas y mecánicas presentes en el PHBV. La mayor producción de PHBV ($3.91 \pm 0.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con 22 % mol de 3HV se obtuvo con la adición de AL a las 120 h de cultivo; mientras que el AV ejerció mayor efecto inductor en la síntesis del monómero 3HV, logrando una concentración de 41 % mol y una producción de PHBV de $1.53 \pm 0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a las de 72 h. En contraste, la adición de PrS inhibió significativamente el crecimiento de BtE264, lo que desencadenó la menor producción de PHBV ($0.13 \pm 0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con 29 % mol de 3HV a las 48 h. La caracterización térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) indicó que el PHBV obtenido con la adición de AL presentaba un grado de cristalización menor (21 %), comparado con el PHB (57 %) y el PHBV-estándar comercial (PHBV-STD) (69 %), además PHBV presentó una temperatura de fusión 26°C inferior a PHB, mientras que el análisis termogravimétrico (TGA) indicó que PHBV presenta una mejor estabilidad térmica (276°C) que el PHBV-STD (269°C). El ensayo mecánico de tracción indicó que el aumento del % mol de 3HV en PHBV mejoró las propiedades mecánicas de tensión del biopolímero frente a el PHBV-STD. Estos hallazgos confirman la efectividad de la adición de co-sustratos en la inducción de la síntesis del monómero 3HV y el co-polímero PHBV por BtE264. Además de visualizar aplicaciones potenciales comerciales con base en las propiedades térmicas y mecánicas observadas en el PHBV sintetizado.

Palabras clave:

Burkholderia thailandensis; Biopolímero; Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato); Co-sustratos; Caracterización Térmica-Mecánica.

Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	1
Índice de Tablas.....	2
Abreviaturas	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1. Plásticos y microplásticos.....	7
2.2. Bioplásticos.....	8
2.2.1 Bioplásticos oxo-degradables.....	9
2.2.2 Bioplásticos de base biológica.....	10
2.3 Polihidroxicanoatos.....	11
2.3.1 Estructura molecular de los PHA's.....	11
2.4 Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV).....	14
2.4.1 Biosíntesis de PHBV.....	15
2.4.2 Propiedades de PHBV.....	17
2.4.3 Aplicaciones de PHBV.....	19
2.5 Sustrato y co-sustratos.....	22
2.5.1 Glicerol.....	23
2.5.2 Co-sustratos.....	24
2.6 Microorganismos productores de PHBV.....	26
2.7 <i>Burkholderia thailandensis</i>	28
2.8 PHBV frente a plásticos convencionales.....	29
3. Objetivos.....	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. Hipótesis.....	32
5. Metodología.....	33
5.1 Obtención de cepa y preparación de inóculo.....	33
5.2 Medio base de producción para la síntesis de PHA's.....	33

5.3 Efecto de la adición de co-sustratos en la producción de PHBV.....	33
5.4 Medición del crecimiento bacteriano.....	34
5.5 Análisis de consumo de sustratos.....	34
5.6 Cuantificación de PHBV.....	35
5.7 Caracterización del PHBV producido.....	36
5.7.1 Recuperación de PHBV.....	36
5.7.2 Determinación de propiedades térmicas.....	36
5.7.3 Determinación de propiedades mecánicas-ensayo de tracción.....	37
5.7.3.1 Formación de películas de PHA's.....	37
5.7.3.2 Ensayo de tracción.....	37
5.8 Análisis estadístico.....	38
6. Resultados y discusión.....	39
6.1 Perfil de crecimiento de BtE264 en el MBP y MBP más co-sustratos (AL, AV y PrS).....	39
6.2 Consumo de sustrato en el MBP y co-sustratos (AL, AV y PrS).....	41
6.3 Producción de PHA's en el MBP y co-sustratos (AL, AV y PrS).....	44
6.4 Caracterización de propiedades térmicas y mecánicas del PHBV.....	49
6.4.1 Propiedades térmicas.....	49
6.4.2 Propiedades mecánicas-ensayo de tracción.....	55
7. Posibles aplicaciones del PHBV.....	59
8. Conclusiones y perspectivas.....	61
9. Referencias.....	62
10. Anexos.....	78
Anexo 1. Análisis estadístico.....	78
Anexo 2. Fórmulas.....	80
Anexo 3. Curvas de calibración.....	82
Anexo 4. Productos del trabajo.....	85

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de bioplásticos.....	9
Figura 2. Estructura básica de los PHA's.....	12
Figura 3. Diferentes estructuras de los PHA's.....	13
Figura 4. Estructura básica del Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato).....	14
Figura 5. Ruta de síntesis para PHBV utilizando glicerol como fuente de carbono y propionato como co-sustrato.....	16
Figura 6. Perfil de crecimiento de BtE264 en MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS.....	40
Figura 7. Consumo de glicerol en MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS.....	42
Figura 8. Consumo de AL, AV y PrS en MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS.....	43
Figura 9. Perfil de producción de PHA's en los tratamientos MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS.....	45
Figura 10. Termogramas de DSC; A) PHB, B) PHBV-STD y C) PHBV.....	51
Figura 11. Termograma por TGA; PHB (A), PHBV-STD (B) y PHBV (C).....	53
Figura 12. Diagrama esfuerzo-deformación de muestras de PHB, PHBV-STD y PHBV.....	56
Figura 13. Posibles aplicaciones propuestas para el PHBV.....	60
Figura 14. Curva de calibración para glicerol.....	82
Figura 15. Curva de calibración para AL.....	82
Figura 16. Curva de calibración para AV.....	83
Figura 17. Curva de calibración para PrS.....	83
Figura 18. Curva de calibración para monómero 3HB.....	84
Figura 19. Curva de calibración para monómero 3HV.....	84

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades térmicas y mecánicas de plásticos convencionales y PHBV a distintas fracciones mol de 3HV.....	18
Tabla 2. Propiedades térmicas, mecánicas y aplicaciones de PHBV a distintas fracciones mol de 3HV.....	21
Tabla 3. Producción de PHBV y %3HV por distintos microorganismos con adición y sin la adición de co-sustratos.....	25
Tabla 4. Ventajas y desventajas de los PHBV.....	31
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de BtE264.....	40
Tabla 6. Rendimiento producción de biomasa/consumo de sustrato ($Y_{X/S}$) de BtE264.....	43
Tabla 7. Medios de cultivo, composición (% mol) de PHBV y rendimiento producto/biomasa ($Y_{P/X}$) por BtE264.....	48
Tabla 8. Propiedades térmicas de las muestras PHB, PHBV-STD y PHBV comparadas con valores obtenidos por otros autores.....	53
Tabla 9. Propiedades mecánicas de PHB, PHBV-STD y PHBV frente a valores obtenidos por otros autores.....	56
Tabla 10. Análisis de Varianza para $Y_{X/S}$	78
Tabla 11. Prueba post-hoc de Tukey para $Y_{X/S}$ ($\alpha = 0.05$).....	78
Tabla 12. Análisis de Varianza para $Y_{P/X}$	78
Tabla 13. Prueba post-hoc de Tukey para $Y_{P/X}$ ($\alpha = 0.05$).....	78
Tabla 14. Análisis de Varianza para Módulo de Young.....	79
Tabla 15. Prueba post-hoc de Tukey para Módulo de Young ($\alpha = 0.05$).....	79
Tabla 16. Análisis de Varianza para resistencia a la tracción.....	79
Tabla 17. Prueba post-hoc de Tukey para resistencia a la tracción ($\alpha = 0.05$).....	79
Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis para % elongación.....	79
Tabla 19. Prueba de comparación por el método Dunn's para % elongación ($\alpha = 0.05$).....	80

Abreviaturas

%Xc	Porcentaje de cristalización
ΔH_c	Entalpía de cristalización
ΔH_m	Entalpía de fusión
μ	Tasa específica de crecimiento
3HB	3-Hidroxibutirato
3HV	3-Hidroxivalerato
AgNP	Nanopartículas de plata
AGVS	Ácidos grasos volátiles
AL	Ácido levulínico
AP	Ácido propiónico
AV	Ácido valérico
Bio-PA	Bio-poliamida
Bio-PE	Bio-polietileno
Bio-PET	Bio- tereftalato de polietileno
BtE264	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
CN	Caldo nutritivo
CoA	Coenzima A
CuO	Óxido de cobre
DHAP	Fosfato de dihidroxiacetona
DSC	Calorímetro diferencial de barrido
FA	Ácido fólico
fCEV	Factor de crecimiento endotelial vascular
fCFB	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
fDCE	Factor 1 α derivado de células estromales
HEP	Heparina
Llo	Iloprost
MBP	Medio base de producción
MBP+AL	Medio base de producción + ácido levulínico
MBP+AV	Medio base de producción + ácido valérico
MBP+PrS	Medio base de producción + propionato de sodio
MP	Microplásticos
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducida
NP	Nano plásticos
PBAT	Poli (butil adipato-co-tereftalato
PBS	Succinato de polibutileno
PBSebt (Mater-Bi [®] PTCS)	Formulación patentada producido por Novamont
PCL	Policrapolactona

PE	Polietileno
PEP	Fosfoenolpiruvato
PET	Tereftalato de polietileno
PHA's	Polihidroxialcanoatos
PHA's -lcc	Polihidroxialcanoatos de longitud de cadena corta
PHA's -lcl	Polihidroxialcanoatos de longitud de cadena larga
PHA's -lcm	Polihidroxialcanoatos de longitud de cadena media
PHB	Polihidroxibutirato
PHBHVHB	Poli(-3-hidroxibutirato- co -3-hidroxivalerato- co -4-hidroxibutirato)
PHBV	Poli (3-hidroxibutirato- co -3- hidroxivalerato)
PLA	Ácido poliláctico
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PP	Polipropileno
PrS	Propionato de sodio
PS	Poliestireno
PTX	Paclitaxel
PUR	Poliuretano
PVC	Cloruro de polivinilo
QAPM	Queratina de alto peso molecular
So	Sustrato inicial
T _c	Temperatura de cristalización
T _d	Temperatura de degradación
td	Tiempo de duplicación
T _g	Temperatura de transición vítrea
T _m	Temperatura de fusión
X _{max}	Biomasa máxima
X _o	Biomasa inicial
Y _{P/X}	Rendimiento producto/biomasa
Y _{X/S}	Rendimiento biomasa/sustrato

1. Introducción

Los plásticos son indispensables en la vida cotidiana, obteniendo un lugar y una función fundamental en la vida moderna. Estos materiales deben su relevancia a sus características físicas, químicas, versatilidad y accesibilidad, entre otros, que ha impulsado su producción a nivel mundial. La producción global de plástico ha aumentado drásticamente en las últimas décadas, alcanzando valores de alrededor de 370 megatoneladas durante el año 2020 y se estima un crecimiento de 1.3 gigatoneladas en 2060 (Wang & Praetorius, 2022). Los productos plásticos obtenidos a partir de recursos no renovables presentan poca o nula biodegradabilidad, aproximadamente el 50% de los plásticos se desechan después de un solo uso, creando un problema en la gestión de residuos, ya que la mayoría de estos plásticos terminan en vertederos, suelos, medios marinos y otros entornos naturales, causando daños al ecosistema, además de liberar sustancias tóxicas que representan un riesgo para la salud de los seres vivos (Napper & Thompson, 2019).

Una alternativa a los plásticos de fuentes no renovables son los polihidroxialcanoatos (PHA's), los cuales son una familia de biopolíesteres biodegradables, biocompatibles y no tóxicos, compuestos por varios monómeros de hidroxialcanoatos que son principalmente sintetizados y almacenados intracelularmente por algunas bacterias. El miembro más conocido de la familia PHA's es el poli (3-hidroxibutirato) (PHB), un polímero que exhibe propiedades mecánicas notables, comparables con homopolímeros de polietileno y polipropileno. La incorporación del monómero 3-hidroxivalerato (3HV) a la cadena de PHB da como resultado la formación de un copolímero más resistente llamado poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) producido generalmente por la adición de precursores como valerato o propionato al medio de cultivo. Actualmente el PHBV se ha utilizado en aplicaciones para el sector biomédico, ingeniería de tejidos, liberación de fármacos y envasado de alimentos (Ibrahim et al., 2021; Yeo et al., 2018).

Se ha reportado que la mayoría de las bacterias con la capacidad de producir PHBV lo sintetizan sólo si se dispone de precursores (co-sustratos) específicos; por lo que la correcta combinación de sustratos específicos, selección de los microorganismos, así como la correcta

selección y concentración de precursores es crucial para la producción de PHBV. De igual forma, la concentración de precursores también es fundamental para ajustar la fracción de monómero de 3HV en PHBV y, en consecuencia, modificar las propiedades (térmicas, mecánicas, ópticas, físicas, eléctricas, químicas, biológicas, acústicas, reológicas) del polímero (Berezina, 2012).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de diferentes co-sustratos en la producción de PHBV por el microorganismo *Burkholderia thailandensis* E264 y se caracterizaron las propiedades térmicas y mecánicas del biopolímero obtenido.

2. Antecedentes

2.1. Plásticos y microplásticos

Los plásticos son un grupo de polímeros sintéticos obtenidos principalmente a partir de fuentes fósiles, como el petróleo, el carbón y el gas natural. Están compuestos de carbono, hidrógeno, silicio, oxígeno, cloruro y nitrógeno. Los plásticos son utilizados preferentemente por su estabilidad y durabilidad. Existen diferentes tipos de plásticos, entre estos se encuentra el polietileno (PE), tereftalato de polietileno (PET), nylon, polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC) y poliuretano (PU). Es importante mencionar que, la mayoría de los plásticos de origen fósil (PVC, PE, PP, etc.) y biológico (bio-polipropileno, bio-polietileno, etc.) que se utilizan actualmente, no son biodegradables o presentan condiciones poco realistas para su biodegradación (Ahmed et al., 2018; Alshehrei, 2017). Por lo tanto, se acumulan en grandes cantidades en el medio ambiente debido a la gestión inadecuada de los desechos y al vertido descontrolado representando una grave amenaza para nuestro planeta.

La exposición de materiales plásticos en el entorno ocasiona que los factores ambientales, como la radiación solar, fotodegradación, la abrasión mecánica, y la oxidación, degraden los plásticos a partículas más pequeñas. Las partículas de plástico que presentan un diámetro que oscila entre 1 μm y 5 mm se describe como microplásticos, mientras que las que tienen un diámetro entre 1 y 1000 nm se definen como nanoplásticos (Junaid et al., 2023; Lebreton et al., 2019).

A pesar de tener un tamaño relativamente pequeño, dichos fragmentos presentan alta estabilidad y durabilidad, con una permanencia potencial de cientos a miles de años, confirmando que los plásticos convencionales aún después de fragmentarse en partículas de menor tamaño presentan poca o nula biodegradabilidad. Durante la erosión de los desechos plásticos en los mares, se generan micro y nanopartículas plásticas persistentes que ponen en riesgo al ecosistema (Cózar et al., 2014; Lebreton et al., 2019). Asimismo, la fragmentación de plásticos presenta un grave problema de contaminación debido a que su tamaño facilita su desplazamiento en el medio ambiente e incluso su penetración en los organismos vivos

(Markowicz & Szymańska-Pulikowska, 2019).

2.2. Bioplásticos

Los biopolímeros son macromoléculas de gran tamaño (pesos moleculares superiores a 10^3 - 10^4 Da) compuestos de muchas unidades repetidas, la larga cadena de biomoléculas poliméricas es producida por organismos vivos. Las unidades monoméricas de estos polímeros se unen mediante enlaces covalentes para formar grandes estructuras. Algunos ejemplos de biopolímeros son el ADN, el ARN, la gelatina, la queratina, la celulosa, el almidón, etc. (Singh et al., 2021).

Los bioplásticos son biomoléculas con características físicas similares a los plásticos sintéticos. El término bioplástico se otorga sólo si el material es biodegradable, de origen biológico o presenta ambas propiedades; y se dividen en tres grupos (Fig. 1). Dependiendo de su origen y propiedades, pueden ser bioplásticos de base biológica no biodegradables, bioplásticos de base biológica-biodegradables o bioplásticos de origen fósil biodegradables (Chauhan et al., 2024).

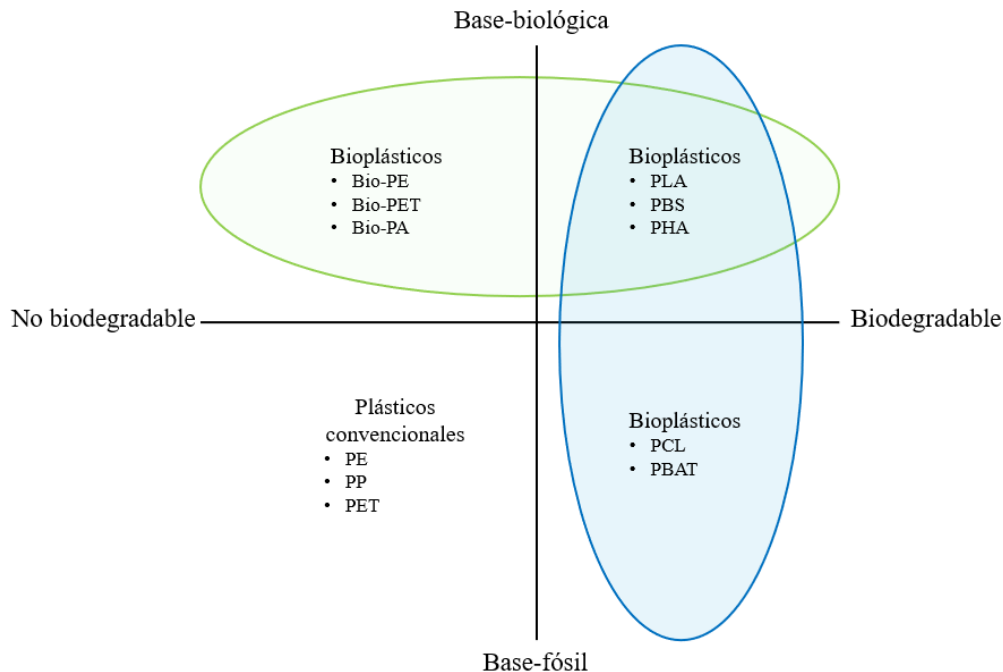


Figura 1. Clasificación de bioplásticos: PE (polietileno), PP (polipropileno), PET (tereftalato de polietileno), PBAT (poli (butil adipato-co-tereftalato), PCL (policaprolactona), bio-PE (bio-polietileno), bio-PET (bio-tereftalato de polietileno), bio-PA (bio-poliamida), PLA (ácido poliláctico), PHA's (polihidroxialcanoatos), PBS (Succinato de polibutileno). Modificado de Ashter (2016).

Un polímero biodegradable es aquél que puede degradarse en el entorno ya sea en condiciones aerobias (presencia de oxígeno) o anaerobias (ausencia de oxígeno). Los microorganismos descomponen el material a dióxido de carbono, agua y sales minerales en condiciones aerobias y en sales minerales y metano en condiciones anaerobias. Los microorganismos presentes en el entorno utilizan los polímeros biodegradables como fuente de carbono para extraer energía química para sus procesos de vida (Ashter, 2016).

2.2.1 Bioplásticos oxo-degradables

Los bioplásticos oxo-degradables son plásticos sintéticos como PE, PP, PS, PET a los que se agregan aditivos conocidos como aditivos oxo-degradables. Esto hace que los plásticos se degraden por un proceso de dos etapas; la primera es la activación de los aditivos responsables de la oxidación del material, la cual inicia en presencia oxígeno y es acelerada

por luz UV y calor. La segunda etapa es la degradación con la participación de microorganismos (Havstad, 2020; Markowicz & Szymańska-Pulikowska, 2019),

2.2.2 Bioplásticos de base biológica

El término bioplástico puede dar lugar a malentendidos debido a que son indistinguibles de los plásticos convencionales. Su estructura química es idéntica a los plásticos producidos de origen fósil como el Bio-PE que se produce a partir de la caña de azúcar mediante un proceso de fermentación obteniendo bioetanol que se utiliza para la producción de etileno, en términos de funcionalidad el Bio-PE y el PE no existe una diferencia clara entre ellos. Esto suele crear la confusión al etiquetar ciertos plásticos como bioplásticos cuando no todos tienen propiedades ecológicas claras (Rujnić-Sokele & Pilipović, 2017).

Los plásticos de base biológica se definen como plásticos que se derivan de la biomasa, se refiere a material orgánico biodegradable derivado de plantas, animales y microorganismos, por esto se consideran renovables, además de ser productos prometedores en el remplazo de los plásticos convencionales al ser menos dañinos al medio ambiente (Lambert & Wagner, 2017). Algunos son completamente de base biológica y pueden ser biodegradables (almidón, PHA's), también pueden ser de base biológica parcial y biodegradables (PLA, celulosa), o de base biológica parcial y no biodegradable (Bio-PP, Bio-PE). La capacidad de degradación de los plásticos de base biológica no depende de su contenido de origen biológico, sino de su estructura química y propiedades físicas (Siracusa & Blanco, 2020).

Denominar un plástico como biodegradable es algo que no se debería tomar a la ligera debido a que ciertos productos mencionan ser “biodegradables” pero presentan ciertas discrepancias en la degradación acelerada o poco realista que prometen requiriendo tratamientos específicos, como compostaje industrial, digestión anaeróbica, pretratamientos enzimáticos y térmicos o mantener condiciones controladas para su degradación. Lo que genera expectativas poco realistas en entornos con la ausencia de dichos factores por

consecuencia, su degradación en ambientes naturales es mucho más lenta o ineficaz. (Meereboer et al., 2020).

2.3 Polihidroxialcanoatos

Los PHA's son una familia de poliésteres biodegradables producidos por una gran variedad de microorganismos, son una fuente de almacenamiento intracelular de carbono y energía como parte de un mecanismo de supervivencia del microorganismo, donde la síntesis de PHA's se ve favorecida por el crecimiento microbiano desequilibrado. Los PHA's se acumulan dentro del citoplasma del microorganismo, en forma de gránulos intracelulares, por lo general, durante la fase estacionaria de crecimiento, y bajo condiciones de estrés por limitación de nutrientes esenciales como nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre o magnesio, junto con la presencia en exceso de un suministro de carbono (Li et al., 2016; Saravanan et al., 2022).

Los PHA's se pueden producir por tres métodos diferentes: catálisis enzimática, síntesis en plantas modificadas genéticamente, y fermentación microbiana. Sin embargo, se ha reportado que la fermentación microbiana es el método más eficaz para la producción de PHA's (Ganesh Saratale et al., 2021).

2.3.1 Estructura molecular de los PHA's

Una molécula de PHA's (Fig. 2) está formada por unidades monoméricas de (R) - hidroxíácido graso conectadas entre sí por enlaces éster; cada unidad monomérica tiene un grupo R de cadena lateral, el cual puede estar constituido por un grupo alquilo saturado o grupos alquilo insaturados, grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo ramificados (Sharma et al., 2021).

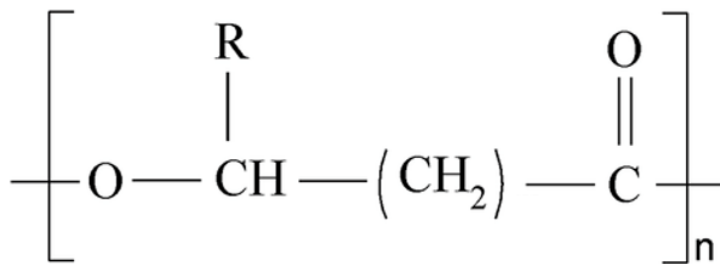


Figura 2. Estructura básica de los PHA's, (n= cantidad que se puede repetir el monómero) (Dobrogojski et al., 2018).

Los PHA's se dividen en tres grupos dependiendo de la longitud de las unidades monoméricas de la cadena de carbono (Saravanan et al., 2022): Polihidroxialcanoatos de cadena corta (PHA's-lcc; de 3 a 5 átomos de carbono), de cadena media (PHA's-lcm; de 6 a 14 átomos de carbono), y de cadena larga (PHA's-lcl; de 17 a 18 átomos de carbono). Se han identificado más de 150 monómeros de PHA, lo que los sitúa en el grupo más grande de poliésteres naturales clasificados por el número de carbonos incorporados. A medida que aumenta la longitud de la cadena lateral, el polímero producido se vuelve más elástico, adquiere menor cristalinidad y disminuye su temperatura de fusión (Choi et al., 2020; Saravanan et al., 2022).

Los PHA's se pueden sintetizar como homopolímeros, co-polímeros aleatorios, co-polímeros en bloque o polímeros funcionales, que contienen enlaces dobles o triples, epoxi, carbonilo, ciano, fenilo y/o grupos halógenos en las cadenas laterales del polímero (Fig. 3) (Meng et al., 2014). El miembro más conocido de la familia PHA's es el Polihidroxibutirato (PHB), un polímero que exhibe propiedades mecánicas comparables con homopolímeros de PE y PP. El PHB se utiliza en diversas aplicaciones en sectores relacionados con la biomedicina (material para suturas, andamios para ingeniería de tejidos, implantes médicos) y envasado de alimentos de gama baja (materiales con la capacidad de transportar y conservar el producto de manera básica), a pesar de esto, sus aplicaciones se ven limitadas debido a que es un polímero que presenta un comportamiento frágil por su alta cristalinidad e inestabilidad térmica y la estrecha ventana de procesamiento térmico (Yeo et al., 2018).

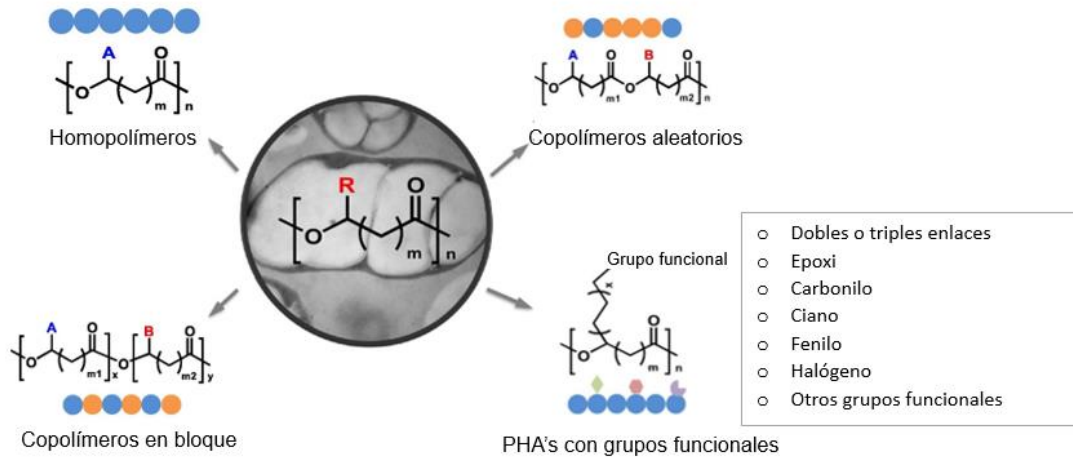


Figura 3. Diferentes estructuras de los PHA's modificado de Tan et al. (2021).

Los arreglos de estas estructuras proporcionan infinitas variaciones, funciones y propiedades (físicas, mecánicas, térmicas, eléctricas, ópticas etc.), junto con otras modificaciones químicas (co-polimerización, funcionalización, reticulación etc.), lo que da como resultado una variedad de PHA's con ventajas y desventajas en comparación con los plásticos sintéticos tradicionales (Tan et al., 2021).

El uso y la comercialización de los PHA's es limitado por su alto costo de producción comparado con el de los polímeros sintéticos, por ejemplo, Goodfellow® una reconocida empresa con sede en el Reino Unido comercializa el PHB en forma de gránulo con un tamaño de partícula de 5 mm a un precio de venta de 495.83 USD/kg, mientras que el homopolímero de polipropileno granulado con el mismo tamaño de partícula tiene un costo de 277.19 USD/kg (Goodfellow, 2025). Los costos de las materias primas utilizadas para la producción de PHA's alcanzan el 30-50 % de los costos totales de producción debido a que se producen principalmente a partir de materias primas costosas como sacarosa, glucosa, lactosa o ácidos grasos volátiles (Choi & Lee, 1997; Martínez-Martínez et al., 2019).

2.4 Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV)

El poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) es un polímero de origen natural que forma parte de la familia de los PHA's compuesto por la unión de dos monómeros como el 3-hidroxibutirato (3HB) y 3-hidroxivalerato (3HV); el cual es producido y acumulado intracelularmente por varios tipos de microorganismos, principalmente bacterias. La incorporación del monómero 3HV a las cadenas de 3HB (Fig. 4) dan como resultado la formación del co-polímero que es sintetizado en su mayoría, añadiendo precursores como valerato o propionato al medio de cultivo, puede tener diferentes proporciones molares dependiendo las condiciones de producción. El PHBV es un biopolímero que posee diferentes propiedades térmicas y mecánicas en comparación con el PHB. Estas propiedades ofrecen una ventaja significativa en el desarrollo de productos con la capacidad de ser biodegradables, biocompatibles y no tóxicos (Dalgic et al., 2022; Ibrahim et al., 2021).

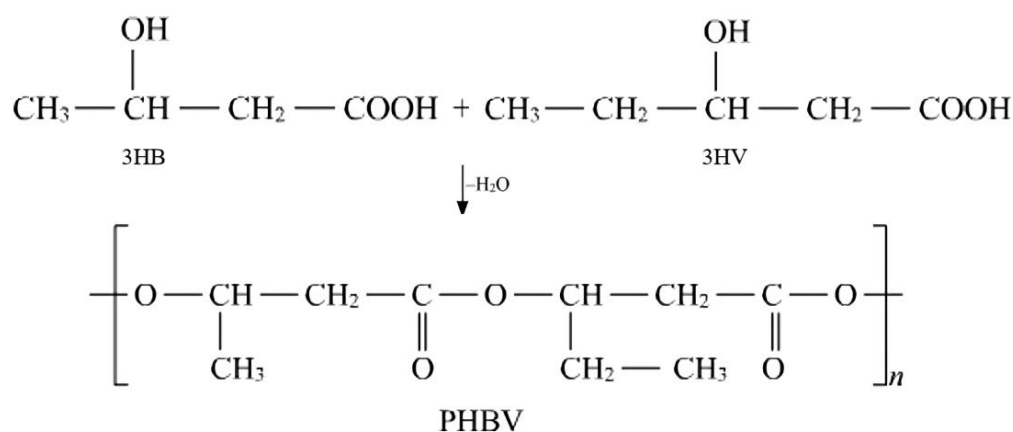


Figura 4. Estructura básica del Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV)
Alchetron (2024)

El PHBV contiene cadenas laterales de etilo debido a su contenido de 3HV junto con cadenas laterales cortas de metilo provenientes del 3HB, el impedimento estérico resultante entre las cadenas da como resultado que factores, como la cristalinidad y la temperatura de fusión disminuyan al aumentar el contenido de 3HV. La rigidez también disminuye formando un polímero más dúctil, lo que impacta positivamente en la procesabilidad del polímero. Asimismo, el contenido de 3HV tiene un severo impacto en el aumento de la degradabilidad del polímero en aguas oceánicas, y brinda mejores propiedades térmicas y mecánicas,

factores clave para determinar las características del tipo de producto que se desea obtener (Avella et al., 2000; Kliem et al., 2020).

2.4.1 Biosíntesis de PHBV

Los microorganismos pueden seguir la ruta metabólica (Fig. 5) que da como resultado la producción de PHA's siempre que ocurra una o más de las siguientes condiciones específicas: 1) señales ambientales específicas (falta de nutrientes, que conducen a la activación de la expresión del gen *pha*), 2) presencia de intermediarios metabólicos específicos o componentes celulares que activan las enzimas sintéticas PHA's, y 3) enriquecimiento de los intermediarios requeridos para la síntesis de PHA's por inhibición de rutas metabólicas competidoras. El PHBV es acumulado principalmente por la mayoría de las bacterias en condiciones de escasez de nutrientes (nitrógeno, fósforo o azufre etc.) a la par de una fuente de carbono en exceso, sintetizado especialmente cuando el medio de crecimiento contiene ácidos orgánicos. Las vías metabólicas que fomentan la biosíntesis de PHBV dependen principalmente de las características de la cepa bacteriana (Balakrishna Pillai et al., 2020; Policastro et al., 2021).

Las bacterias generalmente sintetizan acetil-CoA durante el proceso orgánico. La primera reacción implica la condensación de dos moléculas de acetil-CoA catalizada por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa ó PhaA (codificada en el gen *phaA*), para formar acetoacetil-CoA y heterofusiona fracciones de acetil-CoA y propionil-CoA para formar 3-cetovaleril-CoA. La segunda reacción es una reducción catalizada por acetoacetil-CoA reductasa o PhaB (codificada en *phaB*), una reductasa dependiente de NADPH que reduce simultáneamente acetoacetil-CoA a 3-Hidroxibutiril-CoA y 3-cetovaleril-CoA a 3-Hidroxivaleril-CoA. La última reacción es una polimerización catalizada por la PHA sintasa o PhaC (codificada en *phaC*), una polimerasa que incorpora monómeros de 3-Hidroxibutiril-CoA y 3-Hidroxivaleril-CoA en la cadena polimérica para formar PHBV (Fig. 5) (Miscevic et al., 2021).

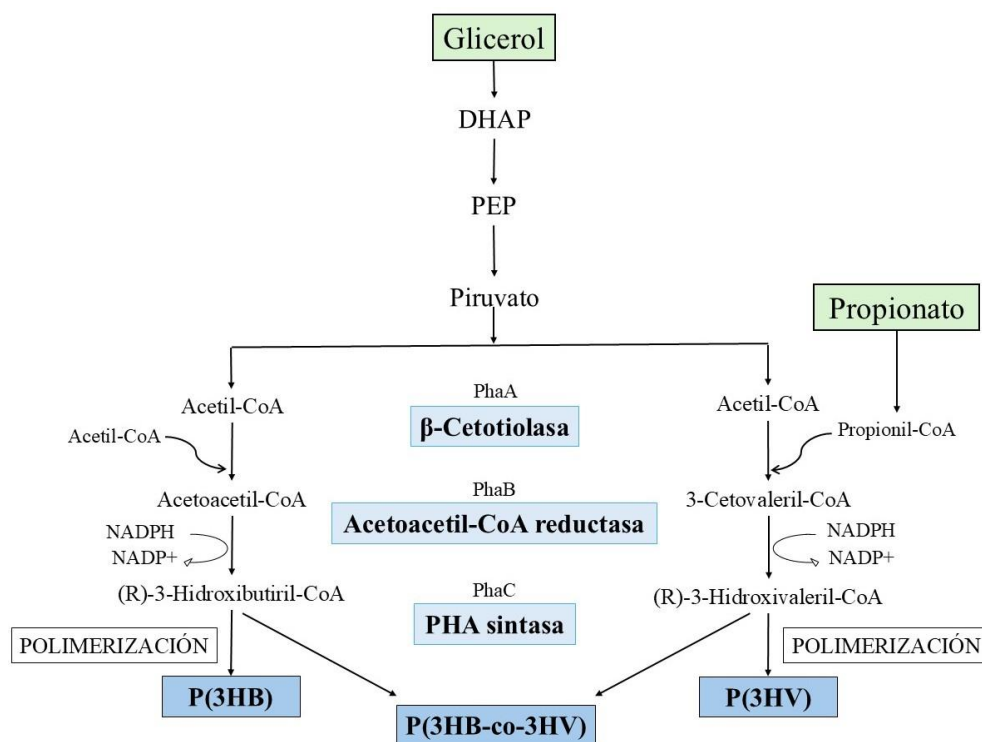


Figura 5. Ruta de síntesis para PHBV utilizando glicerol como fuente de carbono y propionato como co-sustrato: DHAP (fosfato de dihidroxiacetona), PEP (fosfoenolpiruvato), CoA (coenzima A), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, oxidada), P(3HB) (Polihidroxiacetylato), P(3HV) (polihidroxiacetylato), P(3HB-co-3HV) (polihidroxiacetylato-co-valerato o PHBV) modificado de Álvarez da Silva (2016).

La síntesis de PHA's es bloqueada cuando existen condiciones ricas en nutrientes para el microorganismo debido a que la CoA presente en el ciclo de Krebs se produce en gran cantidad inhibiendo la enzima PhaA encargada de iniciar la síntesis del biopolímero. Como resultado, el acetyl-CoA proveniente del piruvato se introduce en el ciclo de Krebs para el crecimiento celular y la producción de energía. Mientras que, en condiciones de limitación de nitrógeno y fósforo, así como en presencia de un exceso de carbono, los niveles de CoA no son inhibitorios, permitiendo la canalización de la acetyl-CoA en la síntesis de PHA's. Esta estrategia aumenta la acumulación de PHA's intracelular en los microorganismos (Deshmukh et al., 2020).

2.4.2 Propiedades de PHBV

El PHBV al igual que su homopolímero el PHB, son biopolímeros con propiedades similares a plásticos convencionales como el PE y PP. Sin embargo, cuentan con la característica única de ser biodegradables; degradándose en agua y dióxido de carbono en condiciones ambientales por una gran variedad de bacterias. Además, son biocompatibles, lo que les permite ser utilizados como biomateriales y no producir una respuesta perjudicial al tejido vivo, es decir, no presenta toxicidad. El PHBV ofrece resistencia a los rayos UV, exhibe permeabilidad al oxígeno, es insoluble en agua y relativamente resistente a la degradación hidrolítica, ventaja sobre la mayoría de los plásticos biodegradables que pueden ser sensibles a la humedad o solubles en agua. Sin embargo, el PHBV, al igual que los polímeros pertenecientes a la familia PHA's, son poco resistentes a los ácidos y bases, además de ser solubles en cloroformo (Sathya et al., 2018).

A pesar de que el PHB se ha utilizado en diversas aplicaciones como productos de embalaje y materiales desechables pequeños, sus aplicaciones se ven limitadas debido a su alta cristalinidad, lo cual se refleja en sus propiedades térmicas y mecánicas. El PHB posee un módulo de elasticidad (Young) con valores aproximados de 3500 MPa y un porcentaje de elongación del 5 %, clasificándolo como material poco dúctil. Además de tener un punto de fusión alto y cercano a su punto de degradación, lo que crea una estrecha ventana para su procesamiento térmico. El PHBV presenta propiedades térmicas y mecánicas mejores que el PHB, teniendo un módulo de elasticidad de 900 MPa, una elongación del 15 % y resistencia a la tracción de 28 MPa cuando un 8 % mol de 3HV está presente en el biopolímero (Tab. 1). A medida que aumenta la cantidad de 3HV, la cristalinidad disminuye, otorgando mayores valores de elasticidad y elongación, en consecuencia, presentando una menor rigidez (Kim et al., 2020).

Tabla 1. Propiedades térmicas y mecánicas de plásticos convencionales y PHBV a distintas fracciones mol de 3HV.

Polímero	Punto de fusión (°C)	Transición vítrea (°C)	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación (%)	Referencia
PHB	180	4	3500	40	5	(Strong et al., 2016)
PHBV (8% mol 3HV)	N/D	N/D	900	28	15	(MatWeb, 2023)
PHBV (12% mol 3HV)	N/D	N/D	500	23	35	(MatWeb, 2023)
PHBV (20% mol 3HV)	145	-1	800	20	50	(Strong et al., 2016)
Polipropileno homopolímero	176	-10	1310	33.1	400	(MatWeb, 2023; Strong et al., 2016)
Polietileno de baja densidad	130	-30	200	10	620	(Strong et al., 2016)

N/D = No disponible

Las características mencionadas del PHBV han captado el interés de la academia e industria para investigar su uso en la creación de productos para sectores como la agricultura, acuicultura, cosméticos, envasado de alimentos y mayormente en sectores para aplicaciones biomédicas, ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos, cicatrización de heridas y tejidos en la piel (Kaniuk & Stachewicz, 2021; Saravanan et al., 2022).

2.4.3 Aplicaciones de PHBV

El PHBV es un biopolímero adecuado en una amplia gama de aplicaciones biomédicas; se ha utilizado en sectores como ingeniería de tejido óseo, reconstrucción de tejido cartilaginoso, cicatrización de heridas, sistemas de administración de fármacos, regeneración de tejido nervioso e ingeniería cardiovascular (Kaniuk & Stachewicz, 2021). El uso de PHBV en aplicaciones médicas está aprobado por la administración de alimentos y medicamentos de los E.U.A (Dalgic et al., 2022).

Grillo et al. (2011), desarrollaron un sistema modificado para la liberación de un herbicida a partir de PHA's con el propósito de reducir el impacto causado por el herbicida ametrina en el medio ambiente y en las personas durante su manipulación. El herbicida se incorporó en micropartículas compuestas de dos polímeros, PHB y PHBV obteniendo eficiencias de encapsulación de ~40 %. El perfil de liberación de ametrina se modificó por encapsulación en las micropartículas, lo que proporcionó una liberación más lenta y sostenida en comparación con la cinética de liberación del herbicida libre. Las micropartículas de PHBV, presentaban rugosidad y alta porosidad, características importantes para el mecanismo de liberación del herbicida. Este nuevo sistema basado en PHBV, no solo tuvo el potencial de reducir los efectos nocivos de la ametrina, sino también de proporcionar un sistema de manipulación más seguro.

La presencia continua de nitratos en las aguas representa un riesgo a la salud pública debido a al incremento en los riesgos de eutrofización del agua y floraciones de algas tóxicas, lo que conlleva a una contaminación del agua potable. El uso de PHBV en combinación con materiales vegetales utilizados como fuente de carbono ha tenido resultados favorables para la eliminación de nitratos presente en el agua. Yang et al. (2020), informaron que el uso de PHBV y aserrín, presentaban una combinación factible para el tratamiento avanzado de efluentes en las plantas de tratamiento de aguas, mediante sistemas de desnitrificación en fase sólida. La mezcla de PHBV con aserrín podría aumentar la rugosidad de la superficie en sitios para adherencias microbianas y compuestos portadores.

Por otra parte, Xia et al. (2022) probaron una mezcla biodegradable formada por una mezcla de ácido poliacético, cáscaras de arroz y PHBV. Esta combinación se utilizó como soporte para la formación de biopelículas bacterianas, mediante biorreactores anaeróbicos utilizando aguas residuales sintéticas. El compuesto formado actuó no sólo como un soporte para la proliferación celular, sino también como una fuente de carbono esencial para realizar el proceso de desnitrificación por parte de las bacterias, siendo una alternativa biológica prometedora para la eliminación de nitratos.

Singh et al. (2022) investigaron el uso de nanoesferas de PHBV cargadas con paclitaxel (PTX), el cual es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer. Las nanoesferas de PHBV se funcionalizaron con polietilenglicol (PEG) y fueron recubiertas con ácido fólico (AF), como moléculas de transporte del fármaco PTX cargado con nanopartículas de óxido de cobre (CuO). Los estudios *in vitro* demostraron que el nanosistema CuO-PTX/PHBV-PEG-AF presenta una tasa de liberación controlada de PTX en entornos de pH ácido y básico, además de exhibir una mayor citotoxicidad respecto al suministró de PTX libre, reflejando el potencial de ser explorados como un vehículo de administración de fármacos *in vivo*. Los sistemas de liberación de fármacos es un sector de gran importancia en el estudio de la medicina, buscando continuamente estrategias que puedan brindar mejores resultados a diversos problemas de salud en el mundo. Además de los ejemplos citados, se han realizado diversos estudios con el fin de investigar los posibles usos del PHBV en distintos sectores (Tab. 2).

Tabla 2. Propiedades térmicas, mecánicas y aplicaciones de PHBV a distintas fracciones mol de 3HV.

Propiedades								Aplicaciones	
Tipo de PHA's	%mol 3HV	Punto de fusión (°C)	Transición vítrea (°C)	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación (%)	Combinación	Producto	Ventajas
PHBV	3	165	8	500 – 1100	N/A	1.1 – 1.7	PHBV	Películas	PHBV/PBAT mostraron propiedades funcionales mejoradas en comparación con las películas sopladas a partir de mezclas (Cunha et al., 2016)
	3	127	N/D	900 – 1100	N/A	8 – 14	PHBV+PBAT		
	3	142	N/D	600 – 700	N/A	7.5 – 8.5	PHBV+PBseBT		
PHBV	5	N/D	N/D	2730 ± 100	39.2 ± 1.8	2.29 ± 0.29	PHBV	Películas	Degradación significativa en propiedades de tracción máxima con el aumento de fibra, incremento en tasa de transmisión de vapor de agua ampliando su aplicabilidad como materiales de envasado de alimentos en productos frescos (Berthet et al., 2015)
	5	N/D	N/D	2770 ± 130	27.6 ± 2.0	1.41 ± 0.10	PHBV/fibras de paja de trigo (10%)		
	5	N/D	N/D	3030 ± 130	19.6 ± 1.0	1.03 ± 0.10	PHBV/fibras de paja de trigo (20%)		
	5	N/D	N/D	2750 ± 140	19.6 ± 1.0	0.89 ± 0.09	PHBV/fibras de paja de trigo (30%)		
PHBV	21	148.5	N/D	1268	70	6.43	PHBV /Nanocelulosa bacteriana/glicerol	Películas	El plastificado (con glicerol o polietilenglicol) de nanocelulosa bacteriana mejoró significativamente el rendimiento mecánico y el recubrimiento de PHBV redujo la afinidad por el agua (vapor y estado líquido) en BNC. (AG Soares da Silva et al., 2023)
	21	148.5	N/D	1578	66.4	4.66	PHBV /Nanocelulosa bacteriana /Polietilenglicol		
PHBV	2 – 3	120.6	–3.3	N/D	N/D	1.18 ± 0.15	PHBV	Láminas moldeadas por compresión	Efecto bacteriostático, desarrollo de compuestos verdes en envasado de alimentos activos para brindar protección y extensión de la vida útil (Torres-Giner et al., 2018)
		120.2	–2.4	N/D	N/D	1.06 ± 0.10	PHBV/ (1%) fibra de coco + aceite esencial de orégano		
		121	–2.2	N/D	N/D	0.88 ± 0.12	PHBV/ (5%) fibra de coco + aceite esencial de orégano		
		119.8	–1.8	N/D	N/D	0.67 ± 0.09	PHBV/ (10%) fibra de coco + aceite esencial de orégano		
PHBV	N/D	N/D	N/D	94.6 ± 0.6	N/D	N/D	N/D	Esteras de nanofibras	Mejor capacidad de cicatrización de heridas, buena biocompatibilidad y propiedades antibacterianas favorables. (Ye et al., 2020)
	N/D	N/D	N/D	43.4 ± 1.9	3.2 ± 0.1	N/D	QAPM/AgNP		
PHBV	1.20	N/D	N/D	282 ± 42	N/D	N/D	PHBV/PLA	Fibras	Alta biocompatibilidad, degradabilidad relativamente alta y resistencia de sutura después 36 semanas de implantación. (He et al., 2014)
PHBV	N/D	N/D	N/D	N/D	0.16 ± 0.03	3.05 ± 1.07	PHBV	Fibras para parches humectantes en piel	Propiedades mecánicas mejoradas y una mayor hidratación de la piel (Kaniuk et al., 2022)
	N/D	156.9	N/D	N/D	0.51 ± 0.09	015.03 ± 2.62	PHBV /5% aceite de onagra		

	N/D	144.8	N/D	N/D	1.07 ± 0.15	22.68 ± 4.59	PHBV /10% aceite de onagra		
PHBV	9	N/D	N/D	6	4.2	N/D	N/D	Nanofibras	Capacidad antimicrobiana mejorada, no presentan efectos tóxicos contra los queratinocitos (Kamal et al., 2022)
	9	N/D	N/D	8.4	6.4	N/D	PHBV + cefalexina 0.5%		
	9	N/D	N/D	11.75	7.8	N/D	PHBV + cefalexina 1.0%		
PHBV	N/D	N/D	N/D	156.08 ± 4.73	2.94 ± 0.14	N/D	PHBV	Nanofibras electrohiladas	Excelente biocompatibilidad tisular y capacidad sustancial de regeneración ósea (Zhong et al., 2019)
	N/D	N/D	N/D	140.09 ± 4.91	2.30 ± 0.36	N/D	PHBV /0.1% adenosina		
	N/D	N/D	N/D	134.04 ± 2.52	2.26 ± 0.10	N/D	PHBV /0.3% adenosina		
	N/D	N/D		33.36 ± 2.99	1.10 ± 0.08	N/D	PHBV /0.5% adenosina		
PHBV	N/D	188.6	N/D	7.8 1 ± 2.34	3.68 ± 0.58	71 ± 11	PHBV	Membranas como apósitos de heridas	Capacidad de promover proliferación celular, vascularización, formación de vasos sanguíneos promoviendo la curación de heridas diabéticas (Augustine et al., 2020)
	N/D	188.5	N/D	11.18 ± 3.14	4.38 ± 0.36	65 ± 8	PHBV + 1% Nanopartículas de CeO2		
	N/D	189.4	N/D	4.54 ± 2.32	2.53 ± 0.84	43 ± 12	PHBV + 4% Nanopartículas de CeO2		
PHBV	10	156.6	-20.7	N/D	N/D	N/D	PHBV utilizado para cultivar fibroblastos dérmicos	Mallas nanofibrosas como apósitos	Regeneración de tejidos delgados, mitigación en la formación excesiva de cicatrices al regular la formación de miofibroblastos. (Kim et al., 2020)
	30	106.8	-1.7	N/D	N/D	117.80			
	60	78.6 – 153.2	-5.9	N/D	N/D	194			
PHBV	N/D	N/D	N/D	1.6 ± 0.35	N/D	67.38 ± 5.1	PHBV	Andamios nanofibrosos	Aumentó la biocompatibilidad del andamio, lo que a su vez aumentó la cantidad de células adheridas al andamio en las primeras etapas y luego aumentó la tasa de crecimiento y proliferación de las células madre (Tahmasebi et al., 2020)
	N/D	N/D	N/D	1.2 ± 0.45	N/D	77.28 ± 2.89	PHBV / Gel de aloe vera		
PHBV	8	N/D	N/D	8.60	3.05	121.70	PHBV PCL/fCEV/fCFB/fDCE	Injertos vasculares	Mayor permeabilidad primaria, promovió la regeneración del tejido vascular, se necesita reforzar por problemas de aneurismas (Antonova et al., 2021)
	8	N/D	N/D	49.95	3.94	109.17	PHBV PCL/fCEV/fCFB/fDCE/HEP/Ilo		

Abreviaturas: Poli (butil adipato-co-tereftalato) (PBAT), Mater-Bi ® PTCS, formulación patentada por Novamont (PbseBT), queratina de alto peso molecular (QAPM), nanopartículas de plata (AgNP), ácido poliláctico (European-bioplastics), óxido de cerio (CeO2), policaprolactona (PCL), factor de crecimiento endotelial vascular (fCEV), factor de crecimiento de fibroblastos básico (fCFB), factor 1α derivado de células estromales (fDCE), heparina (HEP), iloprost (Ilo)

N/D = No disponible

2.5 Sustrato y co-sustratos

Entre los carbohidratos, la glucosa se considera como una de las fuentes de energía más importantes para la mayoría de los microorganismos, además de ser más fácil de

asimilar. Sin embargo, puede no ser rentable debido a que tiene un precio elevado en comparación con otros sustratos carbonados (ejemplo; xilosa, sacarosa, glicerol), lo cual enfatiza la búsqueda de sustratos económicamente más accesibles (Koller et al., 2010).

El tipo de sustrato y co-sustratos a utilizar son un factor clave para la producción de PHBV, debido a que no todos los microorganismos pueden asimilar las mismas fuentes de carbono, lo cual tiene un impacto en la tasa de crecimiento y la producción del metabolito. Por lo tanto, suplementar el medio con precursores que promuevan la síntesis del monómero 3HV, la presencia de una fuente de carbono asimilable por el microorganismo, así como la limitación de la fuente de nitrógeno (relación carbono-nitrógeno, C/N), son principios clave que afectan la síntesis del biopolímero (Berezina, 2012; Liu et al., 2019).

2.5.1 Glicerol

El glicerol o glicerina es un polialcohol compuesto por 3 átomos de carbono y tres grupos hidroxilo ($-OH$), presente en todas las grasas vegetales y animales en forma de ésteres de ácidos grasos también denominados triglicéridos. Debido a su amplia presencia en la naturaleza, muchos microorganismos pueden utilizar naturalmente el glicerol como única fuente de carbono y energía, pudiendo sustituir en algunos procesos de fermentación industrial a los carbohidratos tradicionales, como la sacarosa, la glucosa y el almidón. El glicerol se puede obtener a partir de la hidrólisis de los triglicéridos derivados de los desechos de alimentos y aceites, además representa el principal subproducto en la industria del biodiesel con concentraciones que oscilan entre el 70-90%, lo que lo convierte en un sustrato sumamente atractivo como fuente de carbono para producir compuestos bioquímicos valiosos, su naturaleza de poliol le da un equivalente reductor más alto que los azúcares comunes como la glucosa o la xilosa. Por lo tanto, el uso de glicerol como subproducto proveniente de una industria, es un claro ejemplo de un enfoque de economía circular para crear procesos más ecológicos (Ardi et al., 2015; Christoph et al., 2006; Da Silva et al., 2009; Intasian et al., 2021).

2.5.2 Co-sustratos

Los co-sustratos (Tab. 3) son precursores que se añaden como fuentes de carbono alternativas o complementarias en combinación con el sustrato principal. Los co-sustratos promueven la síntesis de unidades monoméricas específicas por parte de las bacterias cuando existen la presencia de un crecimiento desequilibrado o la limitación de algún nutriente esencial, el ácido propiónico (AP), ácido valérico (AV), ácido levulínico (AL) y en menor medida el propanol, son algunos de los precursores más estudiados para la formación del copolímero PHBV, esto debido, a su capacidad de promover la síntesis del monómero 3HV (Policastro et al., 2021).

El AP, es un ácido carboxílico de tres carbonos miembro de la familia de los ácidos grasos volátiles (AGVs). En general, el AP es sintetizado a partir de procesos petroquímicos, u obtenido orgánicamente a partir de la fermentación de pulpa de madera. El AP es utilizado en diferentes industrias, por ejemplo, en la industria de alimentos se utiliza como conservador y/o potenciador de sabor en productos lácteos y de panificación; en la industria cosmética se utiliza como base para mejorar la consistencia y aumentar la vida útil de perfumes; también se utiliza en la fabricación de plásticos derivados de la celulosa (Gonzalez-Garcia et al., 2017; MacFabe et al., 2011).

El AV, también llamado ácido pentanoico, es un ácido carboxílico de alquilo de cadena lineal perteneciente al grupo de los AGVS. Es un compuesto comúnmente extraído de la planta *Valeriana wallichii*, además de ser producido por la microbiota intestinal como subproducto de la fermentación de la fibra dietética. El AV se considera un ejemplo de compuesto de plataforma derivado de lignocelulosa renovable, siendo un intermediario en la conversión de lignocelulosa a ésteres de AV, que son una clase de biocombustibles celulósicos (Kamran et al., 2019; Onyszkiewicz et al., 2020).

El AL, también conocido como ácido 4-oxopentanoico, ácido β -acetilpropiónico y ácido γ -cetovalérico, es un compuesto orgánico soluble en agua, posee una cetona y un grupo carboxílico que le dan una amplia gama de funcionalidad y reactividad soluble en alcohol y éter. Es producido en su mayoría a través de la hidrólisis de biomasa celulósica (Rackemann

& Doherty, 2011).

Tabla 3. Producción de PHBV y %3HV por distintos microorganismos con adición y sin la adición de co-sustratos.

Microorganismo	Sustrato	Tipo de PHA's	% mol de 3HV	Rendimiento % Y _{P/X}	Método	Referencia
<i>Bacillus flexus</i>	Glucosa	PHBV	2	62	Biorreactor por lote	(Wagle et al., 2019)
<i>Yangia sp. ND199</i>	Glicerol	PHBV	5.4	45	M	(Van-Thuoc et al., 2015)
<i>Bacillus cereus</i> FA11	Glucosa	PHBV	15	48.43	M	(Masood et al., 2012)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Glicerol	PHBV	8	32	M	(Han et al., 2015)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Glicerol + valerato	PHBV	32	41	M	(Han et al., 2015)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glucosa + PrS	PHBV	30	78	Biorreactor	(Yu et al., 2005)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glucosa + AV	PHBV	62.7	33.7	Biorreactor por lote	(Shang et al., 2004)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glucosa + AL	PHBV	53.9	81.2	Biorreactor por lote	(Wang et al., 2013)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Fructosa + AP	PHBV	17	13.5	M	(Aramvash et al., 2016)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Fructosa + propanol	PHBV	21	17.25	M	(Aramvash et al., 2016)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Fructosa + propanol+ extracto de carne	PHBV	44.5	16	M	(Aramvash et al., 2016)
<i>Caldimonas taiwanensis</i>	Glucanato + AV	PHBV	51	51	M	(Sheu et al., 2009)
<i>Burkholderia sacchari</i> IPT 189 (modificado genéticamente)	Sacarosa + AP	PHBV	6.5 – 40	N/D	Biorreactor por lote	(Rocha et al., 2008)
<i>Burkholderia sp.</i>	Glucosa + AP	PHBV	68.3	28	M	(Silva et al., 2000)
<i>Burkholderia sacchari</i>	Xilosa + AL	PHBV	95	31	M	(Ashby et al., 2018)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glicerol crudo + AP	PHBV	11.8	52	M	(Kachrimanidou et al., 2014)

M = Matraz Erlenmeyer; N/D = No disponible

Los co-sustratos en concentraciones superiores a las tolerables por cada microorganismo pueden inhibir el crecimiento celular, por lo tanto, mantener un control en la concentración del co-sustrato que se añada al medio de cultivo o dosificar las concentraciones a lo largo de la cinética, son estrategias empleadas para incrementar la fracción 3HV sin que el rendimiento total del producto se vea afectado (Zhu et al., 2012).

2.6 Microorganismos productores de PHBV

Los PHA's se acumulan intracelularmente en una amplia gama de microorganismos, incluidas bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, cianobacterias y arqueas; en forma de inclusiones citoplasmáticas intracelulares para el almacenamiento de energía (Rajgadia & Debnath, 2023); muchos de estos microorganismos pueden producir PHBV si su entorno tiene las condiciones adecuadas.

Cupriavidus necator, anteriormente conocida como *Ralstonia eutropha*, es la β -proteobacteria Gram negativa más estudiada para la biosíntesis de PHA's considerada como la bacteria modelo debido a que tiene la capacidad de almacenar el 90 % de su peso seco en producto (rendimiento producto/biomasa) ($Y_{P/X}$) lo que la convierte en una bacteria viable en la producción de PHA's a gran escala. A pesar de eso *C. necator* es incapaz de producir PHBV sin la presencia de precursores que promuevan la síntesis del monómero 3HV. Para este caso, se han utilizado co-sustratos como AP, AV y AL para promover la formación del co-polímero PHBV obteniendo rendimientos reportados de 78, 81 y 34 % $Y_{P/X}$, con valores de 30, 54 y 63 % 3HV respectivamente (Shang et al., 2004; Wang et al., 2013; Yu et al., 2005).

Una alternativa sumamente prometedora en la producción de PHA's bacterianos, es la modificación genética de microorganismos, dirigida a introducir genes no nativos, mejorando la capacidad de producción de biopolímeros bacterianos. Zhang et al. (2015), modificaron genéticamente un mutante asimilador de glucosa, derivado de *R. eutropha* H16 para la producción de PHBV. Los resultados mostraron que la cepa modificada denominada

Rem-8 podía producir PHBV sin la adición de AP obteniendo valores de $9.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un 29 % mol de 3HV cuando la fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer, por otro lado, cuando se evaluó la cepa Rem-8 en un biorreactor de 7.5 L alcanzó una producción de $90.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con un 26 % mol de 3HV y un rendimiento $Y_{P/X}$ del 68.6 %, indicando resultados prometedores con un alto potencial de comercialización en el futuro.

Los halófilos, debido a sus características halófilas (crecen en altas concentraciones de sal) poseen varias ventajas; entre ellas destaca su capacidad de cultivo en condiciones de pH alto y concentración de NaCl elevada, lo que hace posibles la realización de procesos sin la necesidad de esterilización del biorreactor; además de ser microorganismos robustos y resistentes a la contaminación. Zhao et al. (2015), utilizaron la bacteria halófila *Halogranum amylolyticum* TNN58 para la producción de biopolímeros intracelulares; ellos reportaron que cuando se utilizó glicerol como única fuente de carbono se obtuvieron valores máximos de $Y_{P/X} = 7.2 \%$ de PHBV y una fracción molar de 19.6 % mol de 3HV, resultados menores a los obtenidos con glucosa ($Y_{P/X} = 26.1 \%$, 20.1 % mol 3HV). Además, reportaron que, al utilizar un proceso por lotes alimentado con glucosa, la producción de PHBV y el peso seco de las células aumentaron aproximadamente ocho y cuatro veces, respectivamente, en comparación con los resultados del proceso por lotes en matraces de agitación.

Hermann-Krauss et al. (2013), investigaron la producción de poli (-3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato) (PHBHVHB) y PHBV utilizando la bacteria halófila *Haloferax mediterranei* encontrando que dicho microorganismo tiene la capacidad de acumular hasta un 10 % mol de 3HV sin la necesidad de utilizar precursores en un medio de cultivo con glicerol puro o glicerol crudo como única fuente de carbono. No obstante, los rendimientos obtenidos en % mol de 3HV suelen ser más bajos que los obtenidos a través del uso de co-sustratos. El estudio que reportó el valor máximo para la producción de PHBV (Policastro et al., 2021). a partir de fuentes de carbono sin la adición de precursores fue realizado por Liu et al. (2019), en donde se obtuvo una fracción de 3HV de 46.5 % en el polímero sintetizado por *Rhodospirillum rubrum*.

En presencia de glicerol como única fuente de carbono *Burkholderia cepacia* solamente tiene la capacidad de producir PHB. Cuando se adiciona AL como co-sustrato, *B. cepacia* convierte el glicerol y el AL en precursores de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato, los cuales al polimerizarse forman el co-polímero PHBV. La relación de 3HV en el copolímero varía con la cantidad de AL empleado, obteniendo valores de 5.6–32.6 % mol de 3HV en presencia del co-sustrato (Zhu et al., 2012).

Priya et al. (2022) evaluaron el uso de residuos alimentarios (carne, arroz, verduras y fideos) como materia prima sostenible adicionando AL como precursor para la producción de PHBV por *H. mediterranei*. Se utilizaron biorreactores de lote alimentado con AL adicionado en pulsos, encontrando que la concentración óptima de 5 g·L⁻¹ de AL produce el rendimiento máximo de PHBV (56.70 %) con un contenido de 3HV de 18.55 % mol.

2.7 *Burkholderia thailandensis*

B. thailandensis presenta células Gram negativas, poseen un mechón polar de dos a cuatro flagelos, temperatura óptima de crecimiento de 25 a 42 °C. Por lo general, se distingue de *B. pseudomallei* por su capacidad para asimilar arabinosa. Los aislados de *B. thailandensis* son resistentes a los aminoglucósidos, pero sensibles a la tetraciclina, ceftazidima y trimetoprima. La cepa tipo *Burkholderia thailandensis* E264 (BtE264), se aisló de una muestra de suelo de un campo de arroz en Tailandia central. La cepa fue depositada en la American Type Culture Collection con clave ATCC 700388 (Brett et al., 1998). Las bacterias del género *Burkholderia* se encuentran con frecuencia en ambientes naturales, ocupando diversos nichos como en suelo, agua (incluida agua de mar), rizosfera de las plantas y los productos agrícolas.

A partir de un análisis en la curva de crecimiento, en la que se utilizó glicerol como fuente de carbono, se observó que se trata de una bacteria con crecimiento bastante lento, y que puede permanecer en la fase estacionaria durante períodos prolongados. Dicho comportamiento se atribuye a que muchas bacterias del suelo se han adaptado para sobrevivir

a través de períodos prolongados de estrés celular y falta de nutrientes. Las bacterias del género *Burkholderia* suelen ser microorganismos robustos, demostrando ser extremadamente tolerantes, acercándose al 100 % de viabilidad en condiciones extremas de inanición (Funston et al., 2016; Kumar et al., 2023).

Kourmentza et al. (2018) estudiaron la producción de PHA's por BtE264; ellos encontraron que esta cepa produce el homopolímero de PHB utilizando aceite de cocina como sustrato. Después de entrar en la fase estacionaria, la biomasa celular y la producción de PHA's alcanzaron $12.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 60 % del peso seco celular, respectivamente. BtE264 acumuló PHA's desde el inicio de la fermentación. Estudios realizados por Hernández-Alonso (2021), en los que se evaluaron diferentes fuentes de carbono para la producción de PHA's por BtE264, se encontró que el mayor crecimiento bacteriano y producción de PHA's se obtuvo cuando al utilizar glicerol como fuente de carbono. En las condiciones estudiadas, la producción de PHA's alcanzó hasta un 46 % del peso seco celular. El análisis cinético del crecimiento y la formación de producto indicó que la producción de PHA's por BtE264 a partir del glicerol no estuvo asociada al crecimiento.

2.8 PHBV frente a plásticos convencionales

Desde la creación del primer plástico sintético llamado “baquelita” en 1907. Los plásticos convencionales han tenido un enorme impacto a nivel global, donde, virtudes como; bajo costo de producción, ligereza, durabilidad, versatilidad, etc., se convirtieron en razones para su producción a gran escala, alcanzando una expansión acelerada en la vida moderna iniciada en la década de 1950 (Chen & Yan, 2020; Pathak et al., 2014). Dichos factores acompañados de un desconocimiento sobre los efectos negativos causados a los ecosistemas en esa época, propiciaron que en la actualidad se vean reflejados los efectos que involucran los plásticos sintéticos al entorno, destacando su baja o nula biodegradabilidad, así como su fragmentación en microplásticos y nanoplásticos (Markowicz & Szymańska-Pulikowska, 2019).

Los fragmentos segmentados causados por la degradación de los plásticos convencionales a partículas de menor tamaño representan un serio problema a los sistemas biológicos con los que interactúan, pudiendo alterar los sistemas metabólicos de las plantas (inhibiendo o reduciendo su crecimiento, dificultando la fotosíntesis) o afectar los sistemas endocrinos en animales cuando existe el riesgo de ingesta en el organismo. Esto los sitúa como potencial amenaza para el crecimiento de organismos acuáticos o animales que los ingieren, pudiendo llegar a representar un peligro para la salud humana. La degradación de un solo fragmento de microplásticos puede generar de millones a miles de millones de partículas de tamaño nanométrico (Bosker et al., 2019; Gao et al., 2019; Huan et al., 2011; Liu et al., 2022; Nguyen et al., 2019; Wu et al., 2020).

Uno de los grandes puntos a favor del PHBV, y que los separa de los plásticos convencionales, es la capacidad de biodegradarse. Cheng et al. (2022) investigaron la biodegradación de polímeros en entorno marino, destacando tres polímeros convencionales; (PE, PMMA y PCL) y dos polímeros de origen biológico (PLA y PHBV). Después de 2 meses de incubación el PHBV destacó como el mejor polímero biodegradable, teniendo una tasa de biodegradación del 4.1 % con un 17 % en pérdida de peso. Resaltando ser un material resistente a la hidrólisis, y susceptible a la degradación microbiana.

Si bien el PHBV es un material relativamente nuevo, comparado con los plásticos sintéticos, es adecuado para una amplia gama de aplicaciones biomédicas (Tab. 2). Exhibe excelente biocompatibilidad, además su degradación en el organismo no representa un efecto tóxico. El PHBV, al degradarse, libera ácido D-3-hidroxibutírico el cual es un compuesto presente en la sangre humana, que al tener un origen biológico, ofrece ventajas al entorno respecto al uso de polímeros sintéticos (Wang et al., 2023).

La búsqueda de bacterias productoras de PHBV, así como sustratos accesibles, y procesos eficientes, denota un reto para la producción de polímeros bacterianos; sin embargo, dicho reto demuestra una alternativa sostenible a los plásticos convencionales (Tab. 4), siendo el PHBV un biopolímero de creciente importancia debido a sus características biocompatibles y biodegradables. El PHBV no sólo ofrece una posible solución al problema

de contaminación que ocasionan los plásticos sintéticos, sino además también presenta importancia en sectores médicos, agrícolas o en manufactura de envases lo que lo convierte en un material clave en la transición de una economía circular y ecológica.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los PHBV*

Ventajas	Desventajas
○ Capacidad de biodegradación en entornos ambientales. ○ Se pueden utilizar para la creación de biomateriales y no producir una respuesta perjudicial al tejido vivo. ○ No representan una reacción tóxica al organismo. ○ Propiedades mecánicas comparables con algunos plásticos convencionales. ○ Dependiendo de su fracción de 3HV puede modificarse sus propiedades térmicas y mecánicas. ○ Se pueden utilizar como productos de administración de fármacos y mezclar con medicamentos. ○ Se pueden mezclar con otros polímeros y modificar sus propiedades.	○ Alto costo de producción comparado con los plásticos convencionales. ○ Proceso de producción complejo. ○ Calidad no homogénea del producto. ○ Estimulan la biomasa microbiana teniendo el potencial de alterar el funcionamiento ecológico del suelo.

* Brown et al. (2023); Greenfield et al. (2022); Kamal et al. (2022); Kim et al. (2020); Policastro et al. (2021).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar efecto de la adición de co-sustratos en la producción de Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) por *Burkholderia thailandensis* E264.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los ácidos levulínico, valérico y el propionato de sodio como co-sustratos en la producción de PHBV por *Burkholderia thailandensis* E264 (BtE264).
- Caracterizar las propiedades térmicas y mecánicas del PHBV.
- Proponer aplicaciones potenciales en base a las propiedades térmicas y mecánicas presentes en el PHBV.

4. Hipótesis

La adición de co-sustratos induce a la producción de PHBV intracelular en *Burkholderia thailandensis* E264 mejorando sus propiedades térmicas y mecánicas con respecto a su homopolímero PHB.

5. Metodología

5.1 Obtención de cepa y preparación de inóculo.

La cepa de BtE264 (ATCC 700388) fue proporcionada por el Dr. G. Saucedo-Castañeda de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La cepa se activó en caldo nutritivo (CN) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): peptona, (5); extracto de carne, (3); agar, (15); y se incubó durante 24 h a 30 °C con agitación constante (150 rpm). El inóculo se preparó transfiriendo 5 mL de la cepa activa a un matraz Erlenmeyer de 250 mL (con 50 mL de CN) y se incubó bajo las mismas condiciones.

5.2 Medio base de producción para la síntesis de PHA's

Se usó el medio reportado por Aljuraifani et al. (2019) para la producción de PHA's con algunas modificaciones. El medio base de producción (MBP) está compuesto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): urea (2.50), KH_2PO_4 (1.50), Na_2HPO_4 (3.50), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.20), glicerol (20) y 1 mL de solución de elementos traza (1 mM de $\text{FeSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2), el pH se ajustó a 7-7.2 con NaOH (2 N). Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, y 5 % (v/v) de inóculo; se incubaron durante 7 días a 30 °C, y agitación orbital a 150 rpm. Se tomaron muestras (1.8 mL) cada 24 h por 7 días y se determinó el crecimiento, consumo de sustrato y producción de PHA's.

5.3 Efecto de la adición de co-sustratos en la producción de PHBV

Se probaron tres co-sustratos diferentes: PrS ($6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), AV ($4\text{ m}\cdot\text{L}^{-1}$) y AL ($4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en combinación con el MBP. Los diferentes co-sustratos se probaron de manera individual. Además; se preparó un control en el que sólo se utilizó el glicerol como única fuente de carbono, es decir, no se adicionó co-sustrato. Las concentraciones de co-sustratos utilizadas se establecieron de acuerdo con lo reportado por Ashby et al. (2018) y Mendonça et al. (2014), realizando modificaciones a una cantidad de moles de carbono similar en los 3 medios. Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL

con deflectores; se utilizaron 50 mL de medio de cultivo, y 5 % (v/v) de inóculo; se incubaron durante 7 días a 30 °C a 150 rpm. Se tomaron muestras (1.8 mL) cada 24 h; y se determinó el crecimiento, consumo de sustrato, y producción de PHBV. Se realizó un diseño experimental completamente al azar de 4 niveles (PrS, AV, AL y GL), la producción del biopolímero PHBV en % mol de 3HV fue la variable de respuesta.

5.4 Medición del crecimiento bacteriano

La biomasa se midió gravimétricamente; las células se recuperaron por centrifugación. Se colocaron 1.8 mL del cultivo microbiano en microtubos previamente pesados. Se centrifugó a $8000 \times g$ por 20 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo. La muestra se mantuvo en congelación hasta el momento del análisis de determinación de consumo de sustrato por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés). Las células se lavaron (2X) con agua destilada, posteriormente se deshidrataron en estufa a 60 °C hasta peso constante (12 h), se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron en balanza analítica. La biomasa se determinó por diferencia de peso (Aljuraifani et al., 2019), posteriormente se liofilizó para proceder a la cuantificación de PHBV.

5.5 Análisis de consumo de sustratos

La fase líquida (sobrenadante) obtenida de la etapa anterior (ver sec. 5.4) se descongeló y se filtró (nylon 0.2 μm) previo a su análisis por los métodos cromatográficos de Ashby et al. (2018) y Tao et al. (2011) con algunas modificaciones. El análisis de la concentración de glicerol y co-sustratos (AL, AV y PS) utilizados se realizó en un equipo de HPLC Waters™ 2695, (Milford, MA, USA) equipado con un detector de índice de refracción (RID) (Modelo 2414), un detector de matriz de fotodiodos (PDA) (Modelo 2996) y un horno de columna. La separación se realizó en una columna IC-pak ion-exclusión (300 mm x 7.8 mm x 7 μm). Se utilizó un método isocrático con H_2SO_4 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min a 37 °C usando 20 μL volumen de inyección. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo. Para la cuantificación de glicerol se utilizó el detector RID y para el análisis de los co-sustratos el detector PDA, PrS y AV (210 nm) y AL

(260 nm). Para ello, se realizaron curvas de calibración de los estándares PrS, AV, AL y glicerol (Anexo 3).

5.6 Cuantificación de PHBV

La preparación de las muestras para el análisis por cromatografía de gases siguió el método descrito por Juengert et al. (2018) con algunas modificaciones. Se pesaron muestras liofilizadas de 2 – 10 mg en tubos de ensaye, posteriormente se añadió 1 mL de cloroformo adicionado con 1 mL de metanol acidificado con 15 % v/v de H₂SO₄, y se incubó en un termorreactor Thermo Scientific™ Orion™ AQUAfast COD165 (Waltham, MA, USA) a 100 °C durante 150 min.

Las muestras se dejaron enfriar en baño de hielo durante 5 min, después se adicionó 1 mL de agua destilada, se agitó por 30 s (vortex) y se dejó reposar por 1 min. La fase orgánica inferior se recolectó, se filtró (nylon, 0.2 µm) y se transfirió a viales con insertos. Los ésteres metílicos de 3HB y 3HV se determinaron en un cromatógrafo de gases Agilent-Technologies 7820A (Santa Clara, CA, USA) equipado con un automuestreador G-4513A, una columna DB-Heavywax (60 m × 0.250 mm × 0.25 µm) y un detector de ionización de flama. Se inyectaron 2 µL de muestra, utilizando nitrógeno como gas portador a un caudal de 1.5 mL/min. La temperatura del horno se fijó inicialmente a 60 °C y luego se incrementó a razón de 10 °C/min durante 7 min y 30 °C/min hasta alcanzar una temperatura máxima de 250 °C, y posteriormente se mantuvo constante durante 3 min, la temperatura del inyector y del detector fueron de 250 °C (Cha et al., 2020; Zhang et al., 2015).

La cantidad total de PHBV se calculó sumando las cantidades detectadas de 3HB y 3HV. La fracción molar de 3HV (% en moles) se calculó como; Las concentraciones de 3HB y 3HV entre su masa molar (3HB = 104.1 g·mol⁻¹, 3HV = 118.3 g·mol⁻¹), y la relación entre 3HV y la suma de 3HB y 3HV. Se utilizó un PHBV-STD (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) compuesto de 8 % de 3HV y 92 % de 3HB para la calibración como estándar externo (Zhang et al., 2015).

5.7 Caracterización del PHBV producido

Se realizó una cinética a punto final con base en la mayor producción obtenida de PHB y PHBV para los medios seleccionados, manteniendo constantes los parámetros operativos (ver sec. 5.1, 5.2, 5.3). Se utilizó el volumen total del medio (50 mL) con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa y por consecuencia mayor cantidad de producto para su posterior caracterización, además se sometieron muestras de PHBV comercial bajo los mismos procedimientos.

5.7.1 Recuperación de PHBV

El PHBV se recuperó por la técnica de Aljuraifani et al. (2019) con algunas modificaciones. El sedimento celular obtenido de la determinación de la biomasa (ver sec. 5.4) se dispersó en una solución comercial de hipoclorito de sodio (Clorox[®]) equivalente al volumen total del medio y se incubó a 45 °C durante 2 horas. Se centrifugó nuevamente a $8,000 \times g$ durante 20 min, y el sedimento de PHA's se enjuagó una vez con agua destilada y dos veces con una mezcla de etanol y acetona (2:1). Después, el sedimento se disolvió en cloroformo y se centrifugó nuevamente a $8,000 \times g$ por 20 min. El producto resultante se vertió en una caja Petri y se dejó evaporar el solvente durante 12 h a temperatura ambiente.

5.7.2 Determinación de propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los polímeros resultantes se determinaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) y un analizador termogravimétrico (TGA). Los análisis por DSC se realizaron en un analizador térmico TA Instruments Model Q 200 (New Castle, DE, USA). El análisis se realizó desde -50 °C hasta 200°C a una velocidad $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, en bandejas de aluminio utilizando ≈ 10 mg de polímero como muestra. Se realizó un primer calentamiento para obtener los picos endotérmicos de fusión partiendo de -50 °C, hasta 200 °C a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ con el objetivo de eliminar el historial térmico de la muestra, después las muestras fueron enfriadas desde 200 °C hasta -50 °C, posteriormente se realizó una segunda corrida a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta alcanzar los 200 °C. La

temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m), entalpía de fusión (ΔH_m), temperatura de cristalización (T_c), entalpía de cristalización (ΔH_c) y % cristalización ($\%X_c$), se determinaron a partir del termograma del segundo ciclo de calentamiento (Ashby et al., 2018).

Se realizó un análisis TGA en un equipo TA Instruments Model Q 500 (New Castle, DE, USA), para evaluar la estabilidad térmica (temperatura de degradación (T_d), y residuo generado) de las muestras de PHB, PHBV y el estándar de PHBV. Se pesaron ≈ 17 mg de polímero para posteriormente calentar las muestras desde 25 °C hasta 400 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C·min⁻¹ en presencia de atmósfera de nitrógeno (Bhatt et al., 2008). Los resultados obtenidos se compararon con los valores obtenidos a partir del PHBV-STD.

5.7.3 Determinación de propiedades mecánicas-ensayo de tracción

5.7.3.1 Formación de películas de PHA's

Con el fin de analizar las propiedades mecánicas se formaron biopelículas según el método de Gao et al. (2006) con algunas modificaciones. Se disolvió 1 g del biopolímero en 100 mL de cloroformo en un tubo de ensaye, se agitó vigorosamente (vórtex) hasta tener una solución homogénea, misma que se vertió en placa de Petri de 20 cm de diámetro, se dejó evaporar el cloroformo (dentro de una campana de extracción) por 12 h en una superficie nivelada. La evaporación del disolvente dio lugar a la formación de películas (0.1 ± 0.02 mm de espesor) sobre las placas de Petri. Las películas se recortaron en láminas de 1 x 10 cm, las cuales se secaron al vacío por 6 h a 80 °C. Las películas se mantuvieron a 50 ± 10 % de humedad relativa durante 7 días antes de proceder con los ensayos de tracción.

5.7.3.2 Ensayo de tracción

Se realizó un ensayo de tracción basado en el método estándar de propiedades mecánicas de tracción para láminas de plástico delgadas (ASTM D882-10) en un analizador de textura Brookfield CT3 (Middleboro, MA, USA) operado con una carga de activación de 0.044 N y una velocidad de 0.5 mm·s⁻¹ (Díaz-Montes et al., 2021) a temperatura ambiente (≈ 25 °C). La resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y módulo de Young se

determinaron mediante el diagrama esfuerzo-deformación obtenidos del promedio tres muestras. Los resultados obtenidos se compararon con los valores obtenidos a partir del PHBV-STD.

5.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se presentan como promedio $\pm$ desviación estándar. El efecto del co-sustrato sobre la producción de PHBV se estudió siguiendo un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el software estadístico Minitab 20 (Minitab LLC, State College, PA), además de una prueba complementaria post-hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los valores obtenidos. Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis además de una prueba complementaria post-hoc de Dunn's cuando los datos no cumplían con los supuestos del ANOVA.

6. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos, iniciando con la curva del crecimiento, consumo de sustrato y producción PHA's por BtE264, con lo que se definieron las condiciones adecuadas para la producción de PHBV. Posteriormente se describen los resultados de la caracterización por análisis térmico, termogravimétrico y pruebas mecánicas de las películas obtenidas.

6.1 Perfil de crecimiento de BtE264 en el MBP y MBP más co-sustratos (AL, AV y PrS)

La Fig. 6 muestra los perfiles de crecimiento obtenidos en los diferentes medios. En MBP sin la adición de co-sustratos, el máximo crecimiento de BtE264 se alcanzó a las 96 h de incubación con un crecimiento de $8.6 \pm 0.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en biomasa. En el MBP+AL, el microorganismo adoptó un perfil de crecimiento similar al MBP, registrando una producción de biomasa de $8.6 \pm 0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 96 h de cultivo. En contraste, en MBP+AV y MBP+PrS, el máximo crecimiento se registró en las 72 h y se obtuvo menor concentración de biomasa de $5.3 \pm 0.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.7 \pm 0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. La Tab. 5 muestra los parámetros cinéticos de crecimiento para cada tratamiento. De acuerdo con lo anterior, la tasa específica de crecimiento en los tratamientos fue; MBP (0.05 h^{-1}), MBP+AL (0.04 h^{-1}), MBP+AV (0.03 h^{-1}) y MBP+PrS (0.01 h^{-1}).

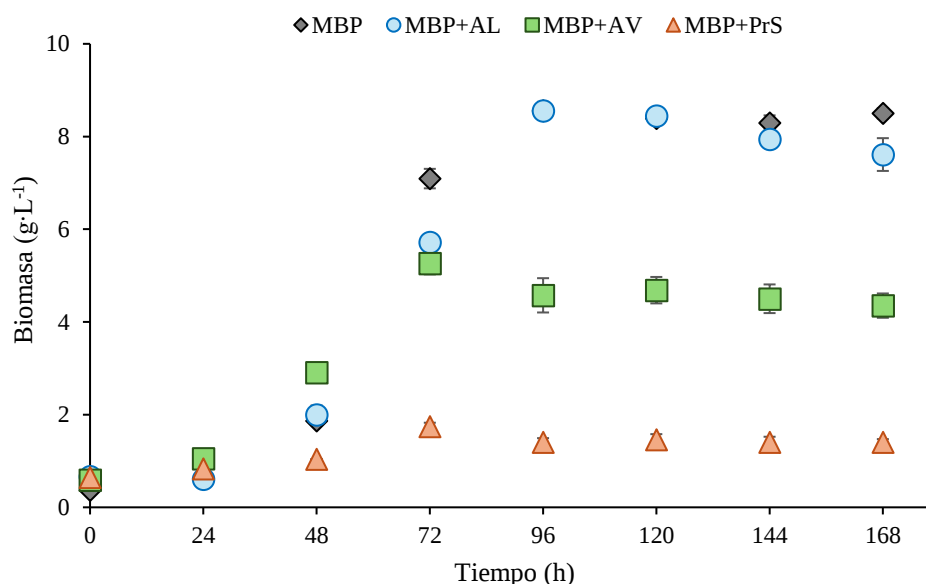


Figura 6. Crecimiento de BtE264 en MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS. Los valores son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de BtE264.

Parámetro	MBP	MBP+AL	MBP+AV	MBP+PrS
X_0 (g·L ⁻¹)	0.37 $\pm$ 0.08	0.67 $\pm$ 0.16	0.59 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.03
X_{max} (g·L ⁻¹)	8.56 $\pm$ 0.19	8.56 $\pm$ 0.08	5.27 $\pm$ 0.24	1.74 $\pm$ 0.08
μ (h ⁻¹)	0.05 $\pm$ 0.003	0.04 $\pm$ 0.004	0.03 $\pm$ 0.004	0.01 $\pm$ 0.002
td (h)	13.9	17.3	23.1	69.3

Los resultados son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar

El uso de co-sustratos en la síntesis de PHBV puede ser tóxico e inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, sin embargo, existen microorganismos que son capaces de utilizar los co-sustratos como fuente de carbono. En el crecimiento de BtE264 en MBP+AL, la adición de AL (4 g·L⁻¹) no presentó un efecto inhibitorio. Ashby et al. (2018), evaluaron diferentes concentraciones de AL para la producción de PHBV por la bacteria *Burkholderia sacchari* DSM 17165, utilizando 2 % xilosa como fuente de carbono; ellos observaron disminución en el crecimiento microbiano cuando la concentración de AL se incrementó a 2 g·L⁻¹. En este trabajo, se observó que BtE264 puede tolerar concentraciones de 4 g·L⁻¹ de AL

ya que no presentó una disminución de crecimiento respecto al obtenido en el MBP.

Cuando se evaluó el crecimiento de BtE264 en los medios MBP+AV y MBP+PrS se observó una disminución del crecimiento microbiano de 46 % y 84 % respectivamente, al compararse al crecimiento obtenido en MBP. Es de mencionar que en MBP+AV se neutralizó el carácter ácido al ajustar el pH a 7.2, sin embargo, no se evitó el efecto inhibitorio del co-sustrato en el crecimiento microbiano. La disminución del crecimiento en los MBP+AV y MBP+Prs se pueden atribuir a las altas concentraciones de co-sustrato desde el inicio del proceso; y a la posible naturaleza inhibitoria de los productos de la degradación de los co-sustratos por BtE264.

Loo & Sudesh, (2007) evaluaron el efecto inhibitorio de PrS, AV y sal de valerato sobre el crecimiento de *Delftia acidovorans*. Los autores reportaron que los efectos inhibidores de los precursores de 3HV disminuían en el siguiente orden: PrS > AV > sal de valerato. Por otra parte Bhatia et al. (2019) encontraron que PrS en concentraciones superiores a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ tenían un efecto altamente inhibitorio en *Ralstonia eutropha* reportando valores de $0.87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa después de 96 h de cultivo. En este estudio, se obtuvieron $1.4 \pm 0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa después de las 96 h cuando se utilizó MBP+PrS. Se considera que el PrS y al ser una sal, la alta concentración adicionada ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) creó un gradiente osmótico en el que el medio de cultivo tiene mayor concentración de solutos respecto al interior de la célula, creando un desbalance osmótico que pudo inhibir el crecimiento microbiano deshidratando a las células, ocasionando un daño celular irreversible por exceso de sal de propionato (PrS) (Zhang et al., 2018). En nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta el consumo de AL, AV y PrS como fuente de carbono para BtE264.

6.2 Consumo de sustrato en el MBP y co-sustratos (AL, AV y PrS)

La Fig. 7 muestra el perfil de la concentración residual de glicerol en los diferentes cultivos. Se observa que, en MBP, BtE264 consumió el glicerol lentamente en las primeras 24 h, sin embargo, partir de las 48 h se observa un descenso pronunciado para posteriormente registrando una tasa de consumo de $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

de las 0 - 72 h en la concentración de glicerol, y es consumido en su totalidad o estar por debajo del límite de detección del método empleado, a las 96 h de cultivo.

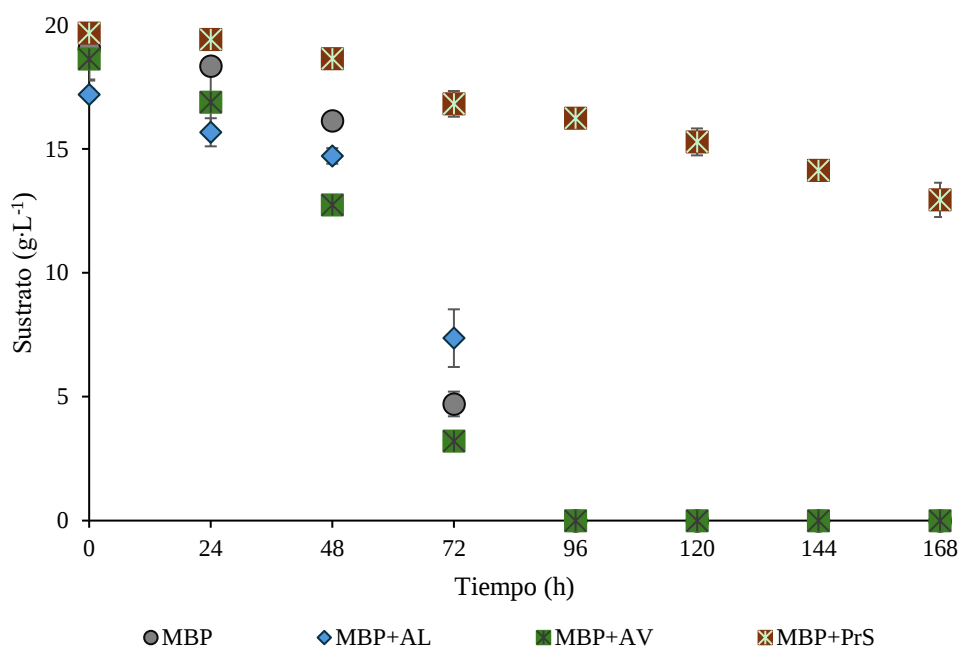


Figura 7. Consumo de glicerol en MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS. Los valores son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar.

En el caso del MBP+AL se observó menor tasa de consumo de glicerol ($0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 0 - 72 h) respecto al obtenido en el MBP debido a la presencia de AL en el medio, lo cual proporcionó al microorganismo el consumo simultáneo de las dos fuentes de carbono (Fig. 8), sin embargo, al igual que en el MBP, el consumo total del glicerol se alcanzó a las 96 h. Para el caso del MBP+AV se registró un comportamiento parecido al MBP donde, la tasa de consumo fue de $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de las 0 - 72 h, este comportamiento puede asociarse con un consumo preferencial de AV respecto a AL como co-sustrato (Fig.8), lo cual obligó a BtE264 a consumir el glicerol restante, caso contrario que en el MBP+AL que a las 48 h aún había en el medio sustrato (glicerol) y co-sustrato (AL) (Fig. 7 y 8). En contraste, el consumo de glicerol en el tratamiento MBP+PrS se ve limitado desde el inicio, observándose la disminución del 1 % de consumo a las 24 h; y una tasa de consumo de glicerol de $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de las 0 - 72 h.

La Fig. 8 representa la concentración de los co-sustratos AL, AV, y PrS . En el cultivo con MBP+AL, BtE264 consumió el AL en su totalidad a una tasa de $0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de las 0 - 72 h. Para el caso del MBP+AV el AV se agotó a las 48 h reflejando un consumo acelerado ($0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) desde las 0 h de cultivo. Para el PrS en el MBP+PrS se observó una tasa de consumo de PrS de $0.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El AL en MBP+AL (Tab. 6) representó el co-sustrato con el mayor rendimiento en producción de biomasa sobre consumo de sustrato ($Y_{X/S}$), produciendo $0.38 \pm 0.05 \text{ g}$ de biomasa, por cada g de sustrato (glicerol+AL).

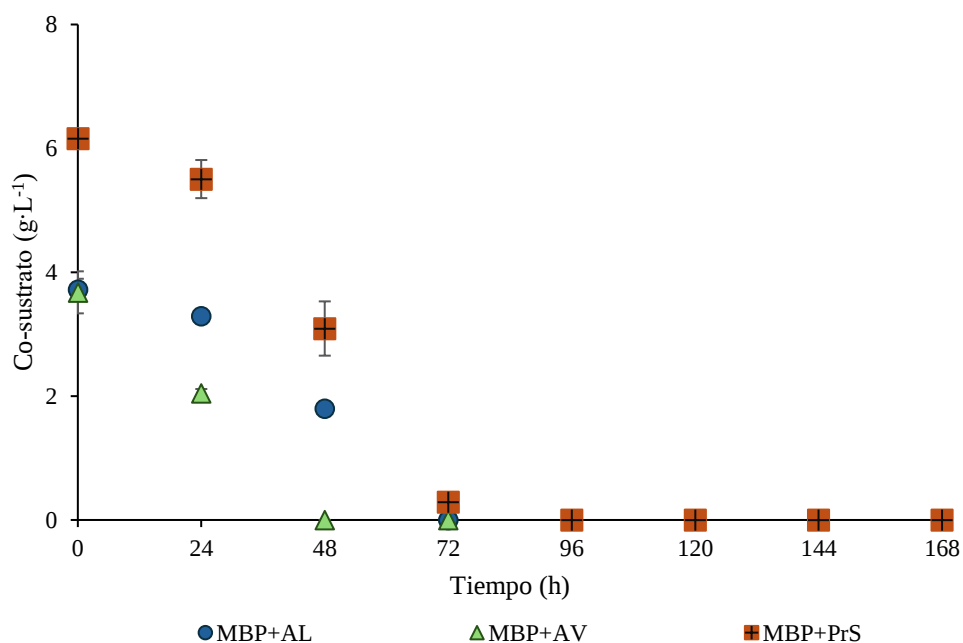


Figura 8. Consumo de AL, AV y PrS en MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS. Los resultados son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar.

Tabla 6. Rendimiento producción de biomasa/consumo de sustrato ($Y_{X/S}$) de BtE264

Medio	Sustrato – co-sustrato	$Y_{X/S} (\text{gX}\cdot\text{gS}^{-1})$
MBP	Glicerol	$0.47 \pm 0.01^{\text{A}}$
MBP+AL	Glicerol	$0.38 \pm 0.05^{\text{B}}$
	AL	

MBP+AV	Glicerol	0.17 ± 0.01^c
	AV	
MBP+PrS	Glicerol	0.06 ± 0.00^d
	PrS	

Los resultados son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$)

6.3 Producción de PHA's en el MBP y co-sustratos (AL, AV y PrS)

La Fig. 9 muestra el perfil de producción de PHA's en los distintos medios (MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS). En el caso de MBP la máxima producción de PHA's se alcanzó a las 144 h ($4.22 \pm 0.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con un rendimiento de producto en biomasa ($Y_{P/X}$) de $\approx 53\%$ (Tab. 7) a una tasa de producción de $0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. En el caso de MBP+AL se alcanzó la máxima producción ($3.91 \pm 0.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a las 120 h a una tasa de producción de $0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, valor similar al obtenido en el MBP, pero con menor acumulación de biopolímero ($47\% Y_{P/X}$), mismo que después fue, posiblemente consumido, por la bacteria. En el caso del MBP+AV, se observó un comportamiento diferente; en este caso la producción máxima ($1.53 \pm 0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) registrando una acumulación del $0.33\% Y_{P/X}$, y tasa de producción de las 0 a las 72 h de $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El MBP+PrS fue el medio con la menor producción de PHA's ($0.13 \pm 0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

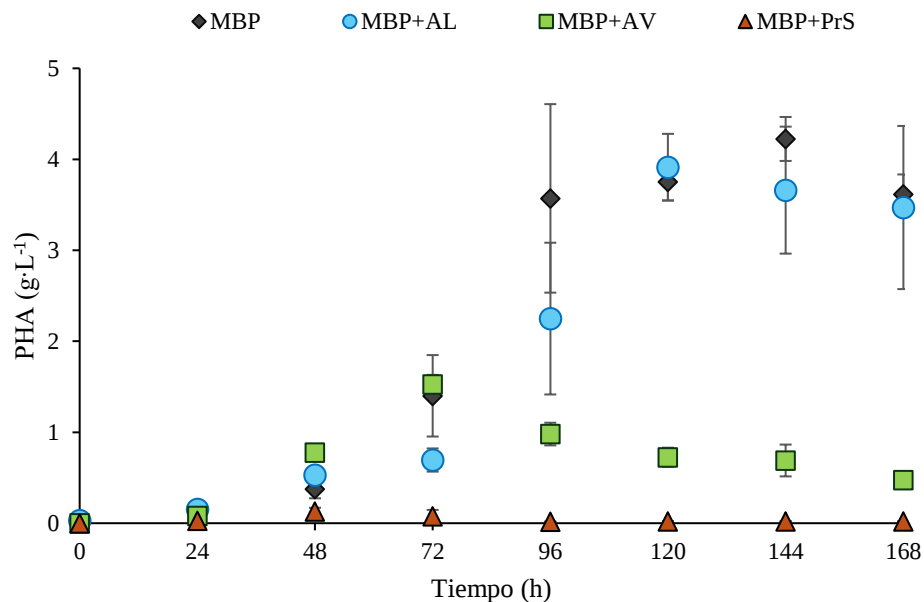


Figura 9. Perfil de producción de PHA's en los tratamientos MBP, MBP+AL, MBP+AV y MBP+PrS. Los valores son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar.

La Tab. 7 registra los valores de tiempo, composición % mol y rendimientos de PHBV en células. En el medio MBP únicamente se observó la acumulación del homopolímero PHB, es decir, en ausencia de co-sustratos el microorganismo sólo sintetiza el monómero 3HB, debido a que en el medio no se encuentra un precursor que conlleve a la síntesis del monómero 3HV (Fig. 5), validando la importancia que representa la adición de co-sustratos para promover la producción de co-polímeros bacterianos. Si bien BtE264 en MBP no produjo PHBV, los valores obtenidos en $Y_{P/X}$ ($\approx 53\%$) y producción del homopolímero PHB ($4.22 \pm 0.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), con una productividad de $0.029 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ son mayores a los reportados por Blunt et al. (2023), quienes también utilizaron BtE264 para la producción de PHB. Ellos reportaron una producción de $2.51 \pm 0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un $Y_{P/X}$ del $\approx 52\%$ a las 336 h con una productividad de $0.007 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ utilizando glicerol como fuente de carbono. En este estudio se obtuvo una productividad 4 veces mayor a la reportada por Blunt et al. (2023), lo cual representaría un ahorro importante en gastos de operación a nivel industrial.

En el MBP+AL, se obtuvo una acumulación de PHBV con el 31% mol 3HV a las 72 h, sin embargo, la mayor producción se registró a las 120 h ($3.91 \pm 0.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con 22 % mol

de 3HV y $Y_{P/X}$ del $\approx 47\%$; valores que sitúan al AL como el co-sustrato que conlleva a la mayor producción de PHBV por BtE264 (Tab. 7). En un estudio similar con *Ralstonia eutropha* para la producción de PHBV utilizando glucosa ($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y AL ($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Wang et al. (2013) reportaron valores máximos de producción de $3.18 \pm 0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con un 21 % mol de 3HV y $Y_{P/X}$ del 72 % a las 72 h de incubación, lo cual asemeja sus valores de producción y % mol de 3HV con los obtenidos en este estudio por BtE264 en MBP+AL. Sin embargo, es necesario mencionar que *R. eutropha* es considerada como el “microorganismo modelo” para la producción de PHA’s (Xue et al., 2024), lo cual proporciona buen marco de referencia sobre la producción de PHBV por BtE264. Así mismo, los valores obtenidos en este trabajo, son comparables con los reportados por Ashby et al. (2018), quienes evaluaron los efectos de AL sobre la producción de PHBV por *Burkholderia sacchari* DSM 17165. Ellos adicionaron $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AL y reportaron valores de producción de $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con 43 % mol 3HV y un $Y_{P/X} \approx 45\%$, a las 72 h de cultivo. En este trabajo, a pesar de que BtE264 presentó un % mol de 3HV menor a mayor tiempo (120 h), se obtuvo una acumulación similar ($\approx 47\% Y_{P/X}$), con mayor producción ($3.91 \pm 0.37\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de PHBV.

En el MBP+AV se obtuvo una producción de PHBV de 83 % mol de 3HV en las 24 h; sin embargo, los mejores valores se obtuvieron a las 72 h alcanzando una producción de $1.53 \pm 0.10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con 41 % mol 3HV (Tab. 7). Estos valores son menores a los reportados por Urtuvia et al. (2020), quienes utilizando *Azotobacter vinelandii* obtuvieron una producción de $2.8 \pm 0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con 27 % mol 3HV a las 64 h. Cabe mencionar que en el análisis de Urtuvia et al. (2020), AV se adicionó a las 18 h de cultivo, lo que pudo influir en el crecimiento celular y por consecuencia en la producción de PHBV, debido a que *A. vinelandii* no presentó los efectos inhibitorios de AV desde el inicio del cultivo. El uso de esta estrategia (adición de AV a las 18 h) explica el resultado obtenido por Urtuvia et al. (2020) frente a nuestro estudio. La adición puntal o a tiempo determinado es un enfoque que implica la adición de un sustrato (o co-sustrato) en un momento específico del proceso, implicando la asimilación del nutriente en un momento crucial para la formación de PHA’s. Khanna and Srivastava (2007), evaluaron la adición de AV en *Ralstonia eutropha* NRRL B14690 en tiempos críticos en la formación de PHA’s; 10 h (cultivo en fase logarítmica), 20 h (limitación de nitrógeno e inicio de acumulación de PHA’s) y 30 h (fase de acumulación activa de PHA’s), observaron que cuando se adicionó AV al inicio del cultivo, la producción

de PHBV disminuyó un 87 % comparado con la adición de AV a las 20 h de incubación. El adicionar $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de AV a las 20 h proporcionó el mejor tiempo para la producción de PHBV reportando valores de $5.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ con 45 % mol de 3HV. Dicha estrategia se considera sumamente relevante para maximizar la producción de PHBV.

En el caso de MBP+PrS se acumuló PHBV con 29 % mol de 3HV a las 48 h con una producción de $0.13 \pm 0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ siendo este el valor más bajo obtenido en comparación con los otros medios (Tab. 7). Los bajos valores son atribuidos al efecto del PrS en el crecimiento de BtE264 (Fig. 6), lo cual afectó directamente la producción de PHBV (Fig. 9), Bhatia et al. (2019) reportaron un efecto del PrS similar al de este trabajo cuando adicionaron $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PrS, ellos obtuvieron una producción de PHBV de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ con 92 % mol de 3HV con *Ralstonia eutropha* Re2133/pCB81.

Tabla 7. Medios de cultivo, composición (% mol) de PHBV y rendimiento producto/biomasa ($Y_{P/X}$) por BtE264

Medio de cultivo	Tiempo (h)	Composición (% mol)		Rendimiento $Y_{P/X}$ ($gP \cdot gX^{-1}$)
		3HB	3HV	
MBP	0	100	n/a	-
	24	100	n/a	-
	48	100	n/a	0.24 ± 0.07
	72	100	n/a	0.21 ± 0.07
	96	100	n/a	0.43 ± 0.12
	120	100	n/a	0.47 ± 0.03
	144	100	n/a	0.53 ± 0.04
	168	100	n/a	0.44 ± 0.03
MBP+AL	0	100	0	-
	24	97	3	-
	48	74	26	0.32 ± 0.00
	72	69	31	0.14 ± 0.04
	96	78	22	0.27 ± 0.10
	120	78	22	0.47 ± 0.03
	144	77	23	0.44 ± 0.02
	168	76	24	0.41 ± 0.04
MBP+AV	0	100	0	-
	24	17	83	0.16 ± 0.02
	48	27	73	0.34 ± 0.03
	72	59	41	0.33 ± 0.01
	96	58	42	0.25 ± 0.01
	120	50	50	0.18 ± 0.02
	144	45	55	0.18 ± 0.04
	168	44	56	0.13 ± 0.01
MBP+PrS	0	100	0	-
	24	71	29	0.15 ± 0.06
	48	71	29	0.16 ± 0.05
	72	76	24	0.07 ± 0.07
	96	73	27	0.02 ± 0.00
	120	74	26	0.03 ± 0.00
	144	76	24	0.03 ± 0.00
	168	77	23	0.03 ± 0.00

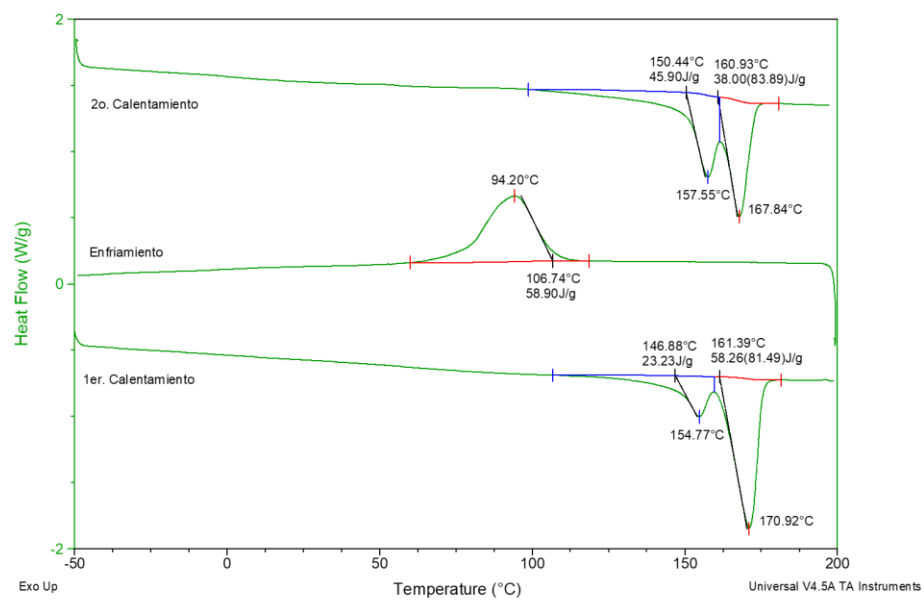
Los resultados son el promedio de tres unidades experimentales $\pm$ una desviación estándar

6.4 Caracterización de propiedades térmicas y mecánicas del PHBV

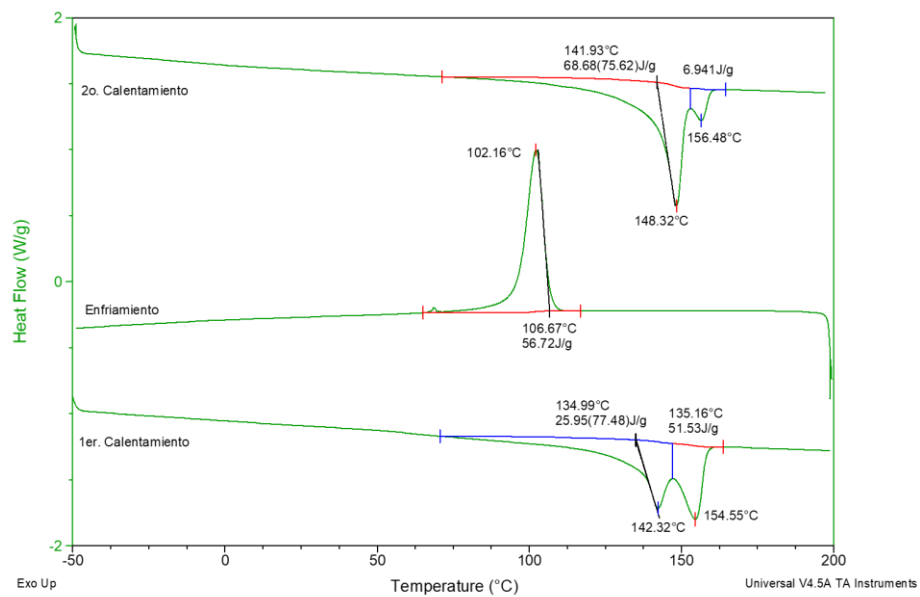
6.4.1 Propiedades térmicas

La Fig. 10, muestra los termogramas obtenidos a partir del análisis térmico por DSC en las muestras de PHA's producidas por BtE264. El homopolímero PHB (Fig. 10.A), presenta dos endotermas de fusión (154.77 y 170.92 °C) durante el primer ciclo de calentamiento, lo cual coincide con lo reportado por Biradar et al. (2018) y Wellen et al. (2013). Además, se observa una T_c a 94.2 °C y un ΔH_c de 58.9 J·g⁻¹ durante el enfriamiento. En un segundo ciclo de calentamiento, las T_m se desplazaron ligeramente a 157.55 y 167.84 °C denotando la existencia de dos puntos de fusión en la muestra de PHB, lo cual se explica por la presencia de dos tipos de cristales que funden a temperaturas diferentes o a la recrystalización durante la fusión. Los materiales semicristalinos como el PHB, tienden a formar regiones con cristales imperfectos que, al calentarse, se funden para después reorganizarse en nuevas estructuras cristalinas más ordenadas, dichos cristales son más estables y requieren mayor energía para fundirse, lo que produce la segunda endoterma de fusión a una temperatura superior (D'Arienzo et al., 2024). Por otro lado, la muestra comercial, PHBV-STD (Fig. 10. B), presentó dos endotermas de fusión a 148.32 y 156.48 °C, temperaturas menores que las que presentó el homopolímero PHB. La muestra PHBV-STD presentó una T_c de 102.16 °C y un ΔH_c de 56.72 J·g⁻¹, la diferencia en ΔH_c en las muestras PHB y PHBV-STD puede ser explicada considerando que el co-polímero PHBV-STD presenta mayor grado de cristalización que el homopolímero. La muestra de PHBV (Fig. 10. C) sintetizada por BtE264 presentó un comportamiento diferente, exhibiendo dos endotermas de fusión a temperaturas relativamente bajas, 134.15 y 145.36 °C y con ΔH_m relativamente bajas comparadas con el PHB y con PHBV-STD. Sin embargo, durante el enfriamiento la muestra PHBV presentó la T_c a 84.8 °C con un ΔH_c de 23.69 J·g⁻¹, valor relativamente bajo comparado con las muestras anteriores (PHB y PHBV-STD), mientras que en el segundo ciclo de calentamiento presentó dos T_m de 128.93 y 141.55 °C, indicando, *a priori*, que tiene un nivel bajo de cristalinidad. La muestra de PHBV presentó la T_g a -7 °C mientras que las muestras de PHB y PHBV-STD no presentaron un valor apreciable en las curvas de calentamiento en DSC, lo cual se atribuye al alto grado de cristalinidad en las muestras, dificultando su detección por las metodologías descritas (Chen et al., 2005)

A)



B)



C)

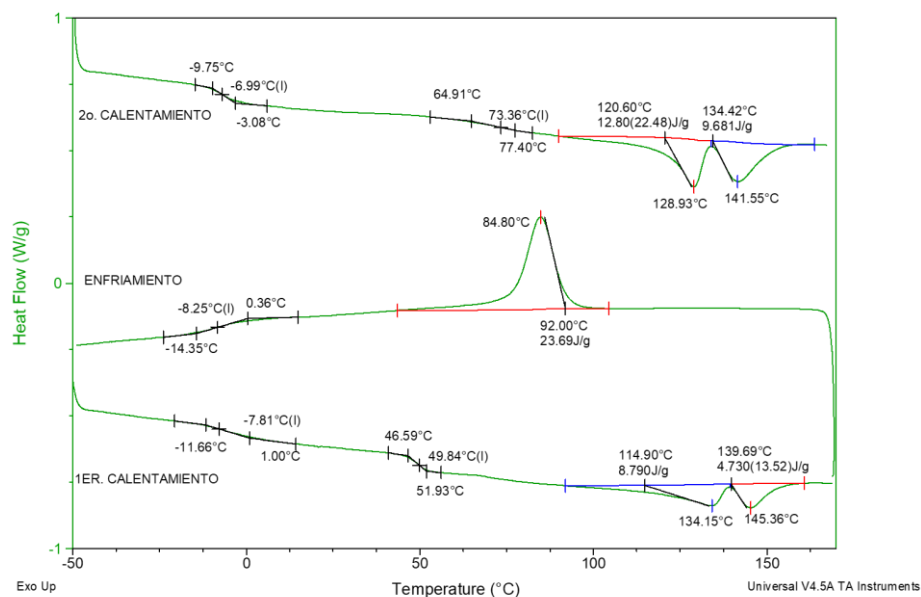
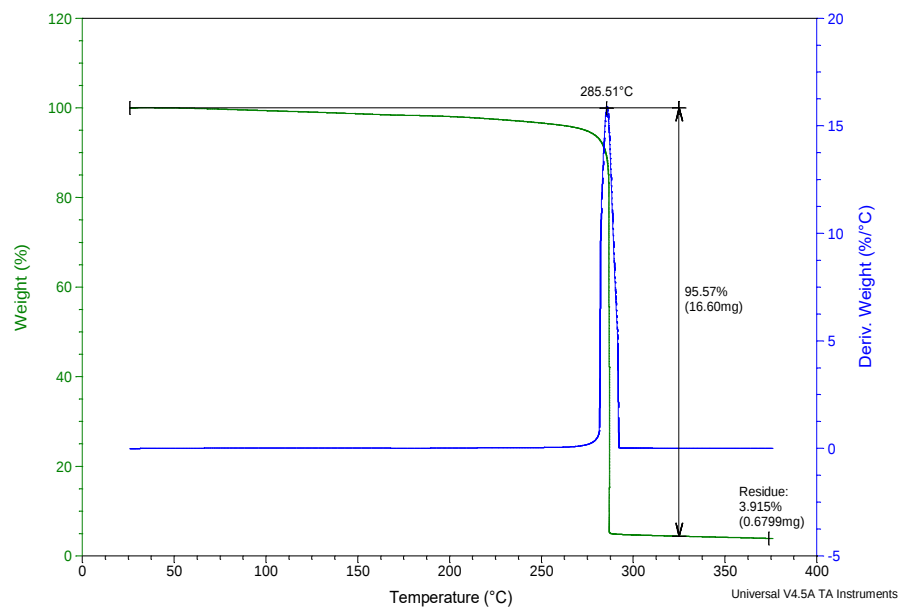


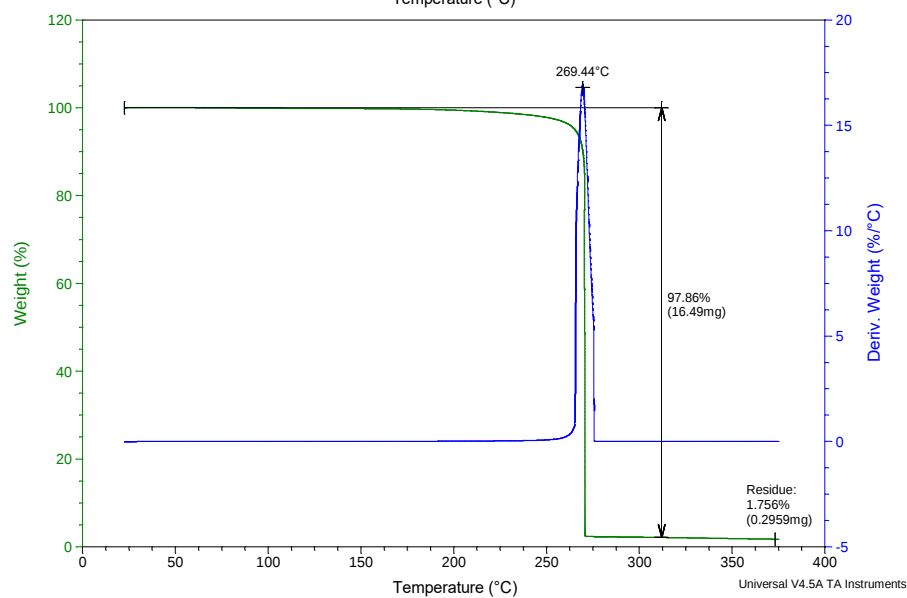
Figura 10. Termogramas de DSC; A) PHB, B) PHBV-STD y C) PHBV.

En las Fig. 11 se muestran los termogramas obtenidos a partir del análisis termogravimétrico por TGA en las muestras de PHA's producidas por BtE264. Se observa que el PHB presenta mejor estabilidad térmica (Fig. 11. A) con una T_d de 285.51°C, seguido por la muestra PHBV (Fig. 11. B), con una T_d de 276.71 °C, en contraste, la muestra PHBV-STD (Fig. 11. C) presentó menor estabilidad térmica (T_d = 269 °C). El residuo generado (componentes no volátiles-impurezas) fue muy similar en las tres muestras.

A)



B)



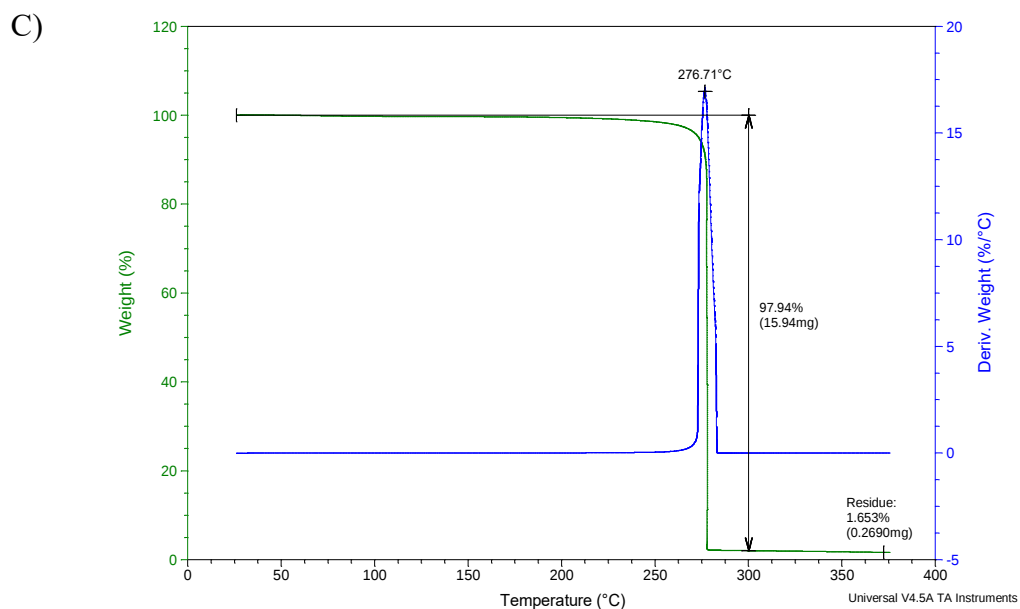


Figura 11. Termograma por TGA; PHB (A), PHBV-STD (B) y PHBV (C).

En la Tab. 8 se comparan los valores de T_g , T_m , ΔH_m , T_c , ΔH_c , T_d y $\%X_c$ obtenidos de las muestras PHB, y PHBV-STD y PHBV de este estudio frente otros autores. Los valores obtenidos por DSC se tomaron a partir del segundo ciclo de calentamiento.

Tabla 8. Propiedades térmicas de las muestras PHB, PHBV-STD y PHBV comparadas con valores obtenidos por otros autores.

Propiedades térmicas									
Producido por:	PHA's	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J·g ⁻¹)	T_c (°C)	ΔH_c (J·g ⁻¹)	$\%X_c$	T_d (°C)	Referencia
BtE264	PHB	-1.5	79.8	166.4	48.5	42.4	54.7	279	(Kourmentza et al., 2018)
Bt2364	PHB	-7.9	170	N/D	N/D	N/D	N/D	294	(Blunt et al., 2023)
Goodfellow	PHB	N/D	163 – 169	76.9	111.7	62.9	52.4	N/D	(Pracella et al., 2021)
BtE264	PHB	N/D	157 – 167	46 – 38	94.2	58.9	57	285	Este estudio
Sigma-Aldrich	PHBV (8 % mol 3HV)	N/D	148 – 156	68.6 – 6.9	102.1	56.7	69	269	Este estudio
BtE264	PHBV (24 % mol 3HV)	-7	129 – 141	12.8 – 9.6	84.8	23.7	21	276	Este estudio
<i>Methylocystis sp.</i>	PHBV (25 % mol 3HV)	-4.8	163.9	41.9	67.6	N/D	38	N/D	(Lee et al., 2023)
<i>Burkholderia sacchari</i>	PHBV (88%mol 3HV)	-14	99.7	43.7	52.4	-42	40	N/D	(Ashby et al., 2018)

N/D = No disponible

Las propiedades térmicas T_g , T_m , T_d y $\%X_c$ son parámetros fundamentales que definen el comportamiento del polímero, por ejemplo; la T_g es crucial para definir las condiciones bajo las cuales el material debe de ser utilizado, la T_m es esencial en los procesos de moldeo o extrusión de termoplásticos, la T_d es el límite máximo de temperatura antes de que el polímero se degrade irreversiblemente y el $\%X_c$ indica la fracción del material cristalino respecto a sus regiones amorfas (Reynoso, 2018). Dichas propiedades se han investigado ampliamente en los PHA's, presentando variaciones dependiendo del origen del material o procesamiento. Blunt et al. (2023) reportaron valores de -7.9, 170 y 294 °C para la T_g , T_m y T_d respectivamente, en PHB sintetizado por BtE264. En contraste, Kourmentza et al. (2018) reportaron valores de -1.5, 79.8 y 279 °C para la T_g , T_m y T_d respectivamente, cuando se sintetizó PHB por el mismo microorganismo; en este estudio se obtuvieron valores para PHB de BtE264 de 158 – 168 y 285 °C para la T_m y T_d , lo cual expone la variación de las propiedades térmicas debido al procesamiento del material, así como los parámetros de operación para la síntesis del biopolímero (Tab. 8).

En el caso de PHBV sintetizado, se obtuvieron propiedades térmicas cercanas a las obtenidas por Lee et al. (2023), además se obtuvo un $\%X_c$ inferior al reportado (40 %) por Ashby et al. (2018), el PHBV sintetizado por BtE264 presentó más regiones amorfas con un % mol de 3HV menor ($\%X_c = 21$). La adición de monómeros de 3HV a cadenas poliméricas de PHBV es un factor crucial que modifica la estructura del biopolímero debido a que representa un impacto en la creación y ordenamiento de regiones amorfas y cristalinas en el co-polímero, por consecuencia, sus propiedades térmicas y mecánicas se verán afectadas con respecto a la fracción mol de 3HV que se adicione en las cadenas (Wang et al., 2001). Se identificó que el PHB producido en MBP presentó un menor $\%X_c$ respecto al PHBV-STD, mientras que el PHBV sintetizado en MBP+AL tiene un $\%X_c$ 2.5 veces menor al PHBV-STD y al PHB obtenido en MBP (Tab. 8).

6.4.2 Propiedades mecánicas—ensayo de tracción

En la Fig. 12 se muestra el diagrama esfuerzo-deformación obtenido del ensayo de tracción. Se aprecia que el PHB denota un comportamiento característico en polímeros rígidos presentando una alta resistencia a la deformación plástica, una vez que su alargamiento unitario empieza a dejar de ser proporcional a la fuerza aplicada, registrando un módulo de Young de 1194 ± 422 MPa, y soportando una tensión máxima (resistencia a la tracción) de 10 ± 3.1 MPa, y una elongación de rotura de $0.9 \% \pm 0.1 \%$ (Tab. 9). El PHB suele ser un material rígido, esto debido a su regularidad estereoquímica, lo cual implica que sus átomos y grupos funcionales estén organizados en el espacio de una forma específica, promoviendo la creación de zonas cristalinas, lo que contribuye a una mayor rigidez entre las cadenas poliméricas (Yeo et al., 2018). Por otro lado, la muestra de PHBV-STD mostró un módulo de Young de 359 ± 48 MPa, con una resistencia a la tracción de 3.5 ± 1.2 MPa y una elongación de rotura de $1.1 \% \pm 0.1 \%$ presentando una menor rigidez que el PHB, debido a que se ocupó un menor esfuerzo para deformar la muestra, lo que se traduce en valores de resistencia a la tracción y módulos de Young inferiores, el co-polímero PHBV suele presentar un comportamiento menos rígido debido a la presencia de unidades de 3HV en las cadenas poliméricas, disminuyendo su regularidad estereoquímica con la presencia de un grupo etilo que facilita el grado de rotación e interacciones estéricas con otros grupos en la molécula (García-Chumillas et al., 2024; Yeo et al., 2018). En el caso de PHBV se aprecia un comportamiento diferente, éste debido a que el material logra deformarse con un menor esfuerzo que el PHB y el PHB-STD obteniendo un módulo de Young de 160 ± 47 MPa, resistencia a la tracción de 3.1 ± 0.9 MPa y una elongación de rotura de $3.1 \% \pm 0.7 \%$. Lo cual se atribuye a el aumento de la fracción mol de 3HV en la muestra de PHBV (24 % mol 3HV) frente a PHBV-STD (8 % mol 3HV), un % mol de 3HV mayor incrementa la fase amorfa en la estructura polimérica disminuyendo el ordenamiento de las cadenas, reflejando la importancia del incremento del contenido de 3HV en PHBV para mejorar la flexibilidad y reducir la fragilidad del biopolímero (Abbasi et al., 2022).

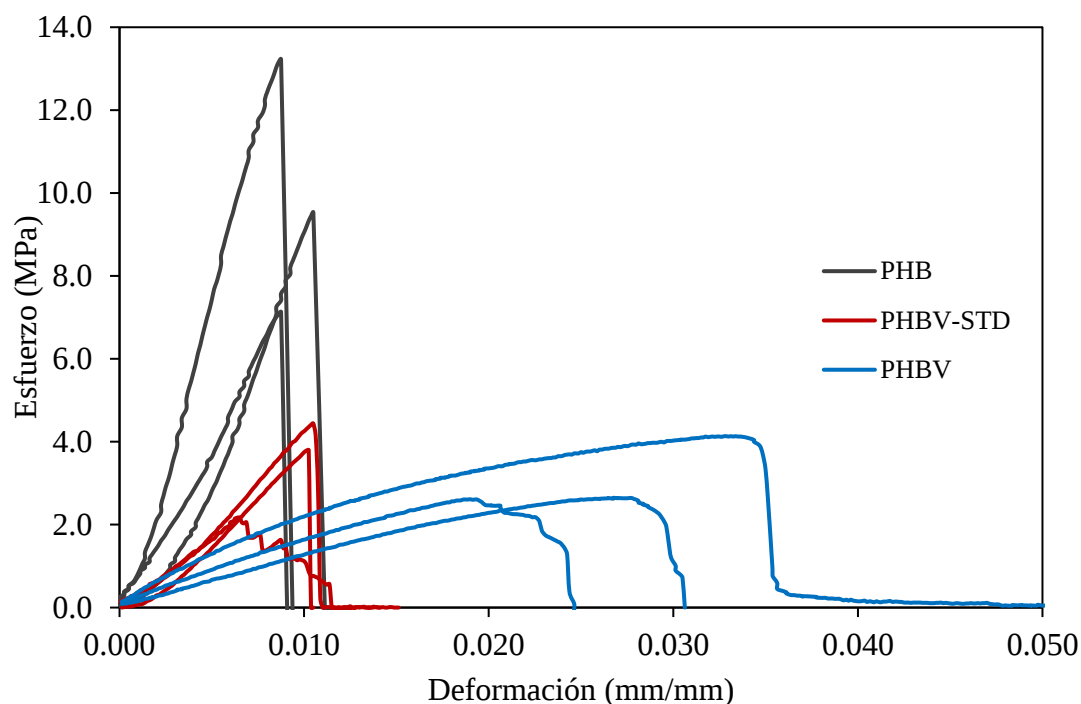


Figura 12. Diagrama esfuerzo-deformación de muestras de PHB, PHBV-STD y PHBV.

En la Tab. 9 se comparan los valores de Modulo de Young, resistencia a la tracción y elongación obtenidos de las muestras PHB, PHBV-STD y PHBV obtenidos en este estudio con los valores reportados por otros autores.

Tabla 9. Propiedades mecánicas de PHB, PHBV-STD y PHBV frente a valores obtenidos por otros autores.

Parámetro						
Producido por:	PHA's	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación de rotura (%)	Producto	Referencia
Goodfellow	PHB	820 ± 39.7	20 ± 0.7	5.8 ± 0.2	Película	(Pérez-Arauz et al., 2019)
Goodfellow	PHB	550	4.8	1	Película	(Al et al., 2024)
BtE264	PHB	1194 ± 422^A	10 ± 3.1^A	0.9 ± 0.1^B	Película	Este estudio
Sigma-Aldrich	PHBV (8%mol 3HV)	359 ± 48^B	3.5 ± 1.2^B	1.1 ± 0.1^B	Película	Este estudio
BtE264	PHBV (24 %mol 3HV)	160 ± 47^B	3.1 ± 0.9^B	3.1 ± 0.7^A	Película	Este estudio
N/A	PHBV (23%mol 3HV)	1766 ± 246	N/A	3.0 ± 0.4	Película	(Arcos-Hernández et al., 2013)
	PHBV (62%mol 3HV)	867 ± 35	N/A	5.0 ± 0.4		

Cultivos microbianos mixtos	PHBV (7 %mol 3HV)	1140 ± 0.04	24.29 ± 1.47	3.13 ± 0.40	Película	(Martínez-Sanz et al., 2014)
	PHBV (40 %mol 3HV)	400 ± 0.05	14.57 ± 1.23	44 ± 5.66		
NaturePlast	PHBV	73.45 ± 11.75	0.85 ± 0.18	≈ 4	Nanofibras	(Budharaju et al., 2024)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	PHBV (18 %mol 3HV)	600	9.1	2.4	Películas	(Urtuvia et al., 2023)
	PHBV (33 %mol 3HV)	1100	22.6	3.2		
<i>Methylocystis parvus</i>	PHBV (24%mol 3HV)	1000	22	50.5	Películas	(Myung et al., 2017)

N/D = No disponible. Los valores obtenidos en este estudio son el promedio de tres unidades experimentales ± una desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Las propiedades mecánicas de tensión son parámetros clave que miden la resistencia a la deformación de un material bajo una fuerza aplicada, siendo propiedades fundamentales para conocer las características de un material polimérico. Por ejemplo; el módulo de Young está ligado a la resistencia del material a deformarse elásticamente; la resistencia a la tracción representa el máximo esfuerzo que un material puede soportar antes de romperse, mientras que la elongación de ruptura mide el límite máximo de deformación de un material antes de la fractura, estas propiedades son responsables de la rigidez, flexibilidad y resistencia del material, siendo parámetros complejos influenciados por factores como; el procesamiento de la muestra (moldeo por disolvente, inyección, soplado etc.), condiciones de prueba (tipo de tensión, carga de activación, velocidad de deformación) y estructura del polímero (tipo de polímero, peso molecular, grado de cristalinidad, microestructura, grado de reticulación, etc.) responsables de la variabilidad de valores en la caracterización de polímeros.

Un ejemplo de esto se aprecia en el estudio realizado por Al et al. (2024), al utilizar PHB comercial reportando valores de módulo de Young, resistencia a la tracción, y elongación de rotura de 550 MPa, 40 MPa y 1 %. Si bien, evaluar las propiedades del PHB comercial no era su objetivo, dichos valores difieren de los suministrados por la marca comercial (3500 MPa, 40 MPa y 6 %, para módulo de Young, resistencia a la tracción, y elongación de rotura) reflejando que las propiedades de un material pueden diferir, aunque se utilice un material ya caracterizado, porque el procesamiento o método al que se someta

la muestra puede ocasionar que los parámetros de referencia sean distintos.

En este estudio la incorporación de 3HV a la cadena de PHBV (24 % mol 3HV) mejoró el módulo de Young y la elongación de ruptura (160 ± 47 MPa, $3.1 \% \pm 0.7\%$) obtenido en películas de PHBV menos rígidas en comparación del PHBV-STD que presentó módulo de Young mayor (359 ± 48 MPa) y menor elongación de ruptura ($1.1 \% \pm 0.1 \%$). Por otra parte, nuestros valores de % mol 3HV se comparan a los reportados por Myung et al. (2017) para el PHBV de la bacteria metanotrófica *Methylocystis parvus* con un 50.5 % de elongación de ruptura en películas de PHBV con 24 % mol 3HV. Dicha diferencia se atribuye al efecto de la velocidad de deformación utilizada en el ensayo de tensión por Myung et al. (2017), la cual fue 6 veces menor (0.08 mm/s) a la utilizada en este estudio (0.5 mm/s).

Los polímeros rígidos, dúctiles o elastómeros suelen presentar cierta sensibilidad a la velocidad de deformación, mostrando generalmente una disminución de la ductilidad, mientras que el módulo de Young y el límite elástico, o la resistencia a la tracción aumentan, debido que a bajas velocidades. Las cadenas poliméricas tienen más tiempo de reorganizarse y alinearse en respuesta al esfuerzo aplicado, permitiendo una mayor elongación a través del deslizamiento de las cadenas. En cambio, velocidades altas pueden llevar a una fractura prematura debido a el tiempo insuficiente para reordenarse. Las condiciones de prueba como la velocidad de deformación (velocidad de cruceta) va a depender del tipo de material y el efecto que se busque analizar (Ebewele, 2000; Stan et al., 2014). En este caso los valores obtenidos para el PHBV de BtE264 son comparables a los obtenidos por Urtuvia et al. (2023), reportando una elongación a ruptura, módulo de Young y X_c de 3.2 %, 1100 MPa , 62.81 % respectivamente en películas de PHBV con 33 % mol 3HV, sintetizadas por *Azotobacter vinelandii*. En donde; las películas de PHBV realizadas en este estudio por BtE264, presentaron valores de elongación a ruptura similares, pero con un % mol de 3HV (24 %) y un X_c (21 %) menor, implicando que, si se buscara elevar el % mol de 3HV obtenido, se podrían crear películas aún más flexibles.

7. Posibles aplicaciones del PHBV

El PHBV es un biopolímero ampliamente investigado por sus propiedades biodegradables y biocompatibles. Melendez-Rodriguez et al. (2018) abordaron la producción de PHBV para la elaboración de biopelículas electrohiladas reforzadas, enfocadas a aplicaciones de envasado de alimentos, la estructura de fibra electrohilada dio como resultado películas más transparentes con menor humectabilidad y mayor flexibilidad, exhibiendo un gran potencial como capas intermedias o recubrimientos. Por otra parte; las películas de PHBV se han utilizado como portadores de diferentes compuestos (extractos de; orégano, clavo, carvacrol, eugenol, romero, té verde y ácidos fenólicos) brindando soporte y protección antimicrobiana. La cual brinda una reducción en la utilización de conservadores químicos ya que puede prolongar la vida útil de los alimentos, además de ofrecer una alternativa ecológica frente a los plásticos convencionales (Figueroa-Lopez et al., 2019; Moll et al., 2023; Requena et al., 2019).

EL PHBV tiene una alta presencia en sectores relacionados con la biomedicina, siendo un polímero altamente atractivo en aplicaciones como: 1) ingeniería de tejidos; utilizados para la creación de andamios celulares tridimensionales, permitiendo la adecuada integración del material al tejido y promoviendo la creación de la matriz celular a medida que el polímero se degrada (Sadreddini et al., 2023); 2) Apósitos en la curación de heridas; por medio de la creación de parches nanofibrosos los cuales brindan una protección en la zona del tejido dañada, además de la posibilidad de cargar fármacos en las nanofibras promoviendo una cicatrización efectiva disminuyendo el riesgo de infección (Wang et al., 2024); 3) Sistema controlado de liberación de fármacos; por medio de la encapsulación de fármacos e ingredientes activos, aumentando su biodisponibilidad, además de la síntesis de microesferas y nanopartículas las cuales brindan una amplia gama de aplicación dependiendo del diseño, propósito e interacción que se busque obtener mediante dichas nanopartículas (Rodríguez-Cendal et al., 2023). Las investigaciones enfocadas al sector biomédico suelen utilizar PHBV comercial el cual, en la mayoría de los casos, no sobrepasa los 15 % mol 3HV, lo cual brinda una gran posibilidad de aplicación del PHBV con mayor % mol de 3HV obtenido en este estudio.

En este estudio, se destaca la importancia de la producción de PHBV, así como la caracterización térmica y mecánica del material obtenido, sin embargo; un fundamento clave para entender la manera en la que un producto se relaciona a una aplicación específica se basa en la estructura de un material, la cual definirá sus propiedades, mismas que se verán influenciadas por su proceso de fabricación. La relación de la estructura, propiedades y procesamiento van a definir el tipo de aplicaciones que podrá tener un material, así como su capacidad para satisfacer las necesidades específicas de cada sector.

Alternativas como la modificación química, adición de plastificantes, mezcla de materiales y modificación del procesado son opciones utilizadas para modificar la estructura y propiedades de un material polimérico para adecuarlo a una aplicación determinada (Reynoso, 2018). En la Fig. 13 se resumen las posibles aplicaciones para el biopolímero producido, comparando los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura. En la Tab. 3 de la sección 2.4.3 se presentan las aplicaciones con datos más específicos.

Aplicaciones de PHBV



Figura 13. Posibles aplicaciones propuestas para el PHBV

8. Conclusiones y perspectivas.

Burkholderia thailandensis E264 fue capaz de sintetizar el co-polímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) en presencia de los tres co-sustratos estudiados, sin embargo, la adición de propionato de sodio como co-sustrato inhibió el crecimiento de BtE264 y con ello la producción de biopolímero. La adición de ácido valérico presentó mayor efecto inductor en la producción del monómero de 3HV. La adición de ácido levulínico demostró ser una fuente de carbono metabolizable para BtE264, ya que no provocó disminución en el crecimiento celular en comparación al crecimiento obtenido en el MBP. La ausencia de un precursor para la formación del monómero 3HV conduce a la producción del homopolímero PHB. En particular, el uso de AL como co-sustrato promovió significativamente el 22 % mol 3HV sin afectar el crecimiento microbiano, indicando su potencial para mejorar la producción de PHBV, evidenciando la importancia del uso de co-sustratos, en particular el ácido levulínico, en la síntesis de biopolímeros bacterianos.

Esta investigación tiene un impacto potencialmente significativo, ya que conduce a la producción de bioplásticos con un enfoque sostenible y respetuoso con el medio ambiente. Se debe enfatizar que aún son necesarios estudios para determinar las condiciones óptimas de operación (aireación, temperaturas, formulación de medio de cultivo), que proporcionen las mejores características del biopolímero de acuerdo con las aplicaciones deseadas; así como los respectivos estudios de escalamiento.

9. Referencias

- Abbasi, M., Pokhrel, D., Coats, E. R., Guho, N. M., & McDonald, A. G. (2022). Effect of 3-hydroxyvalerate content on thermal, mechanical, and rheological properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymers produced from fermented dairy manure. *Polymers*, 14(19), 4140. <https://doi.org/10.3390/polym14194140>
- AG Soares da Silva, F., Matos, M., Dourado, F., A M Reis, M., C Branco, P., Poças, F., & Gama, M. (2023). Development of a layered bacterial nanocellulose-PHBV composite for food packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(3), 1077-1087. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11839>
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287-7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>
- Al, G., Aydemir, D., & Altuntaş, E. (2024). The effects of PHB-g-MA types on the mechanical, thermal, morphological, structural, and rheological properties of polyhydroxybutyrate biopolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264, 130745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130745>
- Alchetron. (2024, 02/12/2023). PHBV. Alchetron. Retrieved 03/10/2024 from <https://alchetron.com/PHBV#phbv-258890c4-55fa-41f4-9446-ea80b272f62-resize-750.png>
- Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M., & Ghazwani, A. A. (2019). Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00755. <https://doi.org/10.1002/mbo3.755>
- Alshehrei, F. (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>
- Álvarez da Silva, L. (2016). Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos [Trabajo de fin de grado inédito]. *Universidad de Sevilla, Sevilla*. <http://hdl.handle.net/11441/54517>
- Antonova, L. V., Krivkina, E. O., Sevostianova, V. V., Mironov, A. V., Rezvova, M. A., Shabaev, A. R., Tkachenko, V. O., Krutitskiy, S. S., Khanova, M. Y., Sergeeva, T. Y., Matveeva, V. G., Glushkova, T. V., Kutikhin, A. G., Mukhamadiyarov, R. A., Deeva, N. S., Akentieva, T. N., Sinitsky, M. Y., Velikanova, E. A., & Barbarash, L. S. (2021). Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model. *Polymers*, 13(16), 2637. <https://doi.org/10.3390/polym13162637>

- Aramvash, A., Hajizadeh-Turchi, S., Moazzeni-zavareh, F., Gholami-Banadkuki, N., Malek-sabet, N., & Akbari-Shahabi, Z. (2016). Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in *Cupriavidus necator* and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 397-404.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002>
- Arcos-Hernández, M. V., Laycock, B., Donose, B. C., Pratt, S., Halley, P., Al-Luaibi, S., Werker, A., & Lant, P. A. (2013). Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV). *European Polymer Journal*, 49(4), 904-913.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.10.025>
- Ardi, M. S., Aroua, M. K., & Hashim, N. A. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1164-1173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., Nuñez, A., Strahan, G. D., & Johnston, D. B. (2018). *Burkholderia sacchari* DSM 17165: A source of compositionally-tunable block-copolymeric short-chain poly(hydroxyalkanoates) from xylose and levulinic acid. *Bioresource Technology*, 253, 333-342.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.045>
- Ashter, S. A. (2016). Introduction. In S. A. Ashter (Ed.), *Introduction to Bioplastics Engineering* (pp. 1-17). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-39396-6.00001-4>
- Augustine, R., Hasan, A., Patan, N. K., Dalvi, Y. B., Varghese, R., Antony, A., Unni, R. N., Sandhyarani, N., & Moustafa, A.-E. A. (2020). Cerium oxide nanoparticle incorporated electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membranes for diabetic wound healing applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(1), 58-70.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01352>
- Avella, M., Martuscelli, E., & Raimo, M. (2000). Review: Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)(PHBV) copolymers. *Journal of Materials Science*, 35(3), 523-545.
<https://doi.org/10.1023/a:1004740522751>
- Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., & Kumarapillai, H. (2020). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) in *Bacillus aryabhattai* and cytotoxicity evaluation of PHBV/poly(ethylene glycol) blends. *3 Biotech*, 10(2), 32.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-2017-9>
- Berezina, N. (2012). Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Journal*, 7(2), 304-309.
<https://doi.org/10.1002/biot.201100191>

- Berthet, M. A., Angellier-Coussy, H., Chea, V., Guillard, V., Gastaldi, E., & Gontard, N. (2015). Sustainable food packaging: Valorising wheat straw fibres for tuning PHBV-based composites properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 72, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.02.006>
- Bhatia, S. K., Gurav, R., Choi, T.-R., Jung, H.-R., Yang, S.-Y., Song, H.-S., Jeon, J.-M., Kim, J.-S., Lee, Y.-K., & Yang, Y.-H. (2019). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production from engineered *Ralstonia eutropha* using synthetic and anaerobically digested food waste derived volatile fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.083>
- Bhatt, R., Shah, D., Patel, K. C., & Trivedi, U. (2008). PHA-rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technology*, 99(11), 4615-4620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.054>
- Biradar, G. G., Shivasharana, C. T., & Kaliwal, B. B. (2018). Characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by novel bacterium *Lysinibacillus sphaericus* BBKGBS6 isolated from Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(4), 1685-1701. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1054-x>
- Blunt, W., Blanchard, C., Doyle, C., Vasquez, V., Ye, M., Adewale, P., Liu, Y., Morley, K., & Monteil-Rivera, F. (2023). The potential of *Burkholderia thailandensis* E264 for co-valorization of C5 and C6 sugars into multiple value-added bio-products. *Bioresource Technology*, 387, 129595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129595>
- Bosker, T., Bouwman, L. J., Brun, N. R., Behrens, P., & Vijver, M. G. (2019). Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere*, 226, 774-781. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.163>
- Brett, P. J., DeShazer, D., & Woods, D. E. (1998). Review note: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(1), 317-320. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-317>
- Brown, R. W., Chadwick, D. R., Zang, H., Graf, M., Liu, X., Wang, K., Greenfield, L. M., & Jones, D. L. (2023). Bioplastic (PHBV) addition to soil alters microbial community structure and negatively affects plant-microbial metabolic functioning in maize. *Journal of Hazardous Materials*, 441, 129959. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129959>
- Budharaju, H., Bagewadi, S., Devanathan, P., Chellappan, D., Chinnaswamy, P., Sethuraman, S., & Sundaramurthi, D. (2024). Carboxymethyl cellulose-agarose hydrogel in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofibers: A novel tissue engineered skin graft. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264, 130565. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130565>

- Cha, D., Ha, H. S., & Lee, S. K. (2020). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the production of various types of short-chain-length polyhydroxyalkanoates from levulinic acid. *Bioresource Technology*, 309, 123332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123332>
- Chauhan, K., Kaur, R., & Chauhan, I. (2024). Sustainable bioplastic: a comprehensive review on sources, methods, advantages, and applications of bioplastics. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 63(8), 913-938. <https://doi.org/10.1080/25740881.2024.2307369>
- Chen, C., Zhou, X., Zhuang, Y., & Dong, L. (2005). Thermal behavior and intermolecular interactions in blends of poly(3-hydroxybutyrate) and maleated poly(3-hydroxybutyrate) with chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(1), 35-47. <https://doi.org/10.1002/polb.10742>
- Chen, X., & Yan, N. (2020). A brief overview of renewable plastics. *Materials Today Sustainability*, 7-8, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100031>
- Cheng, J., Eyheraguibel, B., Jacquin, J., Pujo-Pay, M., Conan, P., Barbe, V., Hoypierres, J., Deligey, G., Halle, A. T., Bruzaud, S., Ghiglione, J.-F., & Meistertzheim, A.-L. (2022). Biodegradability under marine conditions of bio-based and petroleum-based polymers as substitutes of conventional microparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 206, 110159. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.110159>
- Choi, J.-i., & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335-342. <https://doi.org/10.1007/s004490050394>
- Choi, S. Y., Cho, I. J., Lee, Y., Kim, Y. J., Kim, K. J., & Lee, S. Y. (2020). Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters. *Advanced Materials*, 32(35), 1907138. <https://doi.org/10.1002/adma.201907138>
- Christoph, R., Schmidt, B., Steinberner, U., Dilla, W., & Karinen, R. (2006). Glycerol, Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, Á. T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernández-de-Puelles, M. L., & Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111>
- Cunha, M., Fernandes, B., Covas, J. A., Vicente, A. A., & Hilliou, L. (2016). Film blowing of PHBV blends and PHBV-based multilayers for the production of biodegradable

- packages. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), n/a-n/a.
<https://doi.org/10.1002/app.42165>
- D'Arienzo, L., Acierno, S., Patti, A., & Di Maio, L. (2024). Cellulose/polyhydroxybutyrate (PHB) composites as a sustainable bio-based feedstock to 3D-printing applications. *Materials*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ma17040916>
- Da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30-39.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
- Dalgic, A. D., Koman, E., Karatas, A., Tezcaner, A., & Keskin, D. (2022). Natural origin bilayer pullulan-PHBV scaffold for wound healing applications. *Biomaterials Advances*, 134, 112554. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112554>
- Deshmukh, A. D., Pawar, S. V., & Rathod, V. K. (2020). Ultrasound-assisted fermentative production of Polyhydroxybutyrate (PHB) in *Cupriavidus necator*. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 153, 107923.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107923>
- Díaz-Montes, E., Yáñez-Fernández, J., & Castro-Muñoz, R. (2021). Dextran/chitosan blend film fabrication for bio-packaging of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15489>
- Dobrogojski, J., Spychalski, M., Luciński, R., & Borek, S. (2018). Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(9), 162.
<https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>
- Ebewele, R. O. (2000). *Effect of strain rate*. In *Polymer science and technology (Cap. I)*. CRC Press.
- European-bioplastics. (2016). *Research: Definition of bioplastics*. *European Bioplastics*. Retrieved (27 Septiembre 2024) from <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>
- Figuerola-Lopez, K. J., Vicente, A. A., Reis, M. A. M., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. M. (2019). Antimicrobial and antioxidant performance of various essential oils and natural extracts and their incorporation into biowaste derived poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) layers made from electrospun ultrathin fibers. *Nanomaterials*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/nano9020144>
- Funston, S. J., Tsaousi, K., Rudden, M., Smyth, T. J., Stevenson, P. S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7945-7956. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7564-y>

- Ganesh Saratale, R., Cho, S.-K., Dattatraya Saratale, G., Kadam, A. A., Ghodake, G. S., Kumar, M., Naresh Bharagava, R., Kumar, G., Su Kim, D., Mulla, S. I., & Seung Shin, H. (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>
- Gao, M., Liu, Y., & Song, Z. (2019). Effects of polyethylene microplastic on the phytotoxicity of di-n-butyl phthalate in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *ramosa* Hort). *Chemosphere*, 237, 124482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124482>
- Gao, Y., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Chen, G., Zhao, N., & Zhang, X. (2006). Improvement of mechanical properties of poly(dl-lactide) films by blending of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *European Polymer Journal*, 42(4), 764-775. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.09.028>
- García-Chumillas, S., Guerrero-Murcia, T., Nicolás-Liza, M., Monzó, F., Simica, A., Simó-Cabrera, L., & Martínez-Espinosa, R. M. (2024). PHBV cycle of life using waste as a starting point: from production to recyclability. *Frontiers in Materials*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmats.2024.1405483>
- Gonzalez-Garcia, R., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L., & Marcellin, E. (2017). Microbial propionic acid production. *Fermentation*, 3(2), 21. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020021>
- Goodfellow. (2025). *Supplier of materials for research and development*. Goodfellow. Retrieved 24/01/2025 from <https://www.goodfellow.com/>
- Greenfield, L. M., Graf, M., Rengaraj, S., Bargiela, R., Williams, G., Golyshin, P. N., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2022). Field response of N₂O emissions, microbial communities, soil biochemical processes and winter barley growth to the addition of conventional and biodegradable microplastics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 336, 108023. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108023>
- Grillo, R., Pereira, A. d. E. S., de Melo, N. F. S., Porto, R. M., Feitosa, L. O., Tonello, P. S., Filho, N. L. D., Rosa, A. H., Lima, R., & Fraceto, L. F. (2011). Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *Journal of Hazardous Materials*, 186(2), 1645-1651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.044>
- Han, J., Wu, L.-P., Hou, J., Zhao, D., & Xiang, H. (2015). Biosynthesis, characterization, and hemostasis potential of tailor-made Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Haloferax mediterranei*. *Biomacromolecules*, 16(2), 578-588. <https://doi.org/10.1021/bm5016267>

- Havstad, M. R. (2020). Chapter 5 - Biodegradable plastics. In T. M. Letcher (Ed.), *Plastic Waste and Recycling* (pp. 97-129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00005-0>
- He, Y., Hu, Z., Ren, M., Ding, C., Chen, P., Gu, Q., & Wu, Q. (2014). Evaluation of PHBHHx and PHBV/PLA fibers used as medical sutures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2), 561-571. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5073-4>
- Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A., Fasl, H., Stelzer, F., & Braunegg, G. (2013). Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea*, 2013, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/129268>
- Hernández-Alonso, J. U. (2021). *Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de polihidroxialcanoatos por Burkholderia thailandensis* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Tamaulipas].
- Huan, L., Jinghong, Y., & Shengyuan, L. (2011). The association between dibutyl phthalate (DBP)-induced testicular function damage and endocrine disorders. *Proceedings 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering*, 28-31. <https://doi.org/10.1109/HHBE.2011.6027889>
- Ibrahim, M. I., Alsafadi, D., Alamry, K. A., & Hussein, M. A. (2021). Properties and applications of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(4), 1010-1030. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01946-x>
- Intasian, P., Prakinee, K., Phintha, A., Trisrivirat, D., Weeranoppanant, N., Wongnate, T., & Chaiben, P. (2021). Enzymes, in vivo biocatalysis, and metabolic engineering for enabling a circular economy and sustainability. *Chemical Reviews*, 121(17), 10367-10451. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00121>
- International, A. (2010). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In (Vol. ASTM-D882-10). West Conshohocken, PA.
- Juengert, J. R., Bresan, S., & Jendrossek, D. (2018). Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining. *Bio-protocol*, 8(5), e2748-e2748. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2748>
- Junaid, M., Liu, S., Chen, G., Liao, H., & Wang, J. (2023). Transgenerational impacts of micro(nano)plastics in the aquatic and terrestrial environment. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130274>
- Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., De Bruyn, M., Clark, J. H., & Koutinas, A. A. (2014). Sunflower-based biorefinery: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol,

- sunflower meal and levulinic acid. *Bioresource Technology*, 172, 121-130.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.044>
- Kamal, R., Razzaq, A., Ali shah, K., Khan, Z. U., Khan, N. U., Menaa, F., Iqbal, H., & Cui, J. (2022). Evaluation of cephalexin-loaded PHBV nanofibers for MRSA-infected diabetic foot ulcers treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 71, 103349.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103349>
- Kamran, M., Haroon, M., Popoola, S. A., Almohammed, A. R., Al-Saadi, A. A., & Saleh, T. A. (2019). Characterization of valeric acid using substrate of silver nanoparticles with SERS. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 536-542.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.037>
- Kaniuk, Ł., Podborska, A., & Stachewicz, U. (2022). Enhanced mechanical performance and wettability of PHBV fiber blends with evening primrose oil for skin patches improving hydration and comfort. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(11), 1763-1774.
<https://doi.org/10.1039/d1tb02805g>
- Kaniuk, Ł., & Stachewicz, U. (2021). Development and advantages of biodegradable PHA polymers based on electrospun PHBV fibers for tissue engineering and other biomedical applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(12), 5339-5362.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00757>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2007). Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(6), 457-461.
<https://doi.org/10.1007/s10295-007-0207-7>
- Kim, H. S., Chen, J., Wu, L.-P., Wu, J., Xiang, H., Leong, K. W., & Han, J. (2020). Prevention of excessive scar formation using nanofibrous meshes made of biodegradable elastomer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Tissue Engineering*, 11, 2041731420949332. <https://doi.org/10.1177/2041731420949332>
- Kliem, S., Kreutzbruck, M., & Bonten, C. (2020). Review on the Biological degradation of polymers in various environments. *Materials*, 13(20), 4586.
<https://doi.org/10.3390/ma13204586>
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. In G. G.-Q. Chen (Ed.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (pp. 85-119). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5
- Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., & Reis, M. A. M. (2018). *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion

- of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresource Technology*, 247, 829-837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.138>
- Kumar, R., Barbhuiya, R. I., Bohra, V., Wong, J. W. C., Singh, A., & Kaur, G. (2023). Sustainable rhamnolipids production in the next decade – Advancing with *Burkholderia thailandensis* as a potent biocatalytic strain. *Microbiological Research*, 272, 127386. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127386>
- Lambert, S., & Wagner, M. (2017). Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chemical Society Reviews*, 46(22), 6855-6871. <https://doi.org/10.1039/c7cs00149e>
- Lebreton, L., Egger, M., & Slat, B. (2019). A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. *Scientific Reports*, 9(1), 12922. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49413-5>
- Lee, O. K., Kang, S. G., Choi, T.-R., Yang, Y.-H., & Lee, E. Y. (2023). Production and characterization of a biodegradable polymer, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), using the type II methanotroph, *Methylocystis* sp. MJC1. *Bioresource Technology*, 389, 129853. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129853>
- Li, Z., Yang, J., & Loh, X. J. (2016). Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*, 8(4), e265-e265. <https://doi.org/10.1038/am.2016.48>
- Liu, J., Zhao, Y., Diao, M., Wang, W., Hua, W., Wu, S., Chen, P., Ruan, R., & Cheng, Y. (2019). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Rhodospirillum rubrum* using a two-step culture strategy. *Journal of Chemistry*, 2019, 8. <https://doi.org/10.1155/2019/8369179>
- Liu, T., Hou, B., Zhang, Y., & Wang, Z. (2022). Determination of biological and molecular attributes related to polystyrene microplastic-induced reproductive toxicity and its reversibility in male mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), 14093. <https://doi.org/doi:10.3390/ijerph192114093>
- Loo, C.-Y., & Sudesh, K. (2007). Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(5), 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.11.003>
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K.-P., & Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.005>

- Markowicz, F., & Szymańska-Pulikowska, A. (2019). Analysis of the possibility of environmental pollution by composted biodegradable and oxo-biodegradable plastics. *Geosciences*, 9(11), 460. <https://doi.org/doi:10.3390/geosciences9110460>
- Martínez-Martínez, M. d. I. A., González-Pedrajo, B., Dreyfus, G., Soto-Urzúa, L., & Martínez-Morales, L. J. (2019). Phasin PhaP1 is involved in polyhydroxybutyrate granules morphology and in controlling early biopolymer accumulation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *AMB Express*, 9(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0876-4>
- Martínez-Sanz, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M. G. E., Majone, M., Reis, M., Lopez-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2014). Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. *New Biotechnology*, 31(4), 364-376. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.06.003>
- Masood, F., Hasan, F., Ahmed, S., & Hameed, A. (2012). Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* FA11 isolated from TNT-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1377-1384. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0386-3>
- MatWeb. (2023). *Online materials information resource*. MatWeb. <https://www.matweb.com/index.aspx>
- 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>
- Melendez-Rodriguez, B., Castro-Mayorga, J. L., Reis, M. A. M., Sammon, C., Cabedo, L., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. M. (2018). Preparation and characterization of electrospun food biopackaging films of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) derived from fruit pulp biowaste. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00038>
- Mendonça, T. T., Gomez, J. G. C., Buffoni, E., Sánchez Rodríguez, R. J., Schripsema, J., Lopes, M. S. G., & Silva, L. F. (2014). Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 815-829. <https://doi.org/10.1111/jam.12406>
- Meng, D.-C., Shen, R., Yao, H., Chen, J.-C., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2014). Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.013>
- Miscevic, D., Mao, J.-Y., Mozell, B., Srirangan, K., Abedi, D., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2021). Bio-based production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with

- modulated monomeric fraction in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(4), 1435-1446. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11108-1>
- Moll, E., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023). Release and antibacterial action of phenolic acids incorporated into PHBV films. *Food Packaging and Shelf Life*, 38, 101112. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101112>
- Myung, J., Flanagan, J. C. A., Waymouth, R. M., & Criddle, C. S. (2017). Expanding the range of polyhydroxyalkanoates synthesized by methanotrophic bacteria through the utilization of omega-hydroxyalkanoate co-substrates. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0417-y>
- Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2019). Environmental deterioration of biodegradable, oxo-biodegradable, compostable, and conventional plastic carrier bags in the sea, soil, and open-air over a 3-year period. *Environmental Science & Technology*, 53(9), 4775-4783. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06984>
- Nguyen, B., Claveau-Mallet, D., Hernandez, L. M., Xu, E. G., Farner, J. M., & Tufenkji, N. (2019). Separation and analysis of microplastics and nanoplastics in complex environmental samples. *Accounts of Chemical Research*, 52(4), 858-866. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00602>
- Onyszkiewicz, M., Gawrys-Kopczynska, M., Sałagaj, M., Aleksandrowicz, M., Sawicka, A., Koźniewska, E., Samborowska, E., & Ufnal, M. (2020). Valeric acid lowers arterial blood pressure in rats. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173086. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173086>
- Pathak, S., Sneha, C., & Mathew, B. B. (2014). Bioplastics: its timeline based scenario & challenges. *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem*, 2(4), 84-90. <https://doi.org/10.12691/jpbpc-2-4-5>
- Pérez-Arauz, A. O., Aguilar-Rabiela, A. E., Vargas-Torres, A., Rodríguez-Hernández, A. I., Chavarría-Hernández, N., Vergara-Porras, B., & López-Cuellar, M. R. (2019). Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 20, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>
- Policastro, G., Panico, A., & Fabbricino, M. (2021). Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), 479-513. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09575-z>
- Pracella, M., Mura, C., & Galli, G. (2021). Polyhydroxyalkanoate nanocomposites with cellulose nanocrystals as biodegradable coating and packaging materials. *ACS Applied Nano Materials*, 4(1), 260-270. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02585>

- Priya, A., Hathi, Z., Haque, M. A., Kumar, S., Kumar, A., Singh, E., & Lin, C. S. K. (2022). Effect of levulinic acid on production of polyhydroxyalkanoates from food waste by *Haloferax mediterranei*. *Environmental Research*, 214, 114001. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114001>
- Rackemann, D. W., & Doherty, W. O. S. (2011). The conversion of lignocellulosics to levulinic acid. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(2), 198-214. <https://doi.org/10.1002/bbb.267>
- Rajgadía, N., & Debnath, M. (2023). Biodegradable mulch utilizing bioplastic biopolymer polyhydroxyalkanoates. *Materials Today: Proceedings*, 79, 411-419. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.12.167>
- Requena, R., Vargas, M., & Chiralt, A. (2019). Eugenol and carvacrol migration from PHBV films and antibacterial action in different food matrices. *Food Chemistry*, 277, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.093>
- Reynoso, S. L. (2018). *Los Polímeros Plásticos: Los Conceptos Básicos que debes conocer durante y al salir de la Universidad*. Sara L Reynoso. <https://books.google.com.mx/books?id=fmZhEAAQBAJ>
- Rocha, R. C. S., da Silva, L. F., Taciro, M. K., & Pradella, J. G. C. (2008). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 427-431. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9480-x>
- Rodríguez-Cendal, A. I., Gómez-Seoane, I., de Toro-Santos, F. J., Fuentes-Boquete, I. M., Señarís-Rodríguez, J., & Díaz-Prado, S. M. (2023). Biomedical applications of the biopolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): drug encapsulation and scaffold fabrication. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/ijms241411674>
- Rujnić-Sokele, M., & Pilipović, A. (2017). Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management & Research*, 35(2), 132-140. <https://doi.org/10.1177/0734242X16683272>
- Sadreddini, S., Jodati, H., Evis, Z., & Keskin, D. (2023). Novel barium-doped-baghdadite incorporated PHBV-PCL composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 148, 106185. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106185>
- Saravanan, K., Umesh, M., & Kathirvel, P. (2022). Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): A review on biosynthesis, Properties, fermentation strategies and its prospective applications for sustainable future. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(12), 4903-4935. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02562-7>

- Sathya, A. B., Sivasubramanian, V., Santhiagu, A., Sebastian, C., & Sivashankar, R. (2018). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3995-4012. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1259-7>
- Shang, L., Yim, S. C., Park, H. G., & Chang, H. N. (2004). Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate fraction. *Biotechnology Progress*, 20(1), 140-144. <https://doi.org/10.1021/bp034232o>
- Sharma, V., Sehgal, R., & Gupta, R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and modifications. *Polymer*, 212, 123161. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>
- Sheu, D.-S., Chen, W.-M., Yang, J.-Y., & Chang, R.-C. (2009). Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5), 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.004>
- Silva, L. F., Gomez, J. G. C., Oliveira, M. S., & Torres, B. B. (2000). Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *Journal of Biotechnology*, 76(2), 165-174. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00184-4)
- Singh, R., Gautam, S., Sharma, B., Jain, P., & Chauhan, K. D. (2021). Chapter 2 - Biopolymers and their classifications. In S. Thomas, S. Gopi, & A. Amalraj (Eds.), *Biopolymers and their Industrial Applications* (pp. 21-44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819240-5.00002-X>
- Singh, S., Ghosh, C., Roy, P., & Pal, K. (2022). Biosynthesis of folic acid appended PHBV modified copper oxide nanorods for pH sensitive drug release in targeted breast cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 622, 121831. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121831>
- Siracusa, V., & Blanco, I. (2020). Bio-polyethylene (Bio-PE), bio-polypropylene (Bio-PP) and bio-poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent developments in Bio-based polymers analogous to petroleum-derived ones for packaging and engineering applications. *Polymers*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/polym12081641>
- Stan, F., Sandu, L. I., & Fetecau, C. (2014). Effect of processing parameters and strain rate on mechanical properties of carbon nanotube-filled polypropylene nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 59, 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2013.11.023>

- Strong, P., Laycock, B., Mahamud, S., Jensen, P., Lant, P., Tyson, G., & Pratt, S. (2016). The opportunity for high-performance biomaterials from methane. *Microorganisms*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010011>
- Tahmasebi, A., Shapouri Moghadam, A., Enderami, S. E., Islami, M., Kaabi, M., Saburi, E., Daei Farshchi, A., Soleimanifar, F., & Mansouri, V. (2020). Aloe vera–derived gel-blended PHBV nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *ASAIO Journal*, 66(8), 966-973. <https://doi.org/10.1097/mat.0000000000001094>
- Tan, D., Wang, Y., Tong, Y., & Chen, G.-Q. (2021). Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Trends in Biotechnology*, 39(9), 953-963. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.010>
- Tao, F., Song, H., & Chou, L. (2011). Catalytic conversion of cellulose to chemicals in ionic liquid. *Carbohydrate Research*, 346(1), 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.022>
- Torres-Giner, S., Hilliou, L., Melendez-Rodriguez, B., Figueroa-Lopez, K. J., Madalena, D., Cabedo, L., Covas, J. A., Vicente, A. A., & Lagaron, J. M. (2018). Melt processability, characterization, and antibacterial activity of compression-molded green composite sheets made of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) reinforced with coconut fibers impregnated with oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.05.002>
- Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2020). Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* with different 3HV fraction in shake flasks and bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(8), 1469-1478. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02340-6>
- Urtuvia, V., Ponce, B., Andler, R., & Díaz-Barrera, A. (2023). Relation of 3HV fraction and thermomechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Azotobacter vinelandii* OP. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127681. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127681>
- Van-Thuoc, D., Huu-Phong, T., Minh-Khuong, D., & Hatti-Kaul, R. (2015). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by a moderate halophile *Yangia* sp. ND199 using glycerol as a carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3120-3132. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1479-4>
- Wagle, A. R., Dixit, Y. M., & Vakil, B. V. (2019). Scale up studies for polyhydroxyalkanoate production by a *Bacillus flexus* strain with industrial potential. *Indian Journal of Microbiology*, 59(3), 383-386. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00807-z>

- Wang, Q., Ma, J., Chen, S., & Wu, S. (2023). Designing an innovative electrospinning strategy to generate PHBV nanofiber scaffolds with a radially oriented fibrous pattern. *Nanomaterials*, 13(7), 1150. <https://doi.org/doi:10.3390/nano13071150>
- Wang, Q., Zhang, S., Jiang, J., Chen, S., Ramakrishna, S., Zhao, W., Yang, F., & Wu, S. (2024). Electrospun radially oriented berberine-PHBV nanofiber dressing patches for accelerating diabetic wound healing. *Regenerative Biomaterials*, 11, rbae063. <https://doi.org/10.1093/rb/rbae063>
- Wang, Y., Chen, R., Cai, J., Liu, Z., Zheng, Y., Wang, H., Li, Q., & He, N. (2013). Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE*, 8(4), e60318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060318>
- Wang, Y., Yamada, S., Asakawa, N., Yamane, T., Yoshie, N., & Inoue, Y. (2001). Comonomer compositional distribution and thermal and morphological characteristics of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s with high 3-hydroxyvalerate content. *Biomacromolecules*, 2(4), 1315-1323. <https://doi.org/10.1021/bm010128o>
- Wang, Z., & Praetorius, A. (2022). Integrating a chemicals perspective into the global plastic treaty. *Environmental Science & Technology Letters*, 9(12), 1000-1006. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00763>
- Wellen, R. M. R., Rabello, M. S., Fachine, G. J. M., & Canedo, E. L. (2013). The melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. *Polymer Testing*, 32(2), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.11.001>
- Wu, X., Liu, Y., Yin, S., Xiao, K., Xiong, Q., Bian, S., Liang, S., Hou, H., Hu, J., & Yang, J. (2020). Metabolomics revealing the response of rice (*Oryza sativa* L.) exposed to polystyrene microplastics. *Environmental Pollution*, 266, 115159. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115159>
- Xia, L., Li, X., Fan, W., & Wang, J. (2022). Denitrification performance and microbial community of bioreactor packed with PHBV/PLA/rice hulls composite. *Science of The Total Environment*, 803, 150033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150033>
- Xue, M., Huang, R., Liu, W., Cheng, J., Liu, Y., Zhang, J., Wang, L., Liu, D., & Jiang, H. (2024). Identification and characterization of a potential strain for the production of polyhydroxyalkanoate from glycerol. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1413120>
- Yang, Z., Sun, H., Zhou, Q., Zhao, L., & Wu, W. (2020). Nitrogen removal performance in pilot-scale solid-phase denitrification systems using novel biodegradable blends for treatment of waste water treatment plants effluent. *Bioresource Technology*, 305, 122994. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122994>

- Ye, J.-P., Gong, J.-S., Su, C., Liu, Y.-G., Jiang, M., Pan, H., Li, R.-Y., Geng, Y., Xu, Z.-H., & Shi, J.-S. (2020). Fabrication and characterization of high molecular keratin based nanofibrous membranes for wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111158. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111158>
- Yeo, J. C. C., Muiruri, J. K., Thitsartarn, W., Li, Z., & He, C. (2018). Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 1092-1116. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>
- Yu, S. T., Lin, C. C., & Too, J. R. (2005). PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 40(8), 2729-2734. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.023>
- Zhang, X., Lin, Y., & Chen, G.-Q. (2018). Halophiles as chassis for bioproduction. *Advanced Biosystems*, 2(11), 1800088. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800088>
- Zhang, Y.-Z., Liu, G.-M., Weng, W.-Q., Ding, J.-Y., & Liu, S.-J. (2015). Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Journal of Biotechnology*, 195, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.014>
- Zhao, Y.-X., Rao, Z.-M., Xue, Y.-F., Gong, P., Ji, Y.-Z., & Ma, Y.-H. (2015). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon *Halogranum amylolyticum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(18), 7639-7649. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6609-y>
- Zhong, L., Hu, D., Qu, Y., Peng, J., Huang, K., Lei, M., Wu, T., Xiao, Y., Gu, Y., & Qian, Z. (2019). Preparation of adenosine-loaded electrospun nanofibers and their application in bone regeneration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 15(5), 857-877. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2761>
- Zhu, C., Nomura, C. T., Perrotta, J. A., Stipanovic, A. J., & Nakas, J. P. (2012). The effect of nucleating agents on physical properties of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Polymer Testing*, 31(5), 579-585. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.03.004>

10. Anexos

Anexo 1. Análisis estadístico

Tabla 10. Análisis de Varianza para $Y_{X/S}$

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	3	1.56807	72.36%	1.56807	0.522689	185.46	0.000
Tiempo	6	0.06216	2.87%	0.06216	0.010360	3.68	0.004
Medio*Tiempo	18	0.37902	17.49%	0.37902	0.021057	7.47	0.000
Error	56	0.15783	7.28%	0.15783	0.002818		
Total	83	2.16708	100.00%				

Tabla 11. Prueba post-hoc de Tukey para $Y_{X/S}$ ($\alpha = 0.05$)

Medio	N	Media	Agrupación
MBP	21	0.484623	A
MBP+AL	21	0.322512	B
MBP+AV	21	0.194662	C
MBP+PrS	21	0.125972	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 12. Análisis de Varianza para $Y_{P/X}$

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	3	1.45057	67.45%	1.36688	0.455627	245.63	0.000
Tiempo	5	0.06051	2.81%	0.09254	0.018507	9.98	0.000
Medio*Tiempo	15	0.53920	25.07%	0.53920	0.035947	19.38	0.000
Error	54	0.10016	4.66%	0.10016	0.001855		
Total	77	2.15044	100.00%				

Tabla 13. Prueba post-hoc de Tukey para $Y_{P/X}$ ($\alpha = 0.05$)

Medio	N	Media	Agrupación
MBP	15	0.386498	A
MBP+AL	14	0.341967	A
MBP+AV	18	0.231096	B
MBP+PrS	31	0.053953	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 14. Análisis de Varianza para Módulo de Young

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Laminas	2	1806531	83.19%	1806531	903265	14.85	0.005
Error	6	365031	16.81%	365031	60838		
Total	8	2171561	100.00%				

Tabla 15. Prueba post-hoc de Tukey para Módulo de Young ($\alpha = 0.05$)

Laminas	N	Media	Agrupación
PHB	3	1194	A
PHB-STD	3	358.6	B
PHBV	3	159.6	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 16. Análisis de Varianza para resistencia a la tracción

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Laminas	2	89.06	79.40%	89.06	44.531	11.56	0.009
Error	6	23.11	20.60%	23.11	3.851		
Total	8	112.17	100.00%				

Tabla 17. Prueba post-hoc de Tukey para resistencia a la tracción ($\alpha = 0.05$)

Laminas	N	Media	Agrupación
PHB	3	9.96	A
PHB-STD	3	3.468	B
PHBV	3	3.127	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis para % elongación

Laminas	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
PHB	3	0.8750	2.3	-2.07
PHB-STD	3	1.0875	4.7	-0.26
PHBV	3	3.0500	8.0	2.32
General	9		5.0	

Tabla 19. Prueba de comparación por el método Dunn's para % elongación ($\alpha = 0.05$)

<u>Laminas</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
PHBV	3	3.137	A
PHB-STD	3	1.0833	B
PHB	3	0.9333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 2. Fórmulas

$$\mu = \frac{\ln X_F - \ln X_0}{\Delta t}$$

μ = Tasa específica de crecimiento (h^{-1})

X_0 = Biomasa inicial (Fase exponencial) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

X_F = Biomasa final (Fase exponencial) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Δt = tiempo de duración de la fase exponencial (h)

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

td = Tiempo de duplicación (h)

μ = Tasa específica de crecimiento (h^{-1})

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = Y_{X/S} = \frac{X_F - X_0}{S_0 - S_F}$$

$Y_{X/S}$ = Rendimiento biomasa/sustrato ($\text{gX}\cdot\text{gS}^{-1}$)

X_0 = Biomasa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

X_F = Biomasa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

S_0 = Sustrato inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

S_F = Sustrato Final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = Y_{P/X} = \frac{P_F - P_0}{X_F - X_0}$$

$Y_{X/S}$ = Rendimiento producto/biomasa ($\text{gP} \cdot \text{gX}^{-1}$)

X_0 = Biomasa inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_F = Biomasa final ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

P_0 = Producto inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

P_F = Producto Final ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$$\%X_c = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m \text{ polímero}}^{100\%}} \right) \cdot 100$$

$\%X_c$ = Porcentaje de cristalización (%)

ΔH_m = Entalpía de fusión ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)

$\Delta H_{m \text{ poímero}}^{100\%}$ = Entalpía de fusión teórica del polímero a evaluar cuando presenta 100% cristalinidad ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

E = Módulo de Young (Mpa)

σ = Tensión uniaxial (Mpa)

ε = Deformación unitaria (mm/mm)

$$\%EL = \frac{L_F - L_0}{L_0} \cdot 100$$

$\%EL$ = Elongación de rotura (%)

L_0 = Longitud inicial (mm)

L_F = Longitud final (mm)

Anexo 3. Curvas de calibración

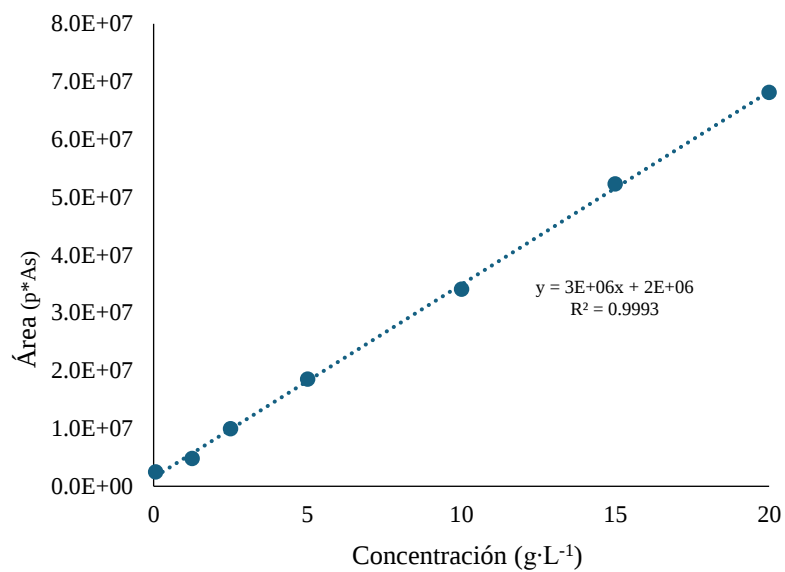


Figura 14. Curva de calibración para glicerol

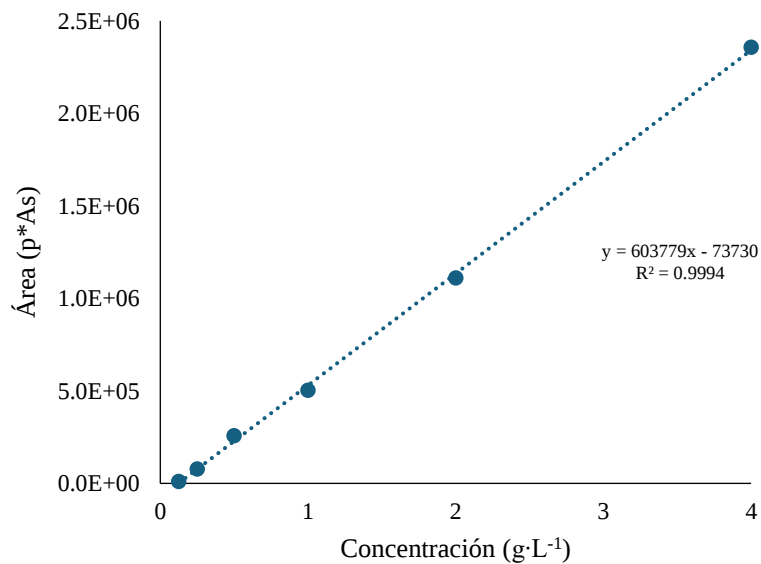


Figura 15. Curva de calibración para AL

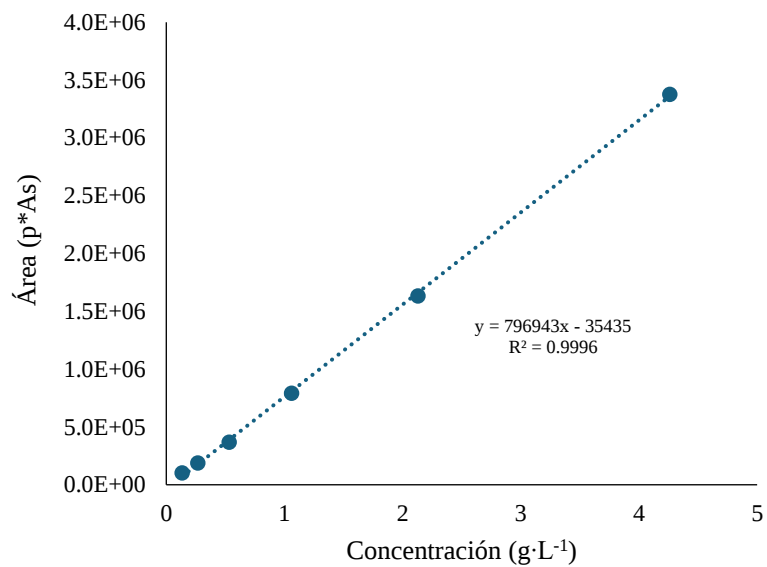


Figura 16. Curva de calibración para AV

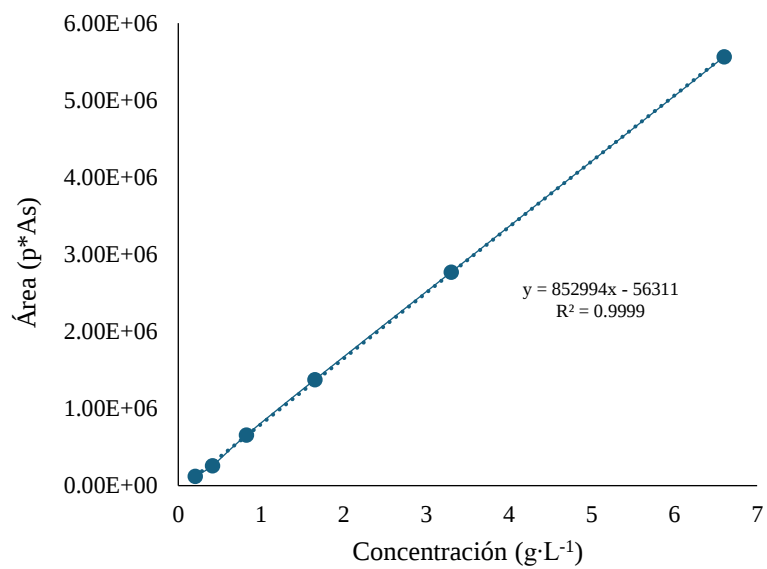


Figura 17. Curva de calibración para PrS

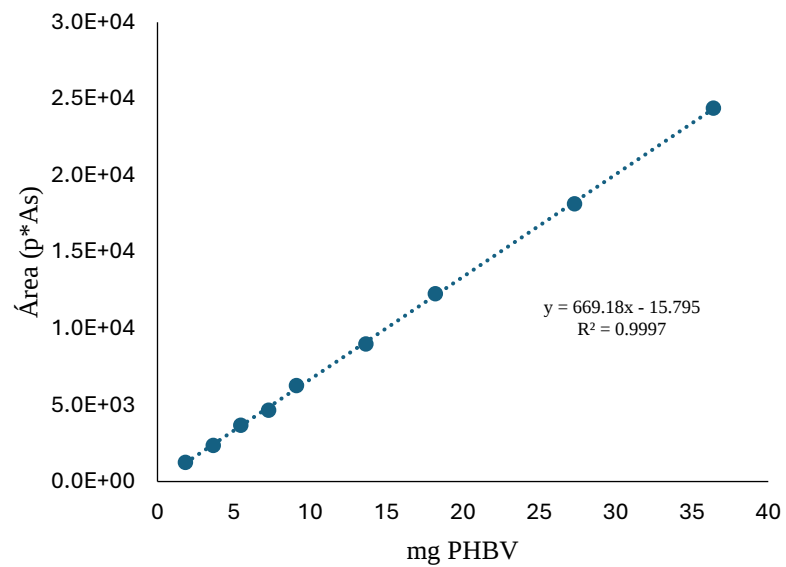


Figura 18. Curva de calibración para monómero 3HB

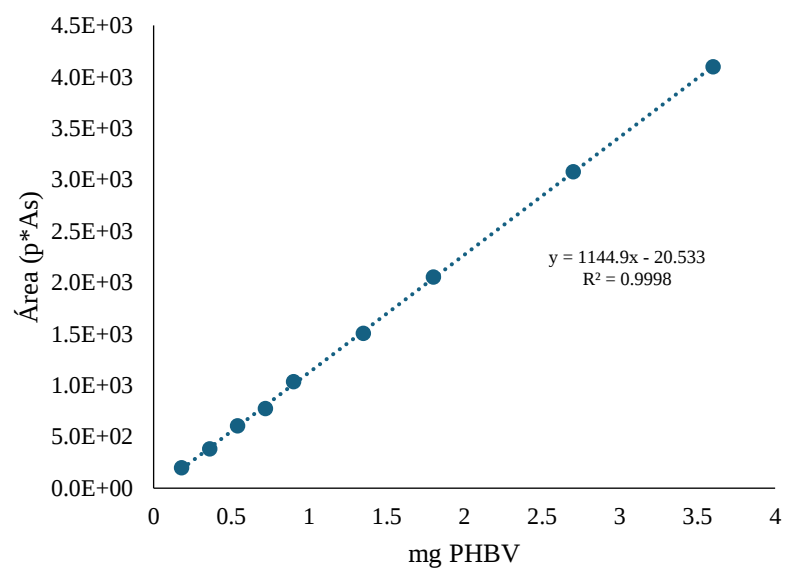
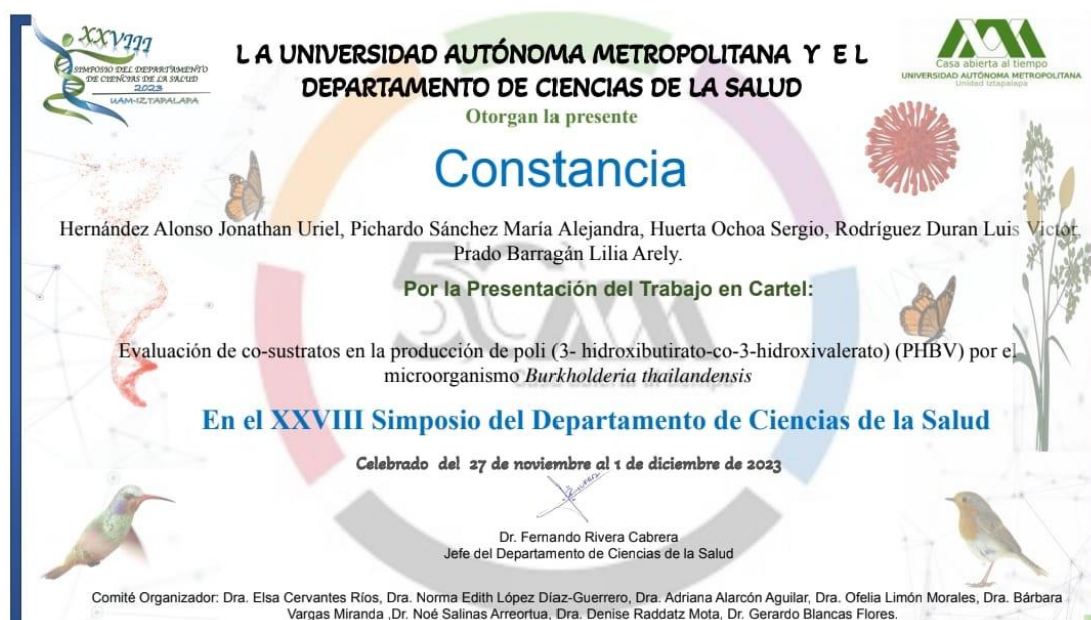


Figura 19. Curva de calibración para monómero 3HV

Anexo 4. Productos del trabajo







Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00323

Matrícula: 2223801850

Evaluación de co-sustratos
en la producción de Poli
(3-hidroxibutirato-co-3-
hidroxivalerato) (PHBV) por
Burkholderia thailandensis
E264.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas
del día 21 del mes de febrero del año 2025 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ
DR. OLIVERIO SANTIAGO RODRIGUEZ FERNANDEZ
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DE: JONATHAN URIEL HERNANDEZ ALONSO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del
Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad
Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado
resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al
interesado el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

VOCAL

DR. OLIVERIO SANTIAGO RODRIGUEZ
FERNANDEZ

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO