

PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Producción y Caracterización de Polihidroxialcanoatos (PHAs) Generados a Partir de Residuos  
Provenientes de la Agroindustria del Cacao Usando una Cepa Nativa.

Maria Andrea Gamboa Suarez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

Cristian Blanco Tirado

Químico, Ph. D.

Codirector

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

### **Dedicatoria**

A Dios, por haberme escogido para esta profesión, darme la fuerza necesaria para continuar y hacer posible este proyecto.

A mi mamá Cela Suarez, que aunque ya no se encuentra físicamente conmigo siempre ha sido mi razón de ser, y su amor y apoyo siguen dentro de mi corazón con la misma fuerza. Tu lo soñaste, me hiciste soñar y Dios dispuso su voluntad para que fuera posible.

A mi nonita, tíos y primos por apoyarme tanto y no permitirme desfallecer a lo largo del proceso, con su compañía y amor. A mi prima y compañera de tesis Silvia Juliana Suarez por desde niñas ser esa hermana incondicional y ahora por hacer parte de este proceso, su ayuda y conocimiento fueron esenciales.

A mis profesores y compañeros de carrera, de los cuales guardo muchos conocimientos y experiencias.

### **Agradecimientos**

A la profesora Mabel Juliana Quintero, por todo el apoyo académico y emocional a lo largo del proyecto, por los nuevos conocimientos adquiridos gracias a sus enseñanzas, por sus correcciones y disponibilidad ante cualquier inquietud.

A los profesores Cristian Blanco y Yajaira Combariza, por orientarme durante el trabajo de grado desde su experiencia y brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

A la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander por el proceso de formación.

A la Gobernación de Santander por la financiación a través del proyecto de Regalías.

A todos los integrantes de los grupos de Investigación GIFTEX por su colaboración.

Al centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM por su colaboración.

A la Universidad Nacional de Colombia y su departamento de Química por sus servicios.

## Tabla de Contenido

|                                                                                        | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Introducción .....                                                                     | 15   |
| 1. Objetivos .....                                                                     | 18   |
| 1.1. Objetivo general.....                                                             | 18   |
| 1.2. Objetivos específicos .....                                                       | 18   |
| 2. Estado del arte y marco teórico.....                                                | 19   |
| 2.1. Generalidades del cacao.....                                                      | 19   |
| 2.2. Caracterización de los residuos provenientes de la agroindustria del cacao .....  | 22   |
| 2.3. PHAs y su producción .....                                                        | 24   |
| 2.4. PHAs como bioplásticos.....                                                       | 27   |
| 2.5. Microorganismos productores de PHAs .....                                         | 28   |
| 2.6. Caracterización de PHAs .....                                                     | 29   |
| 3. Metodología .....                                                                   | 31   |
| 3.1. Caracterización de residuos líquidos provenientes de la industria del cacao ..... | 31   |
| 3.2. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 a sustratos modelo .....                    | 32   |
| 3.3. Producción de PHA usando sustratos modelo .....                                   | 34   |
| 3.4. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 a MCL y LRRA y producción de PHA .....      | 36   |
| 3.5. Cuantificación de biomasa, producto (PHA) y consumo de sustrato .....             | 36   |

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1. Biomasa .....                                                                           | 36 |
| 3.5.2. PHA.. .....                                                                             | 37 |
| 3.5.3. Consumo de sustratos.. .....                                                            | 38 |
| 3.6. Diseño de experimentos .....                                                              | 38 |
| 3.7. Caracterización del PHA .....                                                             | 40 |
| 3.7.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.. .....                                               | 40 |
| 3.7.2. Análisis Infrarrojo (IR).. .....                                                        | 40 |
| 3.7.3. Análisis elemental.. .....                                                              | 40 |
| 3.7.4. Ultravioleta visible (UV-VIS) .....                                                     | 41 |
| 3.7.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....                                         | 41 |
| 3.7.6. Análisis termogravimétrico (TGA).. .....                                                | 41 |
| 4. Resultados .....                                                                            | 41 |
| 4.1. Caracterización de residuos líquidos provenientes de la industria del cacao .....         | 41 |
| 4.2. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 a sustratos modelo (fructosa y ácido acético) ..... | 45 |
| 4.3. Producción de PHA usando sustratos modelo (fructosa y ácido acético) .....                | 46 |
| 4.4. Adaptación de <i>B. megaterium</i> B2 a MCL y LRRA y producción de PHA. ....              | 50 |
| 4.5. Diseño de experimentos .....                                                              | 53 |
| 4.6. Caracterización PHA .....                                                                 | 62 |
| 4.6.1. Análisis MS MALDI- TOF .....                                                            | 62 |
| 4.6.2. Análisis elemental.. .....                                                              | 65 |

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 4.6.3. Análisis infrarrojo.....                    | 65 |
| 4.6.4. UV-VIS.....                                 | 67 |
| 4.6.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).. | 68 |
| 4.6.6. Análisis termogravimétrico (TGA)..          | 68 |
| 5. Conclusiones .....                              | 70 |
| 6. Recomendaciones.....                            | 72 |
| Bibliografía .....                                 | 73 |
| Apéndices .....                                    | 82 |

**Lista de Tablas****Pág**

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Composición de mucílago de cacao antes (dulce o pulpa) y después de la fermentación (lixiviado).....                                                                                                | 23 |
| Tabla 2. Comparación de algunas propiedades del tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP) con el PHB. ....                                                                                       | 27 |
| Tabla 3. Métodos para extracción de PHA. ....                                                                                                                                                                | 37 |
| Tabla 4. Combinaciones de mezclas en % (v/v) obtenidas en MINITAB®. ....                                                                                                                                     | 39 |
| Tabla 5. Composición química de LRRA y MCL y tiempos de retención de las sustancias. ....                                                                                                                    | 42 |
| Tabla 6. Estandarización del método de extracción de PHA SDS-sonicación. ....                                                                                                                                | 48 |
| Tabla 7. Valores de biomasa y PHA extraído, y valores de rendimiento y productividad en cada mezcla del diseño de experimentos.....                                                                          | 55 |
| Tabla 8. Resultados del ensayo de validación del modelo estadístico.....                                                                                                                                     | 60 |
| Tabla 9. Comparación de parámetros cinéticos alcanzados usando diferentes fuentes de carbono y microorganismos para la producción de PHAs reportados por otros autores y los obtenidos en este estudio. .... | 61 |
| Tabla 10. Análisis elemental teórico y experimental.....                                                                                                                                                     | 65 |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                         | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1. Fruto de cacao y sus almendras .....                                                                                          | 19   |
| Figura 2. Países latinoamericanos productores de cacao en grano (toneladas).. .....                                                     | 20   |
| Figura 3. a) Líquido residual rico en azúcares (LRRRA), b) Mucílago de cacao lixiviado (MCL) .....                                      | 21   |
| Figura 4. Estructura general de los polihidroxialcanoatos y nomenclatura según el grupo R.....                                          | 25   |
| Figura 5. Esquema para procedimiento de recuento en placa para <i>B. megaterium</i> B2.....                                             | 33   |
| Figura 6. Esquema para procedimiento de cultivo por lotes para <i>B. megaterium</i> B2.....                                             | 35   |
| Figura 7. Diseño de experimentos método Simplex para producción de PHAs. ....                                                           | 39   |
| Figura 8. Superposición de los cromatogramas de MCL con los patrones de ácidos y azúcares. ....                                         | 43   |
| Figura 9. Superposición de los cromatogramas de LRRRA con los patrones de ácidos y azúcares.....                                        | 43   |
| Figura 10. Curva de crecimiento microbiano para <i>B. megaterium</i> B2 utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono..... | 46   |
| Figura 11. Biomasa acumulada utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono. ....                                           | 47   |
| Figura 12. PHA acumulado utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono. ....                                               | 49   |
| Figura 13. Consumo de sustrato correspondiente a los lotes de fructosa y ácido acético. ....                                            | 49   |
| Figura 14. Curva de crecimiento microbiano para <i>B. megaterium</i> B2 utilizando MCL y LRRRA como fuente de carbono.....              | 50   |
| Figura 15. Biomasa acumulada utilizando LRRRA y MCL como fuente de carbono. ....                                                        | 51   |
| Figura 16. PHA acumulado utilizando LRRRA y MCL como fuente de carbono.....                                                             | 52   |
| Figura 17. Consumo de azúcares totales correspondiente a los lotes de LRRRA y MCL. ....                                                 | 53   |

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18. Biomasa acumulada para las mezclas del diseño de experimentos. ....                                                   | 54 |
| Figura 19. PHA acumulado para las mezclas del diseño de experimentos. ....                                                       | 55 |
| Figura 20. Consumo de sustrato de las mezclas del diseño de experimentos. ....                                                   | 57 |
| Figura 21. Graficas de contorno de mezcla para la productividad y rendimiento. ....                                              | 58 |
| Figura 22. Grafica para aumento de productividad y rendimiento. Ensayo de validación del modelo estadístico. ....                | 59 |
| Figura 23. Consumo de azúcares totales, biomasa y PHA acumulado para el ensayo de validación del modelo estadístico. ....        | 60 |
| Figura 24. Espectro de masas de muestra de PHA tomado en modo reflectrón. ....                                                   | 63 |
| Figura 25. Espectro de masas de muestra de PHA tomado en modo lineal. ....                                                       | 64 |
| Figura 26. Espectros infrarrojos para a) una muestra de biopolímero obtenido en el presente estudio y b) uno de referencia ..... | 66 |
| Figura 27. Espectro ultravioleta visible del PHB. ....                                                                           | 67 |
| Figura 28. Curva DSC. ....                                                                                                       | 68 |
| Figura 29. Curva TGA. ....                                                                                                       | 69 |

### Lista de Apéndices

|                                                                                                            | <b>Pág.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Apéndice A. Cálculo de Unidades formadoras de colonia por mililitro. ....                                  | 82          |
| Apéndice B. Curva de calibración sacarosa. ....                                                            | 83          |
| Apéndice C. Curva de calibración glucosa. ....                                                             | 83          |
| Apéndice D. Curva de calibración fructosa. ....                                                            | 83          |
| Apéndice E. Curva calibración ácido acético. ....                                                          | 84          |
| Apéndice F. Curva de calibración ácido láctico. ....                                                       | 84          |
| Apéndice G. Curva de calibración ácido cítrico. ....                                                       | 84          |
| Apéndice H. Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención para los patrones de azúcares. .... | 85          |
| Apéndice I. Evaluación de la repetibilidad de las áreas para los patrones de azúcares. ....                | 85          |
| Apéndice J. Producción de biomasa y PHA en el tiempo para las mezclas del diseño de experimentos. ....     | 86          |

## RESUMEN

**TITULO:** PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) GENERADOS A PARTIR DE RESIDUOS PROVENIENTES DE LA AGROINDUSTRIA DEL CACAO USANDO UNA CEPA NATIVA\*.

**AUTOR:** MARIA ANDREA GAMBOA SUAREZ\*\*

**PALABRAS CLAVE:** RESIDUOS DE CACAO, POLIHIDROXIALCANOATOS, CEPA NATIVA, BIOPROCESO.

### DESCRIPCIÓN:

Los desechos líquidos de cacao son residuos ricos en azúcares y ácidos que se generan como un subproducto de la fermentación del cacao. Estos fueron utilizados como sustrato en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) por la cepa nativa *Bacillus megaterium* B2. Los PHAs son poliésteres acumulados por los microorganismos como reserva de energía. Este estudio reporta el proceso de adaptación del microorganismo a dos tipos diferentes de desechos: mucílago de cacao lixiviado (MCL) y líquido residual rico en azúcares (LRRA); los cuales fueron caracterizados antes y durante el proceso por medio de la técnica cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cepa adaptada se transfirió a un biorreactor por lotes de 4 litros para el estudio de variables. Se estandarizó un método de extracción y cuantificación de PHA utilizando SDS-Sonicación, el cual es libre de solventes perjudiciales para el medio ambiente. Se realizó un diseño de experimentos para evaluar la producción de polihidroxicanoatos a diferentes concentraciones de sustratos, a través del cual se obtuvo un ensayo de validación del modelo estadístico con un rendimiento producto en sustrato de 0,98 g/g y un porcentaje de acumulación del 57%, lo cual indicó un aumento en estas variables en comparación con anteriores estudios. El polímero obtenido se caracterizó estructural y térmicamente identificando un PHA del tipo polihidroxi-butanato (PHB) con la fórmula molecular  $(C_4H_6O_2)_n$ , que se distingue por ser un polímero biodegradable y muy similar al plástico convencional.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Cristian Blanco Tirado, Químico, Ph. D.

**ABSTRACT**

**TITLE:** PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYHYDROXIALCANOATES (PHAs) GENERATED FROM WASTE FROM CACAO AGROINDUSTRIA USING A NATIVE CEPA\*.

**AUTHOR:** MARIA ANDREA GAMBOA SUAREZ\*\*

**KEYWORDS:** COCOA WASTE, POLYHYDROXIALCANOATES, NATIVE CEPA, BIOPROCESS.

**DESCRIPTION:**

Cocoa liquid wastes are a residue rich in sugars and acids that are generated as a byproduct of the cocoa fermentation. These were used as a substrate in the polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Bacillus megaterium* B2 native strain. PHAs are polyesters accumulated by microorganisms as an energy reserve. This study reports the process of adapting the microorganism to two different types of wastes: leached cocoa mucilage (MCL) and residual sugar-rich liquid (LRRa); which were characterized before and during the process by means of the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. The adapted strain was transferred to a 4-liter batch bioreactor for the study of variables. A method of extraction and quantification of PHA was standardized utilizing SDS-Sonication, a solvent-free method harmful to the environment. Experiment design was carried out to evaluate the production of polyhydroxyalkanoates at different substrate concentrations, through which a validation test of the statistical model was obtained with a product yield of 0.98 g/g and a 57% accumulation percentage was obtained, which indicated an increase in these variables compared to previous studies. The polymer obtained was characterized structurally and thermally identifying a PHA of the type polyhydroxybutyrate (PHB) with the molecular formula  $(C_4H_6O_2)_n$ , distinguished by being a biodegradable polymer and very similar to conventional plastic.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Cristian Blanco Tirado, Químico, Ph. D.

## Introducción

*Theobroma cacao* L, es el nombre biológico para la planta neotropical de las regiones de América Central y América del Sur perteneciente a la familia *Malvaceae*. Se pueden encontrar cerca de 26 especies en Colombia y es cultivada a gran escala para producir chocolate, lo cual la convierte en una especie económicamente valiosa (Richardson Madriñán, Whitlock, Meerow, & Madriñán, 2015).

En la industria cacaotera, se generan diferentes tipos de residuos de naturaleza orgánica durante todo el proceso de transformación de los granos. La obligación que tienen las diferentes industrias de realizar un correcto tratamiento de los residuos generados diariamente, conlleva a buscar alternativas que permitan transformarlos para la obtención de nuevos subproductos de valor. De esta manera se lograría sacar el máximo potencial de utilidad al mismo tiempo que estarían siendo neutralizados de la mejor manera y evitando que generen un gran impacto ambiental.

La finalidad de la presente investigación es valorizar dos de los residuos provenientes del proceso de transformación del cacao, denominados mucílago de cacao lixiviado o MCL (el cual es obtenido al segundo día de fermentación y por lo tanto es de carácter ácido) y líquido residual rico en azúcares o LRRA (residuos generados después de utilizar el mucílago de cacao dulce como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana). Estos dos residuos renovables están constituidos en mayor proporción por glucosa, sacarosa, fructosa, lignina, ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AGVs) y ácidos de cadena más larga, razón por la cual se consideran como una buena fuente de carbono susceptible de ser utilizada en un bioproceso.

Por otro lado, considerando que la industria de los plásticos de origen petroquímico, está generando una carga contaminante a nivel mundial porque son recalcitrantes debido a su contenido de material sintético, la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) se presenta como una alternativa. Investigaciones anteriores reportan el uso de residuos industriales como el glicerol crudo, como fuente de carbono para producir PHB (poli-3-hidroxibutirato) un tipo de polihidroxialcanoato (PHA) mediante una cepa nativa identificada como *Bacillus megaterium* B2 (Moreno, et al., 2015). Residuos de aceite de oliva usando *Azotobacter chroococcum* (Cerrone, Juarez, Sánchez Peinado, & Gonzalez Lopez, 2010) y melaza de caña usando *Bacillus sp. I* (Wu, y otros, 2001) entre otros, también han sido utilizados en la producción de PHA. Naturalmente estas bacterias acumulan PHA intracelular como mecanismo de almacenamiento de energía alcanzando hasta el 90% de su peso seco. Los PHA son básicamente un poliéster lineal producido por acción de bacterias vía fermentativa (Gangurde & Sayyed, 2012).

Estos son polímeros de gran interés en la actualidad debido a que son completamente biodegradables en condiciones anaerobias y aerobias, y básicamente podrían lograr remplazar los plásticos convencionales que son perjudiciales para el medio ambiente. Sin embargo, aunque se han utilizado diferentes bacterias y fuentes de carbono para su producción, no se ha reportado hasta la fecha información sobre la producción de estos bioplásticos utilizando una cepa nativa como *Bacillus megaterium* B2 y como sustrato residuos provenientes de la industria del cacao. Obtener grandes rendimientos de producción de PHA a unos costos accesibles son los retos que actualmente enfrenta esta área de investigación, por esta razón se requieren materias primas de bajo costo y microorganismos eficientes en la producción de estos biopolímeros.

Teniendo en cuenta lo anterior y el alto contenido de carbono que poseen los residuos líquidos del cacao, este trabajo evaluó la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de mucílago

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

de cacao lixiviado (MCL) y el líquido residual rico en azúcares (LRRRA), utilizando la cepa nativa *Bacillus Megaterium B2*.

Adicionalmente, se implementaron técnicas analíticas para caracterizar los residuos antes de iniciar el bioproceso y se establecieron protocolos para monitorear y evaluar la eficiencia del mismo. Para esto, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para caracterizar los residuos siguiendo los parámetros de columna y análisis reportados por Hayenga (2006). Recuento en placa para hacer seguimiento del crecimiento bacteriano para cada sustrato en erlenmeyer y peso seco para los ensayos realizados en el biorreactor de 7,5 litros. Para la determinación del consumo de sustrato de azúcares y ácidos se utilizó HPLC y la cuantificación del polímero se realizó con el método de extracción mediante tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) e irradiación ultrasónica (Arikawa, Sato, Fujiki, & Matsumoto, 2017), ya que mostró ser un proceso eficiente, fácil y además exento de la utilización de solventes perjudiciales para el medio ambiente como compuestos clorados o reactivos fuertes como hipoclorito de sodio. Se realizó la caracterización detallada del polímero por medio de espectrometría de masas, la fuente de iones fue la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), y el analizador de masas fue el analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Rizzarelli & Carroccio, 2014). Se estudió su estructura por medio de Infrarrojo (IR), análisis elemental y ultravioleta visible (UV-Vis), sus propiedades térmicas por análisis termogravimétrico TGA y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Finalmente, gracias a los resultados de este trabajo se demostró que es posible la obtención de PHB con un rendimiento producto en sustrato máximo de 0,98 g/g y una acumulación de 57%, que revolucionará la industria del cacao y de los plásticos, al lograr un bioproceso que incorpore sus residuos agroindustriales en la producción de plásticos biodegradables a partir de una cepa.

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

Producir y caracterizar estructuralmente polihidroxialcanoatos (PHAs) generados a partir de residuos provenientes de la industria del cacao (mucílago de cacao lixiviado y líquido residual rico en azúcares) utilizando la cepa *Bacillus megaterium* B2 y técnicas como MS-MALDI-TOF y SDS-sonicación.

### 1.2. Objetivos específicos

Caracterizar el contenido de ácidos y azúcares presentes en los residuos de cacao (mucílago de cacao lixiviado y líquido residual rico en azúcares) usando la técnica HPLC.

Determinar las condiciones de crecimiento óptimas para la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) usando la cepa *Bacillus megaterium* B2.

Caracterizar estructuralmente el polímero obtenido por MS-MALDI-TOF, y cuantificarlo mediante tratamiento con SDS-sonicación evaluando la eficiencia del proceso.

## 2. Estado del arte y marco teórico

### 2.1. Generalidades del cacao

*Theobroma, cacao* L es el nombre científico del árbol de cacao, este fruto es conocido como alimento de los dioses. Pertenece a la familia malváceas y es propio de América, especialmente de América del sur, en las regiones del amazonas y el Orinoco (Rojas & Sacristán Sánchez, 2013). Los árboles cultivados en la actualidad tienen una altura de entre dos o tres metros de manera que facilita la recolección del fruto pues estos árboles originalmente tienen entre cinco a diez metros de alto (Winkel, 2013). Cada mazorca de cacao puede llegar a medir entre 10 a 30 centímetros de longitud, como se muestra en la figura 1 y en su interior se estima que hay entre 20 a 40 almendras. El cacao es explotado comercialmente, pues es materia prima para productos de chocolatería y mantecas (Aculley, et al., 2010).

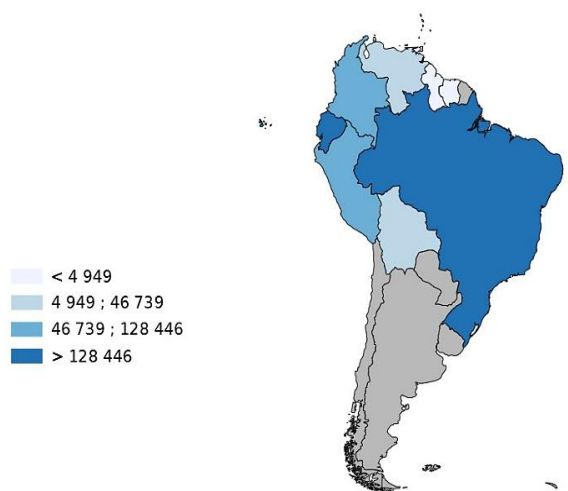


*Figura 1.* Fruto de cacao y sus almendras. Adaptado de parque tecnológico Guatiguará, Edificio de Investigaciones, laboratorio 408, 2019.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Los principales países productores de cacao en el mundo son Costa de Marfil, Ghana y Nigeria en el continente africano, en Asia y Oceanía la producción de cacao se concentra en los países de Malasia, Nueva Guinea e Indonesia y finalmente en América se destacan en mayor proporción Colombia, Brasil y Ecuador como se muestra en la figura 2.

Grano De Cacao - Producción (Toneladas)



*Figura 2.* Países latinoamericanos productores de cacao en grano (toneladas). Adaptado de Actualitix. (01 de octubre de 2016). (FAO) Recuperado el 15 de abril de 2018, de América del sur-grano de cacao- Producción (Toneladas): <https://es.actualitix.com/pais/amer/america-grano-de-cacao-produccion.php>.

En Colombia según el departamento de estadística de la Federación Nacional de Cacaoteros (2017) la producción de cacao para el año 2016 fue de 56.785 toneladas métricas. Aunque Colombia aporta solo el 1 % de la producción mundial de grano cuenta con una posición geográfica y condiciones climáticas para su cultivo (Serrano Gómez, 2009). El departamento de Santander es el mayor productor de cacao con un 38% del total nacional, siendo San Vicente de Chucurí y El Carmen los lugares en donde se da la mayor producción (Oliveros & Pérez, 2013).

En la producción de chocolate y sus derivados a partir del cacao se están generando gran cantidad de residuos debido a que se involucran una serie de procesos que abarca el cultivo y sostenimiento, recolección y posterior transformación del cacao. Este proceso de transformación comprende etapas como: desgrane de las mazorcas, separación de cada uno de los materiales resultantes como cascara, tejido de soporte, mucílago y granos a los que finalmente se les realiza la respectiva fermentación, secado, recolección y empaque (Rojas & Sacristán Sánchez, 2013).

De todo el proceso anteriormente descrito hay residuos que son de especial interés, uno de ellos conocido como mucílago o pulpa (mucílago dulce MD) es el líquido que desprenden los granos de cacao a penas la mazorca es desgranada; es espeso de color blanco, generalmente tiene un sabor agridulce y es rico en azúcares (Cadena Cala & Herrera Ardila, 2008). Con esta pulpa ya se están realizando otras investigaciones para la obtención de varios bioproductos como alcohol, dextrinas y celulosa bacteriana. Es precisamente en este último proceso en donde se genera un segundo residuo denominado líquido residual rico en azúcares (LRRA), el cual junto con mucílago de cacao lixiviado (MCL) correspondiente al día dos de fermentación de los granos de cacao (ver figura 3), están necesitando un correcto tratamiento y si es posible aprovecharlos como materias primas potenciales para la obtención de otros productos de valor agregado.



*Figura 3. a) Líquido residual rico en azúcares (LRRA), b) Mucílago de cacao lixiviado (MCL).*

Adaptado de parque tecnológico Guatiguará, Edificio de Investigaciones, laboratorio 408, 2019.

## 2.2. Caracterización de los residuos provenientes de la agroindustria del cacao

Actualmente, el tratamiento de estos residuos es una necesidad inmediata y ya se han realizado estudios para hacer un aprovechamiento de estos para la obtención de vinos, alcohol y vinagre a partir del mucílago de cacao (Marcillo & Meza, 2010). De 800 kilos de semillas de cacao se pueden obtener hasta 40 litros de pulpa que son desperdiciados y debido a la poca información que hay sobre estos residuos, se busca una alternativa de tratamiento innovadora y que adicionalmente logre incorporarlos en un proceso del cual se pueda obtener valor agregado.

El conocimiento de la composición fisicoquímica de estos residuos es importante para su posterior tratamiento, pero la literatura es escasa. Los estudios que se han realizado sobre el mucílago o pulpa de cacao en Costa de Marfil reportan; Total sólidos solubles (°Brix):  $16.17 \pm 0.74$ , Azúcares reductores totales (g/L):  $235.31 \pm 6.42$ , pH:  $3.75 \pm 0.81$ , Acidez titulable (meq/L):  $170 \pm 6.28$ , Calcio (mg/L):  $171.5 \pm 34.01$ , Sodio (mg/L):  $30.5 \pm 3.77$  y Potasio (mg/L):  $950 \pm 16.32$  (Anvoh, Zoro, & Gnakri, 2009). Para los análisis anteriores se utilizaron técnicas como espectrofotometría UV-Visible para azúcares y espectrofotometría de absorción atómica para identificar minerales (Quizhpi Nieves, 2016). La composición del mucílago de cacao antes (dulce o pulpa) y después de la fermentación (lixiviado) se muestra en la tabla 1, como se puede observar para el mucílago antes de la fermentación se aprecia un elevado contenido de sacarosa lo cual lo hace un sustrato interesante en procesos biotecnológicos (Anvoh, Zoro, & Gnakri, 2009). En cuanto al mucílago después de la fermentación se aprecia que hay ausencia de azúcares y presencia de ácidos, entre estos ácido cítrico y acético como resultado de los procesos de fermentación.

Tabla 1.

*Composición de mucílago de cacao antes (dulce o pulpa) y después de la fermentación (lixiviado).*

| Parámetro       | Antes de la fermentación | Después de la fermentación |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Agua            | 82- 87 %                 | 45 – 47 %                  |
| Sacarosa        | 12 %                     | 0 %                        |
| Ácido cítrico   | 1 -2 %                   | 0.5 %                      |
| Pectina         | 1 – 1.5 %                |                            |
| Alcohol etílico |                          | 0.5 %                      |
| Ácido acético   |                          | 1.6 %                      |

*Nota:* Adaptado de Luzuriaga Peña, D. L. (2012). Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao (*theobroma cacao*) como materia prima en la elaboración de vino. (Tesis pregrado), Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/4930>.

Como el objetivo de esta investigación fue trabajar directamente con los residuos provenientes de la producción de celulosa (LRRRA) y con los residuos de la fermentación de cacao (MCL), fue necesario realizarles a ambos sustratos una caracterización, especialmente en cuanto al contenido de azúcares y ácidos. Una técnica eficiente para realizar este tipo de caracterización es HPLC. Algunos estudios realizados por ejemplo para la determinación simultánea de estos compuestos en uvas, vino y bebidas alcohólicas fermentadas a partir de frutas se realiza mediante la separación de estos metabolitos con el uso de columnas de intercambio iónico ( $300 \times 7,78$  mm) rellenas de partículas de resina sulfonada, a base de un copolímero de estireno divinilbenceno, de 7 a 11  $\mu$ m de diámetro. Se usa una fase isocrática acidificada con temperaturas de 25 a 75 °C, para el sistema de detección se especifica que para la caracterización de azúcares se utiliza un detector de índice de refracción (RID) (Monteiro Coelho, et al., 2018). Para los ácidos orgánicos se utiliza un detector ultravioleta visible (UV), entre 210 y 217 nm. Según Fabio y colaboradores (2005) como eluyente

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

se utiliza 0,005 N de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  debido a una mayor estabilidad de la línea base, flujo 0,4 ml/min y temperatura 25 ° C. Según Hasmin y colaboradores (2009) la separación es exitosa utilizando como eluyente 0,045 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con 6 % acetonitrilo (v/v). Además, se especifica que las muestras se deben diluir 1:10 (V/V) con la fase móvil y deben filtrarse antes de la inyección directa a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ .

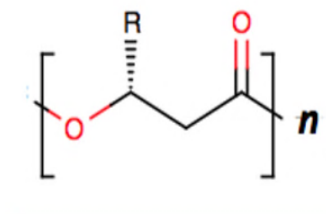
### 2.3. PHAs y su producción

Por otra parte según un estudio realizado en tecnología bioambiental (Amulya, Reddy, & Mohan, 2014) los efluentes residuales agotados enriquecidos con AGVs generados del proceso de producción de biohidrógeno que son semejante a los residuos de la fermentación del cacao resultan ser un sustrato potencial para producción de PHA por medio de biocatalizadores como en este caso la bacteria *Bacillus tequilensis*, la cual se alimenta de esta fuente de carbono y produce y acumula PHA intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y puede llegar a representar más del 90% del peso seco celular (López, et al., 2012), es decir en cantidades de interés.

Este trabajo se considera como una alternativa para el manejo de los residuos ácidos debido a que puede llegar a generar una reducción en el costo de producción de PHA, y además conlleva a una valorización de estos al mismo tiempo que los trata. El tipo de polímero que resulta depende de que AGV utilice la bacteria como fuente de carbono. Se han identificado cerca de 150 congéneres diferentes de PHA, con cadenas cortas conformadas por menos de 5 átomos de carbono en las cadenas laterales, cadenas medias de entre 5 y 14 átomos de carbono y cadenas largas con más de 14 átomos de carbono (Raza, Abid, & Banat, 2018). En una reciente investigación se

determinó que *Bacillus tequilensis* almacenó PHA en un 40% de su peso seco y se obtuvo un copolímero que tenía mayor contenido de poli-β-hidroxibutirato (PHB) que de poli-β-hidroxivalerato (PHV), de modo que su naturaleza depende de la fuente de carbono y la cepa específica. Cuando la bacteria utiliza ácido acético produce PHB, y cuando utiliza ácido acético más ácido propiónico produce un copolímero que contiene PHB y PHV (Wijeyekoon, Carere, West, Nath, & Gapes, 2018).

Los polihidroxicanoatos (PHA) son básicamente un poliéster que se sintetiza y se va acumulando de manera intracelular por una variedad de microorganismos (Gangurde & Sayyed, 2012). En la figura 4 se puede observar la estructura general del compuesto y una tabla en donde se presentan los tipos de PHA más comunes, su grupo R y su respectiva abreviatura.



Dónde:

| Grupo R                                            | Nombre                         | Abreviatura |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| -CH <sub>3</sub>                                   | Poli-3-hidroxibutirato         | PHB         |
| -CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>                 | Poli-3-hidroxivalerato         | PHV         |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> | Poli-3-hidroxihexanoato        | PHHex       |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub> | Poli-3-hidroxioctanoato        | PHO         |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - CH <sub>3</sub> | Poli-3-hidroxidecanoato        | PHD         |
| -CH <sub>2</sub> - Fenil                           | Poli-3-hidroxi-5-fenilvalerato | PHPV        |

Figura 4. Estructura general de los polihidroxicanoatos y nomenclatura según el grupo R.

Adaptado de Gangurde, N., & Sayyed, R. (2012). Poly-β-hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable (2) Polymer of Microbial Origin. Recuperado el 17 de 05 de 2018, de ResearchGate: <https://www.researchgate.net/publication/274067470>.

Un estudio usando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para una especie del género *Bacillus* cepa COL1/A6 y reportó producción de PHA con 54,68% dry cell weight (DCW) (Santimano, Prabhu, & Garg, 2009). También se ha utilizado como sustrato melaza de remolacha y como biocatalizador *Bacillus megaterium* obteniendo una producción de PHA de 50 % (DCW) (Omar, Rayes, Eqaab, & Steinbüchel, 2001). Además de utilizarse sustratos como melazas también se han reportado estudios de producción de PHA a partir de ácidos sintéticos y residuos de alimentos por medio de *Bacillus tequilensis* (Venkateswar Reddy, Amulya, Rohit, Sarma, & Venkata, 2014). En un estudio se emplearon 36 distintas fuentes de carbono para producir PHA utilizando *P. putida* KCTC2407, la cual no logro consumir fuentes de carbono que contenían ácidos carboxílicos de cadena corta con grupos funcionales etoxi, bromo, ciclohexilo, metoxi, fenoxi y olefina (Raza, Abid, & Banat, 2018).

Múltiples estudios han demostrado que producir PHA utilizando mezclas de AGV simples (Dionisi, Majone, Papa, & Beccari, 2004) y sustratos más complejos como desechos fermentados, entre ellos desechos de alimentos (Rhu, Lee, Kim, & Choi, 2003), oliva petróleo (Beccari, et al., 2010), efluentes de la fábrica de papel (Bengtsson, Werker, Christensson, & Welandar, 2008) y residuos sólidos municipales (Korkakaki, et al., 2016) resulta ser una técnica viable, que se ha llevado toda la atención en el campo de la síntesis de PHA. Otros estudios se enfatizan en cómo mejorar a gran escala esta producción reduciendo costos, según Kumar (2018) mediante la síntesis de productos químicos como etanol e hidrógeno simultáneamente con PHA, se logran bajar estos costos, además del uso de residuos biológicos lignocelulósicos, algas marinas, efluentes de la industria del biodiesel, entre otros, que equivalen a la reducción del 50% del costo total. Por lo cual, se puede concluir que la producción de PHA a bajos costos es posible a partir de sustratos con alto contenido de azúcares y ácidos grasos similares a los residuos MCL y LRRRA.

## 2.4. PHAs como bioplásticos

Una importante aplicación en la que se destacan los polihidroxialcanoatos (PHA) es en el área de los bioplásticos. Estos sufren un proceso de cristalización para formar un polímero con características similares al polipropileno el cual es el termoplástico más usado actualmente y que genera un gran impacto ambiental. Según el estudio de Roland (2012) la demanda de producción de plásticos a nivel mundial ha ido aumentando cada vez más, en un promedio de entre un 4-6 % cada año consiguiendo 245 millones de toneladas métricas en 2013. En 2017, la producción mundial de plásticos fue de 348 millones de toneladas (PlasticsEurope, 2018).

Por esta razón, los PHAs, resultan ser un excelente remplazo para los termoplásticos sintéticos debido a que son biodegradables. Este biopolímero se ha evaluado para potenciales usos como: fabricación de productos de aseo, aplicaciones biomédicas como elaboración de parches de pericardio, injertos vasculares y válvulas cardíacas, y en la agricultura como materia prima para pesticidas, herbicidas, o fertilizantes (Gangurde & Sayyed, 2012). En la tabla 2, se puede observar la comparación de algunas propiedades del PET y PP con el PHB, que es el biopolímero que normalmente se encuentra más abundante.

Tabla 2.

*Comparación de algunas propiedades del tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP) con el PHB.*

| Propiedad                        | Polietileno<br>Tereftalato (PET) | Polipropileno<br>(PP) | Polihidroxibutirato<br>(PHB) |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Punto de fusión °C               | 176                              | 176-186               | 171-182                      |
| Punto de congelación °C          | 69                               | 15                    | 5 - 10                       |
| Densidad g/cm <sup>3</sup>       | 1,39                             | 0,905 – 0,940         | 1,23 – 1,25                  |
| Peso molecular x 10 <sup>5</sup> | 2,40                             | 2,2 – 7,0             | 1 - 8                        |
| Resistencia a la tensión M Pa    | 70                               | 39                    | 40                           |
| Resistencia a UV                 | Pobre                            | Pobre                 | Buena                        |
| Biodegradabilidad                | Nada                             | Nada                  | Buena                        |

*Nota:* Adaptado de Patnaik, P. R. (2008). Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 153-171.

Los PHAs se caracterizan por su solubilidad en solventes como cloroformo y otros clorados, su temperatura de fusión varia de 40 a 180 °C y la temperatura de transición vítrea de -50 a 4 °C. Otras propiedades varían dependiendo del polímero que se obtiene y la composición de su unidad monomérica, como la temperatura de degradación térmica, resistencia a la tracción, vapor de agua entre otras (Raza, Abid, & Banat, 2018).

## 2.5. Microorganismos productores de PHAs

Para la producción de PHA hasta la fecha se han identificado más de 90 géneros de bacterias Gramnegativas y Grampositivas, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Raza, Abid, & Banat, 2018). Entre ellas se encuentran *Bacillus sp. I (+)* (Wu, y otros, 2001), *Azotobacter chroococcum* (-) (Cerrone, Juarez, Sánchez Peinado, & Gonzalez Lopez, 2010), *Cupriavidus necator* (-) (Ibrahim & Steinbüchel, 2009), entre otras. Las bacterias Gramnegativas logran una mayor acumulación de PHA, pero tienen en contra que el PHA producido por ellas contiene endotoxinas de lipopolisacárido de membrana externa (LPS) que conllevan a una reacción inmunogénica en humanos, razón por la cual no podría ser vinculado a aplicaciones biomédicas (Chen & Wu, 2005). Las bacterias Grampositivas a diferencia no contienen LPS y son de mayor interés debido a que presentan una respuesta de crecimiento rápido, toleran altas temperaturas y concentraciones de sales (Bonartsev, et al., 2007). Una bacteria Gram positiva con estas características favorables de

cultivo es *Bacillus megaterium*, la cual es estrictamente aerobia y su mayor crecimiento se da en un rango de pH de entre 5.5 – 8.5 (Luvizetto Faccin, et al., 2009).

En el grupo de investigación CEIAM de la Universidad Industrial de Santander existen investigaciones preliminares relacionadas con el aislamiento y caracterización de una cepa nativa perteneciente al género *Bacillus*, identificada como *Bacillus megaterium* B2, y su uso en la producción de PHB usando como fuente de carbono glicerol crudo, residuo de la producción de biodiesel de una planta colombiana. Estos estudios permitieron concluir que las variables más influyentes en la producción de PHB por *Bacillus megaterium* B2 fueron la temperatura (34 ° C), glicerol (7.6 g / L) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3 g/L) (Moreno, et al., 2015).

## 2.6. Caracterización de PHAs

En reportes preliminares del grupo de investigación CEIAM, (Moreno, et al., 2015), también se realizó la caracterización y cuantificación de PHB por medio de HPLC con detector UV. Para este análisis es necesario hidrolizar el polímero y convertirlo a un derivado coloreado (ácido crotónico) por lo que esta técnica solo se aplica al análisis del polihidroxibutirato (PHB) y no permite determinar la existencia de otros tipos de PHA.

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta investigación se utilizan métodos de caracterización alternativos que permitan establecer el tipo de polímero o polímeros que se obtienen en el proceso. Un método de extracción/cuantificación sencilla, rápido y que no utiliza solventes complejos es reportado por Arikawa y colaboradores (2017). En este método las bacterias se someten a irradiación con ondas de ultrasonido en una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) con el fin de

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

romper la membrana celular. La mezcla se centrifuga posteriormente para recuperar el PHA y finalmente el polímero se seca y se pesa, para calcular rendimiento gravimétrico.

Por otra parte, las técnicas de espectrometría de masas como el bombardeo rápido de átomos (FAB)-MS, pirólisis/MS, desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI) y la cromatografía de permeación en gel (GPC)-MS, se han utilizado en la caracterización molecular de polímeros como PHA. MALDI-TOF-MS se caracteriza por ser un método directo que no requiere derivatización química durante la preparación de la muestra en comparación con cromatografía de gases (GC)-MS. Mediante GPC podría determinarse la masa molecular promedio de un polímero de PHA ( $M_w$ ), la distribución de masa molecular ( $M_n$ ) y el índice de polidispersidad (PDI;  $M_w/M_n$ ). Adicionalmente con MALDI también podrían determinarse  $M_w$ ,  $M_n$  y PDI debido a su exactitud, precisión y reproducibilidad (Giin, y otros, 2014).

Existen reportes bibliográficos donde el PHA se ha caracterizado mediante MALDI, utilizando como matriz el 1,8,9-antracenotriol (ditranol), y LiBr como agente cationizante. En este caso, la muestra de biopolímero fue disuelta en  $\text{CHCl}_3$  (5mg/mL) y finalmente ya para el análisis se preparó una solución mixta mezclando dos porciones de la solución matriz, una porción de la solución que contenía el LiBr e igualmente una porción de la solución de muestra (Rizzarelli & Carroccio, 2014).

### 3. Metodología

#### 3.1. Caracterización de residuos líquidos provenientes de la industria del cacao

Los residuos líquidos del aprovechamiento del cacao (LRRRA y MCL) se caracterizaron cualitativa y cuantitativamente en términos de tipo y contenido de azúcares y ácidos por HPLC. Para esto, se utilizó una columna empaquetada en resina de intercambio catiónico Columna SUPELCOGEL C-610H, 30 cm x 7.8 mm ID. El método consistió en una fase móvil de 0,1% (p/p) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a un flujo de 0,4 mL/min, un volumen de inyección de muestra de 10  $\mu\text{L}$ , un detector de índice de refracción (FID) a una temperatura de 35° C (Hayenga, 2006). El tiempo total de análisis fue de 37 minutos.

Para la caracterización de azúcares, se prepararon siete patrones a partir de una solución madre de concentración de 60 g/L de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa, con concentraciones de 1- 10 - 20 - 30 - 40 - 50 y 60 g/L que fueron inyectados por triplicado para evaluar la repetitividad del método y con los cuales se construyeron las correspondientes curvas de calibración. A partir de éstas se calcularon las concentraciones de los compuestos presentes. Para la caracterización de ácidos, se construyeron tres curvas de calibración de los siguientes ácidos: acético, cítrico y láctico, a partir de patrones con concentraciones de 0,2 – 0,5 – 1 – 2 – 3 - 4 y 5 g/L de cada uno por separado. Las muestras tanto de LRRRA, como de MCL fueron sometidas a un filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa antes de ser diluidas en proporción 1:2 con fase móvil. Posteriormente fueron inyectadas en el equipo de HPLC por triplicado.

Un azúcar y un ácido de los encontrados en los análisis de los residuos, se seleccionó como sustrato modelo para estudiar la etapa de adaptación del microorganismo a los sustratos. Para el líquido residual rico en azúcares se escogió como sustrato modelo la fructosa y para el mucílago de cacao lixiviado se escogió el ácido acético. Esto con el fin de adaptar a la bacteria antes de enfrentarla a los sustratos reales LRRA y MCL. Para verificar la adaptación se observó el crecimiento de la bacteria *B. megaterium* B2 a partir de ellos.

### **3.2. Adaptación de *B. megaterium* B2 a sustratos modelo**

Para iniciar con el proceso de adaptación del microorganismo, primero se evaluaron por separado los sustratos modelo seleccionados (fructosa y ácido acético) en la anterior etapa metodológica. Para la adaptación se comenzó reactivando la cepa contenida en un vial criopreservado, el cual se descongeló y se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de caldo nutritivo 1 (CN1) con las siguiente composición: 15 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 6 g/L de NaCl y el sustrato modelo: 10 g/L para la adaptación de fructosa y 0,3 g/L para la adaptación del ácido acético (Moreno, et al., 2015). El momento en que se agregó el vial al medio, este se consideró como el tiempo cero de crecimiento del microorganismo. Se incubó a 34 °C con una agitación de 200 rpm. La toma de muestras se realizó sacando un volumen de 1 mL cada hora por un periodo de 16 horas. Se construyó la curva de crecimiento microbiano teniendo en cuenta las unidades formadoras de colonias por unidad de tiempo usando la técnica de recuento en placa.

Para el recuento en placa se realizaron 8 diluciones seriadas con 900  $\mu$ L de solución peptonada al 0,1% en tubos eppendorf a partir de 100  $\mu$ L de la muestra inicial. Una vez listo los ocho tubos

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

con las diluciones correspondientes se procedió a tomar 10  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se inocularon en cajas Petri que contenían agar con la siguiente composición: 15 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 6 g/L de NaCl, el sustrato modelo: 10 g/L para la adaptación de fructosa y 0,3 g/L para la adaptación del ácido acético y 17 g/L de agar-agar como agente solidificante (Lizcano Gonzáles, 2018). El pH del medio fue ajustado a 7.

Después de sembrar las diluciones en el agar, éste se dejó reposar por 15 minutos y se llevó a incubación por 24 horas en un horno a 34 °C. Trascurrido este tiempo, se realizó el conteo y cálculo de las unidades formadoras de colonia (UFC) como se muestra en el anexo A. Se construyó la curva de crecimiento microbiano en UFC por unidad de tiempo y de allí se definió la duración de la fase exponencial, que es el momento en el cual la bacteria *B. megaterium* B2 se encuentra en su máximo crecimiento. Este tiempo sirvió de referencia para definir el tiempo de crecimiento de los preinóculos en la etapa de producción de PHA usando sustratos modelo. Para verificar la reproducibilidad de los datos se realizó el mismo procedimiento por triplicado (Moreno, et al., 2015). (ver figura 5).

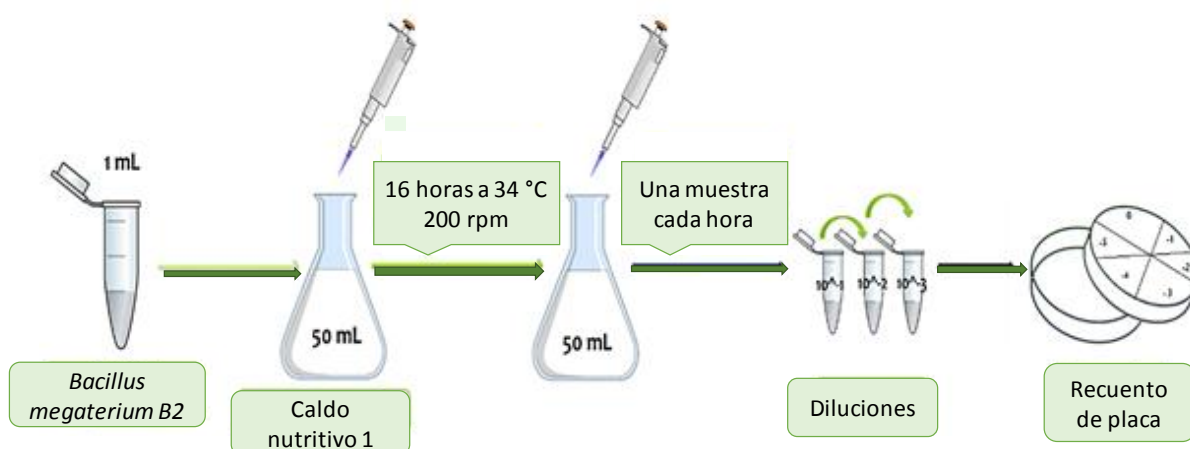


Figura 5. Esquema para procedimiento de recuento en placa para *B. megaterium* B2.

Esta curva de crecimiento microbiano fue útil para observar el desarrollo del microorganismo durante el tiempo de fermentación usando como fuente de carbono cada uno de los sustratos modelo por aparte. De esta manera se evaluó la viabilidad del proceso, pues se podía inferir que si la bacteria lograba crecer con los sustratos modelo fructosa y ácido acético también lo haría con los residuos líquidos del aprovechamiento del cacao.

### **3.3. Producción de PHA usando sustratos modelo**

Una vez evaluadas las condiciones de cultivo a pequeña escala en la etapa anterior, se procedió a evaluar el proceso de producción de PHAs por lotes a mayor volumen usando un biorreactor de 7.5 L con un volumen de operación de 4 L. En este proceso el medio de cultivo utilizado fue caldo nutritivo 2 (CN2). La composición de este caldo con todos los nutrientes necesarios para una producción de PHA fue la siguiente: 3 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de elementos traza (Moreno, et al., 2015) y 10 g/L del sustrato modelo glucosa para el primer ensayo y 0,3 g/L de ácido acético para el segundo. Para la reactivación de *B. megaterium* B2 se depositó un vial criopreservado en 50 mL de CN1 y se incubó hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el numeral 3.2. Las condiciones para este cultivo se mantuvieron en 34 °C, 200 rpm y un pH de 7.

Transcurrido este tiempo se tomaron 4 mL del cultivo anterior y se transfirieron a un Erlenmeyer que contenía 200 mL de CN2 para preparar el preinóculo, e igualmente se incubó hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, manteniendo las mismas condiciones de operación.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Finalmente, el preinóculo fue adicionado en el biorreactor que contenía los 4 L de CN2 y que fue programado para mantener controladas las siguientes condiciones; pH 7, temperatura 34 °C, oxigenación de 1 L/min de aire y agitación de 400 rpm. Estas condiciones son acordes a las exigencias de crecimiento de *B. megaterium* B2, establecidas por Moreno, et al., (2015). En el instante en que todo el preinóculo ingresó al reactor este se consideró como el tiempo cero para la toma de muestras, la cual se realizó extrayendo 30 mL del medio cada dos horas por un periodo de 24 horas. Este muestreo se realizó por triplicado. (ver figura 6).

Estas muestras fueron procesadas como se explica en el numeral 3.5. El sedimento o pellet fue utilizado para la cuantificación de biomasa microbiana usando peso seco y la producción de PHA usando extracción con SDS-sonicación y gravimetría. El sobrenadante fue utilizado para la cuantificación del consumo de sustrato determinando la variación de la concentración de azúcares o ácidos a lo largo de todo el tiempo de experimentación.

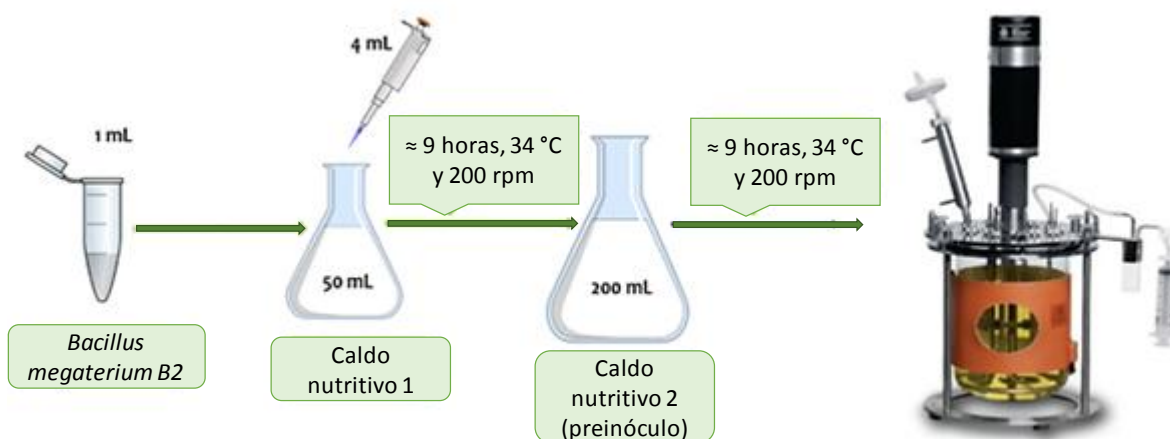


Figura 6. Esquema para procedimiento de cultivo por lotes para *B. megaterium* B2.

### 3.4. Adaptación de *B. megaterium* B2 a MCL y LRRA y producción de PHA

Una vez estudiado el comportamiento del microorganismo con los sustratos modelo (fructosa y ácido acético), se realizaron los mismos procedimientos descritos anteriormente en los numerales 3.2 y 3.3 pero adicionando MCL y LRA por separado. Para la preparación de los medios de cultivo se ajustaron los volúmenes y las concentraciones, de modo que su composición equivalía a un 83% caldo nutritivo y 17 % de MCL o LRRA según cada caso. La relación de los volúmenes se determinó teniendo en cuenta que es la menor proporción de mezcla que se obtuvo en el diseño de experimentos de la figura 7 del numeral 3.6. De manera que al tener todas las mediciones correspondientes a estos dos nuevos ensayos se pudiera realizar una comparación con los sustratos modelo. También se consideró evaluar posibles mezclas de los residuos, para lograr incorporar ambos en un solo ensayo en donde se lograra extraer la máxima cantidad de PHA, razón por la cual se consideró hacer un diseño de experimentos.

### 3.5. Cuantificación de biomasa, producto (PHA) y consumo de sustrato

**3.5.1. Biomasa.** Los 30 mL de muestra extraídos como se mencionó en el numeral 3.3 se depositaron en un tubo falcón previamente pesado y se centrifugaron a 7000 rpm por 15 minutos. Después de centrifugado se conservó en congelación el sobrenadante hasta su posterior análisis de consumo de sustrato por HPLC. El pellet obtenido se lavó dos veces con solución salina fisiológica para evitar la lisis celular. Posteriormente, se llevó al horno a 60 °C por 24 horas y se volvió a pesar de manera que por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de biomasa. Este valor se utilizó

para cuantificar los rendimientos y productividades del proceso, además de que permitió estimar la velocidad de crecimiento celular de *B. megaterium* B2 (Lizcano Gonzáles, 2018).

**3.5.2. PHA.** Para la extracción de PHA, fue necesario estandarizar un método por medio del cual se obtuviera una mayor cantidad de producto, pero que no implicara el uso de reactivos químicos perjudiciales para el medio ambiente. Teniendo en cuenta lo anterior, se seleccionó la técnica de extracción con SDS-Sonicación (Arikawa, Sato, Fujiki, & Matsumoto, 2017). En esta etapa se evaluaron variables como concentración y volumen de SDS, temperatura de extracción y tiempos de irradiación ultrasónica. Se evaluaron tres variaciones del método con diferentes condiciones como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.

*Métodos para extracción de PHA.*

|                                | Método 1 | Método 2 | Método 3 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|
| Volumen SDS (mL)               | 10       | 6        | 6        |
| Concentración SDS (p/v)        | 3,3      | 0,1      | 0,5      |
| Temperatura de Sonicación (°C) | 26       | 70       | 60       |
| Tiempo de Sonicación (min)     | 20       | 15       | 15       |

Cada uno de los métodos se evaluó por triplicado aplicando la siguiente metodología: al pellet seco obtenido en la cuantificación de la biomasa, se le adicionaron 20 mL de agua tipo I y el volumen de SDS a la concentración a evaluar. Esta mezcla fue sometida a irradiación con ultrasonido para romper las células y dispersar los restos en el agua. Este proceso se realizó bajo las condiciones expuestas en la tabla 3. Se centrifugaron nuevamente las muestras a 7000 rpm por

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

15 minutos, de manera que el PHA insoluble se logró concentrar nuevamente en forma de pellet. Este pellet de PHA se sometió a dos lavados con una mezcla de agua desionizada y etanol en proporción 4:1 para remover residuos celulares. Finalmente, el tubo que contenía el PHA extraído se llevó a un horno de secado a 60 °C y se tomó de nuevo su peso. La diferencia de peso respecto al peso del tubo vacío correspondió al peso del PHA. Este valor se utilizó para calcular rendimientos, productividades y % de acumulación de PHAs.

**3.5.3. Consumo de sustratos.** Este análisis se realizó utilizando la misma metodología descrita en el numeral 3.1, observando la variación de la concentración de azúcares y ácidos por acción del microorganismo durante todo el tiempo de fermentación.

## 3.6. Diseño de experimentos

Para esta etapa se realizó un diseño de experimentos usando el método Simplex con punto central. Se utilizó el software estadístico MINITAB® (ver figura 7). Con este diseño se propuso evaluar mezclas de volúmenes de CN2, MCL y LRRRA como se observa en la tabla 4. Para cada una de estas mezclas se realizaron todos los procedimientos anteriormente descritos desde el numeral 3.3 hasta el 3.5. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para garantizar la confiabilidad de los resultados. Lo anterior con el objetivo de seleccionar la mezcla óptima con la cual la bacteria pueda acumular la mayor concentración de PHA, además evaluar la posibilidad de incorporar los dos residuos en un solo bioproceso.

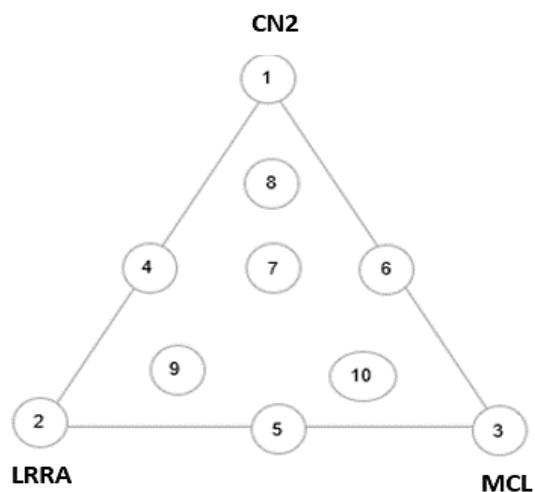


Figura 7. Diseño de experimentos método Simplex para producción de PHAs.

Tabla 4.

Combinaciones de mezclas en % (v/v) obtenidas en MINITAB®.

| Mezcla | CN2 | LRRA | MCL |
|--------|-----|------|-----|
| 1      | 100 | 0    | 0   |
| 2      | 0   | 100  | 0   |
| 3      | 0   | 0    | 100 |
| 4      | 50  | 50   | 0   |
| 5      | 50  | 0    | 50  |
| 6      | 0   | 50   | 50  |
| 7      | 33  | 33   | 33  |
| 8      | 67  | 17   | 17  |
| 9      | 17  | 67   | 17  |
| 10     | 17  | 17   | 67  |

Posteriormente, a los resultados obtenidos en el diseño experimental, se les realizó un análisis estadístico con el fin de aumentar el rendimiento y la productividad del proceso.

### 3.7. Caracterización del PHA

Al biopolímero obtenido durante los anteriores ensayos, se le realizaron las siguientes pruebas de caracterización, con el objetivo de conocer las propiedades estructurales y térmicas.

**3.7.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.** En esta etapa se utilizó un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF equipado con una láser de Nd: YAG de 355 nm, con el instrumento ajustado en modo positivo (lineal y reflectron). Inicialmente en un mortero de ágata se mezcló una porción de la matriz trans-2- [3- (4-terc-butilfenil) -2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB) y una porción de PHA, las sustancias se mezclaron por maceración agregando una pequeña cantidad de disolvente THF para promover homogeneización. La mezcla se depositó en un portamuestras de acero donde se terminó de evaporar el solvente y ocurrió la co-cristalización matriz-muestra. La calibración dentro del rango de masas investigado se realizó utilizando péptidos estándar y politiofeno.

**3.7.2. Análisis Infrarrojo (IR).** Los espectros IR se adquirieron en un equipo Shimadzu IR Prestige - 21 utilizando un módulo ATR (reflexión total atenuada) con un rango de espectro de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , colocando una pequeña cantidad de la muestra en el equipo.

**3.7.3. Análisis elemental.** Los análisis elementales se realizaron en un analizador Thermo Scientific (Modelo. Flash 2000).

**3.7.4. Ultravioleta visible (UV-VIS).** Se disolvió una pequeña cantidad de muestra en tetrahidrofurano (THF) sometiéndola a sonicación por aproximadamente 10 minutos. El espectro de absorción se registró en una solución de THF utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 300.

**3.7.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** La calorimetría diferencial de barrido se realizó en un equipo Mettler Toledo DSC 3+. Se pesaron 5,3000 mg de muestra y se sometieron a una rampa de calentamiento de 20,00 K/min desde -50 °C hasta 250 °C, aire 50,0 ml/min y un periodo de estabilización -50,0 °C, 5,00 min aire 50,0 ml/min.

**3.7.6. Análisis termogravimétrico (TGA).** El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo Mettler Toledo TGA / DSC STARe. Se pesaron 19,361 mg de muestra y se sometieron a calentamiento con una rampa de 20 °C/min hasta 400 °C.

## **4. Resultados**

### **4.1. Caracterización de residuos líquidos provenientes de la industria del cacao**

En la tabla 5 se presentan los resultados de la caracterización de los residuos líquidos del cacao.

Tabla 5.

*Composición química de LRRA y MCL y tiempos de retención de las sustancias.*

| Sustancia     | $t_R$ [min] | MD [g/L] |      | LRRA [g/L] |      | MCL [g/L] |      |
|---------------|-------------|----------|------|------------|------|-----------|------|
|               |             | x        | s    | x          | s    | x         | s    |
| Sacarosa      | 14,1498     | 19,43    | 0,28 | 9,74       | 0,32 | -         | -    |
| Glucosa       | 16,5247     | 58,80    | 0,19 | 22,28      | 0,07 | 37,11     | 0,18 |
| Fructosa      | 17,9431     | 62,48    | 0,17 | 25,39      | 0,14 | 19,23     | 1,13 |
| Ácido cítrico | 15,7093     | 2,10     | 0,09 | 6,35       | 0,50 | 7,27      | 0,02 |
| Ácido láctico | 23,7322     | -        | -    | -          | -    | 10,06     | 0,06 |
| Ácido acético | 27,5055     | 0,40     | 0,10 | 0,50       | 0,01 | 1,50      | 0,03 |

La identificación de los azúcares y ácidos presentes en los residuos MCL y LRRA se realizó asumiendo como parámetro el tiempo de retención ( $t_R$ ) de cada uno de los analitos que eluyen de la columna cromatográfica, teniendo en cuenta que el  $t_R$  se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Estos  $t_R$  fueron comparados con los patrones estándar. En las figuras 8 y 9 se puede observar la superposición de los cromatogramas de LRRA y MCL con el patrón de 10 g/L de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa y los patrones de 3 g/L de ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico.

Usando los cromatogramas de los patrones de azúcares y ácidos se construyeron las correspondientes curvas de calibración para cada una de los compuestos graficando la concentración vs el Área (ver apéndices B al G) con su respectivo coeficiente de determinación y ecuación de la recta utilizada para la cuantificación.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

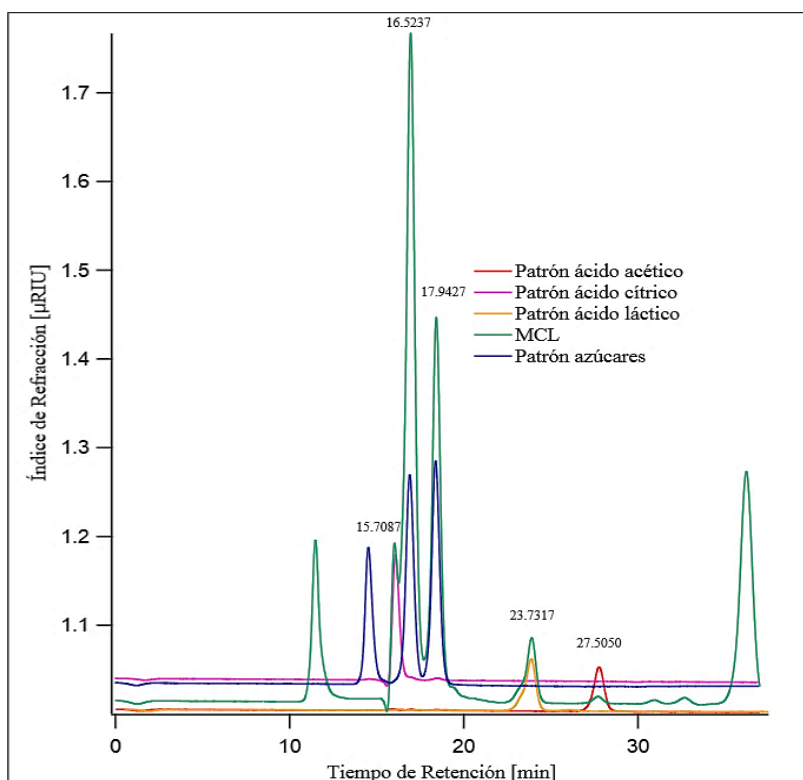


Figura 8. Superposición de los cromatogramas de MCL con los patrones de ácidos y azúcares.

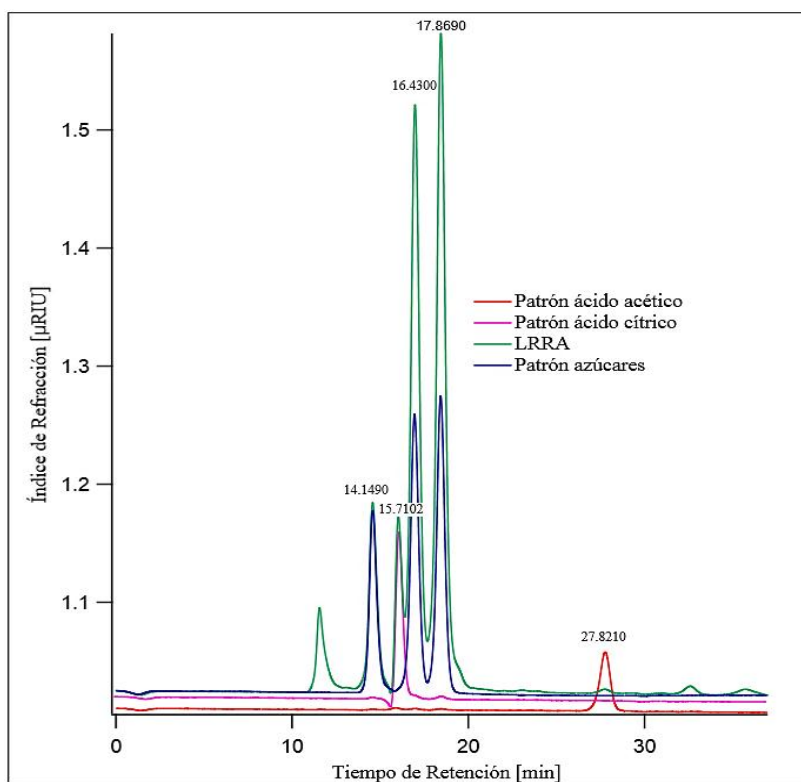


Figura 9. Superposición de los cromatogramas de LRRA con los patrones de ácidos y azúcares.

Para evaluar la repetitividad del método analítico se realizó un análisis estadístico de las áreas y tiempos de retención ( $t_R$ ) para los patrones de los azúcares, los cuales fueron inyectados por triplicado. Como se observa en los apéndices H e I las desviaciones estándar no son muy significativas pues se encuentran en un rango de entre 0,0004 y 0,2300, igualmente se puede observar que los coeficientes de variación no sobre pasan el 0,20 % para la repetibilidad de los  $t_R$  y el 2,95 % para la repetibilidad de las áreas, lo que indica que el método analítico utilizado es confiable.

Adicionalmente, de la composición química de los residuos MCL y LRRA presentados en la tabla 5 se pudo determinar la presencia de azúcares como glucosa y fructosa en los residuos MCL y glucosa, fructosa y sacarosa en LRRA. En cuanto al contenido de glucosa en los residuos, ésta se encuentra en mayor concentración en MCL. En el caso de la fructosa, ésta se encuentra en mayor concentración en LRRA. Sin embargo, si se comparan estos valores con los encontrados en el MD, son menores. Lo anterior indica que en ambos residuos ya ha habido un consumo previo de carbohidratos por parte de microorganismos. No obstante, la cantidad de azúcares residuales es considerable para poder ser utilizada en un bioproceso.

La presencia de sacarosa en el LRRA y no en el MCL se debe posiblemente a que los microorganismos fermentadores presentes en el MCL actuaron sobre la sacarosa presente en este sustrato y por su actividad enzimática la transformaron en glucosa y fructosa libres y por tanto en este residuo no se evidencia presencia de este disacárido. Por el contrario, las bacterias involucradas en la producción de celulosa no logran degradar este dímero de manera eficiente (Madigan, Martinko, & Parker, 2009).

Por otra parte, en los residuos evaluados se encontraron presentes ácidos como cítrico y acético en el LRRA y ácidos cítrico, acético y láctico en el MCL; indicando que el primero proviene de un proceso de degradación aeróbico y el segundo proviene de un proceso de fermentación anaeróbica (Madigan, Martinko, & Parker, 2009).

Finalmente, teniendo en cuenta estos resultados, se escogieron como sustratos modelo fructosa en representación de los azúcares y ácido acético en representación de los ácidos presentes en estos sustratos para utilizarlos en la etapa de adaptación del microorganismo.

#### **4.2. Adaptación de *B. megaterium* B2 a sustratos modelo (fructosa y ácido acético)**

En la figura 10 se muestra el crecimiento de *B. megaterium* B2 con los sustratos modelo fructosa y ácido acético durante un periodo de 16 horas. En esta curva de crecimiento microbiano se pueden observar tres fases: una fase de adaptación o fase lag, una de crecimiento o fase exponencial y finalmente una fase estacionaria. Este resultado fue utilizado para estimar la duración de la fase de crecimiento exponencial, estableciendo el tiempo en el cual se debía detener la incubación de los preinóculos en la etapa de producción del biopolímero (8 horas para la fructosa y 11 horas para el ácido acético) con el objetivo de asegurar que la bacteria se encontrara en su máximo nivel de crecimiento.

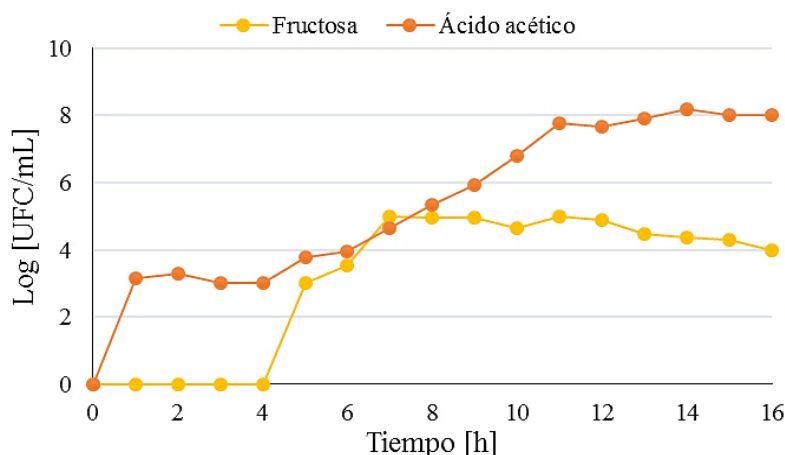


Figura 10. Curva de crecimiento microbiano para *B. megaterium* B2 utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono.

Se evidencia que la bacteria creció en mayor proporción utilizando el ácido acético como fuente de carbono en comparación con la fructosa. Sin embargo, se puede inferir que, aunque el crecimiento del microorganismo usando fructosa fue menor, éste se adaptó de manera positiva al sustrato después de 4 horas de cultivo, logrando un aumento de la población después de este tiempo. Lo anterior teniendo en cuenta que un microorganismo sólo puede multiplicarse si es capaz de adaptar su maquinaria metabólica para degradar el sustrato que tiene disponible.

Por lo tanto, se considera que esta etapa de adaptación fue exitosa teniendo en cuenta que *B. megaterium* B2 era una bacteria acostumbrada a utilizar glicerol como sustrato y no había sido sometida a un proceso de cambio de fuente de carbono.

#### 4.3. Producción de PHA usando sustratos modelo (fructosa y ácido acético)

Una vez se culminó el proceso de adaptación del microorganismo a los sustratos modelo (fructosa y ácido acético), se procedió a evaluar la producción de PHAs en cultivo por lotes a mayor volumen

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

en un biorreactor de 7.5 L con un volumen de operación de 4 L usando  $\text{CN}_2$ , el cual contenían sales que le aportaron equilibrio osmótico a la bacteria.

La figura 11 corresponde a la biomasa microbiana acumulada utilizando fructosa y ácido acético como sustrato. Se puede observar una mayor cantidad de biomasa usando fructosa en comparación con los resultados obtenidos con ácido acético, alcanzando valores de 5,0 y 2,3 g/L respectivamente. De esta manera se pudo inferir que en condiciones controladas la bacteria crece de manera más favorable cuando tiene azúcares como fuente de carbono disponible.

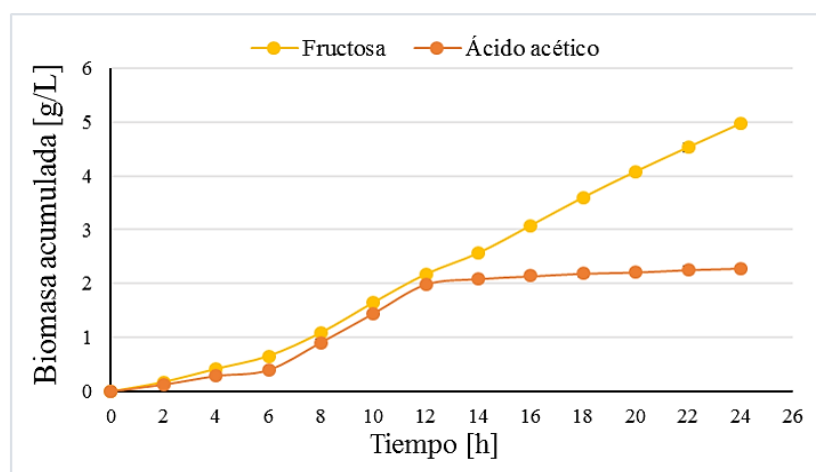


Figura 11. Biomasa acumulada utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono.

Adicionalmente a la biomasa obtenida se le realizó la cuantificación de PHA, para lo cual fue necesario estandarizar un método por medio del cual se obtuviera una mayor extracción del polímero y que no requiriera el uso de solventes nocivos para el medio ambiente. Se tuvieron en cuenta parámetros como: temperatura de extracción, tiempos de irradiación ultrasónica y concentración y volumen de SDS. En la tabla 6 se presenta los resultados obtenidos para este proceso.

Tabla 6.

*Estandarización del método de extracción de PHA SDS-sonicación.*

| Método   | Biomasa [g/L] |        | PHA [g/L] |        | % de PHA extraído |         |
|----------|---------------|--------|-----------|--------|-------------------|---------|
|          | X             | S      | X         | S      | X                 | S       |
| Método 1 | 0,2146        | 0,0283 | 0,1691    | 0,0016 | 79,5150           | 11,2379 |
| Método 2 | 0,2271        | 0,0467 | 0,1913    | 0,0475 | 84,8777           | 3,6615  |
| Método 3 | 0,2218        | 0,0122 | 0,1889    | 0,0165 | 85,0880           | 2,7359  |

A partir de estos resultados se seleccionó el método para la extracción de PHA teniendo en cuenta % de PHA extraído. Al comparar este valor para los tres métodos el mayor resultado se obtuvo usando el método 3. Sin embargo, este método empleaba una mayor concentración de SDS comparado con el método 2 con el cual se obtuvo un % de PHA extraído similar. Por esta razón el método seleccionado de manera costo-efectiva fue el método 2.

Siguiendo esta metodología de extracción se obtuvieron los resultados presentados en la figura 12. Se puede observar la concentración de PHA acumulado utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono. La producción máxima acumulada de PHA durante un tiempo de fermentación de 24 horas para la fructosa fue de 1.3 g/L y para el ácido acético fue de 0,2 g/L. Estos valores son significativamente diferentes, evidenciando que el microorganismo es selectivo hacia el uso de los hidratos de carbono y no de ácidos como fuente de sustrato.

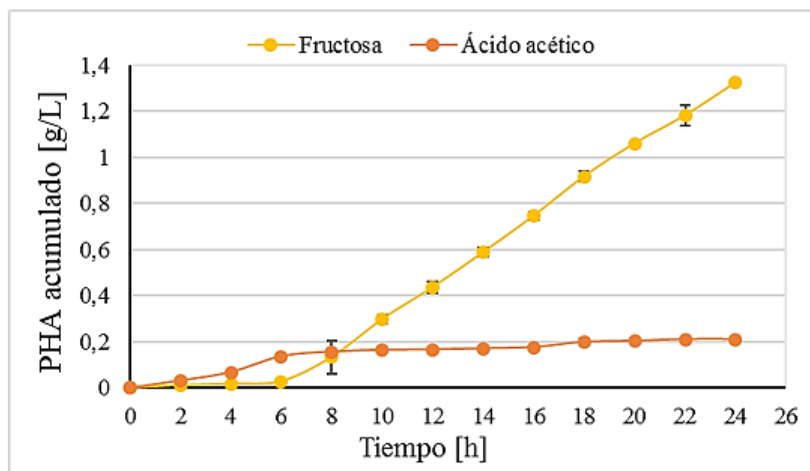


Figura 12. PHA acumulado utilizando fructosa y ácido acético como fuente de carbono.

En la figura 13 se puede observar el consumo de fructosa (eje izquierdo) y ácido acético (eje derecho) durante 24 horas de fermentación para los lotes anteriormente descritos.

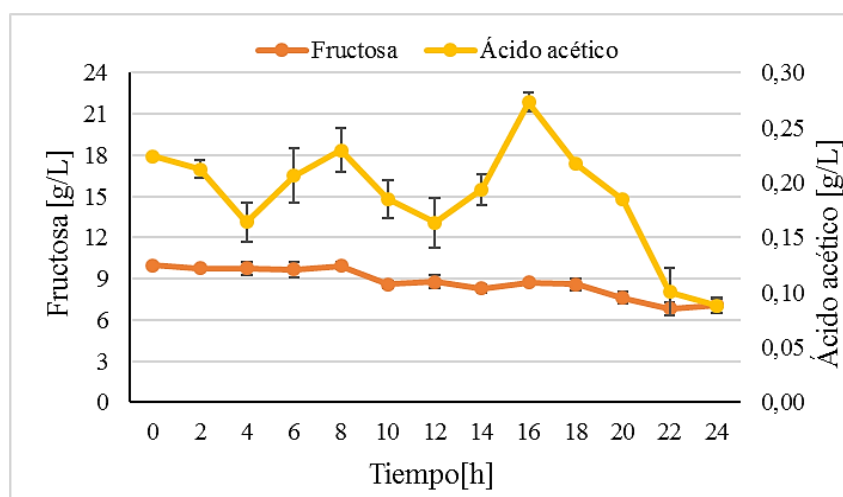


Figura 13. Consumo de sustrato correspondiente a los lotes de fructosa y ácido acético.

De la gráfica de consumo de sustrato se pudo deducir que el consumo de fructosa por *B. megaterium* B2 fue bajo, ya que logro disminuir la concentración del carbohidrato de 10 g/L a 7 g/L, es decir se consumió el 30% de la fructosa agregada al medio de cultivo. Con respecto al ácido

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

acético se identificó que el microorganismo no solo tiene la capacidad de degradar este ácido sino también de producirlo. Lo anterior se corrobora con las fluctuaciones de concentración como se observa en la figura 13. Se puede inferir que el consumo no es tan significativo con los sustratos modelo, lo cual lleva a la deducción de que la razón de que se observara un crecimiento microbiano elevado en la etapa de adaptación (ver figura 10) con estos sustratos fue en parte porque el medio en el cual se realizó esta etapa fue en el CN1 suplementado con peptona, extracto de levadura y cloruro de sodio que le aportaron a la bacteria todo el soporte necesario para su crecimiento.

#### 4.4. Adaptación de *B. megaterium* B2 a MCL y LRRA y producción de PHA.

Una vez observada la adaptación positiva del microorganismo a los sustratos modelo, se realizó la adaptación a los sustratos reales MCL y LRRA como se observa en la figura 14.

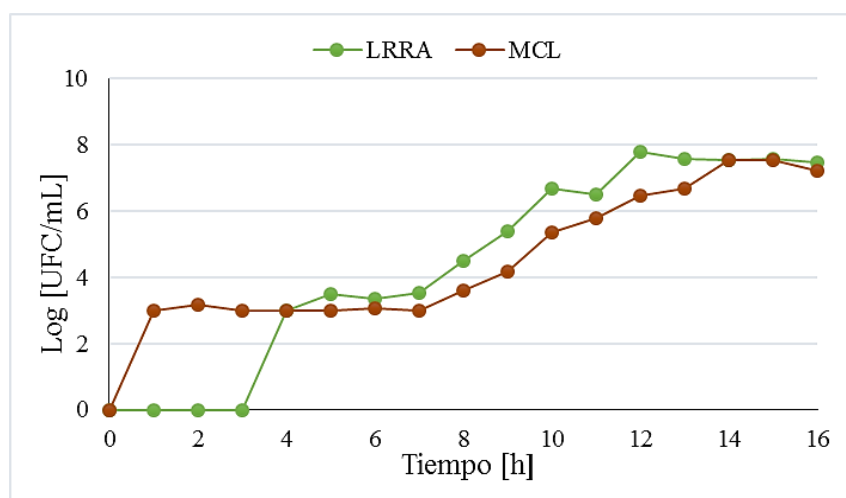


Figura 14. Curva de crecimiento microbiano para *B. megaterium* B2 utilizando MCL y LRRA como fuente de carbono.

Se puede evidenciar que con el sustrato MCL el crecimiento microbiano tardo menos tiempo en iniciar, lo que indica que con este sustrato la bacteria presenta una menor fase de lag comparado con los resultados obtenidos para LRRA, la cual presenta una fase lag de 3 horas.

Finalmente, se puede concluir que la bacteria *B. megaterium* B2 se adaptó positivamente al cambio de su fuente de carbono, inicialmente para unos sustratos modelos y finalmente para unos sustratos reales ricos en azúcares y ácidos como el LRRA y el MCL, con los cuales se obtuvo un mayor aumento en el crecimiento microbiano.

La figura 14 también permitió establecer el tiempo en el cual se debía detener la incubación de los preinóculos para estos sustratos (13 horas para MCL y 11 horas para LRRA) para asegurar que la bacteria se encontrara en su máximo nivel de crecimiento. Lo anterior sirvió de referencia para la etapa de producción del biopolímero.

Una vez observada la adaptación de la bacteria a los residuos MCL y LRRA se procedió a evaluar el proceso de producción de PHAs en cultivo por lotes en un biorreactor de 7.5 L. La figura 15 corresponde a la biomasa acumulada utilizando MCL y LRRA como fuente de carbono.

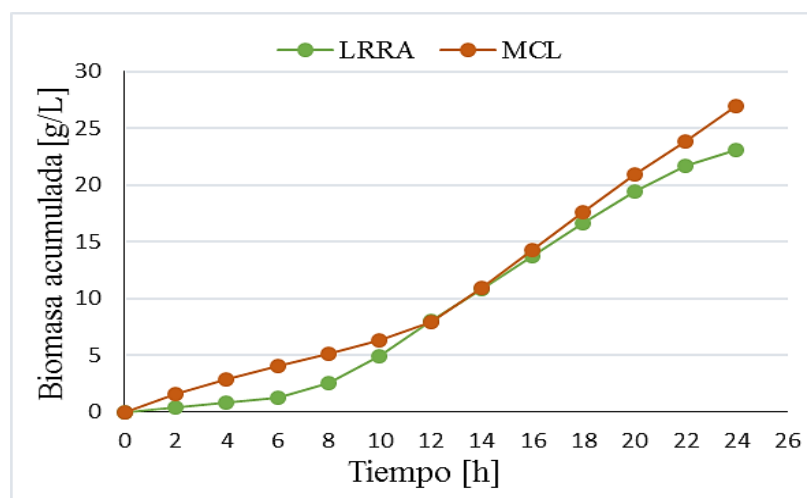


Figura 15. Biomasa acumulada utilizando LRRA y MCL como fuente de carbono.

# PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Se puede observar una mayor cantidad de biomasa acumulada usando MCL comparado con los resultados obtenidos para LRRA, alcanzando valores de 27,0 y 23,1 g/L respectivamente. Adicionalmente, se realizó la cuantificación del PHA extraído. La figura 16 corresponde al PHA acumulado utilizando MCL y LRRA como fuente de carbono.

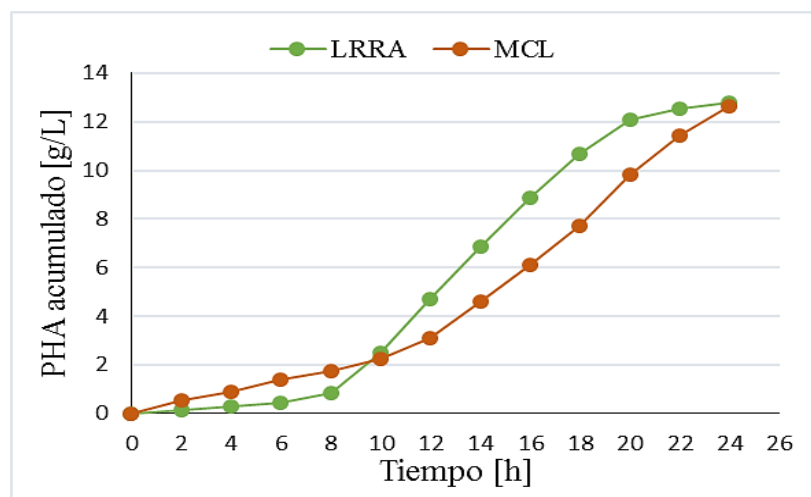


Figura 16. PHA acumulado utilizando LRRA y MCL como fuente de carbono.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede inferir que el microorganismo bajo estas condiciones de cultivo aprovecha de manera indistinta los residuos LRRA y MCL. Esto se corrobora porque se obtiene para ambos residuos la misma cantidad de PHA acumulado luego de 24 horas de reacción usando una concentración inicial de sustrato de 17% (v/v).

En la figura 17 se puede observar el consumo de azúcares totales equivalentes a la suma de glucosa y fructosa durante de 24 horas de fermentación para los lotes de cultivo anteriores. De esta gráfica de consumo de sustrato se pudo deducir que en efecto la bacteria *B. megaterium* B2 se alimentó de los azúcares presentes en los residuos de MCL y de LRRA

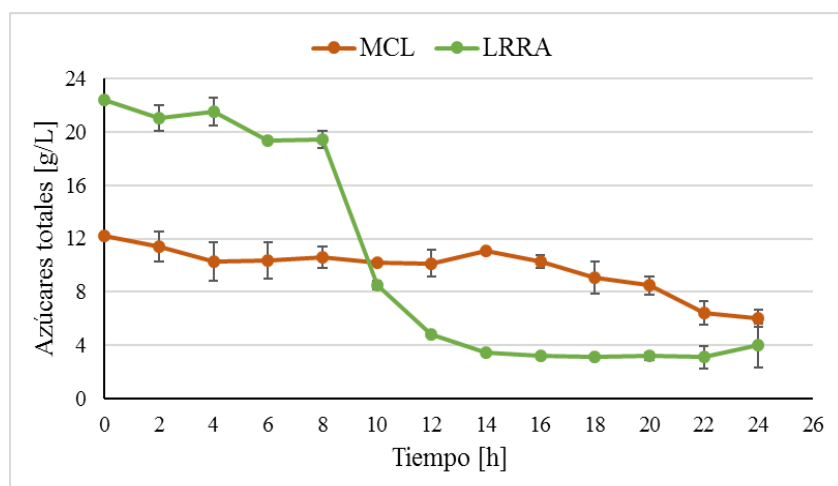


Figura 17. Consumo de azúcares totales correspondiente a los lotes de LRRA y MCL.

Se puede inferir que *B. megaterium* B2 consumió el 86% de los azúcares totales contenidos en el medio de cultivo con LRRA y el 50% de los azúcares totales contenidos en el medio de cultivo con MCL. Lo anterior indica que en esta etapa de producción del biopolímero usando el medio CN2 compuesto por una mínima cantidad de sales, los residuos MCL y LRRA proporcionan la cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo y para la producción del biopolímero.

#### 4.5. Diseño de experimentos.

A partir del diseño de experimentos propuesto en la figura 7, se evaluaron diferentes mezclas para CN2, MCL y LRRA.

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 18 y 19. Se puede inferir que *Bacillus megaterium* B2 se adaptó metabólicamente a las mezclas de sustratos 4, 5, 7, 8, 9 y 10, ya que se

# PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

evidenció crecimiento del microorganismo y producción de PHA en estos experimentos. Sin embargo, en las mezclas 1, 2 y 3 que correspondían a los experimentos con 100% de cada uno de los mucílagos y de medio de sales CN2, no se obtuvo crecimiento. Lo anterior ocurre posiblemente por la carencia de un nutriente esencial para la bacteria.

La mezcla 6 que correspondía al ensayo con 50% de MCL y 50% de LRRRA y no contenía medio de sales (CN2), no presentó crecimiento del microorganismo lo que confirma que *Bacillus megaterium* B2 no puede desarrollarse en ausencia de los micronutrientes proporcionados en el medio de sales.

El ensayo con mayor acumulación de biomasa y de PHA fue la mezcla 7 compuesta por 33% de CN2, 33% de LRRRA y 33 % de MCL.

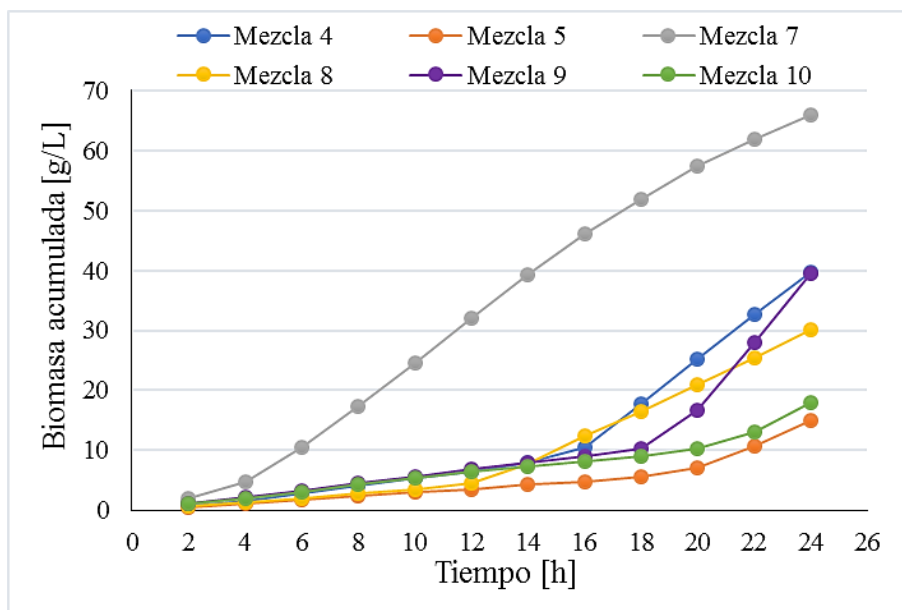


Figura 18. Biomasa acumulada para las mezclas del diseño de experimentos.

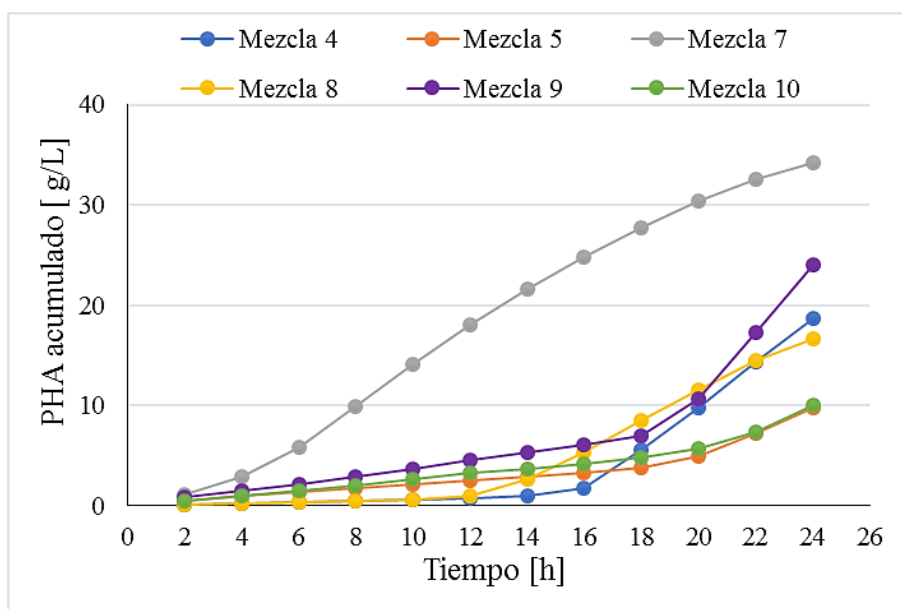


Figura 19. PHA acumulado para las mezclas del diseño de experimentos.

En la tabla 7 se presentan los resultados para los ensayos en los que se obtuvo una adaptación positiva a la mezcla de sustratos evaluada.

Tabla 7.

Valores de biomasa y PHA extraído, y valores de rendimiento y productividad en cada mezcla del diseño de experimentos.

| Mezcla | Biomasa<br>acumulada [g/L] | PHA acumulado<br>[g/L] | $Y_{p/s}$ [g/g] | $Y_{p/x}$ [g/g] | $Q_p$ [g/L*h] |
|--------|----------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 4      | 39,50                      | 18,70                  | 0,43            | 0,61            | 0,21          |
| 5      | 15,00                      | 10,00                  | 0,44            | 0,61            | 0,05          |
| 7      | 65,90                      | 34,30                  | 0,63            | 0,58            | 0,50          |
| 8      | 30,10                      | 16,70                  | 0,38            | 0,71            | 0,18          |
| 9      | 39,50                      | 24,10                  | 0,97            | 0,58            | 0,19          |
| 10     | 18,00                      | 10,00                  | 0,32            | 0,53            | 0,11          |

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Se realizaron cálculos de rendimiento producto en sustrato ( $Y_{p/s}$ ), rendimiento producto en biomasa ( $Y_{p/x}$ ) y productividad volumétrica de producto ( $Q_p$ ), para el punto máximo observado en cada una de las gráficas de producción de biomasa y PHA en el tiempo evidenciadas en el anexo J.

Al analizar los resultados obtenidos para el rendimiento y la productividad para los ensayos realizados se puede inferir que la mezcla 7 obtuvo una mayor producción de PHA por unidad de tiempo comparado con las demás mezclas. Sin embargo, la mezcla 9 compuesta por 67% LRRA, 17% MCL y 17% CN2 obtuvo una mayor producción de PHA por unidad de sustrato alimentado. Por otro lado, las mezclas 5 y 10 que contenían una mayor proporción de MCL obtuvieron los rendimientos y las productividades más bajas comparadas con las demás mezclas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede deducir que el LRRA es la variable más influyente dentro del diseño experimental para obtener una mayor producción de biomasa y PHA, pues en las mezclas en las que este sustrato se encuentra presente y en mayor cantidad se observan mejores resultados.

Para cada una de las mezclas se realizó el análisis de consumo de sustrato obteniendo los comportamientos mostrados en la figura 20. Se observa que en todas las mezclas se presentó consumo de glucosa, fructosa y sacarosa (gama de colores azules). Sin embargo, en el caso de los ácidos acético, cítrico y láctico (gama de colores verdes) en algunas mezclas se presenta consumo y en otras se presenta producción. Lo anterior se debe básicamente al metabolismo del microorganismo, el cual, mediante reacciones catabólicas degrada enzimáticamente moléculas de gran tamaño como carbohidratos hasta convertirlas en moléculas simples y más pequeñas como ácidos orgánicos,  $CO_2$ , amoníaco o urea (Madigan, Martinko, & Parker, 2009).

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

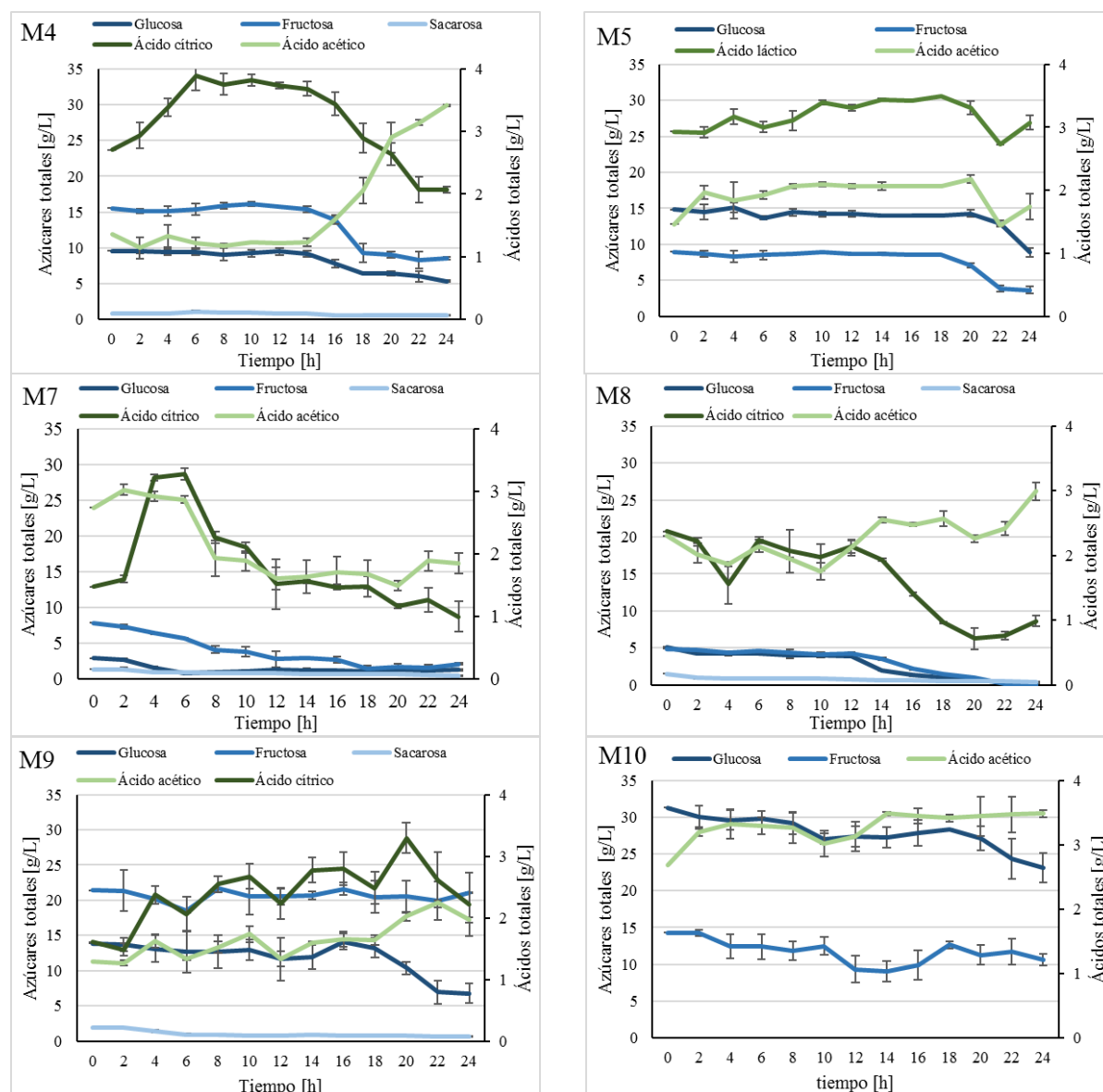


Figura 20. Consumo de sustrato de las mezclas del diseño de experimentos.

En cuanto a los ácidos acético y cítrico, se observa un comportamiento inversamente proporcional en la concentración obtenida para las mezclas evaluadas. Esto se debe a que el ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs, es la ruta catabólica común por la que se degradan todas las moléculas combustibles de la célula (carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos). En cada vuelta del ciclo de Krebs se fusiona una molécula de ácido acético (dos átomos de carbono) por condensación con una molécula de ácido oxalacético, compuesto de cuatro carbonos, para

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

finalmente formar el ácido cítrico de seis átomos de carbono. Subsiguientemente, el ácido cítrico se degrada a dos moléculas de  $\text{CO}_2$  y ácido succínico, un compuesto de cuatro átomos de carbono. Finalmente, este último se oxida a ácido oxalacético, iniciando de nuevo una vuelta del ciclo. Luego cada vez que el microorganismo degrada los carbohidratos producto de las fases del catabolismo se observa la formación y degradación de los ácidos acético y cítrico.

En el caso del ácido láctico, este solo se observa en la mezcla 5. Su presencia puede deberse a que *Bacillus megaterium* B2 desarrolló una fermentación homoláctica en este ensayo. En este tipo de fermentación la molécula de glucosa de 6 átomos de carbono se degrada a dos moléculas de ácido láctico de tres átomos de carbono, aumentando la concentración de este en el medio.

Al realizar el análisis de los resultados presentados en la tabla 10 usando el software estadístico MINITAB®, se obtuvieron los gráficos de contorno para productividad y rendimiento. En la figura 21 se puede observar que las zonas de color verde corresponden a la región binaria para LRRA y CN2 para la cual el programa predice una mayor productividad y rendimiento.

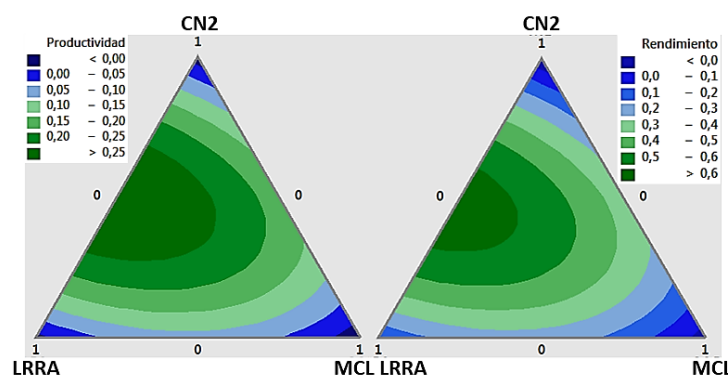


Figura 21. Graficas de contorno de mezcla para la productividad y rendimiento.

A partir de este análisis estadístico se pudo determinar que el mucílago de cacao lixiviado (MCL) correspondiente a los residuos del segundo día de fermentación del cacao no son lo suficientemente

# PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

adecuados para el proceso de producción de PHA usando la bacteria *B. megaterium* B2, contrario a la mezcla compuesta de CN2 y los líquidos residuales ricos en azúcares (LRRRA) provenientes de la producción de celulosa bacteriana a partir de mucílago de cacao.

Teniendo en cuenta lo anterior el software sugiere un ensayo de validación del modelo estadístico para una mezcla binaria compuesta por 47% CN2 (compuestos por sales) y 53% LRRRA (proveniente de la producción de celulosa bacteriana a base de mucílago de cacao), con la cual se predice que se alcanzaría un aumento en el rendimiento máximo de hasta 0,6527 (g/g) y una productividad máxima de hasta 0,2968 (g/L\*h), como se muestra en la figura 22.

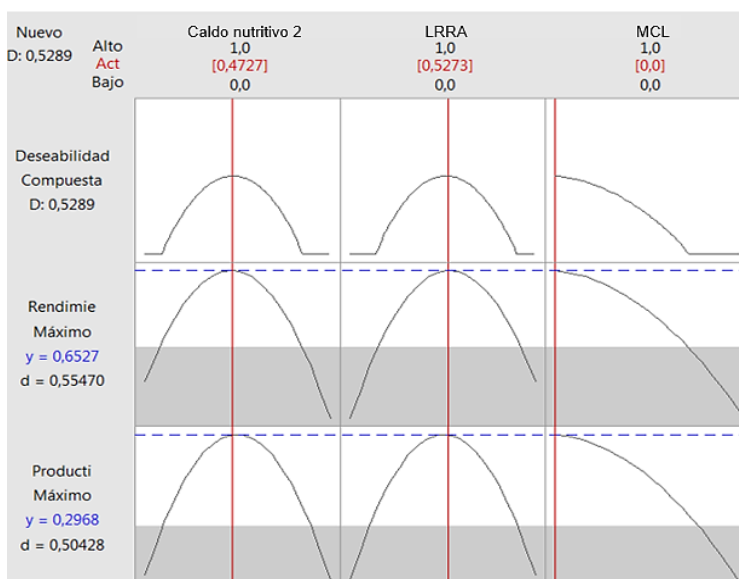


Figura 22. Grafica para aumento de productividad y rendimiento. Ensayo de validación del modelo estadístico.

Los resultados obtenidos para el ensayo de validación del modelo estadístico propuesto se presentan en la figura 23. Se alcanzaron valores de biomasa acumulada de 21,53 g/L y un PHA acumulado de 7,32 g/L. Adicionalmente, se alcanzó un consumo de sustrato del 87%.

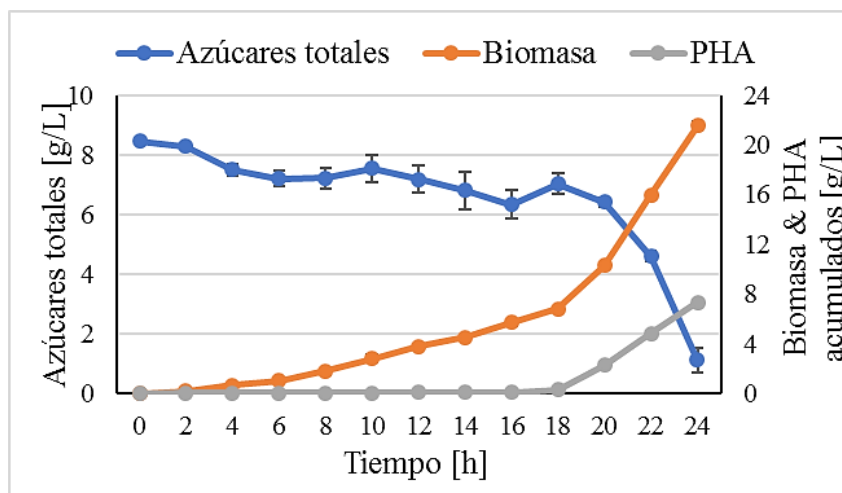


Figura 23. Consumo de azúcares totales, biomasa y PHA acumulado para el ensayo de validación del modelo estadístico.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se realizaron los cálculos para el rendimiento y la productividad. Estos resultados se presentan en la tabla 8.

Tabla 8.

*Resultados del ensayo de validación del modelo estadístico.*

| Mezcla            | $Y_{p/s}$<br>[g/g] | $Q_p$<br>[g/L*h] | $Y_{p/x}$<br>[g/g] | Biomasa<br>acumulada<br>[g/L] | PHA<br>acumulado<br>[g/L] |
|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Ensayo optimizado | 0,98               | 0,10             | 0,57               | 21,53                         | 7,32                      |

Se pudo observar que para este ensayo el rendimiento máximo  $Y_{p/s}$  alcanzó valores de 0,98 g/g, el cual es superior con respecto a los resultados de las mezclas iniciales del diseño de experimentos. En cuanto a la productividad volumétrica esta se mantuvo dentro del rango obtenido por las mezclas anteriores, con un valor de 0.1 g/L\*h al igual que el porcentaje de acumulación que fue de 57%.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo usando la cepa *Bacillus megaterium* B2, con los reportados por Moreno (2015) usando la misma cepa pero diferente fuente de carbono (glicerol crudo), se puede observar que el microorganismo mejoró su crecimiento y producción de polihidroxialcanoatos, usando como fuente de carbono los residuos provenientes de la agroindustria del cacao. Lo anterior se evidencia en la tabla 9, en donde se observa un aumento de todos los parámetros cinéticos. La productividad en el mismo valor, el porcentaje de acumulación fue 1.5 veces mayor y la concentración máxima de PHA fue 3.6 veces más alta.

Tabla 9.

*Comparación de parámetros cinéticos alcanzados usando diferentes fuentes de carbono y microorganismos para la producción de PHAs reportados por otros autores y los obtenidos en este estudio.*

| País                                                              | Fuente de carbono                    | Microorganismo                                                                                         | PHA [g/L] | $Y_{p/x}$ [g/g] | $Q_p$ [g/L*h] |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------|---------------|
| Colombia (Moreno, et al., 2015)                                   | GRIB                                 | <i>Bacillus megaterium</i> B2 / aislado del GRIB (+)                                                   | 0,72      | 0,16            | 0,11          |
| España (Cerrone, Juárez, Sánchez Peinado, & Gonzalez Lopez, 2010) | Aguas residuales del molino de oliva | <i>Azotobacter chroococcum</i> / aislado de la rizosfera (-)                                           | 0,74      | -               | 0,01          |
| Germania (Ibrahim & Stein, 2009)                                  | GRIB                                 | <i>Zobellella denitrificans</i> / aislada de los lodos (-)                                             | 2,72      | 0,25            | 0,03          |
| Germania (Mothes, Schnorpfeil, & Ackermann, 2007)                 | GRIB                                 | <i>Cupriavidus necator</i> DSM 4058 / (-)                                                              | 24,00     | 0,50            | 0,48          |
| Egipto (Swellam, Gouda, & Omar, 2001)                             | Melaza de caña de azúcar             | <i>Bacillus megaterium</i> / aislado de los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales (+) | 2,20      | -               | 0,05          |
| Egipto (Omar, Rayes, Eqaab, & Steinbüchel, 2001)                  | Jarabe de dátil                      | <i>Bacillus megaterium</i> / aislado de los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales (+) | 3,40      | 0,02            | 0,24          |
| Colombia (presente estudio)                                       | Residuos agroindustria del cacao     | <i>Bacillus megaterium</i> B2/aislado del GRIB (+)                                                     | 2,60      | 0,57            | 0,10          |

*Nota:* GRIB: glicerol crudo obtenido de la planta de biodiesel, +: Microorganismo gram positivo, -: microorganismo gram negativo.

Al analizar los resultados presentados en la tabla 9, se puede inferir que los resultados obtenidos en este estudio usando la cepa *Bacillus megaterium* B2 son superiores a los reportados por otros autores utilizando otras cepas de *Bacillus megaterium*, otros microorganismos y otras fuentes de carbono. Lo anterior indica que estos resultados son prometedores en el área de la producción de biopolímeros y como fuente alternativa de bioplásticos.

#### 4.6. Caracterización PHA

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la caracterización estructural y térmica del biopolímero obtenido.

**4.6.1. Análisis MS MALDI- TOF.** En la figura 24 se muestra el espectro de masas MALDI-TOF de una muestra de PHA tomado en modo reflectrón, en donde se observa la distribución de peso molecular del polímero (MWD). El espectro MALDI, que presenta la distribución Gaussiana característica de todos los materiales poliméricos, está compuesto por señales correspondientes a aductos de sodio y potasio de cadenas poliméricas. Al ampliar una región del espectro, entre  $m/z$  2000 y 2300, se observa claramente la repetición monotónica (86 Da) de unidades monoméricas que corresponden al ácido 3-hidroxibutírico. Esta información permite clasificar el polímero como un poliéster de tipo scl-PHB (*short-chain length* poli-3-hidroxibutirato). La técnica MALDI permite además establecer que la estructura polimérica es

única y corresponde a un homopolímero con formula molecular  $(C_4H_6O_2)_n$  donde  $n$  varía entre 10 – 50 unidades aproximadamente.

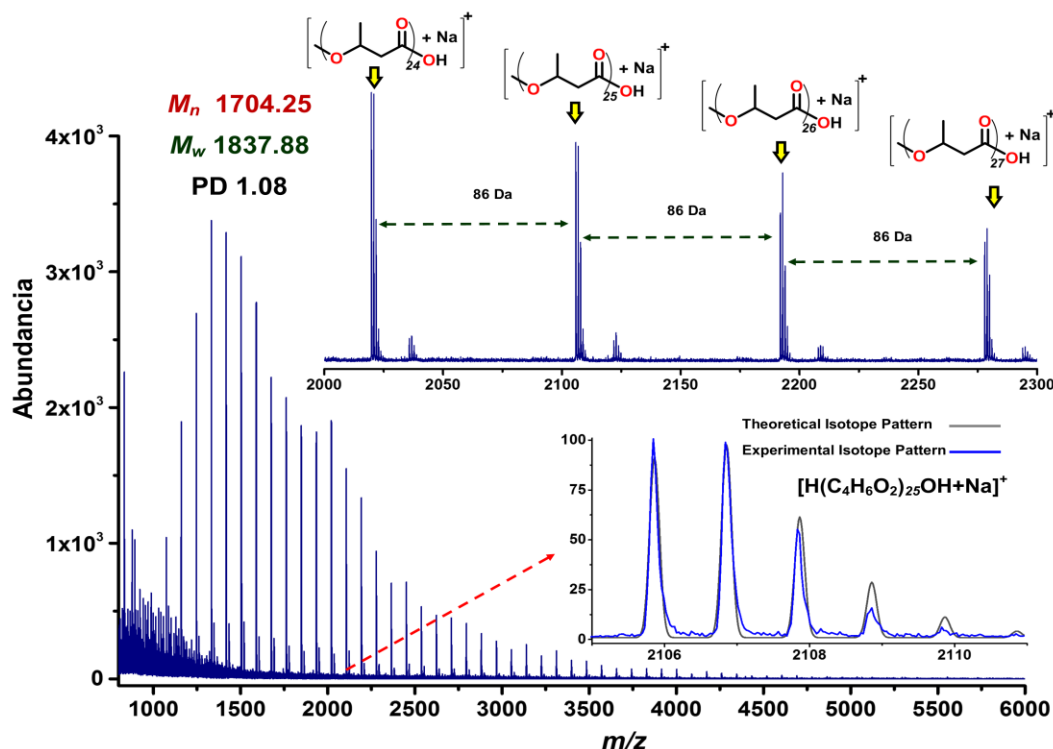


Figura 24. Espectro de masas de muestra de PHA tomado en modo reflectrón.

Para corroborar la identidad del polímero, se hizo un análisis del patrón isotópico experimental correspondiente a la señal del ión en  $m/z$  2106 correspondiente a la especie  $[H(C_4H_6O_2)_{25}OH-Na^+]^+$  y se comparó con el patrón isotópico teórico calculado con la aplicación Bruker isotope pattern®. Los patrones isotópicos experimental y teórico coinciden completamente, lo que confirma la identidad del biopolímero (PHB).

Adicionalmente, con los datos obtenidos por MALDI se calculó el  $M_n$  (peso molecular promedio en número) y el  $M_w$  (peso molecular promedio en peso) por medio de la fórmula:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad , \quad M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

Donde  $M_i$  es el peso molecular de una cadena, y  $N_i$  es el número de cadenas de ese peso molecular. Los valores de peso molecular promedio en número y peso para el polímero son  $M_n$ : 1704,25 y  $M_w$ : 1837,88 mientras la polidispersidad (PD) corresponde a 1,08

En la gráfica 25 se puede observar el espectro de masas MALDI-TOF de la muestra de PHB en modo lineal. Este modo permitió observar la presencia de especies de mayor masa molecular. Sin embargo, en la figura 25 se observa que no hay mucha diferencia entre los resultados observados en modo reflectrón y modo lineal. En modo lineal se pudo también identificar la unidad repetitiva de 86 Da correspondiente al PHB. Los cálculos de  $M_n$  y  $M_w$  muestran valores de 2885,03 y 3823,38 con PD 1,33.

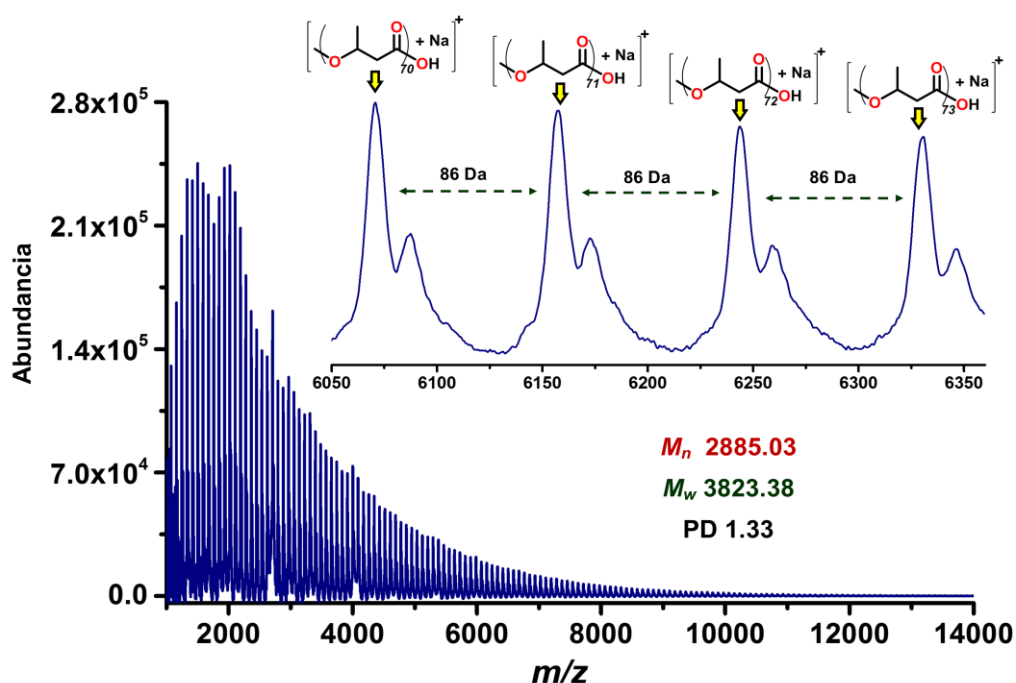


Figura 25. Espectro de masas de muestra de PHA tomado en modo lineal.

**4.6.2. Análisis elemental.** En la tabla 10 se muestra el análisis elemental teórico calculado para el PHB según su fórmula química  $(C_4H_6O_2)_n$  y el experimental obtenido.

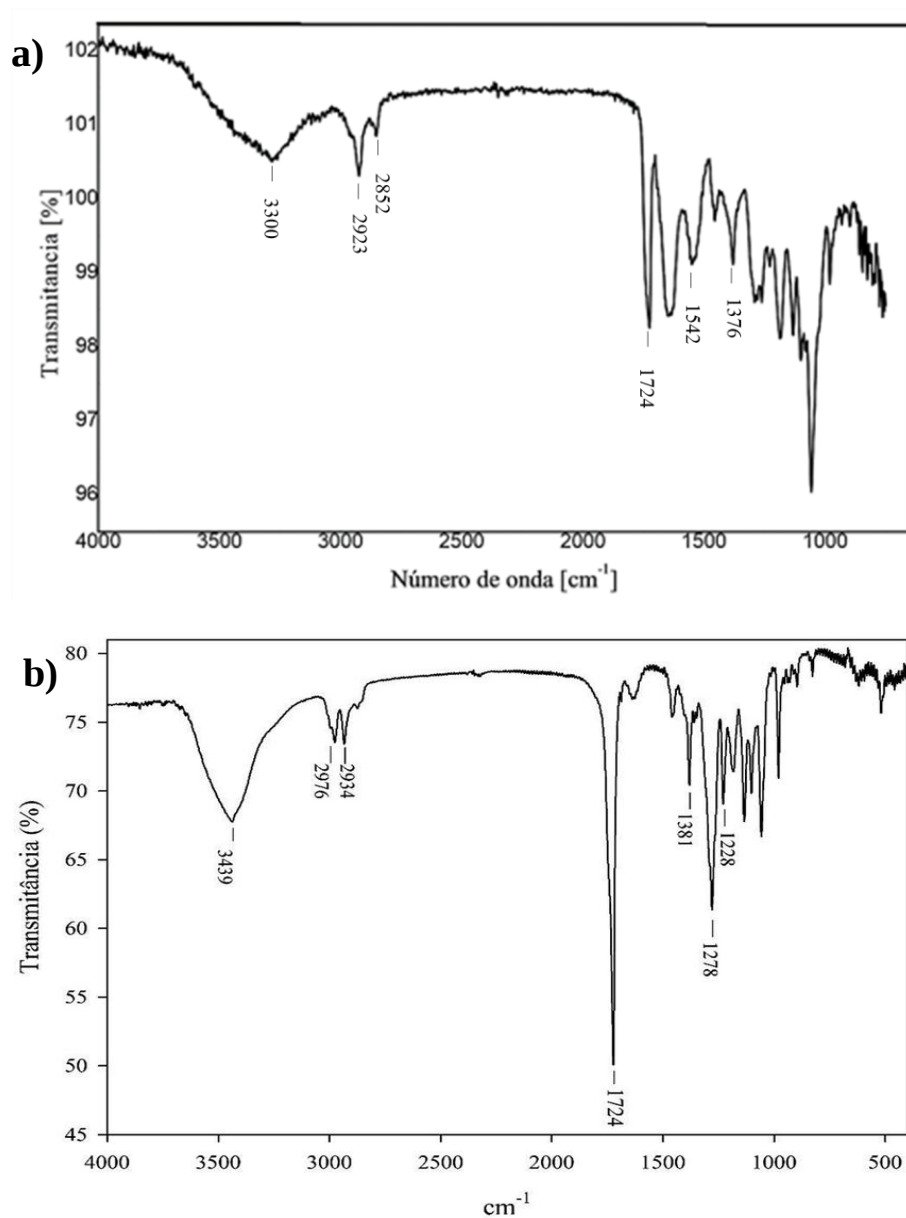
Tabla 10. *Análisis elemental teórico y experimental.*

| Elemento | % Teórico  | % Experimental |
|----------|------------|----------------|
| C        | 55,8006720 | 47,1993        |
| H        | 7,0242673  | 6,6987         |
| O        | 37,169012  | 39,4036        |
| N        | -          | 6,6964         |

Como se puede observar en los resultados experimentales de análisis elemental se evidencia la presencia de nitrógeno en la muestra, esto puede deberse a impurezas que posiblemente quedaron adheridas al polímero durante la extracción, como proteínas, teniendo en cuenta que fue extraído a partir de un rompimiento celular. Lo anterior afectó el porcentaje de cada elemento en comparación con su composición elemental teórico en pequeña proporción, pero finalmente se podría inferir que corresponde a la estructura del PHB.

**4.6.3. Análisis infrarrojo.** En la figura 26 se presentan los espectros infrarrojos para una muestra de biopolímero obtenido en el presente estudio y uno de referencia producido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno (Quines, y otros, 2015). En el espectro IR de este estudio se pueden observar las bandas más características del Polihidroxialcanoato del tipo PHB. A  $1724\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda correspondiente a la tensión  $C=O$  característica de compuestos orgánicos carbonílicos. A aproximadamente  $1455\text{ cm}^{-1}$ , emerge la banda de estiramiento asimétrico de los grupos  $-CH_3$  y  $-CH_2$  y la banda de vibración  $C-O$  a  $1542\text{ cm}^{-1}$ . La

banda a aproximadamente  $1376\text{ cm}^{-1}$  se debe a la deformación simétrica de los grupos  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}_2$  y el tramo simétrico de los enlaces  $\text{C}-\text{O}$  de los grupos  $\text{COO}-$  característicos de los PHA (Giedraitytė, 2015)



*Figura 26.* Espectros infrarrojos para a) una muestra de biopolímero obtenido en el presente estudio y b) uno de referencia (Quines, y otros, 2015).

Adicionalmente, las bandas observadas en la región entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de los enlaces C–O–C, como la intensa observada en  $1056\text{ cm}^{-1}$ , y otras como  $1099\text{ cm}^{-1}$ ,  $1130\text{ cm}^{-1}$  y  $1099\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas alrededor de  $2923\text{ cm}^{-1}$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$  corresponden a deformaciones axiales simétricas y asimétricas de los grupos metilenos  $-\text{CH}_2$  en la cadena de PHB, que concuerda con las bandas observadas en anteriores trabajos, como el que se presenta de referencia (Quines, y otros, 2015). Teniendo en cuenta lo anterior se puede inferir que el biopolímero obtenido corresponde a PHB. Adicionalmente, se observó una banda ancha entre  $3000$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$ , debida a moléculas de agua, es decir algo de humedad en la muestra.

**4.6.4. UV-VIS.** En la figura 27 se puede observar el espectro ultravioleta visible para una muestra de PHB que absorbe la radiación ultravioleta a  $210\text{ nm}$ . La absorción en esta área se debe a la transición de  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los compuestos carbonílicos, que aparece por encima de los  $200\text{ nm}$ . En la investigación de Fuentes y Quezada (2015) se obtuvo PHA a partir del hidrolizado de granos usados de cervecería empleando *pseudomonas aeruginosa* obteniendo una absorción a  $218\text{ nm}$ .

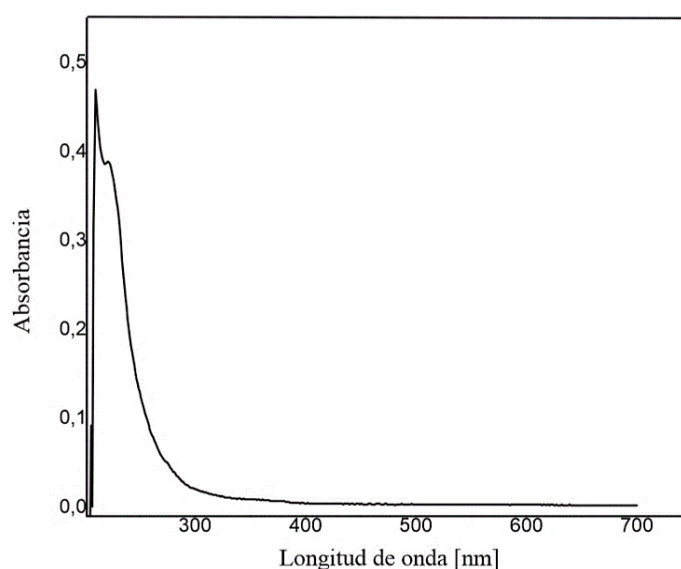


Figura 27. Espectro ultravioleta visible del PHB.

**4.6.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** En la figura 28 se presenta el resultado de la calorimetría diferencial de barrido. Como la muestra absorbe energía, se dice que la entalpía es endotérmica, lo cual ocurre en un proceso como la fusión. En este caso según el tipo de grafico (pico negativo) podemos observar la temperatura de fusión del PHB a 168,8 °C, la cual concuerda con la temperatura de fusión obtenida por Gražina (2015) en la producción de PHB a partir de *Geobacillus sp* utilizando glucosa como única fuente de carbono. Por lo cual se puede deducir que efectivamente se obtuvo el polihidroxialcanoato del tipo PHB.

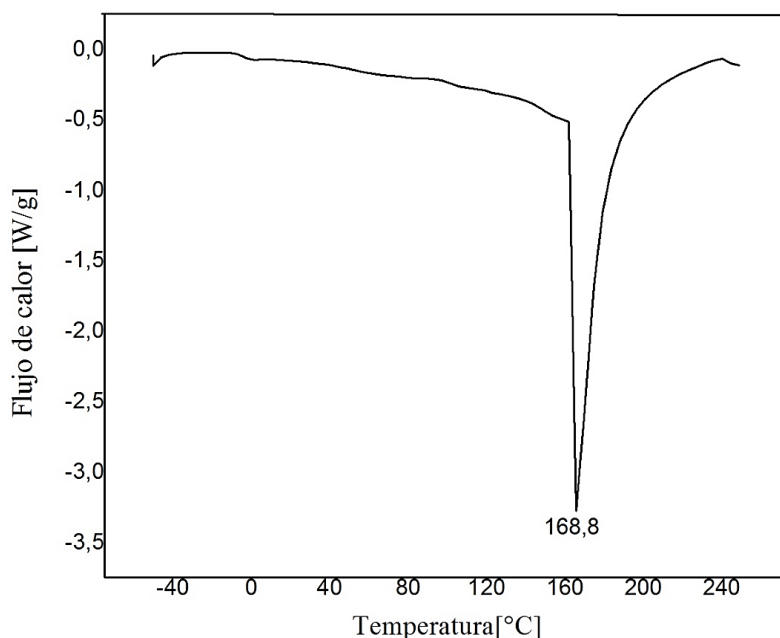


Figura 28. Curva DSC.

**4.6.6. Análisis termogravimétrico (TGA).** En la figura 29 se observa el termograma correspondiente a una muestra de PHB. La curva se obtuvo en el rango de 0 °C a 380 °C. En el análisis muestra que el PHB obtenido por *B. megaterium* B2. sufre una descomposición térmica a

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

258.20 °C, con un punto medio a 275.38 °C y un final a 292.28 °C trazando una línea base. La pérdida de masa fue de 12.022 mg y el porcentaje de pérdida de masa fue de 62.095 %.

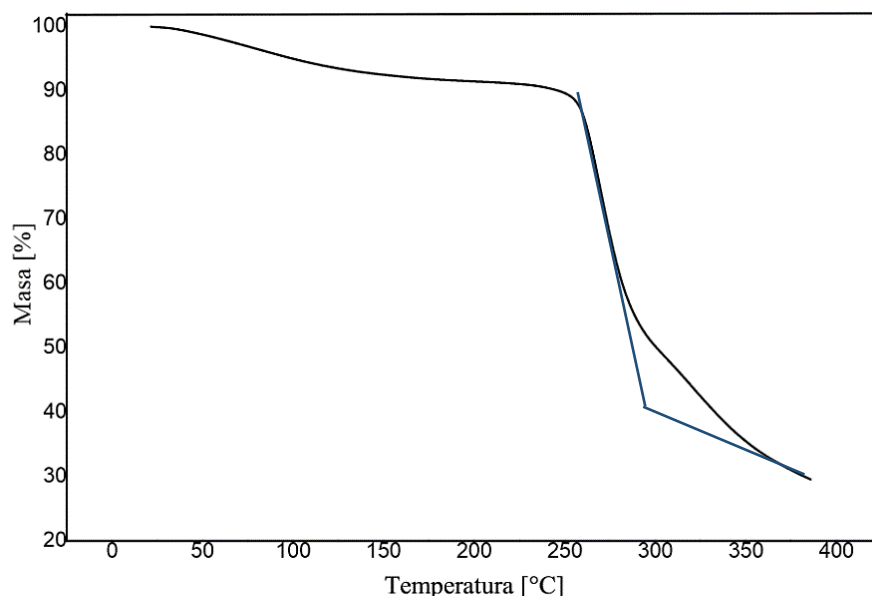


Figura 29. Curva TGA.

En estudios anteriores se reporta degradaciones térmicas en una sola etapa por encima de 270 °C para PHB puro, y un aumento de la estabilidad cuando se adiciona otro compuesto, por ejemplo, fibra de banano. (Rocha Nery, Gama dos Santos, & Mamede José, 2018). En sistemas multifacéticos se encontraron temperaturas de degradación de PHB en un rango de 280 °C y 300 °C (Hablott, Bordes, & Pollet, 2007). Un estudio similar con PHB con 30 % de polvo de madera reporta una degradación del 75 % de la masa total de la muestra en una sola etapa hasta una temperatura de 305 °C y adicionalmente informa una temperatura de degradación térmica por encima de 270 °C para PHB puro, con una completa descomposición hasta 360 °C (Machado, Pereira, Miranda, Terence, & Pradella, 2010). Teniendo en cuenta lo anterior se difiere que los rangos de temperatura de descomposición encontrados para PHB a partir de residuos de la

agroindustria de cacao (presente estudio) se encuentran entre los mismos valores que investigaciones posteriores con este tipo de biopolímeros.

## 5. Conclusiones

Se identificaron los azúcares glucosa y fructosa, y ácidos cítrico y acético en el MCL. Adicionalmente, se encontró glucosa, fructosa, sacarosa, ácido acético, cítrico y láctico en el LRRA; lo cual convierte a estos residuos en sustratos potenciales para ser utilizados en un bioproceso.

A partir del diseño de experimentos y el ensayo de validación del modelo estadístico, se evidenció que la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) se ve favorecida en un medio compuesto por una mezcla binaria de 53% de líquido residual rico en azúcares (LRRA) y 47% de caldo nutritivo 2 (CN2). Se obtuvo un porcentaje de acumulación de 57% y un rendimiento producto en sustrato máximo de 0,98 g/g. Se demostró que la cepa *B. megaterium* B2 no crece en un medio de cultivo en ausencia de CN2 y adicionalmente, se evidenció que el mucílago de cacao lixiviado (MCL) no favorece la producción de polihidroxialcanoatos.

Se cuantificó la cantidad de PHA obtenida por medio de SDS-Sonicación alcanzando hasta 34,3 g/L de PHA acumulado en una fermentación de 24 horas. Se caracterizó estructuralmente el biopolímero obtenido identificando un PHA del tipo polihidroxibutirato (PHB) por medio de la

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

técnica MS-MALDI-TOF y adicionalmente otras técnicas como IR, análisis elemental, UV-VIS, TGA y DSC que permitieron confirmar su estructura y estudiar sus propiedades térmicas y de absorción.

## 6. Recomendaciones

Se recomienda aumentar el tiempo de adaptación del microorganismo en el preinóculo antes de llevarlo al reactor para disminuir la fase de latencia, debido a que como se evidencia en el apéndice J de producción de biomasa y PHA en el tiempo para las mezclas del diseño de experimentos, la bacteria tardó mucho tiempo en empezar a crecer.

Para mejorar la pureza del biopolímero extraído, se sugiere realizar más lavados al polímero en el momento de la extracción para eliminar por completo cualquier resto celular que pudiera haberse adherido en él, dado que en el análisis elemental se evidencio la presencia de nitrógeno.

Se propone la realización de próximos estudios en donde se evalué el efecto en el cambio del régimen de alimentación y un ajuste en la relación carbono-nitrógeno para aumentar la productividad y el porcentaje de acumulación.

Adicionalmente, se recomienda la realización de pruebas para analizar las propiedades mecánicas del polímero con el fin de evaluar futuras aplicaciones de este en la elaboración de nuevos materiales biodegradables.

### Bibliografía

*Actualitix*. (01 de Octubre de 2016). (FAO) Recuperado el 15 de abril de 2018, de América del sur- grano de cacao- Producción (Toneladas): <https://es.actualitix.com/pais/amer/america-grano-de-cacao-produccion.php>

Aculley, p. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompiere, M., Takrama, J., Norgaard, L., . . . Nielsen, D. S. (2010). Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics. *Journal of Food Science*, 75(6), 300-307.

Amulya, K., Reddy, V. M., & Mohan, V. S. (2014). Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 158, 336-342.

Anderson, G., & Yang, G. (Febrero de 1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Federation*, 64(1), 53-59.

Anvoh, K., Zoro, A., & Gnakri, D. (2009). Production and Characterization of Juice from Mucilage of Cocoa Beans and its Transformation into Marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2), 129-133.

Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., & Matsumoto, K. (2017). Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 250-254.

- Balladares, C. A. (2016). *Caracterización físico-química de los desechos agrícolas del cacao y café del litoral ecuatoriano y su potencial empleo como biocombustibles*. (Tesis doctoral), Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., . . . Villano, M. (2010). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(6), 901-908.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509-516.
- Bonartsev, A., Myshkina, V., Nikolaeva, D., Furina, E., Makhina, T., Livshits, V., . . . Bonartseva, G. (2007). Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3- hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 295-307.
- Cadena Cala, T., & Herrera Ardila, Y. (2008). *Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante*. (Trabajo de grado), Universidad Industrial de Santander, Santander, Bucaramanga.
- Cerrone, F., Juarez, B., Sánchez Peinado, M., & Gonzalez Lopez, J. (2010). Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW, alpeorujo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 594-601.

Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578.

Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food composition and analysis*, 18(2-3), 121-130.

Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., & Beccari, M. (2004). Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 569-579.

Federación nacional de cacaoteros. (07 de 02 de 2017). Recuperado el 04 de 05 de 2018, de Producción nacional de cacao: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/noticias/326-en-2016-se-logro-nuevo-record-en-produccion-nacional-de-cacao>

Fuentes Olivera, A. J., & Quezada Alvarez, M. A. (2015). *Influencia de la concentración inicial de azúcares y la temperatura de fermentación en el rendimiento de un bioplástico a partir del hidrolizado de granos de cervecería empleando pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Gangurde, N., & Sayyed, R. (2012). *Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB): A Biodegradable (2)Polymer of Microbial Origin*. Recuperado el 17 de 05 de 2018, de ResearchGate: <https://www.researchgate.net/publication/274067470>

Giedraitytė, G. (2015). Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija*, 26(1), 38-45.

Giin, Y. A., Chia Lung, C., Ling, L., Liya, G., Lin, W., Indah Mutiara, N. R., . . . Jing Yuan, W. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA). *Polymers*, 6, 706-754.

Hablot, E., Bordes, P., & Pollet, E. (2007). Degradación térmica y termomecánica de los sistemas multifásicos basados en poli (3-hidroxibutirato). *Degradación y estabilidad de polímeros*, 1-9.

Hayenga, I. (2006). *Determination of organic acids in wine and fruit juices with ion exclusion chromatography*. Obtenido de SIGMA-ALDRICH: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/analytix-3-2006.pdf>

Holst, R. (2012). *Bioplastics in California: Economic Assessment of Market Conditions for PHA/PHB Bioplastics Produced from Waste Methane*. California. Recuperado el 15 de 07 de 2018, de CERI: <https://www.ocf.berkeley.edu/~tbrooks/portfolio-item/calepa-bioplastics/>

Ibrahim, M. H., & Stein, S. (Agosto de 2009). Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6222–6231.

Ibrahim, M., & Steinbüchel, A. (2009). *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 214-225.

- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.
- Korkakaki, E., Mulders, M., Veeken, A., Rozendal, R., Loosdrecht, M., & Kleerebezem, R. (2016). PHA production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Overcoming the inhibitory matrix. *water research*, 96(1), 74-83.
- Kumar, P., & Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269, 544-556.
- Lizcano Gonzáles, V. A. (2018). *Efecto de las concentraciones de nitrógeno y oxígeno en la producción de polihidroxibutirato por Bacillus megateriuem B2 a partir de glicerol*. (Tesis de maestría), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Recuperado el 02 de 05 de 2018
- López, J. A., Naranjo, J. M., Higueta, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 250-258.
- Luvizetto Faccin, D. J., Martins, I., Medeiros Cardozo, N. S., Rech, R., Záchia Ayub, M. A., Moitinho Alves, T. L., . . . Resende, A. (2009). Optimization of C: N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(12), 1756-1761.

- Luzuriaga Peña, D. L. (2012). *Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao (theobroma cacao) como materia prima en la elaboración de vino*. (Tesis pregrado), Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito. Obtenido de <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/4930>
- Machado, M. L., Pereira, N. C., Miranda, L. F., Terence, M. C., & Pradella, J. G. (2010). Estudio de propiedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. *Polymers*, 20(1), 65-71.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (10 ed.). Madrid, España: Pearson Education.
- Marcillo, M., & Meza, R. (2010). *Vino a partir de mucílago de Cacao (theobroma cacao L) en los laboratorio de la ESPAM-MFL*. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Calceta Bolivar.
- Monteiro Coelho, E., Padiha, C., Aquino Miskinis, G., Gomes Barroso, A., Elias Pereira, G., Cavalcanti de Azevedo, L., & Lima, M. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160-167.
- Moreno, P., Yañez, C., Medeiros Cardozo, N. S., Escalante, H., Combariza, M. Y., & Guzman, C. (2015). Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 32(6), 682-689.

Mothes, G., Schnorpfeil, C., & Ackermann, J. U. (2007). Production of PHB from Crude Glycerol. *Research Article*, 7(5), 475-479.

Oliveros, D., & Pérez, S. (2013). Medición de la competitividad de los productores de cacao en una región de santander-Colombia. *Lebret*(5), 243-267.

Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., & Steinbüchel, A. (Julio de 2001). Optimization of cell growth and poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, 23(14), 1119-1123.

Patnaik, P. R. (2008). Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 153-171.

*PlasticsEurope*. (2018). Recuperado el 14 de 11 de 2018, de Association of plastics Manufacturers: [https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics\\_the\\_facts\\_2018\\_AF\\_web.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf)

Quines, L. K., Lenezak, J., Schmidt, M., Zanfonato, K., Rodrigues, M. I., Schmidell, W., & Aragao, G. (2015). Extração de Poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, con carbonato de propileno. *Química Nova*, 38(2), 214-220.

Quizhpi Nieves, E. X. (2016). *Caracterización del mucílago de cacao CCN 51 mediante espectrofotometría UV-Visible y absorción atómica, caso:Ecuador-zona 6*. (Tesis de pregrado), Universidad de Cuenca, Ecuador.

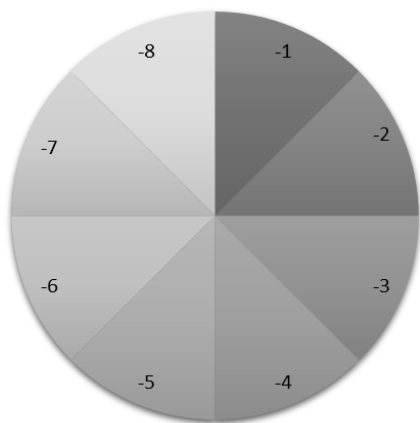
Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56.

- Rhu, D., Lee, W., Kim, J., & Choi, E. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Science and Technology*, 48(8), 221-228.
- Richardson Madriñán, J., Whitlock, B., Meerow, A., & Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: a diversification history of Theobroma and Malvaceae. *Front Ecol*, 3, 120.
- Rizzarelli, P., & Carroccio, S. (2014). Modern mass spectrometry in the characterization and degradation of biodegradable polymers. *Analytica Chimica Acta*, 808, 18-43.
- Rocha Nery, T. B., Gama dos Santos, Z. I., & Mamede José, N. (06 de Diciembre de 2018). Desenvolvimento e caracterização de biocompósitos de polihidroxibutirato e fibra de bananeria. *Matéria*, 23(4).
- Rojas, F., & Sacristán Sánchez, E. (2013). *Guía ambiental para el cultivo del cacao*. Recuperado el 03 de 10 de 2018, de Ministerio de agricultura y desarrollo rural: [https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub\\_doctecnicos/fedecacao-pub-doc\\_05B.pdf](https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_05B.pdf)
- Santimano, M., Prabhu, N., & Garg, S. (2009). PHA production using low-cost agroindustry wastes by *Bacillus* sp. Strain COL1/A6. *Journal of Microbiology*, 4(3), 89-96.
- Serrano Gómez, C. (2009). *Cocoa Santander: comunicación de identidad regional del departamento de Santander a través de productos derivados del cacao Santandereano*. (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Swellam, A. E., Gouda, M. K., & Omar, S. H. (Enero de 2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156(3), 201-207.

- Venkateswar Reddy, M., Amulya, K., Rohit, M., Sarma, P., & Venkata, S. (2014). Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using *Bacillus tequilensis*: integration with dark-fermentative hydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7616-7626.
- Wijeyekoon, S., Carere, C. R., West, M., Nath, S., & Gapes, D. (2018). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors. *Water Research*, 140, 1-11.
- Winkel, T. (2013). *Ecuador and cacao: An old alliance*. (Tesis es maestría), Colorado State University, Spring, USA.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., & Chen, G. Q. (2001). Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 80(2), 111-118.
- Yu, G.-e., & Marchessault, R. (2000). Characterization of low molecular weight poly(b-hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis. *Polymer*, 41(3), 1087-1098.
- Zhang, X., Luo, R., Wang, Z., Deng, Y., & Chen, G. (2009). Applications of (R) -3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuel. *Biomacromolecules*, 10(4), 707-711.

### Apéndices

Se tomaron 10 µL de cada dilución y se depositaron en la sección del agar recuento que correspondía. Se inició desde la dilución de menor concentración hasta la de la mayor concentración.



$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \text{Col} * 10^{d+2}$$

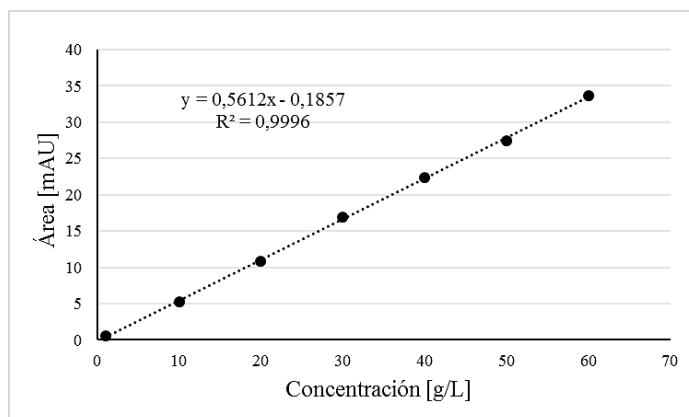
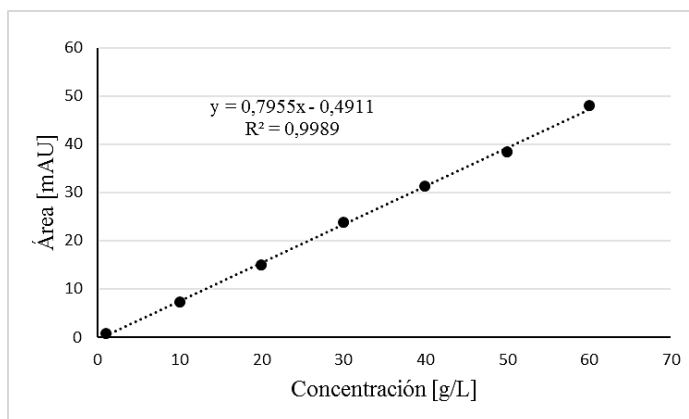
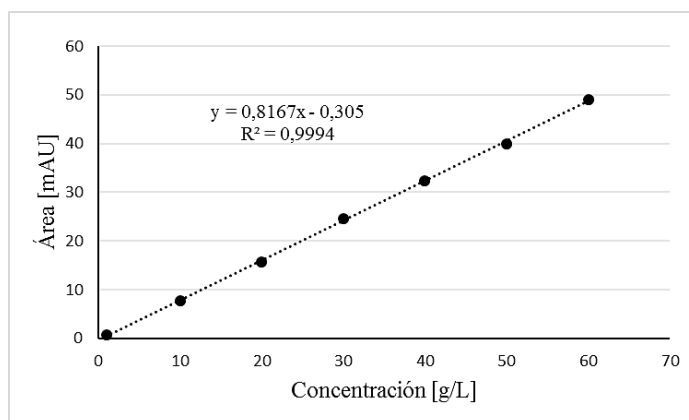
UFC: Unidades formadoras de colonia

Col: Número de colonias presentes en la dilución d

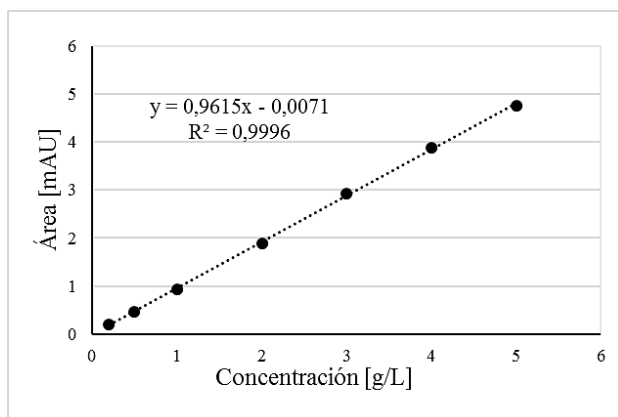
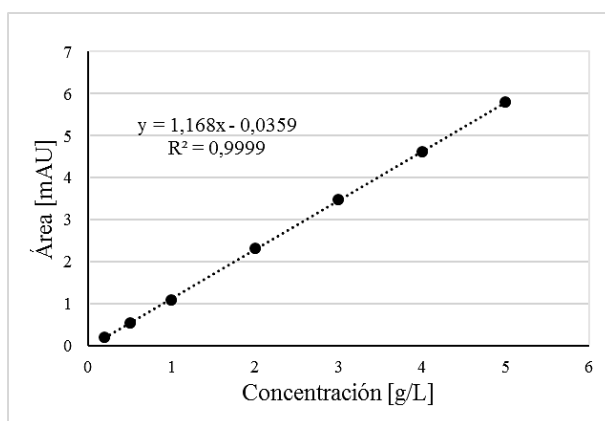
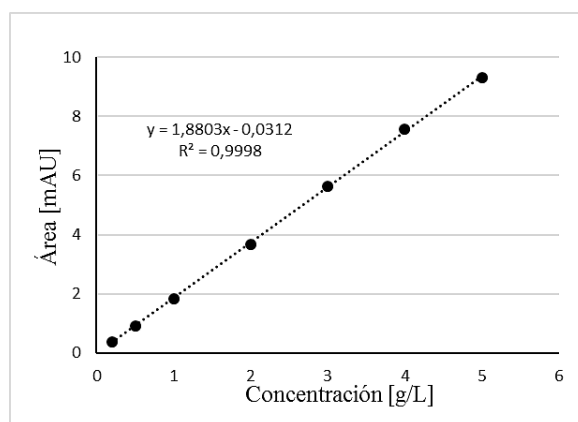
d: Número de la dilución que se está contabilizando

*Apéndice A.* Cálculo de Unidades formadoras de colonia por mililitro.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

*Apéndice B. Curva de calibración sacarosa.**Apéndice C. Curva de calibración glucosa.**Apéndice D. Curva de calibración fructosa.*

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

*Apéndice E. Curva calibración ácido acético.**Apéndice F. Curva de calibración ácido láctico.**Apéndice G. Curva de calibración ácido cítrico.*

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO

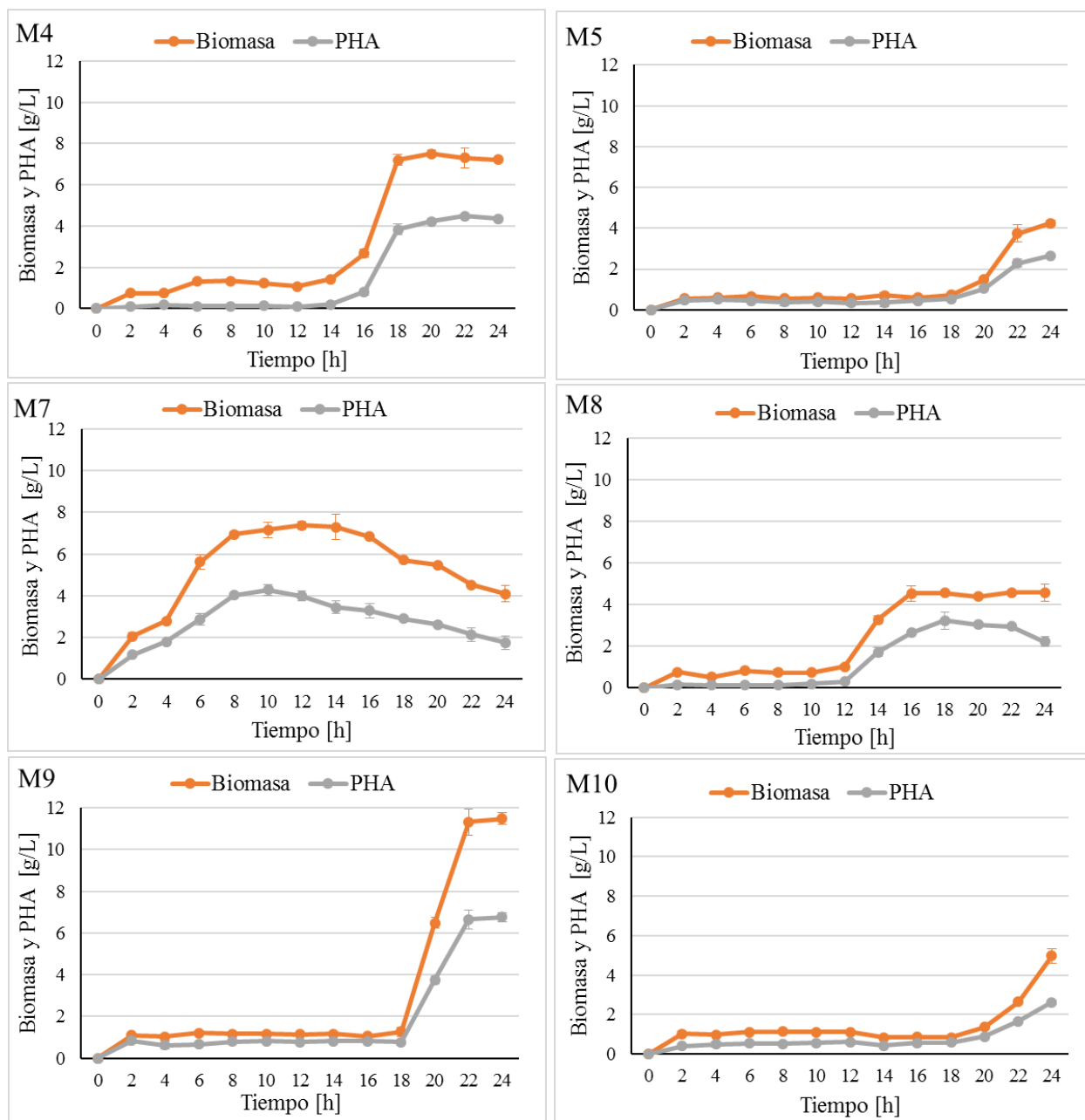
| Patrón<br>[g/L] | Sacarosa       |        |        | Glucosa        |        |        | Fructosa       |        |        |
|-----------------|----------------|--------|--------|----------------|--------|--------|----------------|--------|--------|
|                 | t <sub>R</sub> | S      | CV, %  | t <sub>R</sub> | S      | CV, %  | t <sub>R</sub> | S      | CV, %  |
| 1               | 14,1167        |        |        | 16,4080        |        |        | 17,8537        |        |        |
|                 | 14,1367        | 0,0124 | 0,0875 | 16,4083        | 0,0167 | 0,1015 | 17,8503        | 0,0205 | 0,1145 |
|                 | 14,1393        |        |        | 16,4370        |        |        | 17,8873        |        |        |
| 10              | 14,1580        |        |        | 16,4623        |        |        | 17,9100        |        |        |
|                 | 14,1050        | 0,0284 | 0,2006 | 16,3997        | 0,0313 | 0,1905 | 17,8383        | 0,0360 | 0,2013 |
|                 | 14,1490        |        |        | 16,4300        |        |        | 17,8690        |        |        |
| 20              | 14,1177        |        |        | 16,4173        |        |        | 17,8603        |        |        |
|                 | 14,1157        | 0,0062 | 0,0439 | 16,4197        | 0,0067 | 0,0004 | 17,8627        | 0,0060 | 0,0336 |
|                 | 14,1273        |        |        | 16,4300        |        |        | 17,8717        |        |        |
| 30              | 14,1403        |        |        | 16,4453        |        |        | 17,8873        |        |        |
|                 | 14,1880        | 0,0253 | 0,1790 | 16,5003        | 0,0289 | 0,1756 | 17,9450        | 0,0303 | 0,1690 |
|                 | 14,1493        |        |        | 16,4573        |        |        | 17,9003        |        |        |
| 40              | 14,1980        |        |        | 16,5130        |        |        | 17,9593        |        |        |
|                 | 14,2127        | 0,0188 | 0,1327 | 16,5283        | 0,0200 | 0,1210 | 17,9820        | 0,0232 | 0,1289 |
|                 | 14,1753        |        |        | 16,4887        |        |        | 17,9357        |        |        |
| 50              | 14,1953        |        |        | 16,5013        |        |        | 17,9510        |        |        |
|                 | 14,1410        | 0,0272 | 0,1918 | 16,4480        | 0,0267 | 0,1623 | 17,8923        | 0,0294 | 0,1643 |
|                 | 14,1660        |        |        | 16,4710        |        |        | 17,9177        |        |        |
| 60              | 14,1603        |        |        | 16,4647        |        |        | 17,9100        |        |        |
|                 | 14,1670        | 0,0107 | 0,0758 | 16,4743        | 0,0108 | 0,0657 | 17,9183        | 0,0118 | 0,0659 |
|                 | 14,1460        |        |        | 16,4527        |        |        | 17,8950        |        |        |

*Apéndice H.* Evaluación de la repetibilidad de los tiempos de retención para los patrones de azúcares.

| Patrón<br>[g/L] | Sacarosa |      |       | Glucosa |      |       | Fructosa |      |       |
|-----------------|----------|------|-------|---------|------|-------|----------|------|-------|
|                 | Área     | S    | CV, % | Área    | S    | CV, % | Área     | S    | CV, % |
| 1               | 0,54     |      |       | 0,74    |      |       | 0,79     |      |       |
|                 | 0,52     | 0,01 | 2,27  | 0,72    | 0,02 | 2,45  | 0,78     | 0,02 | 1,89  |
|                 | 0,54     |      |       | 0,75    |      |       | 0,81     |      |       |
| 10              | 5,27     |      |       | 7,13    |      |       | 7,64     |      |       |
|                 | 5,41     | 0,09 | 1,78  | 7,50    | 0,21 | 2,95  | 7,75     | 0,07 | 0,87  |
|                 | 5,23     |      |       | 7,13    |      |       | 7,63     |      |       |
| 20              | 10,80    |      |       | 15,00   |      |       | 15,60    |      |       |
|                 | 10,80    | 0,00 | 0,00  | 15,10   | 0,06 | 0,00  | 15,70    | 0,06 | 0,37  |
|                 | 10,80    |      |       | 15,00   |      |       | 15,60    |      |       |
| 30              | 16,90    |      |       | 23,60   |      |       | 24,60    |      |       |
|                 | 17,00    | 0,06 | 0,34  | 23,80   | 0,12 | 0,49  | 24,70    | 0,06 | 0,23  |
|                 | 16,90    |      |       | 23,80   |      |       | 24,70    |      |       |
| 40              | 22,30    |      |       | 31,30   |      |       | 32,40    |      |       |
|                 | 22,40    | 0,06 | 0,26  | 31,20   | 0,06 | 0,18  | 32,40    | 0,06 | 0,18  |
|                 | 22,30    |      |       | 31,30   |      |       | 32,50    |      |       |
| 50              | 27,70    |      |       | 38,30   |      |       | 39,60    |      |       |
|                 | 27,30    | 0,20 | 0,73  | 38,50   | 0,10 | 0,26  | 40,00    | 0,23 | 0,58  |
|                 | 27,50    |      |       | 38,40   |      |       | 40,00    |      |       |
| 60              | 33,80    |      |       | 48,00   |      |       | 49,10    |      |       |
|                 | 33,60    | 0,10 | 0,30  | 48,10   | 0,10 | 0,21  | 49,20    | 0,06 | 0,12  |
|                 | 33,70    |      |       | 47,90   |      |       | 49,10    |      |       |

*Apéndice I.* Evaluación de la repetibilidad de las áreas para los patrones de azúcares.

## PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE RESIDUOS DE CACAO



*Apéndice J.* Producción de biomasa y PHA en el tiempo para las mezclas del diseño de experimentos.