



CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN ELECTROQUÍMICA, S.C.

Optimización de la producción de un metabolito redox usando
aguas residuales como sustrato

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

Maestro en Ciencia y Tecnología
con la Especialidad de Ingeniería Ambiental

PRESENTA

Ing. Mayra Leticia Figueroa Magallón

Santiago de Querétaro, Qro., México, 20 de agosto del 2020.

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR
Ing. Mayra Leticia Figueroa Magallón

DIRIGIDA POR
Dra. María Yolanda Reyes Vidal

SINODALES

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez
Presidente

Firma

Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela
Secretario

Firma

M. en C. Jesús Cárdenas Mijangos
Vocal

Firma



**Este trabajo fue realizado en el Centro de
Investigación y Desarrollo Tecnológico en
Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección de**

Dra. María Yolanda Reyes Vidal



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Coordinador de Posgrado
PICYT – CIDETEQ
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del comité tutorial de la alumna MAYRA LETICIA FIGUEROA MAGALLON, una vez leída y revisada la Tesis **“OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN METABOLITO REDOX USANDO AGUAS RESIDUALES COMO SUSTRATO”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar a grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de INGENIERIA AMBIENTAL durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmó la presente el 23 del mes de junio del año dos mil veinte.

Dra. Linda Victoria González Gutiérrez

Dra. Irma Robles Gutiérrez

Dr. Fabricio Espejel Ayala

Dra. María Yolanda Reyes Vidal



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Coordinador de Posgrado
PICYT – CIDETEQ
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Examen de Grado de la alumna MAYRA LETICIA FIGUEROA MAGALLON, una vez leída y revisada la Tesis “OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN METABOLITO REDOX USANDO AGUAS RESIDUALES COMO SUSTRATO”, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de INGENIERIA AMBIENTAL durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmó la presente el 18 del mes de agosto del año dos mil veinte.

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez
Presidente

Dr. Francisco Javier Bacame Valenzuela
Secretario

M. en C. Jesús Cárdenas Mijangos
Vocal

**Este proyecto se realizó con recursos del Fondo SEP-
CONACYT-Ciencia Básica. Fondo Sectorial de Investigación
para la Educación. Proyecto No. 258159. Convocatoria CB-
2015-01**

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa produce piocianina como metabolito mayoritario, el cual presenta diferentes propiedades, principalmente su capacidad redox, con aplicación en la producción de corriente eléctrica en celdas de combustible microbianas, una configuración de los sistemas bioelectroquímicos. Se han realizado trabajos para optimizar el proceso de obtención, así como, el diseño de medios de cultivo definidos que incrementen los rendimientos. Sin embargo, los costos asociados a tales medios pueden tener efecto negativo para su escalamiento a proceso industrial. Así, los procesos para la utilización de los efluentes industriales como medio de cultivo pueden ser una alternativa, considerando la valorización de efluentes industriales para la obtención de productos de alto valor. La industria nixtamalera produce un efluente en grandes volúmenes con características fisicoquímicas que rebasan los límites establecidos por las normas ambientales vigentes como valores altos de pH y demanda química de oxígeno, considerándolo tóxico al medio ambiente. Sin embargo, algunos otros parámetros son de interés biotecnológico como la concentración de materia orgánica, especialmente carbohidratos que pueden ser utilizados como fuente de carbono para el cultivo de microorganismos. En este trabajo se utilizó un diseño estadístico de experimentos para optimizar la producción de piocianina, en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, usando como medio de cultivo las aguas residuales del proceso de nixtamalización. Los resultados del diseño estadístico indicaron una producción optimizada máxima de piocianina de 2.803 $\mu\text{m}/\text{mL}$, usando el agua residual de la industria nixtamalera como sustrato. Las condiciones experimentales optimizadas fueron evaluadas en *P. aeruginosa* NEJ01R, una cepa silvestre, y *P. aeruginosa* ATCC 39327, una cepa de referencia. Para explicar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre la obtención del metabolito redox como resultado del consumo del medio se midieron las concentraciones de sólidos totales, sólidos solubles, sólidos insolubles y cenizas.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa produces pyocyanin as the principal metabolite, with different properties mainly its redox capacity. This activity has application in the production of electric current in microbial fuel cells, a configuration of bioelectrochemical systems. Diverse reports have been carried out to optimize the production process, as well as the design of defined culture media that increase yields. However, the costs associated with such media can have a negative effect on their scaling up to an industrial process. Thus, the use of industrial wastewaters as culture medium can be an alternative, considering valorization of that industrial effluents to obtain value added products. The maize-nixtamal industry produces a wastewater in large volumes with physicochemical characteristics that exceed the limits established by current environmental regulations such as high pH values and chemical oxygen demand, considered toxic to environment. However, some other parameters are of biotechnological interest such as concentration of organic matter, especially carbohydrates that can be used as a carbon source for microorganism's culture. In this work, a statistical design of experiments was used to optimize pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* cultures, using the wastewater from the nixtamalization process as a culture medium. The results of statistical design indicated a maximum optimized production of pyocyanin of 2.803 $\mu\text{m}/\text{mL}$, in wastewater from the nixtamal industry used as substrate. Optimized experimental conditions were evaluated in *P. aeruginosa* NEJ01R, a wild strain, and *P. aeruginosa* ATCC 39327, a reference strain. To explain the effect of different culture conditions on obtaining the redox metabolite as a result of the consumption of the medium, the concentrations of total solids, soluble solids, insoluble solids and ashes were measured.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y por el financiamiento a través del proyecto 258159 para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por las instalaciones y recursos necesarios que me permitieron cursar mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis, la Dra. Ma. Yolanda Reyes Vidal, por su enseñanza, soporte y discusión crítica, además por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo a la cual considero mi familia institucional.

Gracias al Dr. Fabricio Espejel Ayala, M. en C. Jesús Cárdenas Mijangos, Dra. Irma Robles Gutiérrez, y Dra. Beatriz Liliana España por haber participado en mi formación de posgrado para alcanzar los objetivos de este proyecto.

Al Dr. Francisco Javier Bacame Valezuela, gracias por guiarme y asesorarme en el arte de hacer ciencia. Gracias por enseñarme a admirar y respetar su profesión, pero sobre todo gracias por su amistad.

A mi amado esposo, Arnold Hernández Palomares, gracias por ser mi motivación cada día, por no soltar mi mano para que yo lograré mis sueños debido a que tú me has enseñado que con paciencia y perseverancia todo se puede lograr. Gracias gordo.

A mis padres, Ricardo Figueroa López y Leticia Magallón García. Gracias por que las lecciones más importantes las aprendí en casa, pues con ellas he forjado los cimientos de mi vida profesional pues este logro al día de hoy me permite demostrarles lo valioso de sus consejos y esfuerzos.

A mis hermanos Ricardo Figueroa Magallón y Pamela Euridice Figueroa Magallón por ser mis mejores amigos e impulsarme a ser mejor persona, a mis pequeños sobrinos que siempre me reciben con los brazos abiertos y una sonrisa maravillosa (Euridice, Christopher y Melina).

A mi Familia Hernández (Sr. Juan y Sra. I. Adela) por estar presentes en mi vida.

A mis amados abuelitos Luz María López Valdovinos, José Luis Figueroa Silva por mostrarme lo bello y simple que es la felicidad, a Ma. del Carmen García Arredondo, gracias por no olvidarme. A Francisco Magallón Castillo por siempre estar.

A Pamela García, Persa Sachenka, Marlen Trejo, Roberto Castán, Jesús Pérez y Roberto Posadas. Por brindarme su amistad y apoyo en este trayecto tan importante, no hubiese sido lo mismo sin ustedes.

Gracias a todos aquellos que contribuyeron en mi formación académica para que este sueño se hiciera realidad.

Índice

RESUMEN	7
A B S T R A C T	8
Índice de Figuras	12
Índice de Tablas	13
Introducción	15
Justificación	18
Hipótesis	19
Objetivos	19
1. Marco Teórico.....	20
1.1. Metabolitos redox	20
1.2. <i>Pseudomonas</i>	20
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.2.2. Piocianina	22
1.3. Producción de piocianina a partir de sustratos convencionales	25
1.4. Producción de piocianina a partir de sustratos no convencionales.....	26
1.5. Valorización de residuos	27
1.6. Industria del nixtamal	28
1.6.1. Efluentes de la industria del nixtamal.....	31
1.6.2. Tratamiento para los efluentes de la industria del nixtamal.....	32
1.7.1 Selección de variables de respuesta.....	35
1.7.2 Factores y niveles en el diseño de experimentos	35
1.7.3 Réplicas	36
1.7.4 Aleatorización.....	36
1.7.5 Prueba F de Fisher.....	36
1.7.5 Optimización.....	36
1.7.6 Diseño de superficie de respuesta	37
1.7.7 Diseño Box-Benhken	37
2. Materiales y métodos.....	38
2.1. Obtención de fracciones del nejayote	38
2.1.1 Obtención de nejayote crudo.....	38

2.1.2 Obtención de clarificado, retenido y filtrado	38
1.1. Cultivo del pre-inóculo	39
1.2. Píocianina	40
2.1.1. Determinación de píocianina	40
1.3. Biomasa	41
2.1.2. Determinación de biomasa	41
1.4. Características fisicoquímicas de los diferentes sustratos	42
2.1.3. Sólidos totales.....	42
2.1.4. Sólidos insolubles.....	42
2.1.5. Sólidos solubles.....	43
2.1.6. Cenizas	43
2.6. Diseño de experimentos.....	44
1.5.1. Optimización.....	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.1. Diseño de experimentos.....	46
3.2. Análisis del efecto de los factores sobre las variables de respuesta (píocianina y biomasa) mediante el diseño de experimentos Box-Benhenk.....	47
3.2.1. Análisis de la producción de píocianina y biomasa usando nejayote crudo como sustrato.	49
3.2.2. Análisis de la producción de píocianina y biomasa usando nejayote clarificado como sustrato.....	55
3.1.3. Análisis de la producción de píocianina y biomasa usando la fracción retenida como sustrato.....	62
3.1.4. Análisis de la producción de píocianina y biomasa usando la fracción filtrada como sustrato.....	68
3.2. Evaluación de las condiciones optimizadas para la producción de píocianina y biomasa en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> NEJ01R y ATCC 39327.....	75
3.3. Caracterización fisicoquímica del nejayote y sus fracciones.....	77
CONCLUSIONES.....	80
Referencias	82

Índice de Figuras

Figura 1. Molécula de piocianina (Alzahrani & Alqahtani, 2016).....	22
Figura 2. Biosíntesis de piocianina a partir de ácido fenazina-1-carboxílico, un derivado de la vía del ácido shikimico (Parsons y col., 2007).....	25
Figura 3. Proceso de nixtamalización (González, 2015).	30
Figura 4. Proceso de ultrafiltración.....	39
Figura 5. Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NEJ01R.....	40
Figura 6. Extracción de piocianina en su fase orgánica.....	41
Figura 7. Determinación de piocianina (El-Fouly y col., 2015).....	41
Figura 8. Determinación de biomasa (Bonham, 1989).	42
Figura 9. Determinación de sólidos totales (APHA, 1992).	42
Figura 10. Sólidos insolubles (Chen, 2007).....	43
Figura 11. Determinación de sólidos solubles (Chen, 2007).....	43
Figura 12. Determinación de cenizas (Chen, 2007).....	44
Figura 13. Producción de piocianina en sustrato crudo y tres fracciones (clarificado, retenido y filtrado).....	47
Figura 14. Diagrama de Pareto estandarizado para la variable piocianina en sustrato crudo.	51
Figura 15. Gráfica de efectos principales para la producción de piocianina en sustrato crudo.	52
Figura 16. Diagrama de contornos de superficie de respuesta para los factores: Temperatura y pH.	53
Figura 17. Diagrama de superficie de respuesta para la producción de piocianina en el sustrato crudo.	54
Figura 18. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de piocianina en nejayote clarificado usado como sustrato.	58
Figura 19. Gráfica de efectos principales para la producción de piocianina en nejayote clarificado usado como sustrato.....	59
Figura 20. Diagrama de contornos de superficie de respuesta para los factores de temperatura y pH.	60
Figura 21. Diagrama de superficie de respuesta para la producción de piocianina en nejayote clarificado usado como sustrato.	60
Figura 22. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de piocianina en la fracción retenida usada como sustrato.	64
Figura 23. Gráfica de efectos principales para la producción de piocianina usando la fracción retenida como sustrato.....	65
Figura 24. Diagrama de contornos de superficie de respuesta para los factores temperatura y pH.	66
Figura 25. Diagrama de superficie de respuesta para la producción de piocianina en la fracción retenida usada como sustrato.	67
Figura 26. Diagrama de Pareto estandarizado para la producción de piocianina en la fracción filtrada usada como sustrato.	71
Figura 27. Gráfica de efectos principales para la producción de piocianina usando la fracción filtrada como sustrato.....	72

Figura 28. Diagrama de contornos de superficie de respuesta para los factores temperatura y pH.	73
Figura 29. Diagrama de superficie de respuesta para los factores de temperatura y pH.	73
Figura 30. Caracterización fisicoquímica del nejayote y sus fracciones Sólidos totales (S.T), Sólidos insolubles (S.I.), Sólidos Solubles (S.S).	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas</i> (Brenner, 2005).	20
Tabla 2. Piocianina y sus aplicaciones	24
Tabla 3. Medios de cultivo para la obtención de piocianina a partir de <i>P. aeruginosa</i>	26
Tabla 4. Obtención de piocianina usando sustratos no convencionales para el cultivo de <i>P. aeruginosa</i>	27
Tabla 5. Composición fisicoquímica del nejayote (Valderrama-Bravo y col., 2012).	31
Tabla 6. Factores y sus niveles.	46
Tabla 7. Diseño Box-Behnken.....	46
Tabla 8. Concentraciones de biomasa y piocianina usando nejayote crudo como sustrato.	49
Tabla 9. Análisis de varianza para piocianina en el sustrato crudo (GI: Grados de libertad).....	50
Tabla 10. Valores optimizados con efecto de los tres factores sobre la obtención de piocianina en sustrato crudo.	54
Tabla 11. Análisis de varianza para la producción de biomasa con nejayote crudo como sustrato.	55
Tabla 12. Concentraciones de biomasa y piocianina en cultivos usando nejayote clarificado como sustrato.	56
Tabla 13. Análisis de varianza para la producción de piocianina en el sustrato clarificado (GI: grados de libertad).	57
Tabla 14. Valores optimizados con efecto de los tres factores sobre la obtención de piocianina usando clarificado como sustrato.	61
Tabla 15. Análisis de varianza para la producción de biomasa usando la fracción de clarificado como sustrato.	61
Tabla 16. Concentraciones de biomasa y piocianina en cultivos usando la fracción retenida como sustrato.	62
Tabla 17. Análisis de varianza para piocianina en el sustrato retenido (GI: grados de libertad).....	63
Tabla 18. Valores optimizados con efecto de los tres factores sobre la obtención de piocianina usando la fracción retenida como sustrato.	67
Tabla 19. Análisis de varianza para la producción de biomasa usando la fracción retenida como sustrato.	68
Tabla 20. Concentraciones de biomasa y piocianina usando la fracción filtrada como sustrato.	69
Tabla 21. Análisis de varianza para piocianina en el sustrato de la fracción filtrada (GI: grados de libertad).....	70
Tabla 22. Valores optimizados con efecto de los tres factores sobre la obtención de piocianina usando filtrado como sustrato.	74

Tabla 23. Análisis de varianza para la producción de biomasa usando la fracción filtrada como sustrato.	74
Tabla 24. Comparación de los valores optimizados contra los valores experimentales de la producción de piocianina en dos cepas de <i>P. aeruginosa</i>	75
Tabla 25. Comparación de la producción de piocianina y biomasa para las dos cepas de <i>P. aeruginosa</i> en sustrato y fracciones de nejayote	76

Introducción

Alrededor del 95% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* producen piocianina, un metabolito redox. Un metabolito es una molécula intermediaria, simple o compleja, que se produce durante los distintos procesos metabólicos que se llevan a cabo en cualquier organismo. Estas moléculas se clasifican en primarias y secundarias, siendo primarias aquellas que participan en funciones metabólicas esenciales y directamente en el desarrollo y crecimiento del microorganismo (azúcares, grasas, proteínas, etc.). Por otro lado, la ausencia de los metabolitos secundarios no impide el desarrollo y crecimiento del microorganismo, aunque en algunos casos, la falta de estos puede tener graves efectos. Ambos tipos de metabolitos se distribuyen de manera diferencial entre grupos taxonómicos limitados, pero cada vez se encuentra mayor interés en su investigación, por las diversas actividades biológicas atribuidas, funcionando como antibióticos, insecticidas, herbicidas, entre otros (Croteau y col., 2000). La obtención de estos metabolitos implica la recolección de muestras, aislamiento, cultivo de cepas y extracción. Algunos de los factores considerados más importantes es la selección de los parámetros de cultivo, tanto ambientales como la composición del medio de cultivo, ya que esto en su mayoría, determina la concentración del metabolito producido por el microorganismo. Un ejemplo común sobre la aplicación industrial de la producción de metabolitos por microorganismos es la obtención de antibióticos, realizando un gran esfuerzo en investigación para optimizar la producción de estos.

P. aeruginosa produce piocianina como metabolito mayoritario, el cual presenta diferentes propiedades, principalmente su capacidad redox, con aplicación en la producción de corriente eléctrica en celdas de combustible microbianas, una configuración de los sistemas bioelectroquímicos. Siendo útil también su adición para el caso de las celdas de combustible inoculadas con microorganismos que no son productoras de metabolitos redox. Dentro de su diversa actividad biológica, piocianina se relaciona con los sistemas de quorum sensing (comunicación celular), así como también se destaca por su capacidad antimicrobiana. Por ello, se han

realizado trabajos para optimizar el proceso de obtención, así como, diseño de medios de cultivo definidos incrementando los rendimientos. Sin embargo, los costos asociados a tales medios pueden tener efecto no redituable para su escalamiento a nivel piloto o proceso industrial. Así, los procesos para la utilización de los efluentes industriales como medio de cultivo pueden ser una alternativa, considerando la valorización de efluentes industriales para la obtención de productos de alto valor.

La industria nixtamalera produce un efluente en grandes volúmenes con características fisicoquímicas que rebasan los límites establecidos por las normas ambientales vigentes como valores altos de pH y demanda química de oxígeno, considerado como altamente contaminante. Sin embargo, algunos otros parámetros son de interés biotecnológico como la concentración de materia orgánica, especialmente carbohidratos que pueden ser utilizados como fuente de carbono para el cultivo de microorganismos.

Cuando se usan medios de cultivo complejos obtenidos de efluentes o residuos, resulta importante aplicar diseños estadísticos para encontrar las condiciones óptimas que permitan maximizar la variable de respuesta. Esto se logra mediante el diseño estadístico de experimentos, siendo la forma más eficaz de hacer pruebas estadísticas, que consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera.

Además, es posible obtener datos que al ser analizados estadísticamente proporcionen evidencias objetivas para responder interrogantes planteadas y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras (Gutiérrez, 2008). Por ello, en este trabajo se utilizó un diseño estadístico de experimentos para optimizar la producción de piocianina, un metabolito redox, en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, usando como medio de cultivo las aguas residuales del proceso de nixtamalización.

Los resultados del diseño estadístico indicaron que una producción optimizada máxima de piocianina de 2.225 $\mu\text{m}/\text{mL}$ puede ser obtenida en el agua residual de

la industria nixtamalera sin tratamiento (nejayote crudo), usando como condiciones de cultivo: pH = 6, temperatura = 31 °C y agitación = 38 rpm. Mientras que la mínima concentración bajo condiciones optimizadas sería de 1.186 µm/mL, con pH = 8, temperatura = 28 y agitación = 83 rpm. También se obtuvieron las condiciones optimizadas para usar las fracciones de clarificado y retenido, con concentraciones de piocianina de 1.202 µm/mL y 1.547 µm/mL, respectivamente. Estas condiciones fueron evaluadas sobre cultivos experimentales de *P. aeruginosa* NEJ01R, una cepa silvestre, y *P. aeruginosa* ATCC 39327, una cepa de referencia. Para explicar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre la obtención del metabolito redox como resultado del consumo del medio se midieron las concentraciones de sólidos totales, sólidos solubles, sólidos insolubles y cenizas.

Justificación

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R se ha identificado como productora de piocianina usando medios de cultivo definidos como el medio de cultivo Luria Bertani, llegando hasta la optimización de la producción del metabolito secundario referido. Estos medios de cultivo son estandarizados para metodologías en laboratorio, sin embargo, la valorización de efluentes señala la posibilidad de usar a los efluentes industriales como medios de cultivo. Representando, además un bajo o nulo costo para el proceso de producción de dicho metabolito. Por esto es necesario, establecer la viabilidad del uso de ciertos efluentes como sustrato para el crecimiento de microorganismos, hasta determinar las condiciones óptimas para la producción de la biomasa o de algún metabolito de alto valor. Los efluentes de la industria nixtamalera han demostrado que son un sustrato adecuado para el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, no se han establecido las condiciones adecuadas, de pH, temperatura y agitación, para el cultivo de *P. aeruginosa* NEJ01R, y tampoco para la producción de piocianina, un metabolito redox, asociado a dicha bacteria.

Hipótesis

La producción optimizada y alta concentración de piocianina, un metabolito redox de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, se obtendrá en fracciones del nejayote diferentes al efluente crudo.

Objetivos

Objetivo general

Establecer la producción óptima de piocianina en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, usando tres fracciones del nejayote y el sustrato crudo, a través de un diseño de experimentos tipo Box Behnken.

Objetivos particulares

- ❖ Obtener tres fracciones del efluente crudo mediante tratamiento fisicoquímico (una fracción) y por membranas de ultrafiltración (dos fracciones).
- ❖ Obtener el diseño de experimentos Box Behnken para la optimización de la producción de piocianina en cultivos de *P. aeruginosa* NEJ01R, usando como factores: pH, temperatura y agitación, con cinco puntos centrales.
- ❖ Determinar los valores óptimos de la concentración de piocianina en cultivos de *P. aeruginosa* NEJ01R, usando el diseño experimental obtenido previamente, y la combinación de factores optimizada en las fracciones del sustrato y nejayote crudo.
- ❖ Evaluar las condiciones optimizadas (temperatura, pH y agitación) de la producción de piocianina por *P. aeruginosa* NEJ01R, y compararlas contra la producción de piocianina por *P. aeruginosa* ATCC 39327.
- ❖ Determinar sólidos solubles, sólidos insolubles, sólidos totales y cenizas en las fracciones obtenidas y el sustrato crudo, antes y después de la producción de piocianina.

1. Marco Teórico

1.1. Metabolitos redox

Los mediadores redox son moléculas orgánicas que pueden ser reversiblemente oxidadas y reducidas, por lo cual se usan como transportadores de electrones en múltiples reacciones redox. En los sistemas bioelectroquímicos, los mediadores redox pueden funcionar como aceptor final de electrones para la respiración microbiana y como acarreador de electrones entre el donador de electrones (microorganismo) y un material inerte aceptor de electrones (electrodo); además también pueden funcionar como donador de electrones para la reducción microbiológica de aceptores de electrones oxidados, impactando significativamente en la conversión redox de distintos contaminantes orgánicos e inorgánicos (Alvarez y col., 2013). Por ejemplo, en las celdas de combustible microbianas, en donde se puede oxidar más rápido el electrodo, lo que causa una disminución en las pérdidas por exceso de potencial (Rabaey y col., 2005).

1.2. *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia Pseudomonadaceae, situado dentro del orden Pseudomonadales y que comprende la familia Moraxellaceae (Brenner, 2005). En la Tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas* (Brenner, 2005).

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i>

Los miembros del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativo aerobios, no fermentadores, poseen oxidasa y catalasa positiva. La mayoría de las especies cuentan con fimbrias y pilis, además de tener movilidad gracias a un flagelo o un mechón de dos o tres flagelos. Debido a que este género puede utilizar como fuente de carbono una gran variedad de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos, tiene la capacidad de crecer en cualquier medio sin importar que este se encuentre enriquecido o no, también son capaces de crecer a una temperatura de 42 °C, siendo 37 °C su temperatura óptima y no son capaces de crecer a 4 °C. Se conocen algunas cepas de *Pseudomonas* capaces de producir pigmentos con cualidades antibacterianas sobre otras bacterias, algunos de estos pigmentos son la pioverdina (amarillo verdoso), la piocianina (azul verdoso), la fluoresceína (amarillo) y la piorrubina (rojo-pardo) (Moore y col., 2006).

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo con forma recta ligeramente curvada y con un tamaño de 1.5 a 5 µm de largo por 1.5 a 1 µm de ancho. Cuenta con pared celular de estructura y composición compleja y semejante a las de los microorganismos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae, estos presentan un esqueleto de peptidoglicano y la membrana externa compuesta de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (Strateva & Yordanov, 2009). A pesar de que *P. aeruginosa* posee un metabolismo aerobio, puede crecer bajo condiciones anaerobias utilizando nitrato o arginina como aceptor final de electrones, además, se diferencia de otras especies por la producción de ácidos a partir de glucosa y xilosa, pero no a partir de lactosa o sacarosa (Breidenstein y col., 2011).

P. aeruginosa es considerado un patógeno oportunista relacionado frecuentemente con infecciones nosocomiales que pueden afectar gravemente a pacientes inmunocomprometidos. Esta bacteria puede adquirir resistencia a una gran variedad de antibióticos debido a las varias adaptaciones como la expresión de diversas enzimas, la formación de biopelículas, la permeabilidad reductiva de la pared celular, entre otros (Finlayson & Brown, 2011). En el organismo humano se presenta como un patógeno oportunista que ataca a aquellos organismos inmunosuprimidos,

causando infecciones que en su mayoría son difíciles de tratar, pero en contraste con esto, se ha aprovechado su versatilidad metabólica en los diferentes procesos de tratamiento de residuos orgánicos, así como en procesos industriales como la fabricación de bioplásticos y en técnicas de biocontrol, además de su capacidad de producir pigmentos que han tomado importancia para diferentes procesos biotecnológicos (Cantón y col., 2005).

Esta bacteria es capaz de aprovechar una amplia variedad de nutrientes, presentando una gran capacidad de adaptación a las diferentes condiciones del medio ambiente. Así, existen diferentes cepas que son capaces de reproducirse en presencia de metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, entre otras sustancias donde otros microorganismos no pueden sobrevivir (Sam y col., 2017).

1.2.2. Piocianina

La piocianina (5-Metil-1(5H)-fenazinona) es un alcaloide fenazínico producida por *P. aeruginosa* como metabolito secundario de color azul capaz de oxidar y reducir otras moléculas y, por lo tanto, puede matar a otros microorganismos y contribuir a la supervivencia de *P. aeruginosa*. Considerando lo anterior, piocianina puede existir en diferentes estados como oxidado, reducido monovalente o reducido divalente (Rashid & Andleeb, 2018).

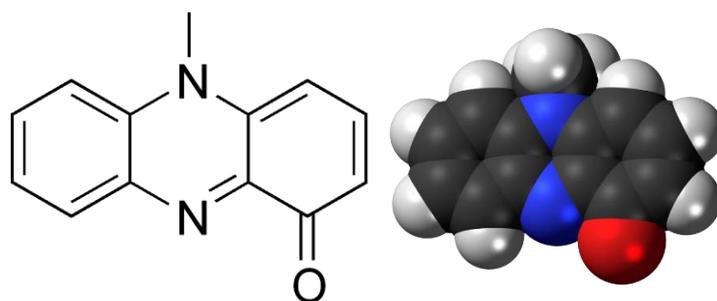


Figura 1. Molécula de piocianina (Alzahrani & Alqahtani, 2016).

Piocianina es un metabolito secundario producido por la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, fácil de identificar debido a su característico color azul verdoso. La piocianina cumple con diferentes actividades biológicas como la inhibición de la función ciliar, pueden ser sideróforos, tóxicos para otras especies bacterianas y células humanas, pueden aumentar el metabolismo oxidativo de los neutrófilos además de inhibir la proliferación de los linfocitos, entre otros (Webster & Sismaet, 2014). La piocianina forma parte del grupo de metabolitos secundarios con propiedades moduladoras de la oxidación, afectando la homeostasis redox intracelular (Finlayson & Brown, 2011).

Los metabolitos redox han jugado un papel importante en los sistemas bioelectroquímicos, donde el paso más crítico es la transferencia de electrones de las bacterias al electrodo. Es por lo que las bacterias capaces de expresar componentes de la cadena de electrones en la pared exterior están potencialmente bien adaptadas para su uso en sistemas como las celdas de combustible microbianas, ya que proporcionan un acceso fácil para la transferencia de electrones (Logan & Regan, 2006). Además, los mediadores de electrones pueden agregarse al medio o a los electrodos de las celdas de biocombustible microbianas para obtener corrientes más altas y una transferencia de electrones mejorada. Es por esto que la producción de piocianina por *P. aeruginosa* puede funcionar como transportador de electrones entre la bacteria y un aceptor de electrones (Rabaey y col., 2005). Recientemente se han resaltado las aplicaciones electroquímicas de la piocianina, además de sus muchas otras aplicaciones como factor de virulencia, actividad antibacteriana y antifúngica, también una molécula implementada en procesos de biocontrol, algunas de estas aplicaciones, así como su método de obtención, se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Piocianina y sus aplicaciones

Obtención	Aplicación	Referencia
Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo Mc Cokey.	Actividad antimicrobiana para <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Paracoccus denitrificans</i> .	(El-Shouny y col., 2011)
Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo agar nutritivo.	Actividad como fármaco antimicótico sobre <i>F. graminearum</i> .	(Houshaymi y col., 2019)
Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo King's B.	Colorante textil.	(Alzahrani & Alqahtani, 2016)
Aislado clínico de <i>P. aeruginosa</i> .	Biosensor para la detección de infecciones.	(Elkhawaga y col., 2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich)	Antiinflamatorio	(Marreiro-de-Sales Neto y col., 2019)

Cuando se comprende la importancia de la participación de piocianina en diversas aplicaciones, se puede considerar su cultivo a mayor escala. El cultivo de cualquier microorganismo para la obtención de productos es tarea de la biotecnología. Dentro de los procesos biotecnológicos es necesario analizar diversos aspectos relacionados con el cultivo del microorganismo, como el medio de cultivo, las condiciones de operación y el diseño del reactor, entre otros. Cada uno de estos puntos exige un estudio organizado que puede incluir metodologías estadísticas como los métodos de optimización. Además, es necesario considerar aspectos como la reducción de costos y la alta eficiencia en el proceso.

1.3. Producción de piocianina a partir de sustratos convencionales

Se ha demostrado que alrededor del 95% de las cepas de *P. aeruginosa* producen piocianina (Ran y col., 2003). Se conocen diferentes factores que influyen en la producción de piocianina, por ejemplo, las condiciones de cultivo de *P. aeruginosa*. Además, como piocianina juega un papel importante en el metabolismo del hierro, esta se produce abundantemente en medios con bajo contenido de este elemento. También se sabe que las enzimas nombradas como PhzM y PhzS son las enzimas que colaboran en la síntesis de piocianina a partir del compuesto ácido fenazina-1-carboxílico (Cox, 1986) (Figura 2).

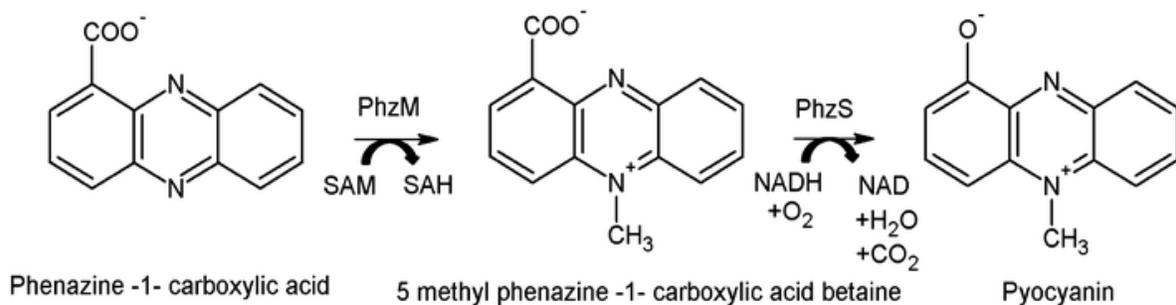


Figura 2. Biosíntesis de piocianina a partir de ácido fenazina-1-carboxílico, un derivado de la vía del ácido shikímico (Parsons y col., 2007).

El primer medio de cultivo reportado para la producción de piocianina a partir de *P. aeruginosa* fue el medio King, compuesto por 20 g/L de peptona, 1.4 g/L de MgCl₂, 10 g/L de K₂SO₄ y 15 g/L de agar, pH = 7 (King et al., 1954). Al mismo tiempo, se han realizado diferentes variaciones de este medio según la especie de *Pseudomonas* y el tipo de metabolito a producir. En la Tabla 3 se muestran diferentes trabajos de investigación realizados en este sentido.

Tabla 3. Medios de cultivo para la obtención de piocianina a partir de *P. aeruginosa*.

Bacteria	Composición del medio de cultivo definido	Concentración de metabolito (µg/L)	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> aislada de aguas residuales	Glicerol 20 mL/L, lactosa 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 2.5 g/L, Na ₂ HPO ₄ 2.5 g/L, MgSO ₄ 1.5 g/L, KCl 0.5 g/L, K ₂ HPO ₄ 0.25 g/L.	6	(Rashid & Andleeb, 2018)
Nueve cepas silvestres	Medio King compuesto de peptona 20 g/L, agar purificado 12 g/L, K ₂ HPO ₄ (anhidro) 1.5 g/L, MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1.5 g/L.	280	(Galvão y col., 2018)
<i>P. aeruginosa</i> OG1 (KC453990)	Agar nutritivo compuesto de extracto de carne de res 3 g/L, peptona 5 g/l, agar 15 g/L.	21.2	(Ozdal y col., 2019)
<i>P. aeruginosa</i> , TGC02 y TGC04.	Medio King compuesto de peptona 20 g/L, agar purificado 12 g/L, K ₂ HPO ₄ (anhidro) 1.5 g/L, MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1.5 g/L.	50	(Alves y col., 2019)

1.4. Producción de piocianina a partir de sustratos no convencionales

La producción de piocianina ha tomado importancia por su diversidad de aplicaciones, con niveles óptimos de producción en aquellas formulaciones que contienen glicerol, hierro, azufre y alanina (Osawa y col., 1965). Sin embargo, a la fecha sigue produciéndose con medios de cultivo convencionales o definidos, que tienen alto costo asociado y originando un precio en el mercado de 5 microgramos piocianina (≥ 98%, grado HPLC), obtenida de *P. aeruginosa*, por \$2,283 MXN (Sigma-Aldrich). El-fouly y col. (2015) reportan varios residuos agroindustriales para el cultivo de *P. aeruginosa* como medios de cultivo (Tabla 4). Este tipo de sustratos para la producción de un metabolito de interés podría ser una alternativa para reducir sus costos de producción.

Tabla 4. Obtención de piocianina usando sustratos no convencionales para el cultivo de *P. aeruginosa*.

Bacteria	Medio de cultivo	Concentración del metabolito µg/mL	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	Harina de semillas de algodón	4	(El-Fouly, y col., 2015)
<i>P. aeruginosa</i>	Semilla de uva	3.1	
<i>P. aeruginosa</i>	Residuos de aceitunas	1.3	
<i>P. aeruginosa</i>	Vainas de guisantes	1.6	
<i>P. aeruginosa</i>	Hojas de taro	2.5	

1.5. Valorización de residuos

La palabra valorización es utilizada para asignar valor a algo, pero en la actualidad es un término que ha tomado gran importancia dado el impacto ambiental de las actividades industriales y que la valorización está relacionada con la asignación de valor a la gran variedad de residuos producidos por la actividad humana. Este concepto se relaciona directamente con el enfoque de la economía circular, lo que conlleva a la obtención de productos de valor agregado a partir del procesamiento de los desechos de otros procesos, de tal forma que se disminuyen al mínimo las pérdidas/salidas de productos. Las actividades que se realizan con este enfoque son, por ejemplo, la digestión anaerobia, las biorrefinerías, tratamiento de aguas, entre otros, donde se utilizan los residuos como materia prima para proporcionar un bien común. Estos términos, aunque en la actualidad son muy populares, aún queda mucho trabajo por delante para lograr un impacto significativo en sistema de producción actual y lograr la transición a la economía circular (Galanakis, 2015).

Otros estudios que han incluido la temática de valorización de residuos hacen uso de diversos efluentes industriales. Por ejemplo, aquellos que utilizan los efluentes de la industria nixtamalera en celdas de combustible microbianas para el tratamiento y valorización del nejayote, obteniendo producción de energía eléctrica (España-

Gamboa y col., 2018). En este estudio, se demostró que con dicho tratamiento se disminuye la demanda química de oxígeno (DQO) a su vez que aumentó la corriente de salida de la celda. Además, se presentó la producción de pigmentos, posiblemente asociados con mediadores redox.

Un estudio del microbioma presente en dichas celdas reveló que había predominio de bacterias *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *P. aeruginosa*. Además, se determinó que *P. aeruginosa* tiene una alta eficiencia en la transferencia extracelular de electrones siendo capaz de producir mediadores redox, específicamente piocianina, caracterizada por análisis en cromatografía de líquidos. De este modo, se comprobó que los pigmentos encontrados en las celdas se producían por *P. aeruginosa* (Cornejo-Martel, 2017).

Derivado de la obtención de diferentes productos de valor agregado a partir de estos residuos, se considera importante continuar con los estudios para utilizarlo como medio de cultivo y ofrecer alternativas que ayuden a mitigar su impacto ambiental negativo. Además, el nejayote es considerado como un fuerte contaminante por sus características fisicoquímicas y producido en grandes volúmenes como residuo industrial.

1.6. Industria del nixtamal

El maíz es el cultivo más importante de la agricultura en México, derivado de sus múltiples usos como materia prima en la industria, ya sea como insumo directo o los subproductos de éste. La utilización del maíz ha estado vinculada principalmente a la agroindustria, en donde la actividad más importante está referida a la industria de la molienda de nixtamal y producción de tortilla. En la cadena agroindustrial del maíz grano, la producción de tortilla contribuyó con el 38.8% del valor bruto de la producción de la cadena, el 13% corresponde con la elaboración de botanas y otros productos, 6.7 % a la elaboración de harina de maíz y 5.4% al rubro dedicado a la elaboración de almidones, féculas y levaduras (FIRA, 2016).

La nixtamalización es la cocción alcalina del maíz para posteriormente convertirlo en masa y harina de maíz, que permiten obtener una gran variedad de productos. El producto más popular es la tortilla, proveniente de la masa de maíz. Este proceso es de origen mesoamericano y su nombre se deriva de la palabra nixtamal, que proviene del náhuatl *nextli* (ceniza de cal) y *tamalli* (masa de maíz cocido). Este proceso consiste en colocar el maíz en una solución alcalina y llevarla a una temperatura cercana al punto de ebullición. Después de la cocción, el maíz se mantiene en la solución un determinado tiempo, este dependerá del tipo de maíz. Durante este proceso los granos se suavizan y sus cascarras se desprenden, los granos se hidratan además de absorber calcio y potasio que son los componentes comunes de la solución alcalina (Boucher, 1995). El proceso de nixtamalización se lleva acabo de diversas formas, dependiendo de la cantidad de maíz. Debido a la alta demanda de los productos derivados del maíz, este proceso puede desarrollarse en pequeños molinos hasta grandes fábricas. La Figura 3 muestra un diagrama de flujo del proceso de nixtamalización a gran escala (González, 2015). La industria nixtamalera, además de proveer productos base para la alimentación humana, también es una fuente de contaminación de los mantos acuíferos ya que, por cada tonelada de maíz procesado, se consumen de 3,000 a 10,000 litros de agua para lavar y enjuagar el nixtamal (Maya y col., 2009).

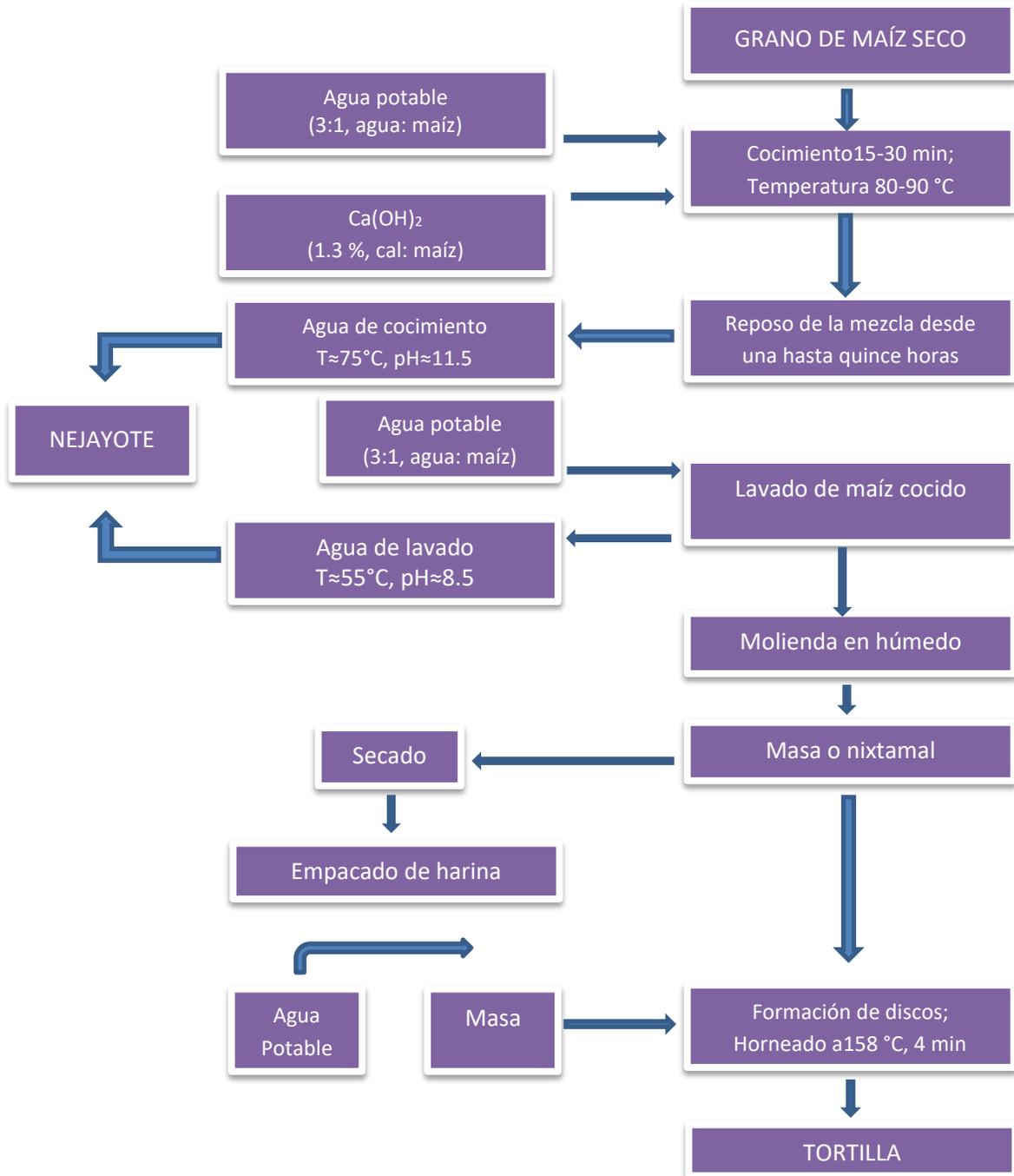


Figura 3. Proceso de nixtamalización (González, 2015).

1.6.1. Efluentes de la industria del nixtamal

Una vez finalizado el proceso de nixtamalización, la solución alcalina denominada como nejayote en el cual se encuentra inmerso el maíz, se decanta y se desecha al sistema de drenaje lo cual provoca un impacto ambiental significativo por su alta concentración de sólidos solubles y cal (Ramírez y col., 2013). El nejayote tiene diferentes características fisicoquímicas como alta cantidad de sales comparada con las aguas residuales de tipo doméstico, alta alcalinidad debida al contenido de carbonatos y bicarbonatos, pH alto que impide tratarlo por medios biológicos sin ajustes previos, turbiedad proveniente de solidos suspendidos y de material coloidal disperso, el material sólido suspendido es inmune al ataque microbiano, los valores de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) son aproximadamente veinte veces mayores que los valores típicos para aguas residuales domésticas y la mayor parte de los componentes contaminantes se encuentra en forma soluble (González, 2015). En la Tabla 5 se presentan datos de los parámetros fisicoquímicos reportados para este efluente industrial. Debido a la considerable carga de solidos suspendidos, estos pueden eliminarse por sedimentación para posteriormente poder tratar este tipo de agua residual (Ferreira y col., 2014).

Tabla 5. Composición fisicoquímica del nejayote (Valderrama-Bravo y col., 2012).

Parámetro	Promedio
pH	11.39
Solidos totales (%)	2.28
Sólidos totales en suspensión (mg/L)	8,342.5
Carbohidratos (%)	0.862
Ceniza (%)	0.767
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	4,510.12
Turbidez (NTU)	963.3
Demanda química de oxígeno (mgO_2/L)	40,058.14

Calcio (mg/L)	1,526.21
Densidad (kg/m ³)	1,003.54
Fibra (%)	0.581
Grasas (%)	0.008
Proteína cruda (%)	0.113
Dureza (mg/L)	5,768.67
Carbono orgánico total (mg/L)	2,984.10
Polifenoles totales (mg/L)	1,190.74

1.6.2. Tratamiento para los efluentes de la industria del nixtamal

Existen diferentes alternativas para el tratamiento del nejayote, desde el aprovechamiento de los sólidos suspendidos, hasta el tratamiento del agua de lavado de nixtamal (Díaz-Montes y col., 2016). También han sido utilizadas técnicas biológicas y fisicoquímicas, como los procesos de degradación enzimática, filtración y coagulación-floculación con diversos agentes como FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ y CuSO₄, con los cuales se han alcanzado reducciones de la demanda química de oxígeno (DQO) poco significativas en relación a los límites con los que se vierte este contaminante, esto se debe a que los coagulantes inorgánicos mencionados, no desestabilizan la capa eléctrica del sistema coloidal, por lo que no se logra una coagulación satisfactoria (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015).

Otras propuestas de innovación ecológica mencionan el uso de coagulantes, como el quitosano, para mejorar las eficiencias del proceso de coagulación-floculación como tratamiento de los efluentes de la industria del nixtamal. Se utilizó el quitosano de manera efectiva en condiciones de pH 5.5 y una dosis de quitosano inferior a 3 g/L, logrando reducir hasta un 80 % la carga orgánica que permitió alcanzar el cumplimiento de la regulación de la NOM-002-SEMARNAT-1996. Esta norma establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal (Suarez-Meraza & Ponce-Vargas, 2015).

Otro de los principales enfoques al tratamiento del nejayote es reducir los valores de DQO. Por ejemplo, (Civit y col., 2008) implementaron un tratamiento anaerobio con los efluentes clarificados en una cascada de cinco reactores, los cuales operaban a una temperatura de 34 °C y un volumen de 117.5 L. En tal trabajo, lograron disminuir hasta el 92.6 % de la DQO después de 73 días de operación del proceso. Aunado a esto se realizó la producción de biogás como proceso secundario, con una composición de gas de 65.2 a 91 % de metano en volumen.

También se han utilizado procesos físicos para el tratamiento de este efluente. En la referencia (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015) se realizaron procesos a escala laboratorio de filtración con membranas para valorizar los residuos de la industria nixtamalera, usando primero sistemas de microfiltración seguidos de procesos de ultrafiltración. Con cada sistema obtuvieron diferentes fracciones del nejayote con diferente valor potencial, por ejemplo, una fracción enriquecida en carbohidratos, una fracción con alto contenido de componentes de calcio y una fracción enriquecida en compuestos fenólicos, las mismas que pueden tener aplicaciones para preparar formulaciones para su uso en la industria alimentaria y se pueden utilizar en aplicaciones cosméticas o farmacéuticas.

Velasco-Martínez (1997) implemento un tratamiento de estos efluentes mediante el aprovechamiento de los sólidos presentes, que fueron retirados por centrifugación y secados a temperatura ambiente. Estos sólidos se utilizaron para formular alimentos de pollo según los requisitos de la National Research Council (NRC). El alimento obtenido se formuló de acuerdo con el contenido de proteína y calcio en dichos sólidos (de 5 y 13 %, respectivamente) suplementando a un porcentaje de 2.4 hasta 6 % de la dieta alimenticia de las aves. Finalmente, se obtuvieron rendimientos muy similares al utilizar la dieta que incluía a los sólidos del nejayote y la dieta control, por esto se consideró que el nejayote es adecuado para usarlo en alimento para aves en engorda.

Mediante procesos biotecnológicos también se ha tratado a los efluentes de la industria del nixtamal, buscando sistemas para la producción de microorganismos (biomasa). Por ejemplo, en el cultivo de rotíferos de agua dulce se implementó

Brachionus calyciflorus. Cuando el efluente fue usado sin diluir no se mostraron resultados satisfactorios, mientras que en diluciones de entre 8 y 16 % se observó el desarrollo del rotífero, demostrando con esto que el nejayote puede ser utilizado de manera efectiva para la producción de microorganismos (Arévalo y col., 1998). En otro estudio, se realizó el aislamiento y la caracterización de dos nuevos microorganismos alcalófilos presentes en el nejayote. Se aislaron dos cepas (NJY2 y NJY4) a partir del nejayote capaces de hidrolizar almidón, xilano y gelatina. Estos microorganismos estaban estrechamente relacionados con los miembros de la especie *Bacillus flexus*, identificados como bacterias tolerantes a condiciones alcalinas de forma facultativa. Así, estas cepas mostraron importantes propiedades fisiológicas para producir moléculas de alto valor a partir de efluentes industriales (Sanchez-Gonzalez y col., 2011). Por otro lado, Ramírez-Romero y col. (2013) evaluaron el potencial del nejayote como medio de cultivo para bacterias probióticas y producción de bacteriocinas. Para llevar a cabo este proceso, se realizó la fermentación del nejayote usando lactobacilos, para después utilizar el sobrenadante con el que se comprobó la producción de bacteriocinas. Con los resultados obtenidos se concluyó que el nejayote puede ser utilizado para la producción de probióticos y bacteriocinas.

Con estos resultados, se deja evidencia del potencial de los efluentes de la industria nixtamalera para usarse en diversos procesos que permitan la obtención de productos de valor. Además, se obtiene un efecto adicional que es el tratamiento del efluente ya que se disminuyen los valores de la alta concentración de componentes orgánicos, medidos como DQO, y de otros componentes del efluente, como diferentes tipos de sólidos. Este tipo de estudios contribuiría a mitigar los efectos negativos que se producen en el medio ambiente cuando el efluente es vertido sin tratamiento alguno.

1.7 Diseño de experimentos

1.7.1 Selección de variables de respuesta

En el diseño de experimentos, las variables de respuesta reflejan la información de los experimentos realizados, a través de estas se puede conocer la calidad de determinado producto, el desempeño de algún proceso o cual material es el que mejor cumple los requisitos, esto dependerá del diseño de experimento donde mejor se analicen las variables y así poder encontrar la forma de mejorar las mismas. Debido a que estas proporcionan la información que se busca de un estudio o proceso, se debe tener bien identificados los aspectos relacionados, así como los principales factores que influyen para que, una vez que se hayan realizado los experimentos bajo estos criterios, las variables de respuesta puedan dar información útil para el estudio (Mason y col., 2003).

1.7.2 Factores y niveles en el diseño de experimentos

La variedad de los factores es muy importante en un diseño de experimentos, ya que estos interactúan con la variable de respuesta. Los factores se pueden controlar, quedando como una característica de la condición experimental que puede variarse a voluntad, controlando así el proceso, por ejemplo: el tiempo de operación de los equipos, temperatura, pH, cantidades de reactivos, etc. Por otro lado, los factores no controlables son variables que no se pueden controlar durante el experimento o la operación de un proceso, por ejemplo, la humedad, el ruido, las partículas del aire e incluso condiciones fisiológicas del operador del experimento también influyen como factor. Los factores pueden ser representados como el resultado numérico de una observación, prueba o tratamiento. Estos factores se evaluarán de acuerdo con diferentes valores que se les asignan, los cuales se llaman niveles, y al mismo tiempo, la combinación de los niveles se les llama tratamiento (Hinkelmann & Kempthorne, 2007).

1.7.3 Réplicas

Una réplica es una repetición del experimento, el número de réplicas que se harán por cada experimento determina el tamaño de la muestra. El número de réplicas se define de acuerdo con las diferencias que se esperan entre los tratamientos, por ejemplo, si se esperan diferencias pequeñas se recomienda un mayor número de réplicas y viceversa, lo mismo sucede cuando se observa mucha variación entre cada experimento, por otro lado, si el diseño por sí mismo considera más de cuatro experimentos, con pocas replicas será suficiente. Otro aspecto importante para considerar es el tiempo y el costo por cada experimento, ya que esto delimitará el número de réplicas viable para el diseño (Dean y col., 2017).

1.7.4 Aleatorización

La aleatorización consiste en llevar a cabo corridas experimentales totalmente al azar y con material también seleccionado aleatoriamente (Hinkelmann & Kempthorne, 2007).

1.7.5 Prueba F de Fisher

La prueba estadística se nombró de acuerdo al científico inglés Ronald Fisher. Esta prueba es un cociente de dos varianzas, donde las varianzas son una medida de cuanto están dispersos los datos con respecto a la media, por consiguiente, un valor más alto representa una mayor dispersión. Considerando que la prueba F es una relación de varianzas, se puede utilizar para evaluar la significancia general de un modelo de regresión, para comparar el ajuste de diferentes modelos, para probar términos de regresión específicos y para evaluar la igualdad de las medias (Gutiérrez, 2008).

1.7.5 Optimización

La optimización es el proceso de encontrar la mejor combinación de las condiciones con la cual se obtiene la mejor solución posible (Lundstedt y col., 1998). En ciertos procesos es necesario optimizar los recursos disponibles, mientras que en diseño

Estas páginas fueron eliminadas debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2017, y con el Artículo 116 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2015.

experimental los valores más altos de concentración de piocianina se obtienen con la fracción retenida, con ambas cepas. El valor optimizado mínimo de concentración de piocianina debería ser en la fracción de filtrado, sin embargo, en condiciones experimentales usando ambas cepas, se obtienen las concentraciones más bajas del metabolito en el efluente crudo (Tabla 25).

Considerando los resultados obtenidos, las concentraciones estadísticamente optimizadas por el diseño de experimentos no concuerdan con los resultados experimentales para ninguna de las dos cepas. Sin embargo, la tendencia de mayor a menor concentración de piocianina obtenida de manera experimental con las condiciones de los factores optimizados, mantiene una tendencia de la mayor concentración de piocianina obtenida en la fracción retenida y la menor concentración en el efluente crudo.

Tabla 25. Comparación de la producción de piocianina y biomasa para las dos cepas de *P. aeruginosa* en sustrato y fracciones de nejayote

	NEJ01R	ATCC	NEJ01R	ATCC
Sustrato y fracciones	Piocianina (µg/mL)	Piocianina (µg/mL)	Biomasa (g/L)	Biomasa (g/L)
Crudo	0.530 ^a ± 0.145	0.473 ^a ± 0.198	8.055 ^a ± 9.275	3.562 ^b ± 10.916
Clarificado	1.277 ^a ± 0.116	0.710 ^b ± 0.241	3.725 ^a ± 4.044	2.682 ^a ± 2.423
Retenido	1.656 ^a ± 0.142	0.946 ^b ± 0.151	5.720 ^a ± 2.078	6.402 ^b ± 8.183
Filtrado	0.542 ^a ± 0.431	0.824 ^a ± 0.081	3.172 ^a ± 0.450	5.460 ^b ± 3.421

* Valores con letras diferentes en la misma fila para piocianina o biomasa tienen diferencia estadística significativa para un $\alpha = 0.05$.

Se observaron diferencias significativas en la producción de piocianina por las dos diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Esto se puede atribuir a que en el caso de la cepa NEJ01R es una cepa silvestre que fue aislada directamente del efluente (nejayote), lo cual le confiere cierta capacidad de adaptación a las condiciones

alcalinas y capacidad de aprovechamiento de los nutrientes presentes en el nejayote. Por otro lado, la cepa ATCC (referencia) se puede asumir que no tiene la misma capacidad de adaptación a las condiciones y características del nejayote.

Otro criterio importante a considerar es que todo el análisis estadístico se realizó utilizando solo la cepa NEJ01R y una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas, se realizaron los cultivos para comparación de las cepas. Esto sugiere que al realizar el análisis completo con ATCC talvez las condiciones de optimización serian diferentes para cada una de las cepas.

Al mismo tiempo, se observa que las dos variables de respuesta analizadas no muestran correlación. En este diseño, se estableció el análisis de ambas variables con la espera de evaluar el efecto de la cantidad de biomasa en el sustrato que podría ser aprovechada por *P. aeruginosa* para la producción de piocianina. Dado que el nejayote presenta una cierta cantidad de materia orgánica en sus diferentes fracciones, se esperaba que esto influyera en la producción de piocianina. Pero como se observó en los resultados, estas variables no tienen relación, lo cual indica que *P. aeruginosa* no aprovecha gran parte de la materia orgánica en nejayote, solo es capaz de aprovechar ciertas moléculas que se encuentran presentes en las diferentes fracciones del nejayote.

3.3. Caracterización fisicoquímica del nejayote y sus fracciones

En este trabajo se obtuvieron las condiciones que permitieran la producción de piocianina a partir del nejayote en sus diferentes fracciones. Aun no se conoce cuáles son las características del nejayote que permiten que *P. aeruginosa* produzca piocianina. Considerando esto, se realizó la determinación de los sólidos presentes en el nejayote crudo y sus diferentes fracciones, esto con la finalidad de observar si tienen un efecto significativo en el desempeño de *P. aeruginosa*.

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos a partir de la caracterización fisicoquímica del nejayote y sus fracciones. Se realizó la medición de sólidos totales

(Figura 30a), sólidos insolubles (Figura 30b), sólido solubles (Figura 30c), cenizas (Figura 30d). Cada una de las mediciones de los diferentes parámetros se realizó para el nejayote crudo y sus tres fracciones (clarificado, retenido y filtrado). A su vez cada una de las mediciones se realizaron en nejayote sin inocular y nejayote inoculado con dos cepas de *P. aeruginosa* (NEJ01R y ATCC).

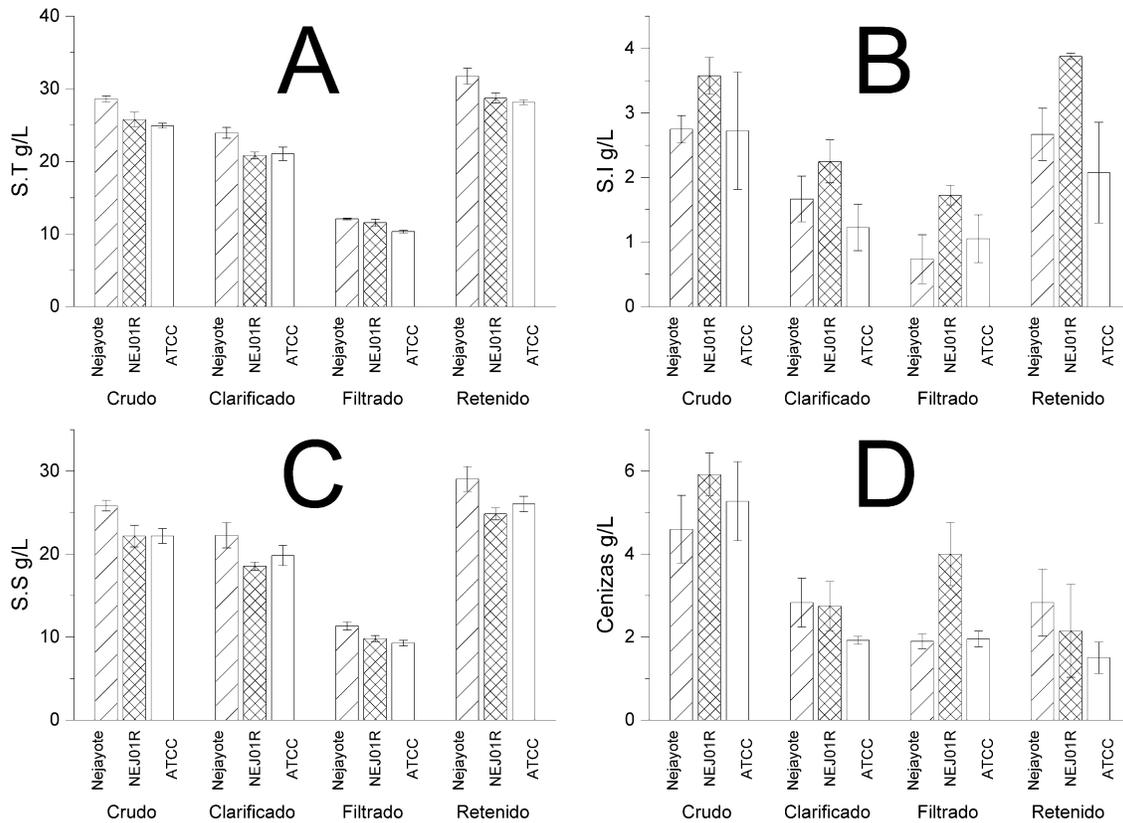


Figura 30. Caracterización fisicoquímica del nejayote y sus fracciones
Sólidos totales (S.T), Sólidos insolubles (S.I.), Sólidos Solubles (S.S).

Las mediciones del nejayote sin tratamiento y sin inocular muestran un contenido de sólidos totales de alrededor de 29 g/L, de estos 26 g/L aproximadamente corresponden a sólidos solubles y 2.6 g/L aproximadamente corresponden a sólidos insolubles. Una vez que el nejayote es sometido a los tratamientos, se obtienen las diferentes fracciones y en cada una de ellas la cantidad de sólidos totales se ve

afectada. La fracción filtrado es la que muestra una menor concentración de sólidos totales, siguiendo la fracción clarificado y finalmente con una mayor concentración, la fracción retenido. Este comportamiento se mantiene en la medición de sólidos solubles e insolubles.

Al inocular las diferentes fracciones con las dos cepas de *P. aeruginosa* (NEJ01R y ATCC), las variaciones de los sólidos totales en las diferentes fracciones son poco representativas. Considerando la determinación de sólidos solubles, se observó que las fracciones inoculadas con *P. aeruginosa* NEJ01R muestran un mayor consumo de estos sólidos. A partir de esto, se sugiere que *P. aeruginosa* NEJ01R aprovecha los componentes insolubles del nejayote para su metabolismo y, por consiguiente, la producción de piocianina. El comportamiento anterior es diferente para *P. aeruginosa* ATCC, ya que se observa un mayor consumo en los sólidos insolubles.

Con base a lo anterior, las fracciones inoculadas con *P. aeruginosa* NEJ01R son las que muestran una mayor producción de piocianina en la fracción retenido, en esta fracción es la que tiene una mayor cantidad de sólidos totales, pero también contiene los nutrientes necesarios que favorecen la producción de piocianina.

CONCLUSIONES

Utilizando al nejayote y sus fracciones como medio de cultivo se logró producir al metabolito conocido como piocianina en la cepa silvestre *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R y en la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327. Mediante el diseño Box-Behnken se establecieron las condiciones óptimas de cultivo para la producción del metabolito referido. Las dos variables de respuesta evaluadas, biomasa y piocianina, no mostraron correlación entre ambas. Esto se atribuye principalmente a que el diseño de experimentos planteado no se ajustó para analizar la variable biomasa, y aunque ambas variables utilizaron los mismos factores y los mismos niveles, estos no tuvieron la misma significancia para ambas variables.

Los resultados optimizados estadísticamente indicaron que la mayor concentración de piocianina debería obtenerse en el efluente sin tratamiento (sustrato crudo), sin embargo, al evaluar los valores predichos de manera experimental usando la misma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, la máxima concentración del metabolito fue obtenida en la fracción llamada retenido. Se observó una tendencia similar usando la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 39327, obteniendo la máxima y mínima concentración en la fracción del retenido y en el sustrato crudo, respectivamente. Estos resultados sugieren que la composición de la fracción retenida contiene sólidos biodisponibles para la asimilación metabólica por el microorganismo, además que la baja concentración de compuestos fenólicos libres (por el tamaño de poro de la membrana) resulta favorable para su adecuado crecimiento. Trabajos futuros podrían establecer la concentración y el consumo de los compuestos fenólicos presentes en las diferentes fracciones, y su relación con el crecimiento del microorganismo y la producción de piocianina.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al desarrollo de la cadena de valor de un efluente de la industria de la nixtamalización, con amplia presencia en nuestro país, considerando que los componentes del efluente reconocidos como altamente contaminantes pueden ser bio-transformados en compuestos

(metabolitos) con aplicación en diferentes áreas, como salud, agricultura y medioambiente.

Referencias

Álvarez, L., Cervantes, F. J., Gortáres, P. 2013. Avances en la Aplicación de Mediadores Redox Durante la (Bio)Transformación de Contaminantes Recalcitrantes. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* 17:43-66.

Alves, R. R., Morais, B. T., Correa, T. T., Cavalgante, V., Gurgel, I. P., Vaconcelos, U. 2019. Activity of two Exometabolites produced by *Escherichia coli* on the synthesis of pyocyanin. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science.* 6:2456-1908.

Alzahrani, S.H., Alqahtani, F.S. 2016. Pyocyanin pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* isolate as antimicrobial agent and textile colorant. *International Journal of Scientific Research.* 5:467-470.

APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Arévalo, R.A., Sarma, S.S., Nandini, S. 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae) in waste water food-processing industry in Mexico. *Revista de Biología Tropical.* 43:595-600.

Asaff Torres, A., Reyes-Vidal, Y. 2015. Method and system for the integral treatment of wastewater from maize industry. WO2014/119990 A2. Solicitud internacional de patente.

Bonham, C.D. 1989. Measurements of terrestrial vegetation. John Wiley Sons, New York, NY. pp 33-39.

Boucher, F. 1995. Agroindustria rural. Recursos técnicos y alimentación. Costa Rica: CIRAD.

Breidenstein, E. B., Níñez, C., Hancock, R. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19:419-426.

Brenner, D. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. USA: Springer.

Cantóna, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero F., Honorato, J., Gartner, S., Álvarez, A., Salcedo, A., Olivere, A., García-Quetglas, E. 2005. Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Archivos de Bronconeumología*, 41: 1-25.

Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J. 2015. Valorization of Nixtamalization wastewaters (Nejayote) by integrated membrane process. *Food and Bioprocess Processing*, 95: 7-18.

Chen, S. F., Mowery, R. A., Scarlata, C. J., Chambliss. C. 2007. Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5912–5918

Civit, E., Duran, C., Engelmann, G., Gonzáles, S., Hartmann, L. 2008. Anaerobic treatment of maize processing waste water (Nejayote) in a packed bed reactor cascade. *Environmental Technology Letters*, 5:89-96.

Cornejo-Martel, A. J., 2017. Electromicrobiología del microbioma presente en celdas de combustible microbianas. Tesis Maestría en Ingeniería Ambiental, CIDETEQ. Querétaro, México.

Cortés-Cano, H. G. 2018. Optimización de la producción de un pigmento de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, Tesis Ingeniería Ambiental. Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache. Veracruz, México.

Cox, C.D. 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and Immunity*, 52: 263-270.

Croteau, R., Kutchan, T., Lewia, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Physiologists.

Dean, A., Voss, D., Draguljić D. 2017. Design and Analysis of Experiments. New York: Springer-Verlag.

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

El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Heba, A., El-Bialy., Omara, A.M. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 8:36-48.

Elkhawaga, A.A., Khalifa, M.M., El-badawy, O., Hassan, M.A., El-Said, W.A. 2019. Rapid and highly sensitive detection of pyocyanin biomarker in different *Pseudomonas aeruginosa* infections using gold nanoparticles modified sensor. *Plos one*, 14:1-16.

El-shouny, W.A., Al-baidani, A.R., Hamza, W.T. 2011. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 1:1-7.

España-Gamboa, E., Domínguez-Maldonado, J. A., Tapia-Tussell, R., Chale-Canul J. S., Alzate-Gaviria, L., 2018. Corn industrial wastewater (nejayote): a promising substrate in Mexico for methane production in a coupled system (APCR-UASB), *Environmental Science and Pollution Research*, 25:712–722

Ferreira, A., Ramírez, G., Ramírez, F. 2014. Aumento de la actividad metanogénica en lodos granulares, precipitando calcio en el nejayote mediante el burbujeo de CO₂. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13:517-525.

Finlayson, E., Brown, P., 2011. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, 60: 24-32.

Galanakis, Ch. M. 2015. Food waste recovery: processing technologies and industrial techniques. New York: Academic Press is an imprint of Elsevier

Galvao, A. A., Morais, B. T., Goncalves, T., Alves, K., Moura, E. A., Gurgel, I. P., Vasconcelos, U. 2018. Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)*, 5:212-223.

González, S. 2015. Tratamiento de aguas de desecho de la industria del nixtamal. México: UNAM.

Gutiérrez, H. 2008. Análisis y diseño de experimentos. México: Mc Graw Hill.

Hinkelmann, K., Kempthorne, O. 2007. Design and analysis of experiments, introduction to experimental design. E.U.A., Wiley.

Houshaymi, B., Awada, R., Kedeas, M., Soayfane, Z. 2019. Pyocyanin, a metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, exhibits antifungal drug activity through inhibition of a pleiotropic drug resistance subfamily FgABC3. *Drug research*, 69:658-664.

Khuri, A. I. 2006. Response surface methodology and related topics. Hacensack, N.J: World Scientific.

King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44:301-307.

Logan, B.E., Regan, J.M. 2006. Microbial fuel cells—challenges and applications. *Environmental Science and Technology*, 40:5172- 5180.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, Asa., Pettersen, J., Bergman, R. 1998. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42:3-40.

Marreiro de Sales-Neto, J., Lima, É. A., Cavalcante-Silva, L. H. A., .Vasconcelos, U., Rodrigues-Mascarenhas, S. 2019. Anti-inflammatory potential of pyocyanin in

LPS stimulated murine macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 1-8.

Mason, R. L., Gunst, R. F., Hess, J. L. 2003. Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science. New York: Wiley.

Moore, E.R., Tindall, B.J., Martins, V.A., Pieper, D.H., Ramos, J.L., Palleroni, N.J. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. *Prokaryotes*, 6:646-703.

Maya-Cortés, D.C., Figueroa Cárdenas, J.D, Garnica-Romo, M.G., Cuevas-Villanueva, R.A., Cortés-Martínez, R., Véles-Medina, J.J., Martínez-Flores, H.E. 2010. Whole-grain corn tortilla prepared using an ecological nixtamalisation process and its impact on the nutritional value. *International Journal of Food Science Technology*, 45:23-28.

Osawa, S., Yabuuchi, E., Narano, Y., Feng, T.Y., Yukawa, Y., Takashina, K., Tanabe, T., Tomono, H. 1965. Studies on pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Microbiology*, 9:115-122.

Ozidal, M., Gurkok, S., Gur, O., Basaran, E. 2019. Enhancement of pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* via the addition of n-hexane as an oxygen vector. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22:1-6.

Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., Ladner, J. E. 2007. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 46:1821-1828.

Rabaey, K., Boon, N., Hofte, M., Verstraete, W. 2005. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science and Technology*, 39:3401-3408.

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

Ran, H., Hassett, D.J., Lau, G.W. 2003. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 25:14315-14320.

Rashid, M. I., Andleeb, S. 2018. Pyocyanin yield improvement for enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* inoculated microbial fuel cell efficiency. *4th International Conference on Power Generation Systems and Renewable Energy Technologies*, 4:10-12.

Sam, J., Pattanathu, K.S.M., Rahmanb., Sharma, S. 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317:232-241.

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

Strateva , T., Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 59:1133–1148.

Suarez-Meraza, K. A., Ponce-Vargas, S. M. 2015. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*, 284:1-31.

Valderrama-Bravo, C., Gutiérrez-Cortez, E., Contreras-Padilla M., Rojas-Molina, I., Mosquera, J. C., Rojas-Molina, A., Beristain, F., Rodríguez-García, M.E. 2012. Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels in maize processing. *Journal of Food Engineering*, 110:478-486.

Velasco-Martinez, M. 1997. Effect of dried solids of nejayote on broiler growth. *Poultry Science Association, Metabolism and Nutrition*, 3:1531–1534.

Webster, T. A., Sismaet, H. J. 2014. Electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* in human fluid samples via pyocyanin. *Biosensors and Bioelectronics*, 60: 265–270.