

# Evaluación de un bioproceso para la producción de ácido indol acético en *Bacillus subtilis*

Alejandro Quintana Menéndez<sup>1</sup>, Diana De la cruz García<sup>2</sup>, Hilda Vázquez López<sup>3</sup>, Juan Gabriel Viguera Ramírez<sup>4</sup> y Roberto Olivares Hernández<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México 05370, México.

<sup>2</sup>Ingeniería Biológica, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México 05370, México.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

<sup>4</sup>Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, 05348, México.

\*Autor de correspondencia: rolivares@cua.uam.mx

## Resumen

### Palabras clave:

bioinsumo, *Bacillus subtilis*, ácido indol-3 acético

El uso de bioinsumos agrícolas es una alternativa al empleo de fertilizantes químicos en la producción agrícola sustentable y la obtención de productos orgánicos y cuyo mercado de consumo ha venido creciendo en los últimos años. Algunas bacterias de la rizosfera, tales como *Bacillus subtilis*, tienen la potencialidad de producir compuestos que estimulan el crecimiento de las plantas, tal como son las auxinas, entre las cuales se encuentra el ácido indol 3 acético (AIA). Esta auxina tiene la característica de promover el crecimiento radicular, así como otros procesos fisiológicos relacionados al alargamiento y división celular, diferenciación de tejidos y fototropismo. Por lo tanto, el AIA como bioinsumo para la producción agrícola y su producción por medio de cultivo microbiano ha generado mayor interés en los últimos años. A partir de datos de cultivo reportados previamente y de la aplicación del sobrenadante en el crecimiento de plantas de lechuga y jitomate, se llevó a cabo el diseño de un bioproceso con el software SuperPro Designer® para evaluar técnica y económicamente la producción de AIA en *Bacillus subtilis*. Los resultados de la simulación indican que es factible la producción de AIA en *Bacillus subtilis* utilizando un medio definido, propionato y triptófano como fuentes de carbono.

Enfoques Transdisciplinarios:  
Ciencia y Sociedad, 2(2),  
231-244. ISSN: 3061-709X.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.12774298>

Recibido: 13 abril 2024  
Revisado: 20 mayo 2024  
Aceptado: 4 julio 2024  
Publicado: 18 de julio 2024



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



## Introducción

El principal objetivo de la agricultura es la obtención de alimentos para el consumo humano, a la vez que se convierte en una actividad económica de relevancia que genera empleos y contribuye al desarrollo y sustentabilidad de las naciones (Pérez Cruz, 2020). El aumento de la demanda alimentaria ha propiciado prácticas ecológicamente agresivas que, para aumentar los rendimientos de producción, utilizan grandes cantidades de agroquímicos. La alternativa al uso de agroquímicos es el uso de bioinsumos agrícolas, basados en compuestos de microorganismos o plantas, capaces de mejorar las prácticas agrícolas, sin generar impactos negativos en el agroecosistema (Dayan & Duke, 2014; Duke, 2018; Gerwick & Sparks, 2014). En los últimos años se ha incrementado la demanda de productos ecológicamente amigables, o biorgánicos, que además de ofrecer beneficios económicos son una alternativa que impacta en la económica circular (Kaur, P. et al, 2019; Priya, A.K. et al. 2023). El empleo de biofertilizantes y estimulantes elaborados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés) constituye una práctica que ha cobrado un singular interés en la agricultura moderna. La mayoría de las PGPB se encuentran en la rizosfera, un ambiente natural propicio para el desarrollo de estos microorganismos que establecen relaciones simbióticas con las plantas. En estos entornos se han encontrado cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, y *Rhizobium* (Higuera et al., 2019).

En particular, la producción de hormonas que favorecen el crecimiento vegetal, como el ácido indol acético (AIA), ha adquirido mayor interés. El mercado global de AIA reporta un crecimiento económico debido a la demanda por productos alimenticios que sean sustentables y ecoamigables, lo que ha impulsado la necesidad de su producción y que se espera alcance un valor de miles de millones de dólares hasta el 2030 (“Global Indole-3- acetic Acid (IAA) Market Size”, Market Reports Word). Teniendo en cuenta los datos para México en 2022 el intercambio comercial total de AIA (incluyendo compras y ventas internacionales) fue de \$246M USD (<https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/product/acetic-acid>). De esta manera en años recientes se ha incrementado el esfuerzo de producirlo por medio de microorganismos.

### Rutas de síntesis de AIA en *Bacillus subtilis*

Las vías de biosíntesis que se han identificado para producir AIA pueden ser clasificadas con base a su dependencia de la utilización de triptófano como precursor (Patten, 2022), se ha reportado que para el género *Bacillus* predominan tres vías 1) vía del indol-3-acetonitrilo (IAN), 2) vía del indol-3- piruvato (IPA) y la mejor caracterizada 3) vía del indol-3-acetamida (IAM). En el caso particular de *Bacillus subtilis*, esta es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal debido a la pro-



ducción de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos (Anguiano-Cabello *et al.*, 2019); la síntesis de AIA es parte del metabolismo secundario de esta bacteria lo que resulta en una gran ventaja para obtener esta auxina de manera natural. El AIA se sintetiza utilizando precursores obtenidos del medio en el que la plantas se desarrolla, y que son parte del metabolismo secundario de otros microorganismos de la rizosfera (Widawati, 2020).

La vía de la indol-3-acetamida fue identificada durante la evaluación de la producción utilizando el modelo metabólico a escala genómica de *Bacillus subtilis* (Castillo Alfonso *et al.*, 2021). Se lleva a cabo en una reacción de dos pasos; la molécula de triptófano se convierte en el intermediario de la vía por la enzima triptófano 2- monooxigenasa, para posterior hidrolizarse el indol-3-acetamida a ácido indol-3-acético por la enzima hidrolasa/amidasa (Pollmann *et al.*, 2002).

### **Producción de AIA por medio de cultivos de Bacillus**

Las bacterias del género *Bacillus* son generalmente protótrofas es decir son capaces de crecer en medios sin requerimientos adicionales, además tiene un crecimiento rápido en condiciones de temperatura ambiente y con fuentes de carbono económicas (Su *et al.*, 2020).

Se ha reportado la producción de AIA con cepas como *Bacillus circulans* E9 en biorreactores a partir de fuentes industriales de carbono como soya, harina de guisante y extracto de levadura como fuentes de carbono alcanzando concentraciones de  $7.81 \pm 0.16 \mu\text{g mL}^{-1}$  de la hormona (Sarmiento-López *et al.*, 2022). Otra cepa aislada, *B. subtilis* DR2 (KP455653) se ha cultivado para producir  $137.81 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando  $1 \text{ g L}^{-1}$  de triptófano como inductor en un medio denominado JNFb<sup>-</sup>, varias fuentes de carbono y concentraciones de sales se ocuparon para optimizar la producción (Kumari *et al.*, 2018). De igual manera se ha ocupado la cepa *Bacillus megaterium* BM5 con el cual reportan  $320 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando de igual manera triptófano como inductor (Lee, J. C., & Whang, K. S. 2016). Dado el interés por producir AIA, otras estrategias se han empleado como la modificación genética de otra especie microbiana *Escherichia coli* para la producción de la auxina alcanzando concentraciones de 7.10 g/L usando una concentración del inductor triptófano de 10 g/L (Wu *et al.*, 2019).

Para propósitos de producción óptima por medio de microorganismos es necesario el diseño de cultivos con medio mínimo y fuentes de carbono económicas, por lo que es necesario llevar a cabo la prueba de distintas fuentes de carbono. Previamente, se ha reportado la producción de AIA utilizando diversas fuentes de carbono, siendo el propionato de sodio la fuente óptima para obtener mejores rendimientos producto/ sustrato de esta auxina (Castillo Alfonso *et al.*, 2021; Quintana, 2022). Adicionalmente se considera que es una fuente de carbono relativamente económica, por tanto, resulta viable su empleo en procesos a escala industrial. El propionato de sodio es la sal



sódica del ácido propiónico y pertenece a los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) más abundantes y como un subproducto de la fermentación bacteriana (Dolan *et al.*, 2018). A partir de la secuencia del genoma de *Bacillus subtilis* y del modelo metabólico a escala genómica se comprobó que la vía que emplea este microorganismo es la de síntesis del indol acetamida (IAM) (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). La evaluación de las concentraciones de AIA demostraron que la producción de AIA ocurre casi de manera equimolar con base en el inductor triptófano. Teniendo en cuenta estos primeros resultados, se escaló el cultivo a un biorreactor de 2 L, los parámetros experimentales para el diseño fueron reportados previamente: concentración de 0.5 g/L de triptófano resultando en una concentración de 0.31 g/L de AIA (Castillo-Alfonso *et al.*, 2022). Con base en estos resultados, en este trabajo presentamos el diseño conceptual de un bioproceso utilizando el software *Super Pro Designer*, para la biosíntesis de ácido indol-3-acético a partir de *Bacillus subtilis*, con la intención de evaluar la factibilidad económica de utilizar propionato y triptófano como inductor.

## Materiales y Métodos

### Microorganismo y condiciones de cultivo

La metodología utilizada para la producción de AIA utilizando *Bacillus subtilis* W168 se reportó previamente (Castillo-Alfonso *et al.*, 2022) y a continuación se reportan los detalles. Para obtener los datos cinéticos de la fermentación se emplea la cepa *Bacillus subtilis* W168 perteneciente al banco celular del Laboratorio de Biotecnología de la UAM Cuajimalpa. Primeramente, se comprueba la viabilidad y pureza de la cepa. Para ello se realizó un cultivo en placas Petri estriado del microorganismo utilizando Agar Nutritivo (Merck) de manera que a las 24 horas de crecimiento se comprobó que las colonias tenían la apariencia típica de *Bacillus subtilis*. Además del análisis macroscópico se utilizó un microscopio óptico (Nikon) a 1000X previamente realizada la metodología de Tinción de Gram.

El medio de cultivo que fue utilizado para los experimentos consistió en un medio mínimo a base de sales (químicamente definido, cómo también se conoce) y que es una variante del medio M9, donde fueron ajustados algunos parámetros en base a la composición Carbono/ Nitrógeno, así como componentes necesarios para mantener el pH de este en un valor óptimo. Se utilizó como fuente de carbono Propionato (Merck).

Para cada experimento se preparó un inóculo partiendo de los crioviales conservados a -80 °C, fueron cultivados en medio sólido conteniendo Agar Nutriente mediante estriado para incubarse a 33 °C por un período de 24 horas.

### Condiciones de cultivo en Biorreactor

Se equipó un biorreactor (*New Brunswick BioFlo III*) con una capacidad de 3 L (volumen total) para los experimentos y cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y



producción. El equipo permitió un monitoreo de varios parámetros que caracterizan el proceso de producción de AIA pues se contó con sensor de pH, sensor de oxígeno disuelto (DO), sensor de temperatura. De igual manera fueron acoplados sensores para el monitoreo de CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> (Blue Sense). Se acopló la consola del equipo a un software (Biorec 1.3.0.0/ Bioreactor Controller 2016) mediante el cual se controló el proceso. El registro de los sensores Blue Sense se obtiene en este caso mediante el software que recomienda el proveedor (Ferm Vis/ Versión 2.0.3.3\_2010).

El equipo fue esterilizado antes de cada cultivo conteniendo el medio mínimo M9 modificado, suplementado con Trp a las 15h de cultivo. Antes de la inoculación se ajustan y calibran los sensores y se preparan las condiciones de trabajo que en estos experimentos se mantiene una temperatura constante de 30 °C mediante mantilla de calentamiento, se ajusta la agitación a 250 rpm (impelentes tipo Rushton), durante todo el proceso hay un suministro de aire pues es un cultivo aerobio (filtro de venteo de 50 mm y 0.2 μm antes de la entrada al biorreactor para garantizar un flujo estéril). El volumen de trabajo fue de 2 L.

### **Análisis de las muestras. Determinación de biomasa**

El incremento de biomasa en los cultivos se determinó mediante peso seco. Los pellets se secaron en estufa (Fisher Scientific) a 80 °C durante 24h. Tras ese período de secado, se determinó el peso seco de la biomasa en una balanza analítica (Mettler Toledo). Se midió la absorbancia a 600 nm en el Espectrofotómetro (Thermo Scientific) de manera que con los valores de peso seco conocidos y su correspondiente en la lectura del espectrofotómetro se elaboró una curva patrón que relaciona ambos parámetros para este cultivo, de manera que se pueden interpolar y obtener los valores de peso seco a partir de la lectura de absorbancia correspondiente a cada muestra en la cinética.

### **Determinación del consumo de sustrato**

El consumo de los diferentes sustratos fue determinado a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas, guardados a -20 °C hasta el momento de su análisis. La cuantificación de las fuentes de carbono se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., USA), se ajustaron los parámetros para detectar el consumo de propionato con buena resolución.

Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de nylon de tamaño de partícula de 0.2 μm. Se utilizó un equipo de HPLC (Varian ProStar) con detector de índice de refracción (Knauer) y horno 50 °C. Como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a una concentración de 5 mM. El flujo de la fase móvil fue de 0.6 mL/min y un



tiempo de corrida de 20 minutos. Se prepararon soluciones estándar en un rango de concentraciones de 5 a 0.01 g/L, estas fueron medidas de igual manera mediante cromatografía HPLC; con estos resultados se elaboró una curva patrón que relaciona la concentración de propionato con el área del pico (mRIU.s). La cuantificación se realizó interpolando los valores obtenidos del análisis de la muestra en la curva estándar explicada anteriormente.

### Determinación de la producción de AIA y el consumo de Trp

La concentración de AIA fue determinada igualmente a partir de los sobrenadantes, estos se guardan a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. La cuantificación de AIA se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm (Espectro Thermo Scientific, Evolution, USA) utilizando el método de Salkowski. Las muestras de sobrenadante se incubaron durante 30 min en la oscuridad con el reactivo Salkowski (2,4 g de  $\text{FeCl}_3$  en 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en una relación 1:1. Para la determinación de las concentraciones de AIA los valores de absorbancia obtenidos fueron extrapolados en una curva patrón de AIA sintético (Sigma & Aldrich). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los resultados de producción de AIA fueron corroborados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna C18 (Waters Inc., USA/ ODS 300 x 4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ). Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de nylon de tamaño de partícula 0.2  $\mu\text{m}$ . Se utilizó un equipo de HPLC (Varian ProStar) con detector de UV (One Varian ProStar 320 UV/VIS) a una longitud de onda de 280 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de agua acidulada (ácido acético al 1%) y acetonitrilo en proporción 70:30. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y tiempo de corrida de 15 min. Las concentraciones de AIA y Trp se determinaron a través de una curva patrón elaborada con estándares de ambos compuestos en un rango de concentración de 1 a 0.01 g/L.

Los datos experimentales que se reportaron previamente (Castillo-Alfonso *et al.*, 2022), se compilan en la Tabla 1 y sirven como base para el diseño conceptual del proceso.

**Tabla 1.** Parámetros experimentales para el diseño conceptual del bioproceso (Castillo-Alfonso *et al.*, 2022). Los valores de concentración son los valores finales

Compuesto	Concentración (g/L)	Rendimientos
Propionato	3.08 g/L	$Y_{\frac{X}{S}} = 0.036$
Biomasa	0.1g/L	$Y_{\frac{AIA}{S}} = 0.168$
AIA	0.31 g/L	$Y_{\frac{CO_2}{S}} = 0.795$

X-biomasa, S-substrato



## Prueba de crecimiento de plantas

Se hicieron pruebas con el sobrenadante de los cultivos de *Bacillus subtilis*, es decir sin biomasa, obtenidos por Castillo-Alfonso *et al.* (Castillo-Alfonso *et al.*, 2022). Las concentraciones de los productos finales de los cultivos se encuentran en la Tabla 1. Este sobrenadante se ocupó como bioinsumo para el cultivo de plántulas de semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y de lechuga (*Lactuca sativa*) ocupando charolas de germinación cuyos pozos tienen un volumen aproximado de 150 mL. El caldo de cultivo se aplicó siguiendo dos metodologías y estos cultivos se hicieron por duplicado:

1. La inmersión de la semilla en el caldo durante dos horas, posterior a este tiempo se dejaron secar al aire ambiente por un periodo de una hora; se realiza la siembra de las semillas colocando una semilla individual en cada espacio de la charola.
2. Aplicación del extracto de fermentación por aspersión sobre las semillas ya sembradas en la charola de germinación de manera regular hasta alcanzar su crecimiento. La aspersión se llevó a cabo dos veces por día durante una semana.

Para la evaluación del crecimiento de las plántulas un grupo de estas funciona como población control, las cuáles no fueron sometidas al tratamiento. En todos los casos se midió el crecimiento de tallo y raíz como variable determinante para comprobar el efecto del extracto en las plántulas y comparar con resultados cuantitativos entre ambos métodos de aplicación.

## Simulaciones para la evaluación técnico-económica

Se utilizó el simulador SuperPro Designer® para la simulación de la producción de ácido indol 3-acético con los parámetros cinéticos de la Tabla 1. Los datos de materias primas para el proceso se muestran en la Tabla 2 y los costos de éstas en la Tabla 3. Los balances de materia y energía se llevaron a cabo para la dimensión de un proceso cuyo lote de producción es de 1000 L de caldo de cultivo. El propionato se consideró como la fuente de carbono a evaluar en el diseño conceptual junto con el triptófano como inductor. Los precios se obtuvieron de la base de datos del simulador y los reportados comercialmente en (<https://es.made-in-china.com>).

**Tabla 2.** Requerimientos de materias primas para la simulación del bioproceso

Compuesto	Flujo (kg/batch)
<b>Sustratos</b>	
Propionato	5.0
Triptófano	2.0
<b>Sales (medio)</b>	
Nitrato de amonio	0.5
Cloruro de calcio	0.5
Fosfato de potasio dihidrogenado	0.3



<b>Sulfato de magnesio</b>	0.02
<b>Fosfato ácido di sódico</b>	3.20
<b>Cloruro de sodio</b>	0.5
<b>Agua</b>	1000

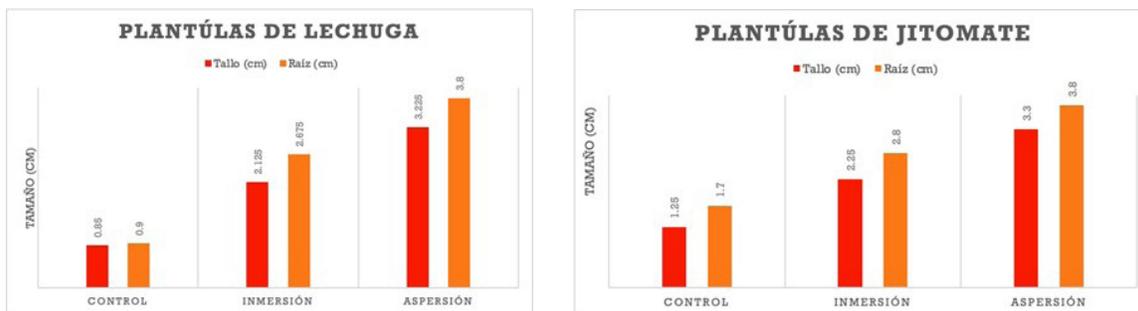
**Tabla 3.** Precios de materias primas utilizados en la simulación del bioproceso

<b>Componente</b>	<b>Precio Kg (USD)</b>	<b>Fuente</b>
Propionato	\$4.6 USD/ kg	<a href="https://www.chemicalbook.com/manufacturer/hebei-crovell-biotech-455/">https://www.chemicalbook.com/manufacturer/hebei-crovell-biotech-455/</a>
Triptófano	\$20 USD/kg	<a href="https://www.chemicalbook.com/manufacturer/anhui-rencheng-technology-349/">https://www.chemicalbook.com/manufacturer/anhui-rencheng-technology-349/</a>
AIA comercial	\$90 USD/ kg	<a href="https://goldbio.com/product/1311/iaa-indole-3-acetic-acid">https://goldbio.com/product/1311/iaa-indole-3-acetic-acid</a> <a href="https://www.chemicalbook.com/Price/Indole-3-acetic-acid-1.htm">https://www.chemicalbook.com/Price/Indole-3-acetic-acid-1.htm</a>
Agua	\$2.22 USD/m3	<a href="https://portal.conagua.gob.mx/Tarifas/Documentos/Agua%20Prieta%20Son%202018.pdf">https://portal.conagua.gob.mx/Tarifas/Documentos/Agua%20Prieta%20Son%202018.pdf</a>

Los costos de AIA que se encontraron son muy variables, la mayoría son productores chinos. Así que se decidió tomar como referencia el precio mínimo ofrecido por los productores.

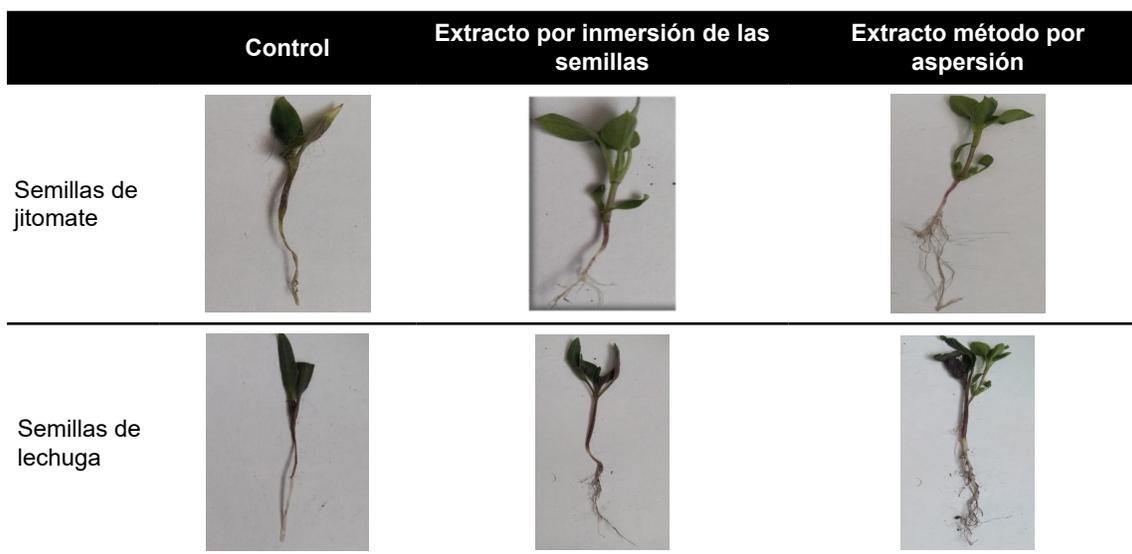
## Resultados y Discusión

En el diseño de bioprocesos una de las reglas empíricas señala que se debe contemplar que la purificación de los productos de interés puede representar un 80% del costo total del proceso. Ante este escenario, se decidió ocupar el sobrenadante con la presencia de AIA en los caldos de cultivos de *Bacillus subtilis* para el crecimiento de plántulas de jitomate y lechuga por duplicado; la concentración de AIA es la reportada en la Tabla 1. Se hicieron mediciones del tallo y raíz, adicional a un control negativo. En la Figura 1 se pueden leer los obtenidos para el tallo y raíz. Para el control negativo se obtiene un menor tamaño de follaje y raíz con respecto a las que se le adicionó el caldo. Entre las dos pruebas en donde fue utilizado el sobrenadante, del método por aspersion se obtiene un mayor crecimiento en tallo y número de hojas a diferencia del primer método de sumergir las semillas. Adicionalmente, se analizan las características físicas de manera visual de la raíz de cada una de las muestras (ver Figura 2) con el objetivo de comprobar que el ácido indol acético está presente y funciona como bioinsumo ya que lo que propicia el AIA es un desarrollo de raíz fasciculada; aquella que se forma hacia los lados propiciando una mejor asimilación de nutrientes para el crecimiento de las plantas. La formación de raíz fasciculada se presenta en las plántulas de jitomate y lechuga con el extracto agregado por aspersion, se observa la raíz mejor desarrollada, así como un follaje más sano. En el control negativo tenemos el desarrollo de raíz pivotante, un crecimiento menor con respecto al uso del extracto de fermentación. Cabe señalar que el sobrenadante se conservó en medio ambiente evitando la incidencia directa de la luz del sol.



**Figura 1.** Comparación del crecimiento foliar del control negativo con respecto a los dos métodos de aplicación del extracto en plántulas de jitomate y lechuga

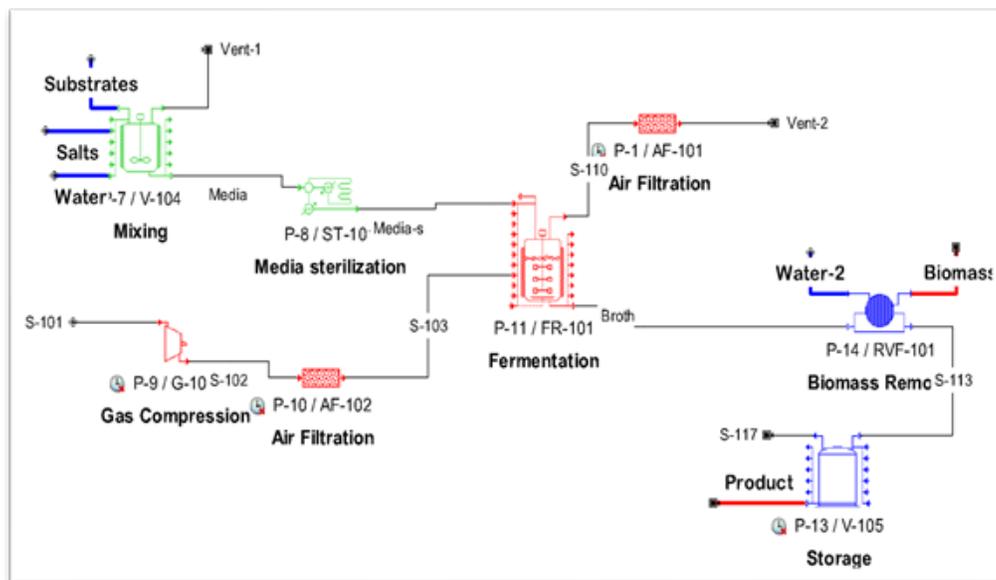
Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se puede ver el efecto del sobrenadante de la fermentación conteniendo el AIA como bioinsumo para mejorar el crecimiento de plántulas. Lo que implica que el AIA puede ser comercializado en forma de solución sin necesidad de ser purificado, lo cual representaría un costo adicional al proceso.



**Figura 2.** Evidencia del crecimiento de plántulas de tomate y lechuga

### Evaluación de la viabilidad técnico-económico de la producción de AIA

Los resultados en el crecimiento de las plantas utilizando el caldo de cultivo se considera como una directriz del diseño conceptual del bioproceso, por lo que para evaluar la factibilidad técnico-económica de la producción de AIA basado en *Bacillus subtilis* W-168 se realizó el diagrama de proceso en SuperPro Designer® mostrado en la Figura 3, donde se representan las tres etapas y corrientes correspondientes del proceso: la etapa río arriba que consiste en la preparación y esterilización de los medios de cultivo, la etapa de fermentación, la etapa de separación de la biomasa suspendida y el almacén del sobrenadante.



**Figura 3.** Diagrama de proceso para la producción de ácido indol acético simulado en el software SuperPro Designer®

Para la simulación del bioproceso se consideró la producción de un fermentador que genera un lote de 1000 L que produciría 16.8 kg AIA y que al año se llevarían a cabo 49 lotes. El software permite un análisis técnico y económico del proceso; el análisis técnico especifica costos: equipos, operativos, mano de obra, servicios y materias primas implicadas en el proceso. El biorreactor y el tanque de almacenamiento son los más utilizados durante el proceso, por lo tanto, representan el mayor costo por operación de los equipos utilizados. El costo de producción que se obtiene de la simulación de AIA es de \$24.5 USD/kg, si se compara este valor con el valor comercial promedio presentado en la Tabla 3 (\$390 USD/kg) representa aproximadamente 10%. Este bajo costo está asociado a que el AIA se encuentra en solución y que podría ser aplicado para el crecimiento de las plantas.

En la Tabla 4 se pueden observar los datos obtenidos en el estudio económico, se determinó un total de capital invertido de 12,827,000 USD, un retorno del 18.87% de la inversión en 5 años, un valor presente neto (VPN) de \$4,534,000 considerando una inflación del 7% y una tasa interna de retorno (TIR) del 12.45%.

**Tabla 4.** Parámetros requeridos para el análisis económico del proceso calculados con el simulador

Total de capital invertido	12,827,000 USD
Costo operativo	2,777,000 USD/yr
Margen bruto	37.76%
Retorno de la inversión	18.87%
Tiempo de recuperación	5 años
Tasa interna de retorno (TIR)	12.45%
Valor presente neto VPN (interés del 7.0%)	4,534,000
Costo unitario de AIA	24.5 USD/kg



Con base en el diseño del bioproceso propuesto, la producción de AIA como un bioinsumo para el crecimiento de plantas se puede considerar factible técnica y económicamente. Es importante comparar que, en esta propuesta de diseño, el producto final es una solución de AIA a una concentración de 0.31 g/L, a diferencia del producto comercial el cual se encuentra purificado; sin embargo, la presentación de AIA en solución puede reducir los costos de producción de alimentos ya que su costo se reduce de manera considerable.

Actualmente no existe un proceso de producción de AIA basado en microorganismos. Los esfuerzos que se han llevado a cabo son para escalar su producción en fermentadores de 100 L a nivel planta piloto, cultivando la levadura *Rhodosporidiobolus fluvialis* DMKU-CP293 y utilizando triptófano, pero no se reporta su factibilidad económica (Bunsangiam, S. *et al.*, 2021).

## Conclusiones

En los últimos años se ha incrementado el interés por producir ácido indol acético para promover el crecimiento de plantas de una manera sustentable y generar productos orgánicos con el objetivo de disminuir el impacto en los suelos. La producción de esta auxina se realiza actualmente por síntesis química y una alternativa a esta producción es utilizar bacterias promotoras de crecimiento como *Bacillus subtilis*.

Actualmente existen esfuerzos para cultivar cepas del género *Bacillus* y producir AIA utilizando triptófano como inductor y fuentes de carbono como glucosa, propionato o sustratos de desecho industrial como soya. Sin embargo, debido al precio del triptófano se podría cuestionar su uso como fuente de carbono, por lo que es importante evaluar un diseño que considere estos costos.

En este trabajo, en particular, se evaluó, por medio de un simulador de bioprosesos, un diseño para la producción de AIA cultivando *Bacillus subtilis* y empleando un medio definido con triptófano y propionato. La alternativa de diseño resultante considera que el AIA puede venderse como una solución, a diferencia del producto concentrado, y que esto puede implicar un costo menor para el consumidor comparado con el que se tiene en el mercado. Por lo tanto, este análisis incentiva la optimización de la producción microbiana de AIA utilizando *Bacillus subtilis*. Como perspectiva se podría considerar no separar la biomasa ya que el microorganismo no se modifica genéticamente y evaluar el efecto en el crecimiento de las plantas.

## Referencias

Anguiano-Cabello, J. C., Flores-Olivas, A., Olalde-Portugal, V., Arredondo-Valdés, R., & Laredo-Alcalá, E. I. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 13-pág. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>



- Alfonso, F. C., Viguera-Ramírez, G., Rosales-Colunga, L. M., del Monte-Martínez, A., & Hernández, R. O. (2021). Propionate as the preferred carbon source to produce 3-indoleacetic acid in *B. subtilis*: comparative flux analysis using five carbon sources. *Molecular Omics*, 17(4), 554-564. <https://doi.org/10.1039/d1mo00039j>
- Bunsangiam, S., Thongpae, N., Limtong, S., & Srisuk, N. (2021). Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Scientific Reports*, 11(1), 13094. DOI:10.1038/s41598-021-92305-w
- Castillo-Alfonso, F., Quintana-Menéndez, A., Viguera-Ramírez, G., Sales-Cruz, A. M., Rosales-Colunga, L. M., & Olivares-Hernández, R. (2022). Analysis of the propionate metabolism in *Bacillus subtilis* during 3-indolacetic production. *Microorganisms*, 10(12), 2352. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122352>
- Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2014). Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant physiology*, 166(3), 1090-1105. DOI: 10.1104/pp.114.239061
- Dolan, S. K., Wijaya, A., Geddis, S. M., Spring, D. R., Silva-Rocha, R., & Welch, M. (2018). Loving the poison: The methylcitrate cycle and bacterial pathogenesis. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(3), 251–259. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000604>
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. DOI: 10.1007/s10482-013-0095-y
- Duke, S. O. (2018). *Herbicide-resistant crops: Agricultural, economic, environmental, regulatory, and technological aspects*. Crc Press.
- Gerwick, B. C., & Sparks, T. C. (2014). Natural products for pest control: an analysis of their role, value, and future. *Pest Management Science*, 70(8), 1169-1185. DOI: 10.1002/ps.3744
- Higuera Ramírez, A. M., & Restrepo Rivillas, A. M. (2019). *Desarrollo de un bioinsumo agrícola con base en un consorcio de Bacillus subtilis-Pseudomonas sp* (tesis de grado, Universidad EAFIT). <http://hdl.handle.net/10784/15882>
- Kaur, P., & Purewal, S.S. (2019). Biofertilizers and Their Role in Sustainable Agriculture. En Giri, B., Prasad, R., Wu, Q.S., Varma, A. (eds) *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment . Soil Biology*, vol 55. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_12)
- Kircher, B., Woltemate, S., Gutzki, F., Schlüter, D., Geffers, R., Bähre, H., & Vital, M. (2022). Predicting butyrate-and propionate-forming bacteria of gut microbiota from sequencing data. *Gut Microbes*, 14(1), 2149019. DOI: 10.1080/19490976.2022.2149019
- Kumari, S., Prabha, C., Singh, A., Kumari, S., & Kiran, S. (2018). Optimization of indole-3-acetic acid production by diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), iso-



- lated from rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 7(2), 20-27. DOI:10.18178/ijpmbs.7.2.20-27
- Lee, J. C., & Whang, K. S. (2016). Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Bacillus megaterium* BM5. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 49(5), 461-468. DOI:10.7745/KJSSF.2016.49.5.461
- Mageshwaran, V., Inmann, F. & Holmes, L. D. 2014. Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in lignocellulosic carbon sources. *International Journal of Microbiology Research*, 6(2), 570-574. [https://www.researchgate.net/publication/268334859\\_Growth\\_kinetics\\_of\\_Bacillus\\_subtilis\\_in\\_lignocellulosic\\_carbon\\_sources](https://www.researchgate.net/publication/268334859_Growth_kinetics_of_Bacillus_subtilis_in_lignocellulosic_carbon_sources)
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220. DOI: 10.1139/m96-032
- Patten, C. L. (2022). Rhizocompetence traits regulated by the transcription factor TyrR in plant-associated bacteria. *Rhizosphere*, 23, 100577. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100577>
- Pérez Cruz, O. A. (2020). La Competitividad y la seguridad alimentaria en México. *Economía Coyuntural*, 5(1), 119–142. <http://www.scielo.org.bo/scielo.php>
- Pollmann, S., Müller, A., Piotrowski, M., & Weiler, E. W. (2002). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216, 155-161. DOI: 10.1007/s00425-002-0868-4
- Priya, A. K., Alagumalai, A., Balaji, D., & Song, H. (2023). Bio-based agricultural products: a sustainable alternative to agrochemicals for promoting a circular economy. *RSC Sustainability*, 1(4), 746-762. DOI: 10.1039/D3SU00075C
- Quintana, L. A. (2022). *Evaluación de la producción de ácido indolacético en Bacillus subtilis utilizando modelos metabólicos a escala genómica y algoritmos de optimización multiobjetivo*. México: UAM, Unidad Cuajimalpa, División de Ciencias Naturales e Ingeniería. <http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/handle/123456789/1124>
- Sarmiento-López, L. G., López-Meyer, M., Maldonado-Mendoza, I. E., Quiroz-Figueroa, F. R., Sepúlveda-Jiménez, G., & Rodríguez-Monroy, M. (2022). Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor. *Journal of bioscience and bioengineering*, 134(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.007>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial cell factories*, 19, 1-12. DOI:10.1186/s12934-020-01436-8
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(Supl. 1), 33-39. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362016000500005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005&lng=es&tlng=es).



- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>
- Widawati, S. (2020). Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 572, No. 1, p. 012025). IOP Publishing. DOI 10.1088/1755-1315/572/1/012025
- Wu, H., Yang, J., Shen, P., Li, Q., Wu, W., Jiang, X., ... & Qi, F. (2021). High-level production of indole-3-acetic acid in the metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(6), 1916-1924. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c08141
- Yamaguchi, I., Cohen, J. D., Culler, A. H., Quint, M., Slovin, J. P., Nakajima, M., ... & Sakagami, Y. (2010). *Plant Hormones Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*. Springer Dordrecht
- Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>