

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS DE
LA FERMENTACIÓN DEL CACAO USANDO *BACILLUS MEGATERIUM B2*.

SILVIA JULIANA SUÁREZ RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2019

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS DE
LA FERMENTACIÓN DEL CACAO USANDO *BACILLUS MEGATERIUM B2*.

SILVIA JULIANA SUÁREZ RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA QUÍMICA

DIRECTOR

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

CODIRECTOR

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Ph.D. en Química Analítica Ambiental

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2019

DEDICATORIA

Este trabajo es principalmente dedicado a quién me ha dado vida, sueños y las capacidades para cumplirlos, mi buen Dios y Padre.

A mis Padres, Carlos y Ruby, por soñar conmigo, apoyarme, patrocinar mis sueños y siempre creer en mí. Ellos lo merecen todo.

A mi hermano, Andrés, por quien busco superar cada escalón y ser mejor cada día, con el fin de abrir caminos que podamos recorrer juntos.

A mis abuelos, tíos y primos que siempre están a mi lado, dándome su apoyo y su cariño. Especialmente a María Andrea, mi prima, amiga, hermana y compañera de vida, quién cumplió un papel fundamental en esta tesis al brindarme sus conocimientos en química y lo más importante su apoyo incondicional.

A Marco, Samuel, Isabella, Juan Pablo, Sebastián y Dulce, porque el amor que me han dado hace que me esfuerce cada día por ser ejemplo para ellos.

A mis maestros y compañeros por hacer de este proceso de aprendizaje el mejor de mi vida, sus enseñanzas trascienden el plano académico.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Mabel Juliana Quintero, por siempre estar atenta a este trabajo investigativo y orientarme desde su experiencia. Junto a ella aprendí grandes lecciones académicas y personales.

A los profesores Cristhian Blanco y Yajaira Combariza, por el apoyo durante todo este proceso y por guiarme en tantos momentos de incertidumbre en el desarrollo del trabajo.

A todos los integrantes del proyecto NEXTCOA, que siempre me brindaron su ayuda con total amabilidad.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Generalidades de la fuente de carbono.	15
2.2. Generalidades de los polihidroxicarboxilatos.....	19
2.3. Generalidades del Microorganismo.	21
3. METODOLOGÍA	24
3.1. Adaptación del microorganismo.....	24
3.1.1. Caracterización química de los residuos de cacao..	24
3.1.2. Adaptación usando sustratos modelo.	25
3.1.3 Adaptación con residuos de cacao como fuente de carbono.....	27
3.2. Escalado del proceso de adaptación en un reactor con un volumen de trabajo 4 Litros.	28
3.2.1. Crecimiento del microorganismo.....	28
3.2.2. Obtención de polihidroxicarboxilatos..	30
3.2.3. Consumo de sustrato.....	31
3.3. Diseño de experimentos para evaluar el efecto de la mezcla de sustratos en la producción de PHAs	31

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	34
4.1. Adaptación de Bacillus megaterium B2.	34
4.1.1. Caracterización química de los residuos del cacao.	34
4.1.2. Crecimiento microbiano con sustratos representativos.....	35
4.1.3. Crecimiento microbiano con mucílagos de cacao como fuente de carbono.....	36
4.2. Escalado del proceso de adaptación de Bacillus megaterium B2 en un volumen de trabajo de 4 litros.	37
4.2.1. Evolución de la biomasa a través del tiempo..	37
4.2.2. Evolución del producto a través del tiempo.....	38
4.2.3. Evolución del sustrato a través del tiempo.....	40
4.3. Diseño de experimentos.	41
5. CONCLUSIONES	49
6. RECOMENDACIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudio al mucílago de cacao de la variedad CCN-51	17
Tabla 2. Aplicaciones del mucílago de cacao.	17
Tabla 3. Producción de PHA usando como sustrato residuos agroindustriales.	22
Tabla 4. Composición del medio nutritivo.	26
Tabla 5. Composición del medio sólido.	27
Tabla 6. Composición del medio básico mínimo requerido por <i>Bacillus megaterium</i> B2.	29
Tabla 7. Composición de los elementos traza.	29
Tabla 8. Proporciones de mezcla en porcentaje v/v.	33
Tabla 9. Resultados del análisis químico del mucílago agotado y el mucílago lixiviado.	34
Tabla 10. Número máximo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro obtenidas con cada sustrato.	36
Tabla 11. Rendimiento producto en biomasa en el punto máximo de producción de PHA y máxima velocidad de crecimiento específica.	39
Tabla 12. Rendimientos y productividades de los ensayos del diseño de experimentos	42
Tabla 13. Rendimientos y productividad para el ensayo de optimización.	46
Tabla 14. Comparación de parámetros cinéticos alcanzados en cultivos de <i>Bacillus megaterium</i> B2.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento de cacao proyecto Nextcoa.....	18
Figura 2. Estructura general de los polihidroxicanoatos.....	19
Figura 3. Etapas de la metodología.	24
Figura 4. Técnica de recuento en placa.	26
Figura 5. Proceso de escalado a un volumen de 4 Litros.	30
Figura 6. Triángulo de proporciones de mezcla.	32
Figura 7. Curva de crecimiento microbiano en sustratos representativos.....	35
Figura 8. Curva de crecimiento microbiano con residuos de cacao como fuente de carbono.	36
Figura 9. Evolución de la biomasa a través del tiempo.	37
Figura 10. Evolución del producto a través del tiempo.	38
Figura 11. Espectro de masas en modo reflectrón.	39
Figura 12. Consumo de sustrato a través del tiempo.....	41
Figura 13. Cinética de consumo de sustrato y producción de biomasa y PHA para los ensayos del diseño de experimentos.	43
Figura 14. Gráfica de contorno de mezcla para productividad.....	44
Figura 15. Gráfica de contorno de mezcla para rendimiento.	45
Figura 16. Optimización del diseño de experimentos para los porcentajes de mezcla.	45
Figura 17. Cinética del ensayo de optimización.....	46
Figura 18. Comparación de parámetros cinéticos con otras fuentes de Carbono..	48

Figura 19. División de la caja Petri con agar recuento.....	55
Figura 20. Ajuste de datos biomasa vs tiempo	58
Figura 21. Espectro de masas en modo lineal.....	59

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Cálculo de Unidades formadoras de colonia por mililitro.....	55
Anexo B. Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento.....	56
Anexo C. Análisis de espectrometría de masas.	59

RESUMEN

TITULO: Producción de polihidroxicanoatos a partir de residuos de la fermentación del cacao usando *Bacillus megaterium* B2*.

AUTOR: Silvia Juliana Suárez Rodríguez**

PALABRAS CLAVE: Mucílago de cacao, Bioprocesos, Polihidroxicanoatos, Cepa nativa.

DESCRIPCIÓN:

El mucílago es un residuo rico en azúcares y ácidos que se genera como subproducto de la fermentación del cacao; lo que lo convierte en una fuente de carbono potencial para ser usada en un bioproceso. Por esta razón, se utilizó como sustrato en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) usando la cepa nativa *Bacillus megaterium* B2. Los PHAs son poliésteres acumulados por los microorganismos como reserva de energía, dependiendo de su estructura poseen propiedades similares a los polímeros convencionales provenientes de la industria petroquímica. Este estudio reporta el proceso de adaptación de la bacteria a dos diferentes tipos de mucílago: un mucílago lixiviado y un mucílago agotado. Se observó la habilidad del microorganismo de crecer degradando los ácidos y los azúcares presentes en estos sustratos. La cepa adaptada se trasladó a un medio de sales y se escaló el proceso a un reactor con un volumen de trabajo de 4 Litros, en el cual se hizo evidente que la bacteria genera PHAs como un metabolito primario. Se desarrolló un diseño de experimentos para evaluar la producción de PHAs a diferentes concentraciones de los sustratos, usando el método simplex con ayuda del software MINITAB. Se maximizaron los valores de rendimiento producto en sustrato y productividad y se logró mejorar la cinética del microorganismo con respecto a los valores reportado anteriormente. Se obtuvo un rendimiento producto en sustrato de 0.98 g/g, un porcentaje de acumulación del 57% y un incremento del 33% en la productividad.

* Trabajo de grado

**Facultad de ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Químicas. Directora: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas.

ABSTRACT

TITLE: Polyhydroxyalkanoates production from residues of cocoa fermentation using *Bacillus megaterium* B2*.

AUTHOR: Silvia Juliana Suárez Rodríguez**

KEY WORDS: Cocoa mucilage, Bioprocesses, Polyhydroxyalkanoates, native strain.

DESCRIPTION:

Cocoa mucilage is a residue rich in sugars and acids that is generated as a byproduct of the fermentation of cocoa beans; which makes it a potential carbon source to be used in a bioprocess. For this reason, we it used as a substrate in the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using *Bacillus megaterium* B2 native strain. PHAs are polyesters accumulated by microorganisms as energy reserves, depending on their structure they have similar properties to conventional synthetic polymers from the petrochemical industry. This study reports the process of adaptation of the bacterium to two different types of mucilage: a leached mucilage and an exhausted mucilage. The microorganism's ability to grow was observed by consuming the acids and sugars present in these substrates. The adapted strain was transferred to a salt medium and the process was scaled to a 4 liters bioreactor, where it became evident that the bacterium generates PHAs as a primary metabolite. An experimental design was developed to evaluate the production of PHAs at different substrates concentrations, using the simplex method with MINITAB software. Product yields values and productivity were maximized and the kinetics of the microorganism was improved with respect to the values reported previously. The product yield on substrate was of 0.98 g/g, an accumulation percentage of 57% with and a productivity increase of 33%.

* Trabajo de grado

**Facultad de ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Químicas. Directora: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas.

INTRODUCCIÓN

El *Theobroma cacao L*, es el árbol a partir del cual se generan productos como el chocolate y sus derivados. Según datos de Fedecaco en el año 2017 se alcanzó una producción histórica de 60,535 toneladas, siendo Santander el principal productor con un aporte del 39% sobre el total nacional. Esta cifra representa un aumento del 6,6% respecto al 2016 y según proyecciones basadas en datos históricos de los últimos 10 años, esta producción seguirá en aumento.

Este incremento en la producción trae grandes beneficios para quienes trabajan en este sector, pero a su vez genera una mayor acumulación de biomasa residual que no está siendo aprovechada, propiciando un gran impacto ambiental. Entre estos residuos encontramos: la cáscara, el tejido de soporte y el mucílago. El mucílago de cacao es rico en azúcares y ácidos que lo convierte en una fuente de carbono potencial para un bioproceso.

Por otra parte, la contaminación relacionada con los plásticos sintéticos es cada vez más preocupante, estos no sólo son difíciles de degradar, sino que además durante su fabricación tienen un importante aporte de CO₂ a la atmósfera. Lamentablemente no podemos prescindir de estos y se hace necesario buscar alternativas, entre las que se destaca la fabricación de biopolímeros que reemplacen su utilidad como es el caso de los polihidroxialcanoatos.

Un aprovechamiento del mucílago de cacao para la generación de nuevos materiales plásticos degradables ayudaría a la mitigación del daño medioambiental por acumulación de residuos y generación de malos olores y a su vez representaría un beneficio económico para la cadena productiva del cacao.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Producir polihidroxicanoatos a partir de los residuos líquidos del cacao usando *Bacillus megaterium* B2.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la cinética de producción de polihidroxicanoatos usando sustratos modelo como glucosa y AGV.

Adaptar del microorganismo *Bacillus megaterium* B2 a un nuevo medio de cultivo donde se utilice como sustrato los residuos líquidos del cacao.

Evaluar la cinética de producción de polihidroxicanoatos usando como sustrato los residuos líquidos del cacao.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la fuente de carbono.

El cacao (*Theobroma cacao* L) es una planta que pertenece a la familia Malvaceae. Se han encontrado alrededor de 22 especies ubicadas principalmente en África, sur y centro América.

Según datos de FEDECACAO, en el año 2017 Colombia alcanzó una producción histórica de 60,535 toneladas, esta cifra representa un aumento del 6,6% respecto al 2016. Cabe destacar que el departamento Santander es el mayor productor con un aporte del 39% sobre el total nacional. El fruto de este departamento se reconoce por su buena calidad ya que cuenta con condiciones que favorecen el cultivo, por ejemplo, las tierras de esta región poseen la altitud indicada, un suelo arcilloso que preserva la humedad, es rico en materia orgánica y cuenta con una temperatura entre los 25°C y 28°C¹.

El grano de cacao se compone de una cascarilla que representa entre el 10 y el 14% en peso del grano seco, y una almendra que representa entre el 86 y el 90% del peso restante. Aproximadamente un tercio de la almendra contiene células con polifenoles lo cuales son los precursores del sabor y el aroma del chocolate². Los dos tercios restantes están formados por células de reserva con lípidos³. La almendra está rodeada de un mucilago blanco rico en azúcares, que tiene como

¹SERRANO GÓMEZ, Carolina. Cacao Santander: Comunicación de identidad regional del departamento de Santander a través de productos derivados del cacao Santandereano. Bogotá: Universidad Pontificia Javeriana. 2009.

² LUCUMBERRI, Elena, *et al.* Characterization of cocoa fiber and its effect on the antioxidant capacity of serum in rats. Barcelona: *Nutrición Hospitalaria*, 2006.p.622.

³ GONZALES MUÑOZ, Yuniesky; PEREZ, Elevina & PALOMINO, Carolina. Factores Que Inciden En La Calidad Sensorial Del Chocolate.Caracas: *Actualización en Nutrición*, vol 13, 2012.p.314-331.

función la formación del aroma durante la fermentación pero que termina siendo un residuo del proceso⁴.

En el proceso de transformación del cacao se genera una gran cantidad de residuos, que representan un 75% del total en peso⁵, gran parte de estos residuos contienen un alto porcentaje de carbono que al no ser tratados causan problemas de contaminación por la lentitud de su proceso de degradación, además de problemas sanitarios por acumulación y generación de malos olores.

El desaprovechamiento de estos recursos se debe en gran medida a que el proceso es realizado por los mismos cultivadores que desconocen de estrategias para tratarlos.

Entre los residuos del proceso de transformación se destacan la cáscara y el mucílago, este último corresponde aproximadamente al 10 y 12% del peso del fruto⁶. Gracias a su contenido de azúcares, fibra y proteína (Ver tabla 1), se ha buscado aplicarlo principalmente en la industria alimenticia para la elaboración de nuevos productos con un valor agregado, como se puede observar en la tabla 2. Sin embargo, el mucílago por acción de las levaduras se fermenta durante los dos primeros días y a partir de este las bacterias transforman el alcohol en ácido acético, impidiendo que después de este tiempo sea usado para las aplicaciones ya mencionadas.

⁴ CADENA CALA, Tatiana & HERRERA ARDILA, Yenny. Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, 2008.

⁵ ARTEAGA ESTRELLA, Yadira. Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjar (provincia del Guayas). Guayaquil: *ECA Sinergia*, 2013. p. 49-52.

⁶ SUAREZ HERNANDEZ, Elkin & MALDONADO GARCIA, Yarin. AREQUIPE CON MUCILAGO DE CACAO EN EL MUNICIPIO DEL CARMEN DE CHUCURI - SANTANDER. Bucaramanga: *Universidad Industrial de Santander*. Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. 2011.

Tabla 1. Estudio al mucílago de cacao de la variedad CCN-51

Humedad	77.34%
Cenizas	2.91%
Extracto Etéreo	0.36%
Proteína	5.41%
Fibra	8.22%
Azúcares Totales	62.95%
Azúcares Reductores	11.98%

Fuente: ARTEAGA ESTRELLA, Yadira. Estudio del desperdicio del mucílago de cacao en el cantón Naranjal (provincia del Guayas). Guayaquil: ECA Sinergia, 2013.p. 49.

Tabla 2. Aplicaciones del mucílago de cacao.

Aplicación	País
Arequipe	Colombia ⁷
Jalea	Ecuador ⁸
Jugo	Colombia ⁹
Mermelada	Pakistán ¹⁰
Licores	Brasil ¹¹
Vinagre	Brasil ¹²
Gelatina	Brasil ¹³

⁷ *Ibíd.*,p.6.

⁸ VALLEJO TORRES, Christian, *et al.* (2016). UTILIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO, TIPO NACIONAL Y TRINITARIO, EN LA OBTENCIÓN DE JALEA. Portoviejo: (E. S. López, Ed.) *Espamciencia*, 7(1),2017.p. 51-58.

⁹ GONZALEZ ORTIZ, Carolina & JAIMES JAIMES, Marilyn. DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE JUGO DERIVADO DEL MUCILAGO DE CACAO. Tesis de Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, 2005.

¹⁰ Anvoh, Koutoua; Zoro Bi, Arsène & Gnakri, Dago. Production and Characterization of Juice from Mucilage of cocoa Beans and its transformation into marmalade. Faisalabad: *Pakistan Journal*, 2009.p. 129-133.

¹¹ *Ibíd.*,p129-133.

¹² *Ibíd.*,p129-133

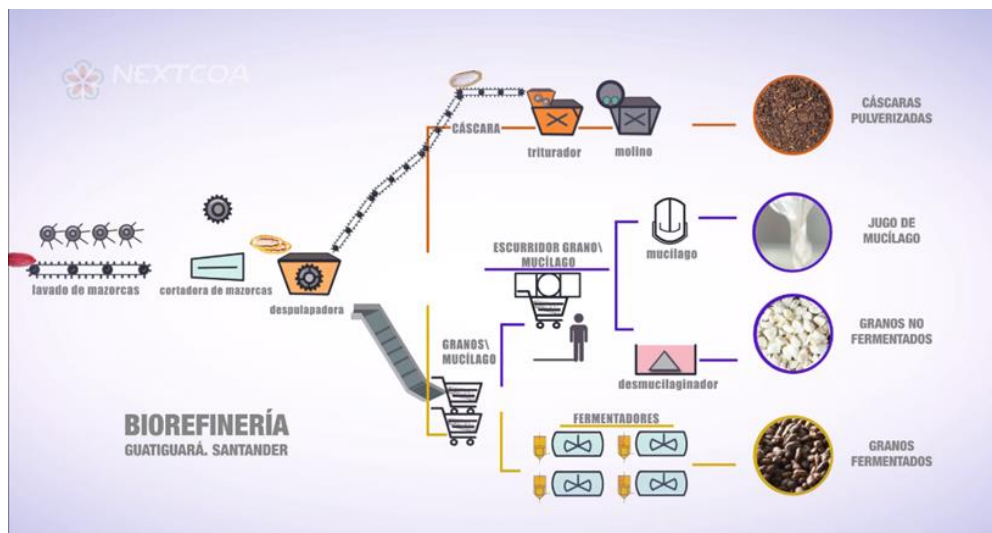
¹³ *Ibíd.*,p129-133.

Este proyecto se encuentra dentro de un macroproyecto llamado NEXTCOA, que actualmente trabaja en la Universidad Industrial de Santander, el cual se ha planteado utilizar el cacao Santandereano clase CCN-51, para la elaboración de diferentes productos con valor agregado y, además, el tratamiento de los residuos de este proceso.

Dentro de las etapas de procesamiento que se le realizan al cacao en Nextcoa están: recepción de las mazorcas, selección, lavado, corte y despulpado (ver figura 1). Después del despulpado, los granos pasan a los fermentadores y el jugo de mucílago es usado como sustrato en la producción de celulosa bacteriana.

La obtención de celulosa bacteriana conlleva una fermentación de 15 días. Pasado este tiempo se obtiene un residuo líquido (mucílago agotado) que conserva aún un alto contenido de azúcares y ácidos, como se evidencia en el análisis químico reportado en los resultados (tabla 9).

Figura 1. Procesamiento de cacao proyecto Nextcoa.



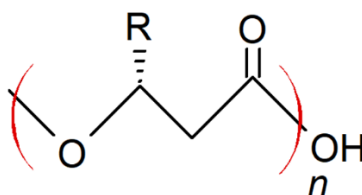
Por otra parte, los granos de cacao que se encuentran en los fermentadores continúan con su proceso del cual se va obteniendo diariamente un lixiviado de

mucílago que durante los primeros días de fermentación es rico en ácidos y azúcares (mucílago lixiviado), como lo muestra su caracterización (Ver Tabla 9).

2.2. Generalidades de los polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son biopolímeros producidos por diferentes microorganismos como reservas de carbono y energía¹⁴. Dependiendo la posición y la longitud de la cadena poseen propiedades termoplásticas y elastómeras para sustituir los polímeros sintéticos convencionales provenientes de la industria petroquímica¹⁵.

Figura 2. Estructura general de los polihidroxicanoatos.



n	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxipropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxibutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxibutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxivalerato)	P5HV

Fuente: LEE, Sang Yup & CHANG, Ho Nam. Production of poly-(hydroxyalkanoic acid). Taejón: Biochem En Biotechnol, 1995.p. 28.

¹⁴ CASTILLO ARTEAGA, R, et al. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by oxalotrophic bacteria from high Andean soil. Bogotá: *Universitas Scientiarum*, 2018.p.35-59.

¹⁵ CALERO, Rolando. Obtención de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de cultivos mixtos microbianos usando efluentes ricos en ácidos grasos volátiles como sustrato. La Libertad: *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 2015.

Entre sus ventajas encontramos que pueden ser modificados dependiendo los requerimientos específicos de la aplicación, no son tóxicos, son obtenidos de reservas renovables y son biodegradables¹⁶; por lo que han recibido una gran aceptación en campos como: medicina, agricultura y alimentos¹⁷. En la medicina se han usado en la fabricación de prótesis biocompatibles y para encapsular medicamentos de liberación controlada¹⁸. En la agricultura, los vemos en macetas biodegradables y tubos de irrigación¹⁹. También, se han desarrollado en la fabricación de películas delgadas de recubrimiento, cubierta de materiales fibrosos como papel o cartón, aunque su mayor aplicación ha sido la fabricación de envases y bolsas.

La producción de PHAs a gran escala está limitada por su inviabilidad económica, pues tradicionalmente para su biosíntesis se utilizan fuentes de carbono de alto costo. Por esta razón se han intensificado los estudios que buscan usar como sustrato residuos agroindustriales para producir los biopolímeros²⁰, como por ejemplo la melaza de caña de azúcar²¹, glicerol residuo de la industria de biodiesel²² y jarabe de dátil²³.

¹⁶ WU, Lin-Ping. Polyhydroxyalkanoates (phas) : Biosynthesis, Industrial Production and Applications in Medicine. New York: *Nova Science Publishers*, 2014. p.172-177.

¹⁷ MIZUNO, Kouhei, *et al.* Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. Yokohama: *Elsevier Ltd*, 2010. p.1335-1339.

¹⁸ dos SANTOS, Antonio, *et al.* From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. Joinville: *Ingeniería y Ciencia*, 2017. p. 269-298.

¹⁹ LEMOS DELGADO, Ana & CORDOBA, Alexis. Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. Cali: *Informador Técnico*, 2015. p.93-101.

²⁰ CHOI, Jongil & LEE, Sang Yup. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. (Springer-Verlag, Ed.). Yusong: *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1999. p.13.

²¹ GOUDA, Mona; SUELLAM, Azza & OMAR, Sanaa. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Alejandría: *Microbiological research*, 2001. p.201

²² CAVALHEIRO, Joao, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Lisboa: *Process Biochem. Vol 44*, 2009. p.509-515.

²³ OMAR, Sanaa, *et al.* Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Alejandría: *Biotechnology Letters*, 2001. p. 1119-1123.

Estos residuos permiten alcanzar rendimientos y productividades altas, similares a las obtenidas con fuentes de carbono convencionales como glucosa, sacarosa y fructosa²⁴.

2.3. Generalidades del Microorganismo.

Existen diferentes microorganismos con la capacidad de acumular PHAs en su interior.

Las bacterias Gramnegativas presentan un mejor crecimiento y una mayor acumulación de PHA (Ver tabla 3); sin embargo, los PHAs obtenidos contienen endotoxinas de lipopolisacárido de membrana externa (LPS) que inducen a una reacción inmunogénica en humanos, por lo que el biopolímero no podría ser utilizado en algunas industrias como la biomédica.

Por el contrario, las bacterias Grampositivas no contienen LPS dando como resultado un producto potencialmente mejor para todas las aplicaciones²⁵. Además, las bacterias grampositivas pueden sintetizar los polímeros a partir de fuentes de carbono abundantes y de bajo costo, como la glucosa, mientras que las bacterias Gramnegativas necesitan sustratos costosos como el ácido propiónico u otros ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono para producir unidades de 3HV²⁶.

²⁴ LUVIZETTO FACCIN, *et al.* Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. Porto Alegre: *Journal. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009.p.1756-1761.

²⁵ CHEN, Guo-Qiang & QIONG, Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Beijing: *Biomaterials*, 2005.p.6565-6578.

²⁶ MIZUNO, Kouhei, *et al.* Op.Cit.,p.1335-1339.

Tabla 3. Producción de PHA usando como sustrato residuos agroindustriales.

País	Fuente de carbono	Microorganismo/Tipo Gram	PHB [g/L]	%Y _{P/X}	q
España ²⁷	Residuos de aceite de oliva.	<i>Azotobacter chroococcum</i> /nativo de suelo (-)	0.74	31.0	0.01
Portugal ²⁸	GRIB	<i>Cupriavidus necátor</i> DSM 545 (-)	26.14	38.0	0.84
Alemania ²⁹	GRIB	<i>Zobellella denitrificans</i> /nativo de lodos (-)	2.72	73.5	0.03
Alemania ³⁰	GRIB	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 4058 (-)	24.00	48.0	0.48
Egipto ³¹	Melaza de caña	<i>Bacillus megaterium</i> /nativo de PTAR (+)	2.20	59.4	0.05
Egipto ³²	Jarabe de dátil	<i>Bacillus megaterium</i> /nativo de PTAR (+)	3.40	25.0	0.24
China ³³	Melaza de caña	<i>Bacillus sp.</i> /nativo de suelo (+)	24.50	35.0	0.82
+: microorganismo gram positivo		Y _{P/X} : rendimiento producto biomasa %			
-: microorganismo gram negativo		q: productividad volumétrica [g/(L*h)]			
GRIB: glicerol crudo residuo de la industria del biodiesel					

²⁷ CERRONE, Federico, *et al.* Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW, alpeorajo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. Granada: *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010.p.594-601.

²⁸ CAVALHEIRO, Joao, *et al.* Op. Cit.,p.510.

²⁹ Ibrahim, Mohammad & Steinbüchel, Alexander. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. Münster: *Journal of Appl. Microbiology*, 2009.p.214-225.

³⁰ Schnorpfeil, C; Ackermann, J & Mothes, Gisela. Production of PHB from crude glycerol. Leipzig: *Engineering in Life Sciences*, 2007.p.475-479.

³¹ GOUDA, Mona; SUELLAM, Azza & OMAR, Sanaa. Op. Cit.,p.201.

³² OMAR, Sanaa, *et al.* Op.Cit.,p.1119-1123

³³ WU, Qiong, *et al.* Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media. Beijin: *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001.p.111-118.

Entre el grupo bacteriano grampositivo sobre salen los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, siendo el *Bacillus* la más utilizada puesto que sus condiciones fermentativas son más simples y tiene un rápido crecimiento en sustratos económicos³⁴, el primer productor de PHA del género *Bacillus* y a su vez el más estudiado fue identificado como *Bacillus megaterium* en 1926³⁵.

Bacillus megaterium B2, es una cepa nativa aislada por el Centro de Estudios Ambientales (CEIAM) de la Universidad Industrial de Santander, que tiene la capacidad de producir polihidroxicanoatos³⁶. Es una bacteria aerobia estricta, gram positiva y de cuerpo cilíndrico que tiene la ventaja de crecer en sustratos económicos y tolerar temperaturas altas³⁷.

Los microorganismos nativos ofrecen variedad de rutas metabólicas, tienen la ventaja de disminuir el uso de antibióticos en comparación con los microorganismos genéticamente modificados y, además, poseen una mayor adaptación a condiciones de fermentación.

³⁴ VALAPPIL, Sabeel, *et al.* Polyhydroxyalkanoates in Gram-Grampositive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Wageningen: *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 2007.p.1-17.

³⁵ MIZUNO, Kouhei, *et al.* *Op.Cit.*,p.1335-1339.

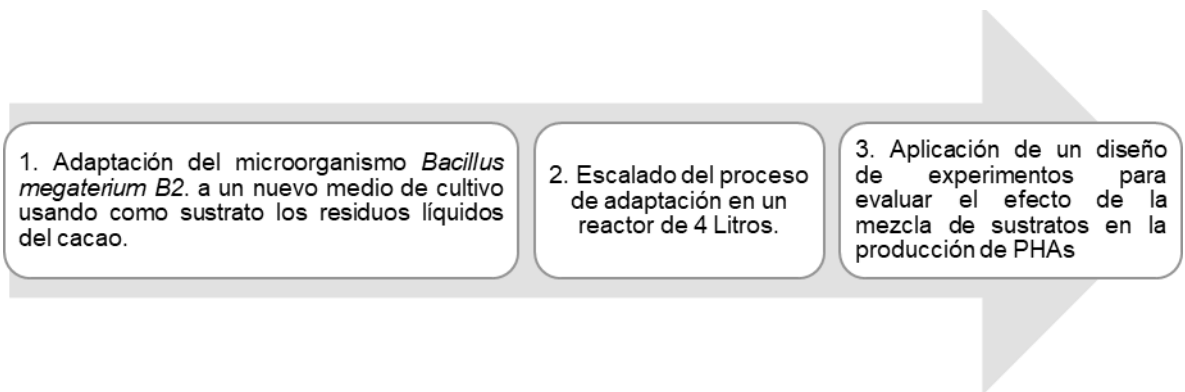
³⁶ MORENO, Paolo, *et al.* Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. Buacaramanga: *Elsevier*, 2015.p.682-689.

³⁷ LUVIZETTO FACCIN, Débora, *et al.* *Op. Cit.*,p.1758.

3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el objetivo propuesto en esta tesis, la metodología se dividió en tres etapas:

Figura 3. Etapas de la metodología.



La cepa *Bacillus megaterium* B2 aislada por el grupo de investigación CEIAM, es una cepa productora de PHAs, pero convencionalmente ha utilizado glicerol como sustrato, por tal motivo fue necesario realizar un proceso de adaptación de esta bacteria a las nuevas fuentes de carbono, mucílago de cacao lixiviado y mucílago de cacao agotado.

3.1. Adaptación del microorganismo.

3.1.1. Caracterización química de los residuos de cacao. Usando Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se hizo la caracterización química de los residuos de cacao usados como sustrato con el fin de identificar los azúcares y los ácidos presentes en ellos.

Se usó una columna de intercambio catiónico SUPERLCOGER C-610H, 30 cm x 7.8 mm ID. El método aplicado consiste en un sistema de detección de RID (índice de refracción) a una temperatura de columna de 35°C con las siguientes condiciones: fase móvil 0.4 mL/min de 0.1% de ácido fosfórico.³⁸

Para la caracterización cualitativa se prepararon 3 patrones de azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa a concentraciones de 20 g/L y para la cuantificación se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre con concentraciones desde 5 hasta 60 g/L de todos los azúcares.

3.1.2. Adaptación usando sustratos modelo. Al no tener un reporte previo del comportamiento del microorganismo en este tipo de medios de cultivo, el objetivo fue dividido en dos etapas: primero se trabajó con sustratos representativos para observar el comportamiento de la bacteria cuando se somete a medios con altos contenidos de azúcares y ácidos y seguido a esto se trabajó con los respectivos mucílagos.

Con la caracterización química previamente realizada a los residuos se eligieron los sustratos representativos; la glucosa, como sustrato modelo para azúcares y el ácido acético, como sustrato modelo para ácidos.

Para comprobar la adaptación positiva de la bacteria, se utilizó la técnica de recuento en placa (Figura 4).

³⁸ HAYENGA, Ingrid. Determination of Organic Acids in Wine and Fruit Juices with Ion Exclusion Chromatography. Analytix, (s.f.). Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/analytix/determination-of-organic.html>

Figura 4. Técnica de recuento en placa.



El procedimiento inició con la reactivación de un vial crio preservado de la cepa *Bacillus megaterium* B2, el cual se agregó a un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio nutritivo³⁹. Adicionalmente se agregó la fuente de carbono: a) glucosa: 10 g/L, b) ácido acético: 1.0 g/L.

Tabla 4. Composición del medio nutritivo.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN [g/L]
Peptona	15
Extracto de levadura	3
NaCl	6

Una vez agregado el vial, el medio inoculado se llevó a incubación por 24 horas a una temperatura de 34°C y agitación de 200 rpm⁴⁰, se realizó una toma de muestra cada hora para hacer el recuento. Las unidades formadoras de colonia fueron calculadas como se muestra en el anexo A.

³⁹ LIZCANO GONZALES, Victor. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A PARTIR DE GLICEROL. Tesis de Magister en ingeniería química. Bucaramanga: *Universidad Industrial de Santander*. Facultad de ingenierías Fisiquímicas. 2018.

⁴⁰ Moreno, Paolo, *et al.* Op.Cit.,p.688.

Recuento en placa: Se tomaron 100 μL de la muestra los cuales se diluyeron en 900 μL de solución peptonada al 0.1% en un tubo eppendorf. Posteriormente se tomaron 100 μL de esta primera dilución y se agregaron a un nuevo tubo eppendorf que contenía igualmente 900 μL de solución peptonada, con el fin de hacer diluciones seriales de la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo hasta completar ocho diluciones. Seguido, se tomaron 10 μL de cada dilución los cuales fueron inoculadas en una caja Petri con agar recuento, cuya composición se muestra en la tabla 5. Las fuentes de carbono en cada ensayo se encontraban en la misma concentración que en el medio líquido.

Tabla 5. Composición del medio sólido.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN g/L
Peptona	15
Extracto de levadura	3
NaCl	6
Agar	17

Una vez sembradas las diluciones en medio sólido se llevaron a incubación por 24 horas a una temperatura de 34°C, sin agitación, pasado este tiempo se procedió a realizar el conteo de las Unidades formadoras de Colonias (UFC) y la construcción de la curva de crecimiento microbiano para cada sustrato.

3.1.3 Adaptación con residuos de cacao como fuente de carbono. Ya obtenida una adaptación positiva con los sustratos modelo, se realizó el mismo procedimiento de adaptación para cada uno de los dos mucílagos residuales de cacao.

Tanto el medio de cultivo nutritivo líquido, como el medio sólido con agar recuento contaban con una concentración de 17% v/v del respectivo mucílago.

Cada ensayo se realizó por triplicado para comprobar la veracidad de los datos obtenidos. Un crecimiento positivo se interpretó como una adaptación positiva, además se obtuvo el tiempo de experimentación para cada uno de los ensayos

3.2. Escalado del proceso de adaptación en un reactor con un volumen de trabajo 4 Litros.

Una vez concluida la primera etapa y vista una adaptación positiva del microorganismo a los nuevos sustratos, se escaló el bioproceso a un reactor con un volumen de 4 Litros.

3.2.1. Crecimiento del microorganismo. Para evaluar el aumento de la biomasa se utilizó la técnica de peso seco. Primero se activó un vial de la cepa crio-preserved el cual se agregó a un Erlenmeyer con 50 mL del medio nutritivo descrito en la etapa 1, este pre-inóculo se llevó a incubación con una temperatura de 34°C y agitación de 200 rpm durante aproximadamente 6-10 horas, tiempo en el cual se asegura que la bacteria esté en su etapa de crecimiento exponencial (datos obtenido de las curvas de crecimiento en la primera etapa).

Posteriormente se tomaron 4 mL de este pre inóculo y se inocularon en un Erlenmeyer con 200 mL del medio básico mínimo requerido por la bacteria⁴¹ (Ver tablas 6 y 7⁴²) y se agregaron cada uno de los sustratos en las siguientes concentraciones: a) glucosa: 10 g/L, b) ácido acético: 1.0 g/L, c) mucílago lixiviado (ML) : 17% v/v, d) mucílago agotado (MA): 17% v/v.

⁴¹ Lizcano Gonzales, Victor. Op.Cit.

⁴² NARANJO, Javier, *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Manizales: Bioresource Technology*, 2013.p.38-44.

Tabla 6. Composición del medio básico mínimo requerido por *Bacillus megaterium* B2.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN [g/L]
Sulfato de amonio	1
Fosfato di ácido de potasio	1.5
Fosfato acido de sodio	3
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Elementos traza	0.1

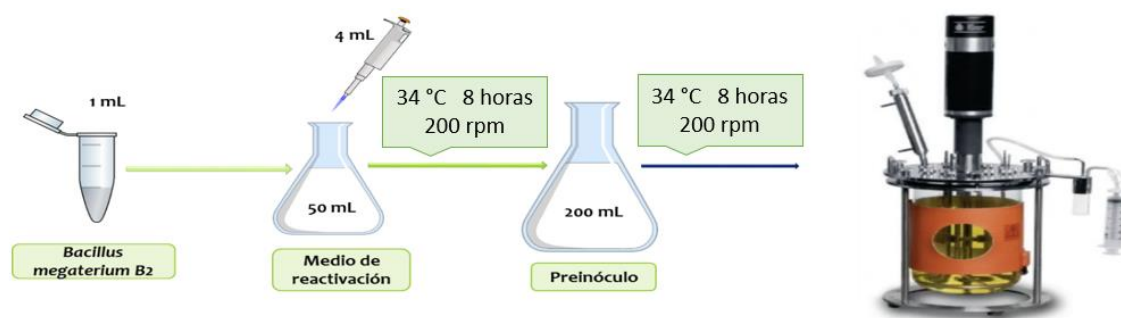
Tabla 7. Composición de los elementos traza.

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN [g/L]
FeSO ₄ 7H ₂ O	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2
H ₃ BO ₄	0.23
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	0.2
HCl	10

Finalmente, el inóculo se llevó a incubación durante el mismo tiempo y manteniendo las condiciones de temperatura y agitación establecidas.

Una vez transcurrido el tiempo, el inóculo se pasó al reactor con 4 litros de medio básico mínimo más sustrato, allí se controlaron las variables de temperatura, pH y flujo de aire, que se mantuvieron a 34°C, 7 y 1 L/min respectivamente, el proceso se esquematiza en la figura 5.

Figura 5. Proceso de escalado a un volumen de 4 Litros.



Se tomaron 30 mL de muestra en un tubo falcón previamente seco y pesado, cada 2 horas durante 24 horas. La muestra se llevó de manera inmediata a centrifugar durante 15 minutos, a 4°C y 7000 rpm para separar el pellet del sobrenadante.

El sobrenadante se conservó a 4°C para el posterior análisis de consumo de sustrato. Mientras que el pellet presente en el fondo de los tubos se llevó a etapa de secado, en un horno a 60°C durante 24 horas para retirar el contenido de agua. Pasado este tiempo se registró el peso. La masa del pellet seco es la diferencia de peso con respecto al tubo vacío.

3.2.2. Obtención de polihidroxialcanoatos. Al ser los PHAs productos intracelulares fue necesario aplicar un rompimiento de las células. Para esto al pellet ya seco y pesado, se le adicionaron 10 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.5% (p/v) y 20 mL de agua tipo I y se llevó a sonicación durante 15 minutos a 70°C. Luego, se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos, de manera que el PHA insoluble se logre recuperar. El sobrenadante fue desechado, y el PHA se lavó dos veces con agua desionizada y etanol en razón 4:1. Los tubos con PHA se llevaron a un horno para retirar la humedad, sometiéndose a una temperatura de 60°C por

24 horas. Posteriormente se pesó, la masa del PHA extraído será la diferencia de pesos con respecto al tubo vacío⁴³.

3.2.3. Consumo de sustrato. Usando la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se determinó la concentración de azúcares y ácidos a lo largo del bioproceso. Para el caso de los mucílagos se cuantificaron los azúcares totales, debido a que estos presentan cambios significativos en su concentración.

Las muestras fueron diluidas con una relación 1:2 en la fase móvil de ácido fosfórico al 0.1%. Se utilizó una columna en resina de intercambio catiónico SUPERLCOGER C-610H, 30 cm x 7.8 mm ID. Se siguió el mismo método aplicado en la caracterización de los residuos de cacao⁴⁴.

Para la cuantificación se usó la curva de calibración a partir de una solución madre con concentración de 60 g/L de todos los azúcares⁴⁵.

El proceso se realizó por triplicado para garantizar veracidad en los datos obtenidos.

3.3. Diseño de experimentos para evaluar el efecto de la mezcla de sustratos en la producción de PHAs.

Para evaluar la producción de PHAs a diferentes concentraciones de los sustratos se propuso un diseño de experimentos usando el método simplex con ayuda de la

⁴³ ARIKAWA, Hisashi, et al. Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Hyogo:Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017.p.250-254.

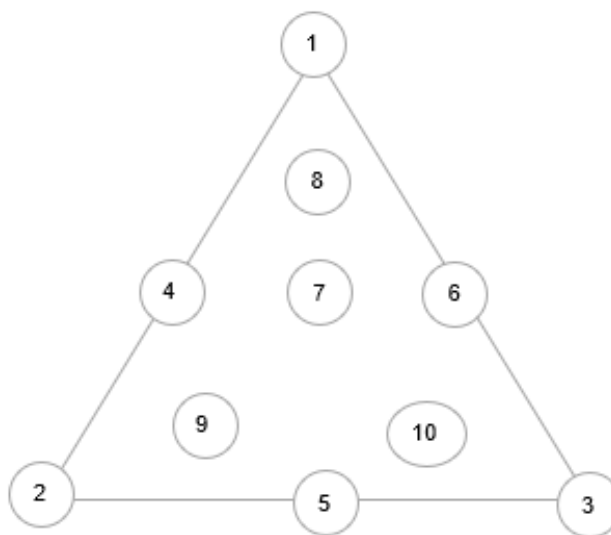
⁴⁴ HAYENGA, Ingrid. Determination of Organic Acids in Wine and Fruit Juices with Ion Exclusion Chromatography. *Analytix*, (s.f.). Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/analytix/determination-of-organic.html>

⁴⁵ COELHO, Emanuela, et al. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Petrolina: Journal of Food Composition and Analysis*, 2018.p.160-167.

herramienta estadística MINITAB⁴⁶, en el que se variaban las proporciones de mezcla.

El método plantea un sistema triangular en dónde cada extremo representa una mezcla pura para cada componente, en este caso uno de los tres medios: medio básico de sales (MB), mucílago agotado (MA) y mucílago lixiviado (ML). Además, tres combinaciones binarias, tres combinaciones completas, en dónde los tres componentes están presentes y un punto central en dónde se incluyen proporciones iguales de cada componente. Como se muestra en la tabla 8, las concentraciones están en %(v/v). Y las variables de respuesta fueron los rendimientos producto en sustrato y productividades.

Figura 6. Triángulo de proporciones de mezcla.



⁴⁶ Software, MINITAB 17 Statistical. [Software de ordenador]. State College, PA: Minitab, Inc.2010. Obtenido de www.minitab.com

Para cada ensayo se siguieron los mismos protocolos utilizados en la segunda etapa: peso seco para la determinación de biomasa, SDS-sonicación para la extracción de PHA y HPLC para la cuantificación de consumo de sustrato. Cada ensayo se realizó por triplicado para veracidad de los datos obtenidos.

Tabla 8. Proporciones de mezcla en porcentaje v/v.

Montaje	MB	MA	ML
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	0	50	50
6	50	0	50
7	33	33	33
8	66	17	17
9	17	66	17
10	17	17	66

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Adaptación de *Bacillus megaterium* B2.

4.1.1. Caracterización química de los residuos del cacao. En la tabla 9 se pueden observar los resultados para la caracterización química de los residuos de cacao usados como sustrato.

Tabla 9. Resultados del análisis químico del mucílago agotado y el mucílago lixiviado.

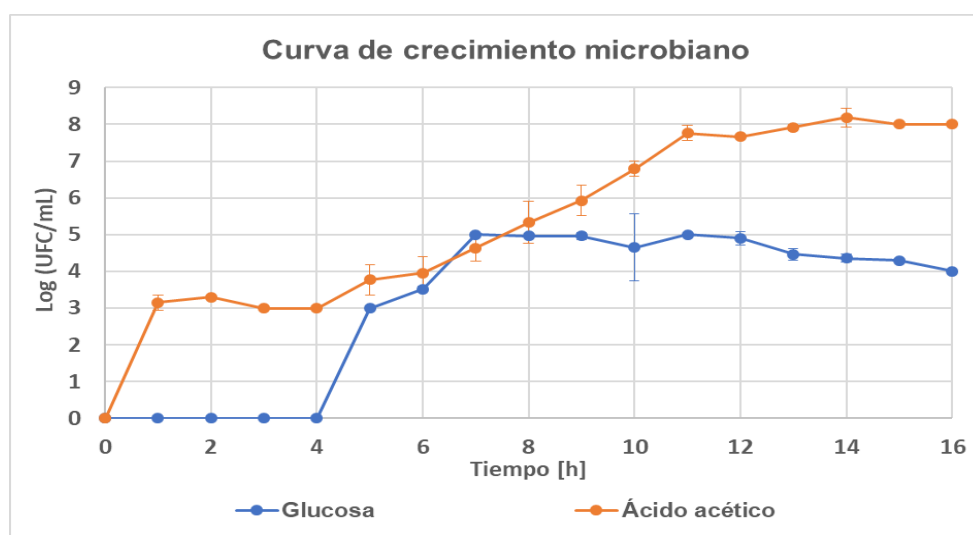
	Mucílago Agotado [g/L]		Mucílago Lixiviado [g/L]	
Glucosa	25.22	± 0.24	35.38	± 0.09
Fructosa	32.97	± 1.12	46.46	± 0.19
Sacarosa	9.96	± 0.02	4.6	± 0.06
Ácido Cítrico	3.81	± 0.03	-	-
Ácido Láctico	-	-	6.21	± 0.04
Ácido Acético	5.13	± 0.96	3.69	± 0.18

En cuanto a la concentración de azúcares, la fructosa fue el hidrato de carbono predominante tanto en el mucílago agotado como en el mucílago lixiviado; seguido de la glucosa y en menor proporción la sacarosa.

En cuanto a la concentración de ácidos, el ácido acético fue predominante ya que lo encontramos en ambos mucílagos; seguido del ácido láctico el cual se encontró únicamente en el mucílago lixiviado, por su parte, el ácido cítrico se encontró únicamente en el mucilago agotado.

4.1.2. Crecimiento microbiano con sustratos representativos. En la figura 7 se muestra el crecimiento del microorganismo en los sustratos modelo (glucosa y ácido acético). Se observan las etapas de adaptación, crecimiento y estacionaria, por lo que se puede inferir que la bacteria posee la capacidad de crecer adaptando su maquinaria metabólica para degradar tanto ácidos como azúcares.

Figura 7. Curva de crecimiento microbiano en sustratos representativos.



Es de resaltar un mayor crecimiento en el medio con ácido acético como fuente de Carbono, cuyo punto máximo se obtiene a la hora 14 con un total de 8×10^8 UFC/mL. En este medio también se observa una etapa exponencial que va de la hora 4 hasta la hora 14.

Por otro lado, la curva obtenida usando glucosa como sustrato, presenta un máximo de crecimiento a la hora 7, con un recuento en placa total de 1.4×10^5 UFC/mL.

Una vez se comprueba la adaptación positiva del microorganismo a los sustratos modelo se procede a revisar su crecimiento en los medios con los residuos de cacao.

4.1.3. Crecimiento microbiano con mucílagos de cacao como fuente de carbono. En la figura 8 se representa el crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 usando mucílago lixiviado y mucílago agotado de cacao como fuente de carbono. Se observa que con el mucílago agotado hay un crecimiento ligeramente mayor, obteniéndose un punto máximo a la hora 12 con un número de UFC por mililitro de $6 * 10^7$. Para el caso del mucílago *lixiviado* el máximo se encontró a la hora 14 con $4.7 * 10^7$ UFC/mL. Los datos se resumen en la tabla 10.

Figura 8. Curva de crecimiento microbiano con residuos de cacao como fuente de carbono.

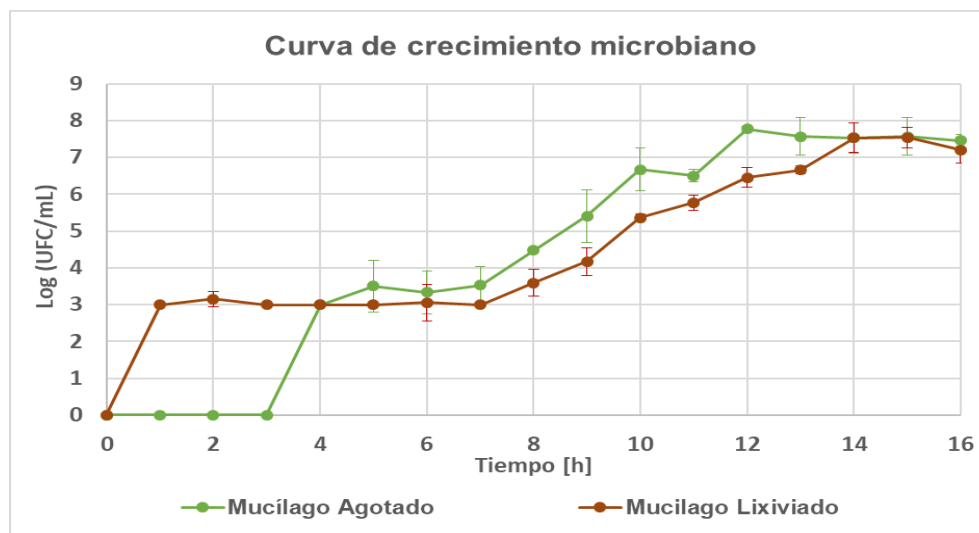


Tabla 10. Número máximo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro obtenidas con cada sustrato.

Medio	UFC/mL
Glucosa	$1.4 * 10^5$
Ácido acético	$8 * 10^8$
Mucílago Agotado	$6 * 10^7$
Mucílago Lixiviado	$4.7 * 10^7$

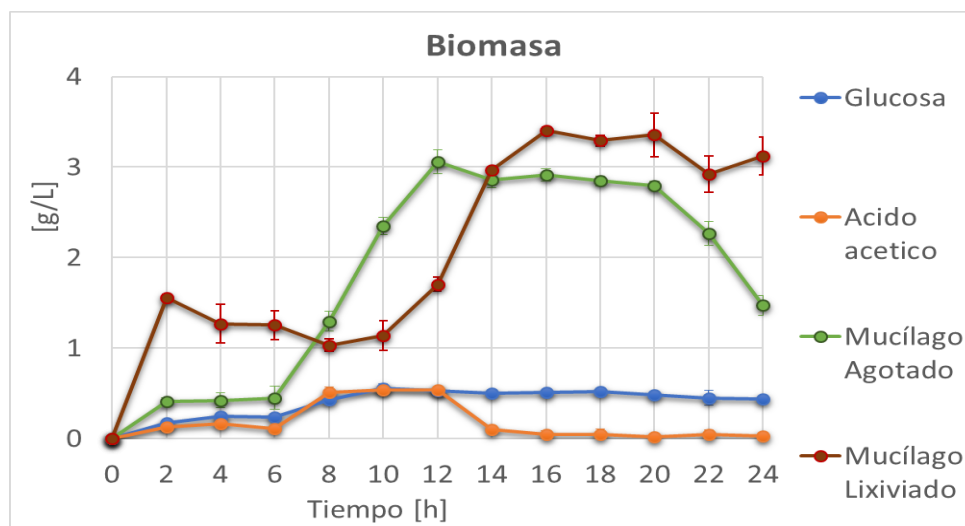
Con base en lo anterior se puede decir, que *Bacillus megaterium* B2 tiene la habilidad de crecer utilizando los residuos líquidos de cacao, ya que es capaz de metabolizar tanto los azúcares como los ácidos presentes en estos medios. Dando como resultado una adaptación positiva.

En cada uno de los medios se eligió un tiempo de incubación para el proceso de adaptación el cuál será de 8 horas, ya que en este punto la bacteria se encuentra en un intermedio de su etapa exponencial, a excepción del medio con glucosa para el cual el tiempo de parada fue de 6 horas.

4.2. Escalado del proceso de adaptación de *Bacillus megaterium* B2 en un volumen de trabajo de 4 litros.

4.2.1. Evolución de la biomasa a través del tiempo. En la etapa anterior se comprobó la adaptación positiva del microorganismo cuando este se encontraba en un medio nutritivo. Pero, como se observa en la figura 9 al someterlo estrictamente a un medio de sales con cada uno de los sustratos el comportamiento de la biomasa varió.

Figura 9. Evolución de la biomasa a través del tiempo.



Se evidenció que bajo este régimen de alimentación el crecimiento es mayor en los mucílagos comparado a los medios convencionales. Lo que sugiere que hay nutrientes en ellos que suplen la función de la peptona y el extracto de levadura, desarrollando un mejor crecimiento.

4.2.2. Evolución del producto a través del tiempo. Es importante identificar que el microorganismo genera el PHA como un metabolito primario, ya que la producción del biopolímero está asociada al crecimiento microbiano como se evidencia en las gráficas 9 y 10. Por lo tanto, la producción del biopolímero es igualmente mayor cuando la bacteria es puesta en medios con mucílago como fuente de carbono.

La acumulación de polihidroxicanoatos dentro de las células fue mejor en los medios con mucílagos; alcanzando valores de 72% para el mucílago agotado y de 63% para el mucílago lixiviado. Por otra parte, en el medio con ácido acético la acumulación fue sólo del 4% y con glucosa fue de 30% (Ver tabla 11)

Figura 10. Evolución del producto a través del tiempo.

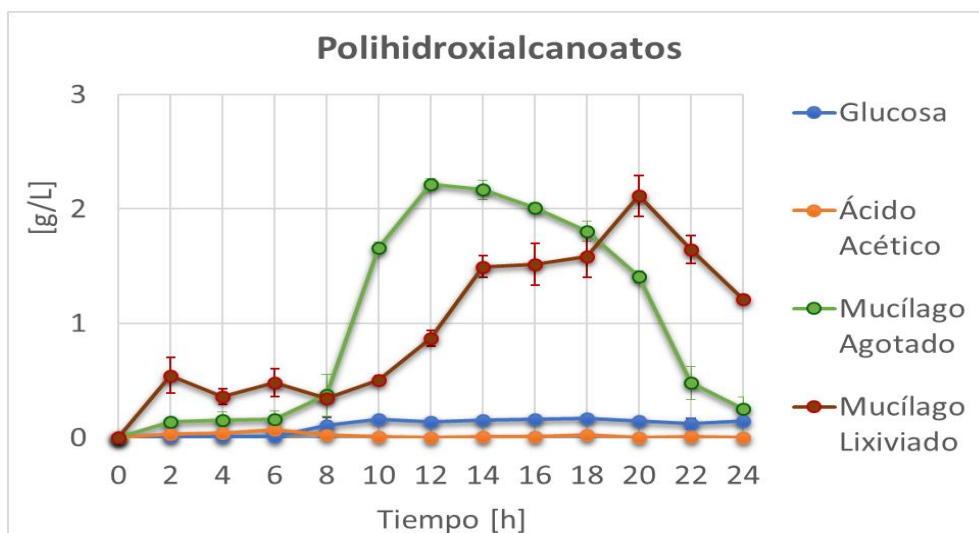


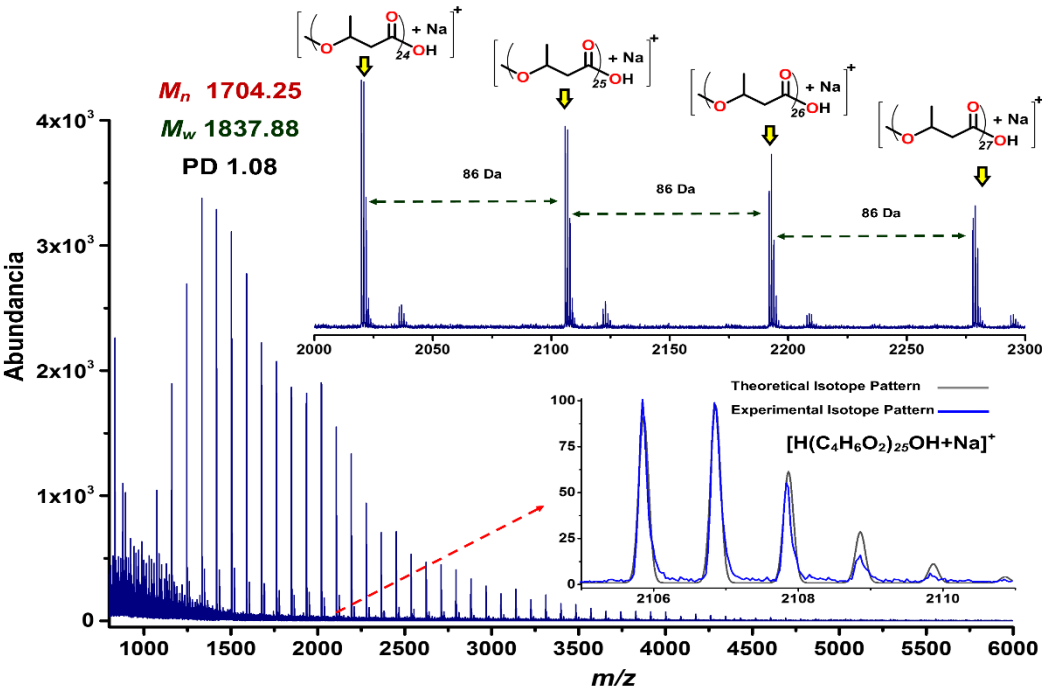
Tabla 11. Rendimiento producto en biomasa en el punto máximo de producción de PHA y máxima velocidad de crecimiento específica.

Fuente de carbono	$Y_{p/x}$	μ máx. [h^{-1}]
Glucosa	0.3	0.16
Ácido acético	0.04	0.11
Mucílago Agotado	0.72	0.65
Mucílago Lixiviado	0.63	0.18

Se hallaron las velocidades específicas de crecimiento experimentales hora a hora mediante el balance de biomasa en el reactor como se expone en el anexo B y en la tabla 11 se reportan los valores máximos obtenidos para cada sustrato.

Para comprobar que el bioproducto obtenido realmente correspondía a un polihidroxialcanoato, se realizó un análisis de espectrometría de masas.

Figura 11. Espectro de masas en modo reflectrón.



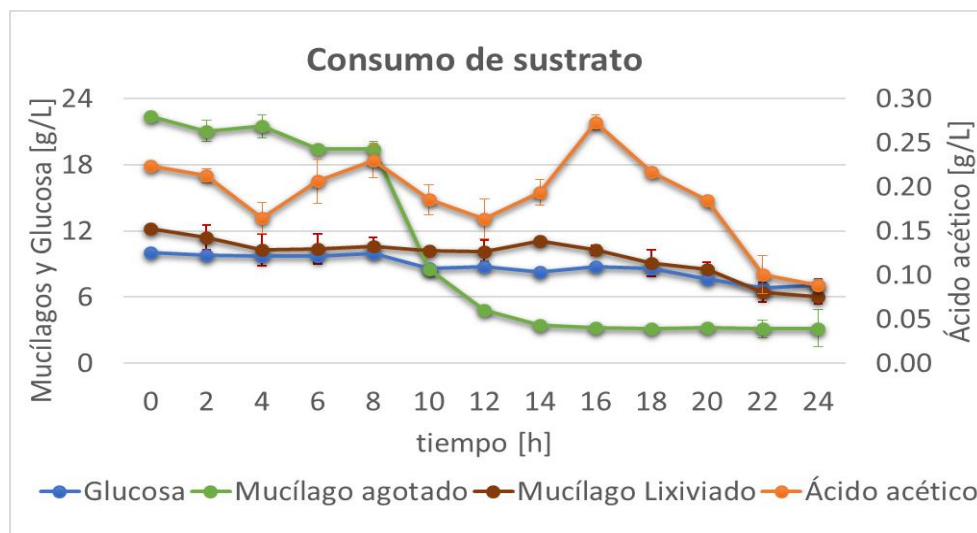
Del análisis por MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz) que se muestra en la figura 11, se determinó que el bioproducto si era un biopolímero perteneciente al grupo de los polihidroxicanoatos y específicamente por la diferencia de masa de 86 Dalton se concluye que es polihidroxibutirato (PHB), en la figura 11 se evidencia el espectro de masas en modo reflectrón. En el anexo C se encuentra el espectro de masas en modo lineal.

4.2.3. Evolución del sustrato a través del tiempo. Se monitoreó a lo largo del ensayo la concentración tanto de azúcares como de ácidos presentes en los dos mucílagos, estos se muestran en la caracterización en la tabla 9 (ácido cítrico, ácido Láctico y ácido acético).

En el caso del medio con ácido acético se identificó que el metabolismo de la bacteria no sólo tiene la capacidad de degradar este ácido sino también de producirlo, como se observa en la fluctuación de la figura 12.

Se evidenció que, a excepción del ácido acético, los demás ácidos presentes en los mucílagos no se consumieron, por tal razón para medir el consumo de sustrato en estos medios se cuantificaron únicamente los azúcares totales (glucosa, sacarosa y fructosa) en ellos.

Figura 12. Consumo de sustrato a través del tiempo.



4.3. Diseño de experimentos.

Los resultados obtenidos para los ensayos propuestos en el diseño de experimentos (ver tabla 8) se presentan en la figura 13. Se puede inferir que *Bacillus megaterium* B2 se adaptó metabólicamente a las mezclas de sustratos 4, 6, 7, 8, 9 y 10, ya que se evidenció crecimiento 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 mucílago y de medio de sales, no se obtuvo crecimiento. Lo anterior ocurre posiblemente por la carencia de un nutriente esencial para la bacteria.

La mezcla 5 que correspondía al ensayo con 50% de cada uno de los mucílago y no contenía medio de sales, 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.

Para los ensayos en los que se obtuvo una adaptación positiva a la mezcla de sustrato evaluada 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), estos resultados se presentan en la tabla 11.

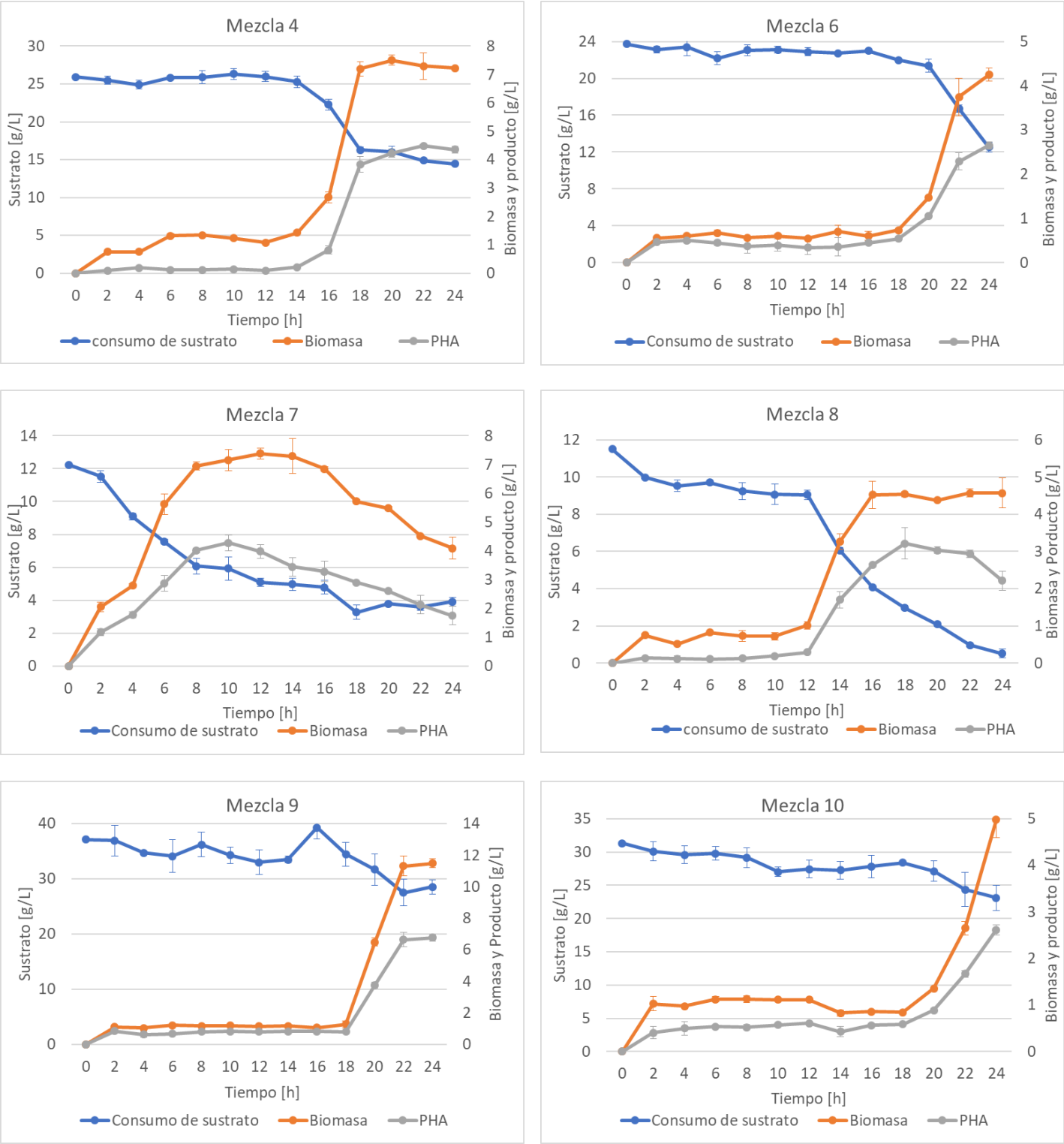
Tabla 12. Rendimientos y productividades de los ensayos del diseño de experimentos

Mezcla	$Y_{p/s}$ [g/g]	$Y_{p/x}$ [g/g]	q_p [g/L*h]
4	0.43	0.61	0.21
6	0.44	0.61	0.05
7	0.63	0.58	0.50
8	0.38	0.71	0.18
9	0.97	0.58	0.19
10	0.32	0.53	0.11

El mayor rendimiento producto sustrato se obtuvo en la mezcla 9 (tabla 12), la cual estaba compuesta por un 66% de mucílago agotado y un 17% tanto de mucílago lixiviado como de medio de sales con un valor de 0.97 [g/g]. Por su parte, el menor rendimiento fue aproximadamente la tercera parte del mayor y correspondió a la mezcla 10, cuyas proporciones son iguales a la mezcla 9, pero el mucílago lixiviado es quién se encuentra en mayor concentración. Lo que sugiere que la producción de polihidroxialcanoatos aumenta cuando la bacteria está en un medio con mucílago agotado, esto también se evidencia al comparar las mezclas 4 y 6.

La mayor productividad volumétrica de producto fue de 0.50 [g/L*h] y se obtuvo en la mezcla 7 la cual está compuesta por porcentajes iguales de cada medio (33.33%). Mientras que la menor fue de 0.05 y se obtuvo en la mezcla 6, que es una mezcla binaria en igual porcentaje de mucílago lixiviado y medio básico.

Figura 13. Cinética de consumo de sustrato y producción de biomasa y PHA para los ensayos del diseño de experimentos.



La acumulación de biopolímero dentro de las células fue muy similar en todas las mezclas, por lo que no se sugiere que los mucílagos presenten influencia en este parámetro. Sólo se obtuvo un aumento significativo de rendimiento producto en biomasa en la mezcla 8 en la cual el medio básico se encontraba en mayor concentración (66%).

Los datos de rendimiento producto en sustrato y productividad se llevaron al software Minitab para realizar el análisis del diseño experimental, las gráficas de contorno se muestran en las figuras 14 y 15.

Para las dos gráficas de contorno se evidencia el aumento del parámetro analizado hacia el lado izquierdo que representa una mezcla binaria entre el medio básico requerido por *Bacillus megaterium* B2 y mucílago agotado. Los valores más bajos como era de esperarse se encuentran en las esquinas del triángulo en dónde se representan los sustratos puros.

Figura 14. Gráfica de contorno de mezcla para productividad.

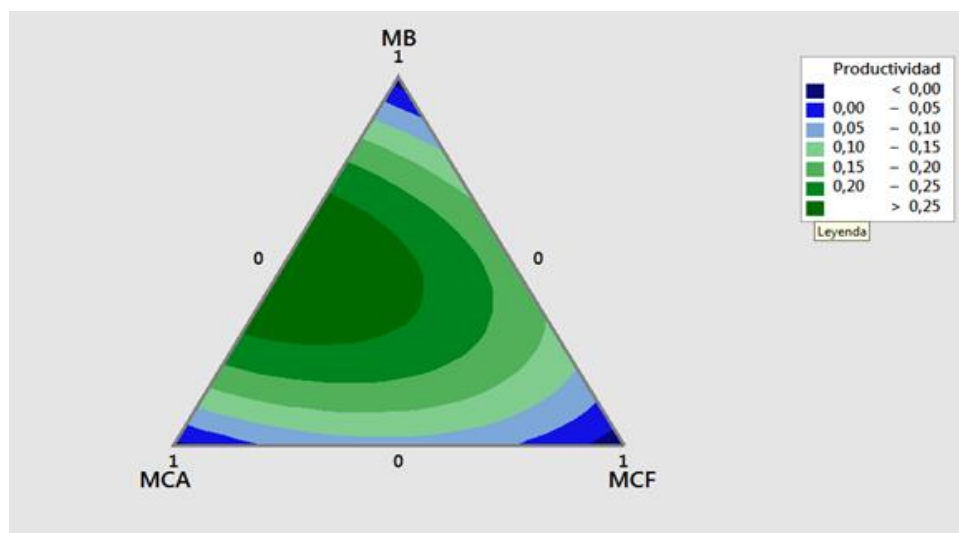
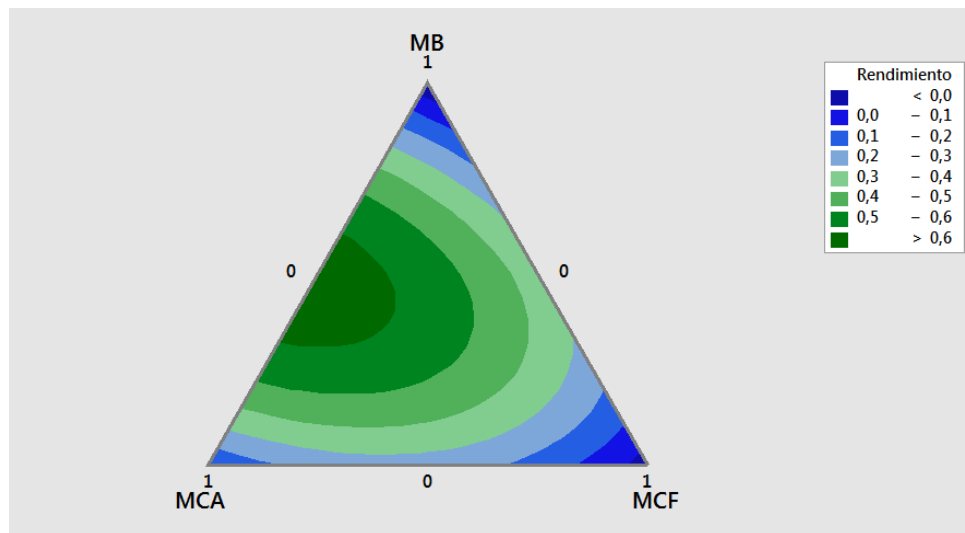
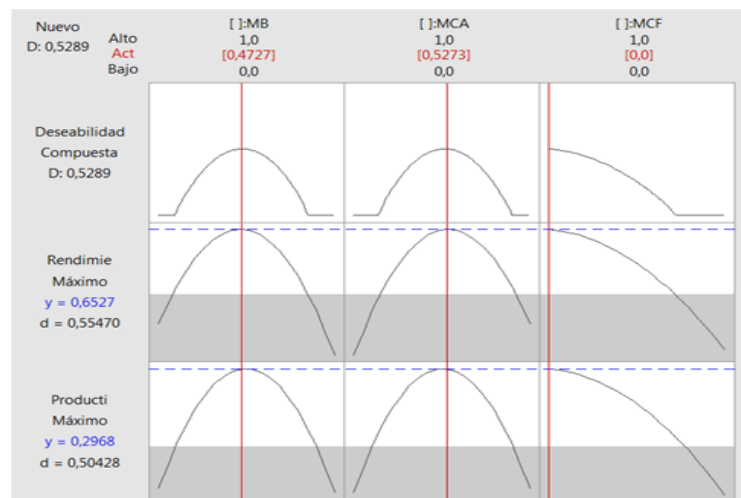


Figura 15. Gráfica de contorno de mezcla para rendimiento.



Los resultados obtenidos para la optimización se presentan en la figura 16.

Figura 16. Optimización del diseño de experimentos para los porcentajes de mezcla.



Como se evidencia en la figura 16 el software sugiere como ensayo de optimización una mezcla compuesta por 47% medio básico de sales y 53% mucílago agotado. Esto se debe a que como muestran las gráficas de contorno, al analizar la influencia

de cada uno de los medios sobre el rendimiento y la productividad fue notoria una mejor adaptación en el mucílago agotado cuando este se suplementa con los micronutrientes del medio básico en comparación con el mucílago lixiviado. La cinética de este ensayo de optimización se presenta en la figura 17.

Figura 17. Cinética del ensayo de optimización.

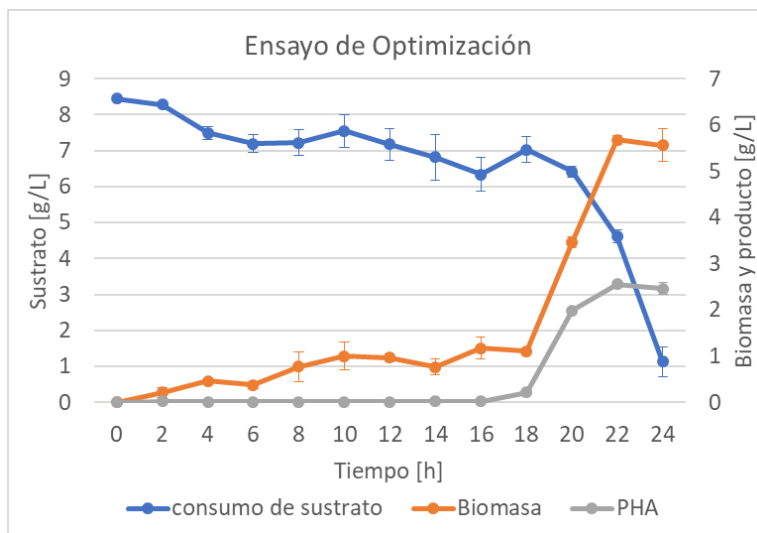


Tabla 13. Rendimientos y productividad para el ensayo de optimización.

Mezcla	Y p/s [g/g]	q_p [g/L*h]	Y p/x [g/g]	μ máx [h ⁻¹]
Ensayo optimizado	0.98	0.1	0.57	0.43

En la tabla 13 se puede observar que para este ensayo aumentó el rendimiento producto en sustrato con respecto a los resultados de las mezclas iniciales. Para el caso de la productividad volumétrica esta se mantuvo dentro del rango obtenido en las mezclas, con un valor de 0.1 [g/L*h] al igual que el porcentaje de acumulación que fue de 57%.

Bacillus megaterium B2, mejoró su cinética de crecimiento y producción de polihidroxialcanoatos, cuando se usó como fuente de carbono residuos líquidos de cacao, comparado con los resultados obtenidos en el proyecto anteriormente realizado por el grupo de investigación donde se utilizó la misma cepa, pero como fuente de carbono se usó glicerol crudo. Lo anterior, teniendo en cuenta que todos los parámetros cinéticos aumentaron significativamente como se observa en la tabla 14. La concentración de biomasa aumentó cuatro veces en comparación al proceso con glicerol, por su parte, el rendimiento producto en sustrato fue nueve veces mayor, la productividad aumentó en un 33% y el porcentaje de acumulación fue 1.5 veces mayor.

Tabla 14. Comparación de parámetros cinéticos alcanzados en cultivos de *Bacillus megaterium* B2.

Fuente de carbono	Máxima concentración de biomasa [g/L]	Y p/s [g/g]	Y p/x [g/g]	Q [g/L*h]
Glicerol ⁴⁷	1.4	0.11	0.39	0.03
Residuos de cacao	5.7	0.98	0.57	0.1

Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo con los reportados para otras fuentes de carbono de residuos agroindustriales (Glicerol⁴⁸, Melaza de caña⁴⁹ y jarabe de dátil⁵⁰) en un gráfico de barras (ver figura 18), se puede deducir que, aunque se pueden mejorar parámetros como porcentaje de acumulación y productividad, se tienen resultados prometedores.

⁴⁷ LIZCANO GONZALES, victor. Op.Cit.

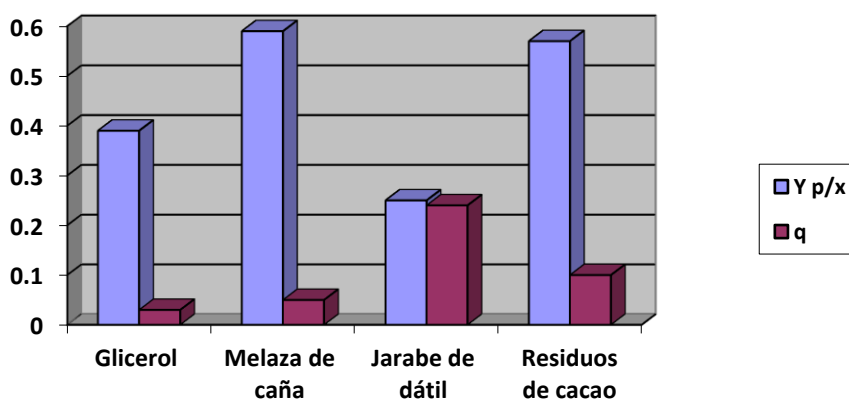
⁴⁸ Ibíd.

⁴⁹ GOUDA, Mona; SUELLAM , Azza & OMAR, Sanaa. Op.Cit.,p.201.

⁵⁰ OMAR, Sanaa, et al. Op.Cit.,p.1119-1123.

En el caso de el porcentaje de acumulación fue superado únicamente en un 2% por la melaza de caña que alcanzó un máximo de 59% y en el caso de la productividad volumétrica de producto sólo fue superada por el jarabe de dátil.

Figura 18. Comparación de parámetros cinéticos con otras fuentes de Carbono.



No se encontraron resultados o estudios similares usando como sustrato residuos de cacao para la producción de polihidroxialcanoatos lo que hace que los resultados obtenidos en este trabajo sean un buen punto de partida para posteriores investigaciones.

5. CONCLUSIONES

Se identificó que *Bacillus megaterium* B2 puede metabolizar sustratos tanto ácidos como azúcares y a partir de estos producir y acumular polihidroxialcanoatos como reserva de energía.

Se demostró que *Bacillus megaterium* B2 adaptó su maquinaria metabólica para degradar los nutrientes presentes en los residuos líquidos del cacao (mucílago lixiviado y mucílago agotado) usados como sustrato. Lo anterior teniendo en cuenta que el microorganismo aumentó su biomasa y fue capaz de sintetizar polihidroxialcanoatos a partir de estos. Además, se evidenció que el producto se genera como un metabolito primario.

La producción de polihidroxialcanoatos se ve favorecida en un medio el cual contenga una mezcla binaria de 53% mucílago agotado y 47% micronutrientes. Obteniéndose un valor máximo de rendimiento producto en sustrato de 0.98 [g/g] y un porcentaje de acumulación de 57%. Así mismo se comprobó que *Bacillus megaterium* B2, no tiene la capacidad de desarrollarse en ausencia de micronutrientes en el medio de cultivo, por tanto, es indispensable adicionarlos a la formulación del mismo.

6. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar ensayos cambiando el régimen de alimentación del biorreactor con el fin de buscar mejorar parámetros como la productividad volumétrica del producto y la acumulación de producto.

Para posteriores trabajos se recomienda aumentar el tiempo de adaptación en el pre-inóculo, para disminuir la fase de latencia en el reactor.

BIBLIOGRAFÍA

ANVOH, Koutoua; ZORO BI, Arsène & GNAKRI, Dago. Production and Characterization of Juice from Mucilage of cocoa Beans and its transformation into marmalade. Faisalabad: *Pakistan Journal*, 2009.p. 129-133.

ARIKAWA, Hisashi; SATO, Shunsuke; FUJIKI, tetsuya & MATSUMOTO, Keiji. Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. Hyogo:*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017.p.250-254.

ARTEAGA ESTRELLA, Yadira. Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjar (provincia del Guayas). Portoviejo: *ECA Sinergia*,2013.p. 51-52.

CADENA CALA, Tatiana & HERRERA ARDILA, Yenny. Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, 2008.

CALERO, Rolando. Obtención de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de cultivos mixtos microbianos usando efluentes ricos en ácidos grasos volátiles como sustrato.La Libertad: *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 2015.

CASTILLO ARTEAGA, R; BURBANO ROSERO, Judith; OTERO RAMÍREZ, Ivan Darío; RONCALLO, Juan; HIDALGO BONILLA, Sandra & FERNÁNDEZ IZQUIERDO, Pablo. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by oxalotrophic bacteria from high Andean soil. Bogotá: *Universitas Scientiarum*,2018.p.35-59.

CAVALHEIRO, Joao; da ALMEIDA, Catarina; GRANDFILS, Christian & da FONSECA, Manuela. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Lisboa: *Process Biochem. Vol 44*,2009.p.509-515.

CERRONE, Federico; SANCHEZ PEINADO, Maria; JUAREZ JIMENEZ, Belen; GONZALES, Jesús & POZO, Clementina. Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW,alpeorujo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. Granada: *J. Microbiol. Biotechnol*, 2010.p.594-601.

CHEN, Guo-Qiang & QIONG, Wu.The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Beijing: *Biomaterials*, 2005.p.6565-6578.

CHOI, Jongil & LEE, Sang Yup. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. (Springer-Verlag, Ed.). Yusong: *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1999.p.13-21.

COELHO, Emanuela; da SILVA, Carla; MISKINIS, Gabriela; da SÁ, Antonio; PEREIRA, Giuliano; de AZEVEDO, Luciana & dos SANTOS, Marcos. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. Petrolina: *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018.p.160-167.

dos SANTOS, Antonio; DALLA VALENTINA, Luiz; DUARTE TOMAZ, Marcia & SCHULZ HIDALGO, Andrey. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. Joinville: *Ingeniería y Ciencia*, 2017.p. 269-298.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS. *Producción Nacional de cacao*. Bucaramanga, 2018.

GONZALES MUÑOZ, Yuniesky; PEREZ , Elevina & PALOMINO, Carolina. Factores Que Inciden En La Calidad Sensorial Del Chocolate.Caracas: *Actualización en Nutrición*, vol 13, 2012.p.314-331.

GONZALEZ ORTIZ, Carolina & JAIMES JAIMES, Marilyn. DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE JUGO DERIVADO DEL MUCILAGO DE CACAO. Tesis de Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, 2005.

GOUDA, Mona; SUELLAM, Azza & OMAR, Sanaa. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Alejandría: *Microbiological research*, 2001.p.201.

HAYENGA, Ingrid. Determination of Organic Acids in Wine and Fruit Juices with Ion Exclusion Chromatography. Analytix, (s.f.). Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/analytix/determination-of-organic.html>

IBRAHIM, Mohammad & STEINBÜCHEL, Alexander. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. Münster: *Journal of Appl. Microbiology*, 2009.p.214-225.

LEMOS DELGADO, Ana & CORDOBA, Alexis. Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. Cali: *Informador Técnico*, 2015.p.93-101.

LIZCANO GONZALES, Victor. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Bacillus megaterium* B2 A PARTIR DE GLICEROL. Tesis de Magister en ingeniería química. Bucaramanga: *Universidad Industrial de Santander*. Facultad de ingenierías Fisiquímicas. 2018.

LUCUMBERRI, Elena; MATEOS, Raquel; RAMOS, Sofia; ALÍA, Mario; GOYA, Luis; IZQUIERDO PULIDO, Maria & BRAVO, Laura. Characterization of cocoa fiber and its effect on the antioxidant capacity of serum in rats. Barcelona: *Nutrición Hospitalaria*, 2006.p.622.

LUVIZETTO FACCIN, Débora; MARTINS, Ivana; MEDEIROS CARDOZO, Nilo Sergio; RECH, Rosane; ZÁCHIA, Marco Antonio; MOITINHO ALVES, Tito Livio & SECCHI, Argimiro. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. Porto Alegre: *Journal. Chem. Technol. Biotechnol*, 2009.p.1756-1761.

MIZUNO, Kouhei; OHTA, Aya; HYAKUTAKE, Manami; ICHINOMIYA, YOUSUKE & TSUGE, Tsuge. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. Yokohama: *Elsevier Ltd*, 2010.p.1335-1339.

MORENO, Paolo; YAÑEZ, Camilo; CARDOZO, Nilo Sergio; ESCALANTE, Humberto; COMBARIZA, Marianny & GUZMAN, Carolina. 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. Bucaramanga: *Elsevier*, 2015.p.682-689.

NARANJO, Javier; POSADA, John; HIGUITA, Juan & CARDONA, Carlos. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. Manizales: *Bioresourse Technology*, 2013.p.38-44.

OMAR, Sanaa; RAYES, Ammar; EQAAB, A; VOSS, Ingo & STEINBÜCHEL, Alexander. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Alejandría: *Biotechnology Letters*, 2001.p. 1119-1123.

SCHNORPFEIL, C; ACKERMANN, J & MOTHES, Gisela. Production of PHB from crude glycerol. Leipzig: *Engineering in Life Sciences*, 2007.p.475-479.

SERRANO GÓMEZ, CAROLINA. Cacao Santander: Comunicación de identidad regional del departamento de Santander a través de productos derivados del cacao Santandereano. Bogotá: Universidad Pontificia Javeriana. 2009.

Software, MINITAB 17 STATISTICAL. [Software de ordenador]. State College, PA: Minitab, Inc.2010. Obtenido de www.minitab.com

SUAREZ HERNANDEZ, Elkin & MALDONADO GARCIA, Yarin. AREQUIPE CON MUCILAGO DE CACAO EN EL MUNICIPIO DEL CARMEN DE CHUCURI - SANTANDER. Bucaramanga: *Universidad Industrial de Santander*. Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. 2011.

VALAPPIL, Sabeel; BOCCACCINI, Aldo; BUCKE, Christopher & ROY, Ipsita. Polyhydroxyalkanoates in Gram-Grampositive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Wageningen: *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 2007.p.1-17.

VALLEJO TORRES, Christian; DÍAZ OCAMPO, Raúl; MORALES RODRÍGUEZ, Wiston; SORIA VELASCO, Román; VERA CHANG, Jaime & BAREN CEDEÑO, Carlos. (2016). UTILIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO, TIPO NACIONAL Y TRINITARIO, EN LA OBTENCIÓN DE JALEA. Portoviejo: (E. S. López, Ed.) *Espamciencia*, 7(1),2017.p. 51-58.

WU, Lin-Ping. Polyhydroxyalkanoates (phas) : Biosynthesis, Industrial Production and Applications in Medicine.New York: *Nova Science Publishers*, 2014.p.172-177.

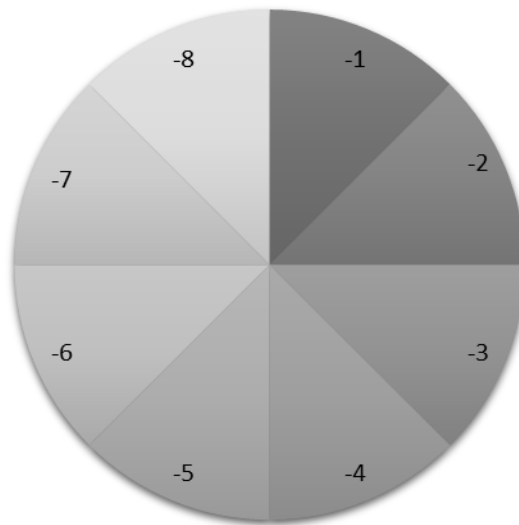
WU, Qiong; HUANG, Honghua; HU, Guohong; CHEN, Jinchun; HO, KP & CHEN, Guo-Qiang. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. Beijin: *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001.p.111-118.

ANEXOS

Anexo A. Cálculo de Unidades formadoras de colonia por mililitro.

Tomar 10 µL de cada dilución y depositarlo en la sección del agar recuento que corresponda según el orden de las diluciones. Iniciar de la dilución con menor concentración. Sembrar por triplicado.

Figura 19. División de la caja Petri con agar recuento.



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

UFC: Unidades formadoras de colonia

Col: Número de colonias presentes en la dilución d

d: Número de la dilución que se está contabilizando

Anexo B. Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento.

Balance de biomasa:

Para un montaje en un biorreactor, se tiene:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{acumulación} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de entrada} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de salida} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad de} \\ \text{formación} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de consumo} \end{array} \right]$$

Considerando que en un cultivo Batch no hay flujos de entrada y salida, y el volumen se mantiene constante, el balance de masa se representa por la ecuación:

$$\frac{d(X * V)}{dt} = r_x * V - r_c * V \quad (\text{ec. 1})$$

En dónde:

X: Concentración de biomasa [g/L]

V: volumen del cultivo [L]

r_x : Velocidad de formación. [g/L*h]

r_c : Velocidad de muerte celular. [g/L*h]

$$r_x = \mu_x * X \quad (\text{ec. 2})$$

$$r_c = \mu_c * X \quad (\text{ec. 3})$$

μ_x : Velocidad específica de crecimiento [h^{-1}]

μ_x : Velocidad específica de muerte. [h^{-1}]

En la fase exponencial la velocidad de formación es mucho mayor a la velocidad de muerte. De lo que tenemos:

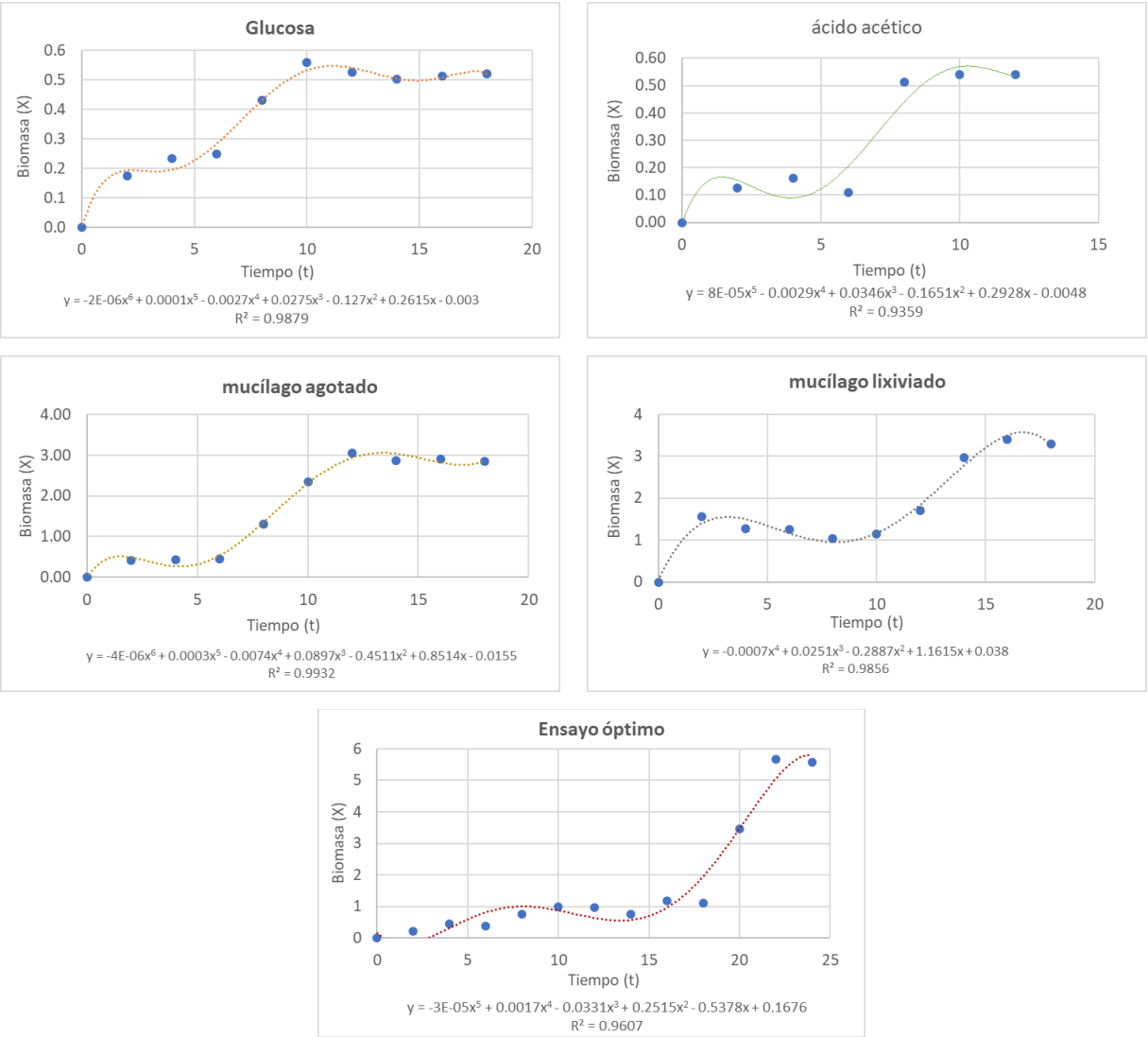
$$\frac{d(X)}{dt} = r_x \quad (\text{ec. 4})$$

Combinando las ecuaciones 2 y 4 se tiene:

$$\frac{d(X)}{dt} = \mu_x * X \quad (\text{ec. 5})$$

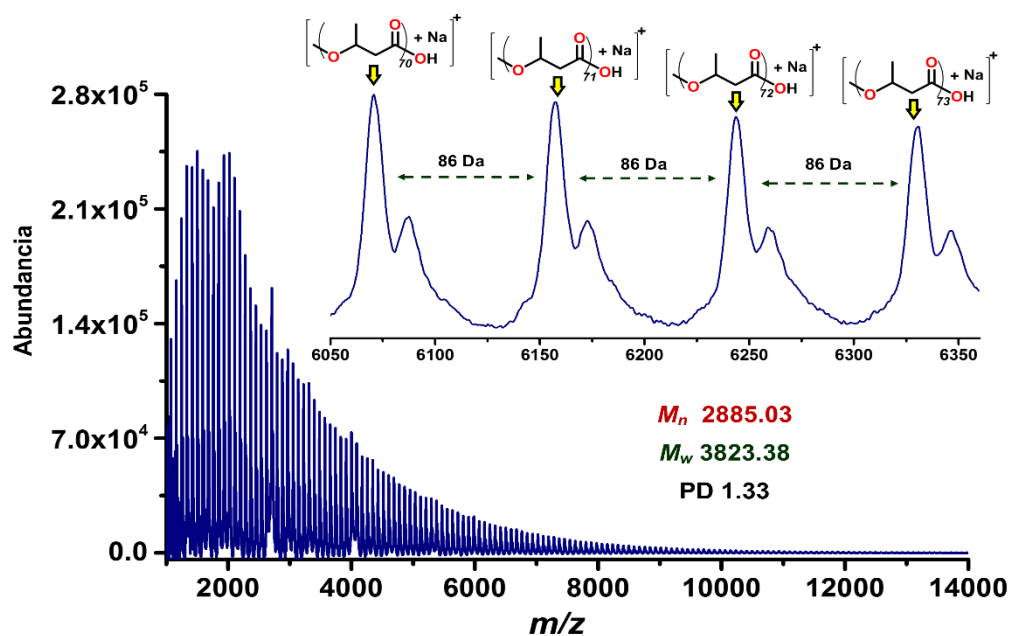
Los valores de velocidades específicas experimentales se determinaron mediante la ecuación 5, primero se ajustaron los datos de cada curva a una función $X = f(t)$, esta función se derivó para calcular los valores de dx/dt , para finalmente obtener el valor de μ_x .

Figura 20. Ajuste de datos biomasa vs tiempo



Anexo C. Análisis de espectrometría de masas.

Figura 21. Espectro de masas en modo lineal.



La figura 21 es el espectro de masas en modo lineal para masas altas, también mostró la unidad monomérica correspondiente al polihidroxibutirato (PHB) con una masa de 86 Daltons, como se evidencia en las señales.