

Extracción y caracterización de polihidroxibutirato (PHB) producido por *Bacillus megaterium* B2 usando como fuente de carbono residuos provenientes de la agroindustria de cacao.

Diana Carolina Uribe Ribero

Trabajo de Grado para optar el título de Química

Director

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Química, Ph. D.

Codirector

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Dios, por ser mi guía, por brindarme esta oportunidad, por darme la fortaleza y la perseverancia necesaria para culminar con éxito mis estudios.

A mi mamá, Doris Ribero, por acompañarme en todo momento, por sus palabras sabias, por su amor infinito y por todos sus sacrificios para sacarnos adelante.

A mi papá, Carlos Uribe, porque aunque ya no se encuentre físicamente conmigo, me dejó grandes enseñanzas y siempre es mi motivo para seguir adelante.

A mis hermanas, Mónica y Liliana, por ser mi apoyo incondicional, por ser unas mujeres maravillosas que me inspiran cada día y me animan a dar lo mejor de mí.

A kento, por ser mi compañero fiel, por brindarme amor y alegría todos los días.

A mis amistades, por las experiencias vividas y por su apoyo en los momentos difíciles.

A mis profesores, por brindarme sus conocimientos y atención durante toda mi carrera.

Agradecimientos

A la profesora Mabel Juliana Quintero por su apoyo incondicional, comprensión, paciencia, guía y enseñanzas que me aportó en la realización del proyecto.

A la profesora Marianny Yajaira Combariza porque confió en mí, brindándome la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación CEIAM y apoyándome con sus conocimientos, orientación y tiempo para culminar con éxito lo propuesto.

Al Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander por permitirme trabajar en sus instalaciones y laboratorios.

A la Universidad Industrial de Santander, la escuela de química, que me formaron como una profesional.

Por último, a todos los integrantes de los grupos de investigación GIFTEX y CEIAM que me colaboraron aportándome ideas y consejos útiles para la culminación del trabajo.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción.....	17
1. Objetivos.....	19
1.1 Objetivo general	19
1.2 Objetivos específicos	19
2. Estado del arte y marco teórico	20
2.1 Plásticos.....	20
2.2 Plásticos biodegradables.....	20
2.3 Polihidroxialcanoatos (PHAs).	21
2.3.1 Definición y propiedades.....	21
2.3.2 Clasificación y estructura.	22
2.4 Microorganismos productores de PHA.....	24
2.4.1 Gram positivas: Bacillus megaterium.....	24
2.4.2 Contenido del granulo intracelular.	25
2.5 Desafíos para la producción de PHA.....	27
2.5.1 Cacao.	28
2.6 Técnicas de recuperación para el aislamiento y la purificación del polihidroxialcanoato a partir de microorganismos.	29
2.6.1 Extracción con disolvente.....	30
2.6.2 Extracción por digestión química.	30

2.6.3 Extracción asistida con ultrasonido.	31
2.6.4 Extracción con fluidos supercríticos.....	32
3. Metodología.....	33
3.1 Producción del polihidroxibutirato a partir de <i>Bacillus megaterium</i> B2 y cuantificación de la biomasa.....	33
3.2 Extracción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de <i>Bacillus megaterium</i> B2..	34
3.2.1 Extracción con los métodos alternativos.	35
3.2.2 Extracción con los métodos alternativos: disrupción celular.	36
3.2.2.1. Baño de sonicación.....	36
3.2.2.2. Ultrasonicación.....	36
3.2.2.3. Tratamiento con CO ₂ supercrítico.	37
3.2.3 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos.....	38
3.2.4 Extracción con el agente surfactante y purificación con el disolvente polar.....	39
3.2.5 Extracción convencional usando disolventes orgánicos.....	41
3.2.5.1 Extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol	41
3.3 Pruebas de solubilidad.	42
3.4 Obtención de películas bioplásticas.....	43
3.5 Caracterización de PHAs.....	43
3.5.1 Análisis elemental.	43
3.5.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	44
3.5.3 Análisis termogravimétrico (TGA).	44

3.5.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	44
3.5.5 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).	44
3.5.6 Resonancia magnética nuclear (RMN).	45
4. Discusión de resultados	45
4.1 Producción del polihidroxitirato a partir de <i>Bacillus megaterium</i> B2 y cuantificación de la biomasa.	45
4.2 Extracción de polihidroxitirato a partir de <i>Bacillus megaterium</i> B2.	47
4.2.1 Extracción con los métodos alternativos: disrupción celular.	47
4.2.2 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos- hipoclorito de sodio.	48
4.2.2.1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre la recuperación de PHB.	48
4.2.3 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos – peróxido de hidrogeno.	50
4.2.3.1. Efecto de la concentración de del peróxido de hidrogeno sobre la recuperación de PHB.	51
4.2.4 Extracción con el agente surfactante y purificación con el disolvente polar..	53
4.2.5 Extracción convencional usando disolventes orgánicos.	55
4.2.5.1. Extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol.	55
4.3 Pruebas de solubilidad.	57
4.4 Obtención de películas bioplásticas.	59
4.5 Caracterización de PHAs.	60

4.5.1 Análisis elemental.	60
4.5.2 Análisis espectroscopia infrarroja (IR).	63
4.5.3 Análisis termogravimétrico (TGA).	66
4.5.4 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).	70
4.5.5 Análisis espectrometría de masas (MALDI-TOF).	74
5. Conclusiones.	82
6. Recomendaciones	83
Referencias bibliográficas	85

Lista de Tablas

	Pág
Tabla 1. Variaciones de las concentraciones para los agentes químicos.....	39
Tabla 2. Comparación de los rendimientos obtenidos con cada método de disrupción celular.	47
Tabla 3. Estudio del efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la recuperación de PHB.	49
Tabla 4. Estudio de las concentraciones del agente químico peróxido de hidrogeno para solubilizar la biomasa residual.	52
Tabla 5. Rendimientos obtenidos al variar el proceso de disrupción celular y utilizando la combinación de SDS, NaClO y C ₂ H ₅ OH.	54
Tabla 6. Rendimiento obtenido utilizando el método convencional usando cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol.	55
Tabla 7. Pruebas de solubilidad del biopolímero obtenido con cada método de extracción y del estándar de PHB, con variaciones en las temperaturas de los dos diferentes tipos de disolventes. I: Insoluble, S: soluble, PS: parcialmente soluble.	58
Tabla 8. Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa con los diferentes métodos de disrupción celular.	60

Tabla 9. Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa con los dos agentes químicos.	61
Tabla 10. Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa y de la muestra patrón de Sigma.	62
Tabla 11. Resumen de los resultados de FTIR del PHB extraído por los diferentes métodos de extracción y del estándar de PHB.	65
Tabla 12. Propiedades térmicas adquiridas a partir del análisis TGA para cada método de extracción empleado en este trabajo, comparando los resultados obtenidos con la literatura.	69
Tabla 13. Propiedades térmicas adquiridas a partir del análisis DSC para cada método de extracción empleado en este trabajo, comparando los resultados obtenidos con la literatura.	72
Tabla 14. Resumen de los resultados del análisis por espectrometría de masas del PHB sintetizado por <i>Bacillus megaterium</i> B2 y del estándar de PHB.	79

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos.....	23
Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los gránulos de PHA de la Célula <i>Bacillus megaterium</i> . Reimpreso (adaptado) de (Grage, Mcdermott, & Rehm, 2017), copyright (2017), con permiso de Springer Nature.	27
Figura 3. Fruto del cacao.	28
Figura 4. Esquema general del procedimiento para la producción y cuantificación de la biomasa.	34
Figura 5. Modelos empleados para la extracción del PHB de la biomasa de <i>Bacillus megaterium</i> B2.	35
Figura 6. Esquema del procedimiento para la extracción del polihidroxibutirato a partir de <i>Bacillus megaterium</i> B2 utilizando los métodos alternativos.	36
Figura 7. Procesador ultrasónico (Marca: Sonics; Modelo: VCX500).....	37
Figura 8. Equipo de extracción con CO ₂ supercrítico.	38
Figura 9. Esquema para el procedimiento de extracción con SDS-agente químico y posterior purificación con etanol.	40
Figura 10. Esquema para la recuperación del biopolímero por medio del método de extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol.	42

Figura 11. Concentraciones del hipoclorito de sodio empleadas para solubilizar la biomasa residual. (A) 5%, (B) 10% y (C) 15%.	50
Figura 12. Biopolímero obtenido de la extracción utilizando peróxido de hidrogeno al 10% como agente químico.....	52
Figura 13. Muestra obtenida por extracción con Baño de sonicación + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH (A), extracción con US + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH (B), extracción con SCO ₂ + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH (C), extracción con CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH (D) y patrón de PHB (E).	56
Figura 14. Películas bioplásticas preparadas a partir del biopolímero recuperado de la biomasa celular.	59
Figura 15. Caracterización por FTIR del polímero obtenido por cada técnica de extracción.	63
Figura 16. Curvas termogravimétricas de la degradación térmica del PHB estándar y del PHB obtenido por los diferentes métodos de extracción.....	67
Figura 17. Termogramas de Calorimetría diferencial de barrido (DSC). PHB extraído utilizando BS + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH (A), PHB extraído utilizando US + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH (B), PHB extraído utilizando SCO ₂ + SDS+ NaClO + C ₂ H ₅ OH (C), PHB extraído utilizando CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH (D) y estándar de PHB (E).	71
Figura 18. Espectro de masas de la muestra extraída con ultrasonificación + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH en modo reflectrón.....	75

Figura 19. Espectro de masas de la muestra extraída con ultrasonificación + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH en modo lineal.	76
Figura 20. Espectro de masas de la muestra extraída con SCO ₂ + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH en modo reflectrón.	76
Figura 21. Espectro de masas de la muestra extraída con CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH en modo reflectrón.	77
Figura 22. Espectro de masas del patrón de PHB en modo reflectrón.	78
Figura 23. Espectro de masas del patrón de PHB en modo lineal.	78
Figura 24. Estructura del polihidroxibutirato enumerado con sus respectivos protones.	81
Figura 25. Espectro ¹ H-RMN del polihidroxibutirato extraído con el método de ultrasonificación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol.	81

Lista de Símbolos y Abreviaturas

atm	Atmosferas
ATR	Reflexión total atenuada
BS	Baño de sonicación
CEIAM	Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales
CHCl ₃	Cloroformo
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CH ₃ OH	Metanol
CO ₂	Dióxido de carbono
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
Fedecacao	Federación Nacional de Cacaoteros
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GAPS	Proteínas asociadas a los gránulos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
IR	Infrarrojo
L	litros
LCL	Long chain length

LPS	Lipopolisacáridos
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight
MCL	Medium chain length
mL	Mililitros
Mn	Peso molecular promedio en número
Mw	Peso molecular promedio en peso
NaOCl	Hipoclorito de sodio
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PD	Polidispersidad
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
P(3HB)	Polihidroxibutirato
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
US	Ultrasonicación

Resumen

Título: Extracción y caracterización de polihidroxibutirato (PHB) producido por *Bacillus megaterium* B2 usando como fuente de carbono residuos provenientes de la agroindustria de cacao*

Autor: Diana Carolina Uribe Ribero**

Palabras Clave: polihidroxibutirato, *Bacillus megaterium*, Extracción.

Descripción:

En la actualidad, se investigan o desarrollan materiales alternativos para sustituir los plásticos de origen fósil por otros compuestos de origen vegetal, o incluso por compuestos derivados de bacterias. El uso de estos nuevos materiales no debe verse limitado por costos elevados en la producción, extracción y purificación frente a los plásticos convencionales. En su procesamiento se deben implementar medidas que no impacten el medio ambiente. En este trabajo se estudiaron métodos amigables con el medio ambiente para la extracción de un bioplástico, el polihidroxibutirato (PHB) que se acumula intracelularmente en algunos microorganismos y normalmente se extrae con solventes orgánicos clorados. Se encontró experimentalmente que el método con mayor potencial para la recuperación del polímero utiliza ultrasonido para realizar la disrupción celular y una suspensión de hipoclorito de sodio-SDS para la solubilización del material no-PHB. El hipoclorito de sodio en conjunto con el dodecilsulfato sódico disolvieron con facilidad la biomasa bacteriana de *Bacillus megaterium* B2. El proceso de recuperación del PHB presentó un rendimiento del 34,59% y una pureza de 99,58%. El polímero recuperado mostró una buena estabilidad térmica, propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas similares a las del estándar de PHB.

* Trabajo de grado

** Facultad de ciencias, escuela de química. Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez. Ph.D. Química. Co-directora: Mabel Juliana Quintero Silva. Bacterióloga, M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas.

Abstract

Title: Extraction and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus megaterium* B2 using cocoa agroindustry waste as carbon source. *

Author: Diana Carolina Uribe Ribero**

Keywords: polyhydroxybutyrate, *Bacillus megaterium*, Extraction.

Description:

Alternative materials are currently being researched or developed to replace fossil-based plastics with other compounds of plant origin, or even compounds derived from bacteria. The use of these new materials should not be limited by high production, extraction and purification costs compared to conventional plastics. In their processing, measures that do not impact the environment should be implemented. In this work, environmentally friendly methods were studied for the extraction of a bioplastic, polyhydroxybutyrate (PHB), which accumulates intracellularly in some microorganisms and is normally extracted with chlorinated organic solvents. It was found experimentally that the method with the greatest potential for polymer recovery uses ultrasound to perform cell disruption and a sodium hypochlorite-SDS suspension for solubilization of the non-PHB material. Sodium hypochlorite in conjunction with sodium dodecylsulfate readily dissolved the *Bacillus megaterium* B2 bacterial biomass. The PHB recovery process showed a yield of 34.59% and a purity of 99.58%. The recovered polymer showed good thermal stability, physicochemical and spectroscopic properties similar to those of the PHB standard.

* Degree Work

** Faculty of Sciences, school of Chemistry. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez. Ph.D. Chemistry. Co-director: Mabel Juliana Quintero Silva. Bacterióloga, M.Sc. Basic Biomedical Sciences.

Introducción

El uso de plásticos de origen fósil va aumentando en diversos sectores comerciales ya que debido a su versatilidad son parte esencial de la vida moderna. Los plásticos sintéticos se convierten eventualmente en desechos con un impacto negativo en el medio ambiente pues permanecen en los ecosistemas por largos períodos de tiempo (Chae & An, 2018). Los biomateriales se han convertido en alternativas de reemplazo de los plásticos de origen petroquímico.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables que tienen el potencial para reemplazar a los plásticos convencionales de origen fósil. Diversos microorganismos sintetizan PHAs en forma de inclusiones lipídicas intracelulares mediante diferentes condiciones de fermentación que depende de los requisitos de la cepa bacteriana. Los PHAs se biosintetizan como compuestos de reserva de carbono y energía cuando se encuentran en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para su crecimiento (Martínez-herrera et al., 2020a). Dentro de los PHAs más estudiados, se destaca el polihidroxibutirato (PHB) por ser el más abundante, no tóxico y biocompatible (Rivera-briso & Serrano-aroca, 2018). A pesar de las grandes ventajas que poseen los PHAs, son poco atractivos desde el punto de vista económico. En su producción por fermentación los costos del sustrato, extracción y purificación son elevados (Biology, Olavide, & Ctra, 2018).

La glucosa, fructosa y sacarosa se utilizan comúnmente como sustratos para la producción de PHAs. Sin embargo, estas fuentes de carbono incrementan los costos de producción del polímero a escala industrial. La rentabilidad del proceso puede ser incrementada usando sustratos de bajo costo como por ejemplo los residuos agroindustriales.

La agroindustria del cacao genera subproductos como la cáscara del fruto, placenta, cascarilla de los granos y pulpa (mucílago). De esta última es posible extraer un lixiviado rico en azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa (Saavedra-Sanabria et al., 2021). Desde el punto de vista biotecnológico, el exudado del mucílago de cacao es una materia prima atractiva para la producción de biopolímeros.

Después de formado y almacenado intracelularmente en el microorganismo, es necesario separar y purificar el PHA. Estos procesos involucran el uso de solventes halogenados como el cloroformo y el diclorometano (cloruro de metileno) (Koller & Niebelschütz, 2013). Sin embargo, el uso de los solventes halogenados es un método inapropiado para la recuperación del PHA. En la extracción a gran escala, los productos químicos halogenados utilizados causan problemas ambientales, contribuyendo a la toxicidad ambiental. El posterior reciclaje de los solventes halogenados por medio de la destilación genera altos costos para la producción comercial de PHA (Kurian & Das, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación se enfoca en demostrar que es posible aplicar estrategias alternativas a las tradicionales para recuperar y purificar el PHA producido por la cepa *Bacillus megaterium* B2 utilizando mucílago de cacao como sustrato. El reemplazar los solventes clorados en el proceso de extracción del polímero disminuirá sus impactos negativos al medio ambiente.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar y caracterizar métodos alternativos de extracción del polihidroxibutirato producido por la bacteria *Bacillus megaterium* B2 utilizando agentes compatibles con el medio ambiente.

1.2 Objetivos Específicos

Producir polihidroxibutirato a partir de residuos provenientes de la industria del cacao (mucílago obtenido de los residuos del proceso de fabricación de celulosa) utilizando la cepa *Bacillus megaterium* B2.

Extraer el polihidroxibutirato del granulo intracelular por medio de métodos que son usados convencionalmente en la literatura.

Caracterizar y comparar el polihidroxibutirato obtenido por los métodos de extracción alternativos, convencionales y con el estándar.

2. Estado del arte y marco teórico

2.1 Plásticos

A pesar de sus impactos negativos al medio ambiente, el uso de los plásticos de origen fósil va aumentando en diversos sectores comerciales, debido a su versatilidad y bajo costo. La producción mundial anual de plásticos sintéticos aumenta cada año alrededor del 9%; actualmente se encuentra alrededor de 300 millones de toneladas (Mohapatra et al., 2017). Con la disminución del petróleo disponible, la producción de plástico a partir de recursos petroquímicos también se limita. Adicionalmente, los plásticos sintéticos tienen efectos perjudiciales para el medio ambiente, ya que son contaminantes xenobióticos y recalcitrantes (Gonzalez Gutierrez, 2008). Al ser liberados a los compartimientos ambientales permanecen durante muchos años en cuerpos de agua, suelo y vertederos, generando impactos ambientales negativos. Algunas alternativas que se han implementado ante esta problemática son la incineración y el reciclaje. Sin embargo, estos procesos siguen siendo insuficientes, tediosos y costosos para el tratamiento de las grandes cantidades anuales de desechos plásticos. Además, en los plásticos hay una gran presencia de aditivos, pigmentos y revestimientos que limita el uso del material reciclado. Por lo tanto, es importante desarrollar plásticos alternativos, con propiedades similares a los plásticos sintéticos, que provengan de fuentes renovables y capaces de ser biodegradados.

2.2 Plásticos biodegradables

Los bioplásticos son de origen natural, en lugar de proceder del petróleo, se derivan de una fuente orgánica renovable. Se han visto como una posible solución a la problemática por el uso de los plásticos de origen fósil. Los biopolímeros se clasifican en:

Polímeros extraídos directamente de la biomasa como la celulosa de los árboles y las plantas, el almidón, la caña de maíz (Rujni, 2020), el caucho natural como el poli-cis-isopreno (Cornish & Xie, 2012) y las proteínas como queratina y colágeno (Brigham, 2018).

Polímeros producidos por microorganismos, bacterias nativas o modificadas genéticamente.

Polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros biológicos de fuentes renovables. (Cerrone, 2011)

Entre todos los polímeros citados anteriormente, ha habido un gran interés tanto a nivel científico como comercial por los biopolímeros de origen microbiano. Estos se producen porque los microorganismos utilizan el carbono como almacenamiento de energía para ser metabolizado cuando no se puede acceder a otras fuentes de energía.(Yousuf, 2017) Entre los más prometedores se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA).

2.3 Polihidroxicanoatos (PHAs).

2.3.1 Definición y propiedades.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) se consideran los mejores candidatos para sustituir a los plásticos derivados del petróleo. Son biopolímeros termoplásticos, elastómeros, insolubles en agua, biodegradables e impermeables a gases y una vez extraído cristaliza con propiedades físicas similares a las del polipropileno. (Pradhan, 2018) En condiciones aeróbicas, los PHAs se biodegradan completamente transformándose en agua y dióxido de carbono. En condiciones anaeróbicas se transforman en metano. Estos procesos son catalizados por microorganismos y pueden ocurrir en suelos, aguas naturales (mar, lagos, ríos) y en aguas residuales (Khanna & Srivastava, 2005). La degradación de los PHAs se ve

afectada por el tipo y la composición del polímero, las condiciones ambientales y el tipo de microorganismo (Israni & Shivakumar, 2019).

Los PHAs son sintetizados intracelularmente por varios microorganismos procariotas mediante diferentes condiciones de fermentación (dependiendo de los requisitos nutricionales y de incubación de la cepa bacteriana empleada). Son acumulados como compuestos de reserva energética cuando se encuentran en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para su crecimiento. Normalmente, se biosintetizan limitando el oxígeno, el fósforo o el nitrógeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono.

Los PHAs poseen muchas aplicaciones en diversos ámbitos (Martínez-herrera et al., 2020b)(Fiorese et al., 2009). En artículos de uso cotidiano como bolsas de empaque, contenedores, revestimientos, artículos desechables de higiene personal, entre otras (Madkour, Heinrich, Alghamdi, Shabbaj, & Steinbüchel, 2013). Debido a su citotoxicidad insignificante, también los utilizan en cirugía, farmacología, trasplantes e ingeniería de tejidos (Thomas & Roy, 2018). Los PHAs tienen una alta resistencia al agua y una baja difusividad. Lo que los hace útiles para aplicaciones en la industria alimentaria, para el envasado de alimentos y para materiales en la industria agrícola como en la fabricación de macetas biodegradables (Mohapatra et al., 2017).

2.3.2 Clasificación y estructura.

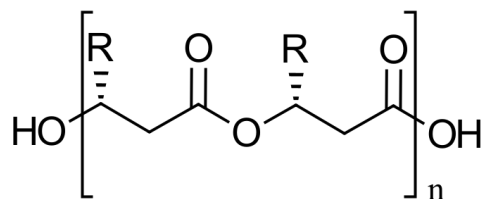
Los PHAs se pueden clasificar en tres grupos, PHAs de cadena corta, media o larga (scl (*short-chain length*), mcl (*medium-chain length*) y lcl (*long-chain length*)) respectivamente. Los monómeros de scl-PHA tienen menos de 5 átomos de carbono como el 3-hidroxibutirato, mientras que los mcl-PHA tienen de 5-14 átomos de carbono como el 3-hidroxihexanoato. Por encima de 14 átomos de carbono se consideran como lcl-PHAs

(Madkour et al., 2013). El peso molecular de los polihidroxicanoatos, que oscila entre 2×10^5 y 3×10^6 Da, depende de las condiciones del cultivo y del microorganismo que lo produce.

Los PHAs son homopolímeros o copolímeros de hidroxialcanoatos. Son poliésteres lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente. La estructura general de los PHA se muestra en la figura 1. Si el grupo es $R = CH_3$, el polímero resultante se llama polihidroxibutirato o ácido polihidroxibutírico, mientras que si $R = C_3H_7$, el polímero se llama polihidroxiocanoato (PHO) y así sucesivamente.

Figura 1.

Estructura general de los polihidroxicanoatos.



El PHA más abundante y mejor caracterizado es el poli (3-hidroxibutirato (PHB)), un homopolímero de (R) -3-hidroxibutirato ([R] -3HB). Presenta mayor rigidez y con una resistencia a la tracción (104 MPa) equivalente a la del polietileno (Dwivedi, Pandey, Kumar, & Mehrotra, 2020) (Abid & Banat, 2018). Fue descubierto por primera vez en 1925 por el científico francés Lemoigne en forma de gránulos intracelulares dentro de la bacteria *Bacillus megaterium* (Suriyamongkol, Weselake, Narine, Moloney, & Shah, 2007).

2.4 Microorganismos productores de PHA.

Hasta la fecha se conocen 100 tipos de microorganismos que sintetizan PHAs. La familia de estos poliésteres microbianos se divide en dos grupos, en los organismos Gram-positivos y los organismos Gram-negativos. Los comúnmente utilizados a escala industrial son las bacterias Gram-negativas como *Cupriavidus necátor*, las cuales pueden acumular hasta un 80% de PHA. Sin embargo, los PHAs que se aíslan de organismos Gram-negativos contienen una capa externa de endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS) de membrana. Estas endotoxinas producen pirógenos, contaminando los PHAs y limitando su uso en las aplicaciones biomédicas. Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o endotoxinas, también designados como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) reconocidos por el sistema inmunitario innato. Actúan como los mediadores microbianos más potentes implicados en la patogénesis de la sepsis y el shock séptico (Dinjaski & Prieto, 2015).

Debido al factor mencionado anteriormente, la purificación y la eliminación de los LPS influyen significativamente en el costo total de producción de PHAs. Para evitar esta limitación, se recomienda usar las bacterias Gram-positivas ya que están libres de LPS y son fuentes potenciales de PHA para su uso en aplicaciones biomédicas.

2.4.1 Gram positivas: *Bacillus megaterium*.

Las especies de *Bacillus* tienen varias ventajas en comparación con otras bacterias debido a su abundancia incluso en condiciones ecológicas extremas pues soportan altas presiones osmóticas y altas temperaturas. Tienen una alta tasa de crecimiento incluso utilizando sustratos de bajo costo y mayor capacidad de producción de PHA (Mohapatra et al., 2017). Las especies de *Bacillus* poseen enzimas hidrolíticas que pueden ser explotadas

para la producción económica de PHA utilizando, por ejemplo, materiales de desecho agroindustriales (Mohapatra et al., 2017).

En el marco del desarrollo de la investigación científica, en el año 2015, el CEIAM logro aislar la cepa *Bacillus megaterium* B2 de residuos de glicerol crudo de una planta de Biodiesel, que fue capaz de producir PHB (Cardozo et al., 2015).

Zhang y su equipo trabajaron con la cepa *Bacillus megaterium* R11 y una fuente de carbono de glucosa con una concentración de 100 g/L. En la investigación obtuvieron un contenido de biomasa seca del 58,6% y 32,16% de PHB (Zhang, Sun, Wang, & Geng, 2013). En otro estudio Yustinah y su equipo utilizaron como fuente de carbono racimo de frutos vacíos de palma aceitera y obtuvieron 55.4% de PHB (Yustinah et al., 2019).

2.4.2 Contenido del granulo intracelular.

Los microorganismos productores de PHA almacenan al PHA en el citoplasma en forma de gránulos definidos que varían en tamaño de 0.2 a 0.5 μm (Abid & Banat, 2018). Rilfors y su equipo hicieron un estudio cualitativo in vitro de la composición lipídica y proteica de las membranas de *Bacillus megaterium*. Utilizando cromatografía de gases-líquidos en dos columnas con diferentes fases estacionarias y por la tecnica de electroforesis. Encontraron tres fosfolípidos principales en las membranas de todas las cepas. Estos lípidos eran fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. También hallaron lípidos neutros, pero no caracterizaron más (Rilfors, Wieslander, & Stahl, 1978). Además, hallaron seis ácidos grasos dominantes de cadena ramificada en las membranas de las cepas de *Bacillus megaterium*. Estos ácidos eran 12-metiltridecanoico (iso-C14), 13-metiltetradecanoico (iso-C15), 14-metilpentadecanoico (iso-C16), 15-metilhexadecanoico

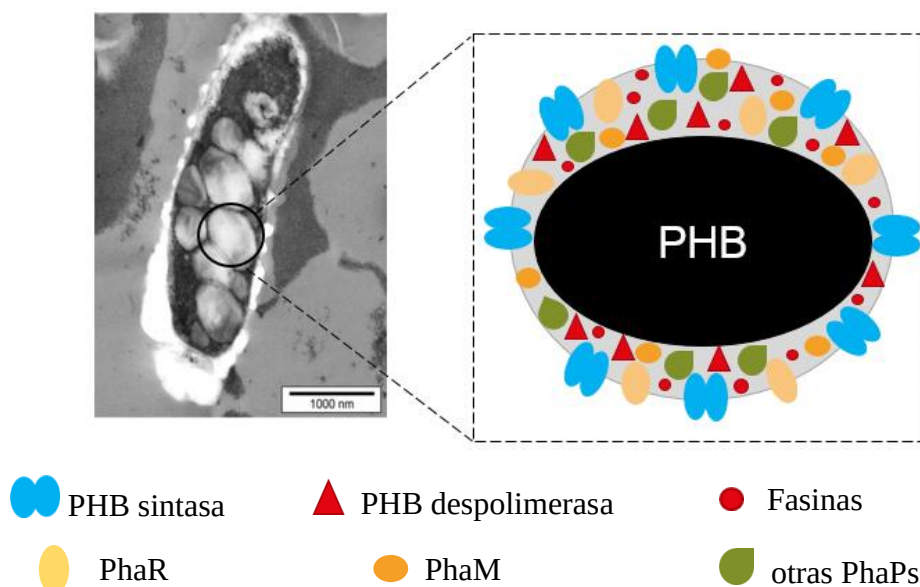
(iso-C17), 12-metiltetradecanoico (anteiso-C15) y 14-metilhexadecanoico (anteiso-C17). Representaban entre el 60 y el 90% (mol/mol) de los ácidos grasos totales (Rilfors et al., 1978).

En el 2016, Bresan y su equipo realizaron un estudio in vivo de la capa superficial del gránulo del PHB. Descubriendo que la capa superficial de los carbonosomas están libres de fosfolípidos y consisten solo en proteínas. Es posible, que la detección in vitro de fosfolípidos sea porque se unen artificialmente al polímero hidrofóbico después de la ruptura de las células durante el proceso de aislamiento de los gránulos de PHB (Bresan et al., 2016). Los fosfolípidos únicamente se encuentran en la membrana celular, siendo fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidil-serina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) los principales componentes de las membranas bacterianas (Madison & Huisman, 1999).

En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la estructura de los gránulos intracelulares de PHA. El núcleo del poliéster está recubierto de una capa superficial de proteínas estructurales y funcionales como las proteínas asociadas a los gránulos (GAPs). Tales como, PHA sintasas, implicadas en la polimerización del biopoliéster. PHA despolimerasas, responsables de la movilización de la PHA. Fasinas, principales componentes estructurales de los GAPs. PhaR que es postranscripcional y funciona directa o indirectamente para producir una PHA sintasa activa (Cannon, 2001). PhaM, una proteína asociada a los gránulos de PHB con propiedades similares a las fasinas, que mantiene la unión de los gránulos de PHB al nucleóide (Wahl, Schuth, Pfeiffer, Nussberger, & Jendrosseck, 2012). Además, contiene otras proteínas como enzimas relacionadas con la síntesis de monómeros de PHA, así como reguladores transcripcionales no clasificados como GAPs (Dinjaski & Prieto, 2015).

Figura 2.

Representación esquemática de la estructura de los gránulos de PHA de la Célula Bacillus megaterium. Reimpreso (adaptado) de (Grage, Mcdermott, & Rehm, 2017), copyright (2017), con permiso de Springer Nature.

**2.5 Desafíos para la producción de PHA.**

A pesar de las grandes ventajas que poseen los PHAs, son poco atractivos desde el punto de vista económico. En su producción por fermentación los costos del sustrato, extracción y purificación son elevados. El costo de las materias primas supone que es de un 25-45% del costo total de producción de biopolímeros. Siendo alrededor del 70-80% del costo de las materias primas la fuente de carbono, que se utiliza como sustrato para la producción de biopolímeros (Wang, Sharma-shivappa, Olson, & Khan, 2013).

Sin embargo, el PHA tiene la característica de que puede sintetizarse a partir de fuentes renovables y de bajo costo, como por ejemplo, los residuos agrícolas o industriales.

En los últimos años se ha investigado el uso de residuos agroindustriales tales como melaza de remolacha (Schmid et al., 2019), glicerol (Cardozo et al., 2015), aceite de fritura residual (Pernicova, Kucera, Nebesarova, Kalina, & Novackova, 2019) y suero de leche (Colombo et al., 2019), entre otros como fuente de carbono para el crecimiento celular.

2.5.1 Cacao.

La agroindustria del cacao genera residuos en grandes cantidades. En la actualidad los países con mayor producción de cacao en el mundo son Costa de Marfil, Ghana, Camerún y Nigeria en África Occidental (Viuda-martos, Delgado-ospina, Lucas-gonz, & Martuscelli, 2021). En Latinoamérica, Colombia se encuentra en quinto lugar con un porcentaje del 1,2%. Santander es uno de los departamentos que más se destaca en la producción anual de cacao, según la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao) tiene una participación de 42% con 22 mil 800 toneladas de la producción anual.

Figura 3.

Fruto del cacao.



El fruto del cacao, es una mazorca conformada por una cascara carnosa y gruesa, y granos rodeados de una pulpa blanca. En la cadena de procesamiento para la obtención de cacao, se generan subproductos como la cáscara del fruto, placenta, cascarilla de los granos y pulpa, que representan en conjunto alrededor del 70-80% de la fruta en peso seco (Vásquez et al., 2019). De la pulpa blanca se filtra un líquido translúcido llamado mucílago de cacao. Del mucílago se obtiene un exudado rico en azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa (10-15%), pectinas (2-3%) y ácido cítrico (1-5%), que constituye del 5 a 7 % en peso de la fruta de cacao (Saavedra-Sanabria et al., 2021).

Desde el punto de vista biotecnológico, el exudado del mucílago de cacao es una materia prima atractiva para la producción de biopolímeros. En el CEIAM ya se han realizado procesos biotecnológicos para la producción de celulosa alimentando a la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* a partir de mucilago de cacao fresco. Al finalizar el proceso de fermentación, se descubrió que se generaba un segundo líquido residual que se puede seguir aprovechando como materia prima.

2.6 Técnicas de recuperación para el aislamiento y la purificación del polihidroxicanoato a partir de microorganismos.

En el CEIAM se han venido realizando trabajos de investigación sobre la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* B2 a partir de mucilago de cacao como única fuente de carbono. Como complemento a estos trabajos, es necesario estudiar procesos de extracción. Ya que es un aspecto clave en la producción de PHB para competir en el mercado con los polímeros de origen fósil. El proceso de extracción debe ser de bajo costo y debe garantizar pureza con el mínimo impacto ambiental. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas, la primera etapa es la disrupción celular y la segunda etapa es la separación del PHB

de la masa residual. Existen varios métodos descritos en la literatura para la extracción de los PHAs que se almacenan dentro de las células, cada método está asociado con algunas ventajas y desventajas. Los métodos comúnmente utilizados para la recuperación se mencionan a continuación.

2.6.1 Extracción con disolvente.

Es el método más utilizado debido a su simplicidad y facilidad de operación. Esta técnica se basa en el hecho de que los PHAs son insolubles en agua pero solubles en un número limitado de solventes orgánicos. La extracción con solventes tiene ventajas sobre los otros métodos de extracción en términos de eficiencia. Este método causa una degradación insignificante de los polímeros (Kunasundari & Sudesh, 2011). La desventaja de esta extracción es que es muy costosa. Se requieren grandes cantidades de disolvente, concretamente hasta 20 veces más de disolventes de extracción en comparación con la masa de la biomasa rica en PHA (Koller & Niebelschütz, 2013). La separación del polímero puede ser difícil debido a la alta viscosidad de la solución polimérica y es un proceso perjudicial para el medio ambiente.

Se han reportado el uso de algunos hidrocarburos clorados como el cloroformo para la extracción de PHAs de las células *Bacillus cereus suaeda* B-001 (Yustinah et al., 2019) y como el carbonato de 1,2 propileno para la recuperación de PHAs de *Cupriavidus necator* (Fiorese et al., 2009), entre otros.

2.6.2 Extracción por digestión química.

Este método consiste en la solubilización de los materiales celulares que rodean los gránulos de PHA (Kunasundari & Sudesh, 2011). Se utilizan algunos agentes químicos como

los tensoactivos (Arikawa, Sato, Fujiki, & Matsumoto, 2017) o el hipoclorito de sodio (Rawre & Mavinkurve, 2002). Los agentes químicos degradan los componentes de la capa superficial de los gránulos, provocando que se pueda recuperar el contenido celular. Este proceso tiene la ventaja de que es aplicable para recolectar PHAs a muestras ambientales y se puede aplicar a gran escala.

Hay que mencionar que el aislamiento de los gránulos de PHA por digestión con hipoclorito de sodio puede presentar una degradación de la masa molecular de aproximadamente el 50% (Koller & Niebelschütz, 2013). Al utilizar tensoactivos, se disminuye el grado de pureza pero se obtiene un peso molecular ligeramente mayor que la digestión con hipoclorito de sodio. Al utilizar una combinación de tensioactivos con hipoclorito de sodio se obtendrá una mejor recuperación del PHA.

2.6.3 Extracción asistida con ultrasonido.

La irradiación por ultrasonidos es una herramienta alternativa para acelerar el proceso de extracción y para aumentar la recuperación del PHA. Los ultrasonidos reducen el uso de disolventes orgánicos y pasos que pueden producir pérdidas durante el proceso de extracción (Martínez-herrera et al., 2020b). Esta técnica es muy conveniente para mejorar el proceso de transferencia de masa en los fluidos. La sonicación genera cambios de presión cíclicos extremos y rápidos en un fluido, produciendo una intensa turbulencia (Annuar & Gumel, 2015). Esto mejora la transferencia de masa y la dispersión de las fases.

Schmid y sus colegas (Schmid et al., 2019) describieron la desintegración ultrasónica de células ricas en PHA de la halófila *Bacillus megaterium uyuni* S29, utilizando un subproducto de la industria azucarera como fuente de carbono. Alcanzando concentraciones

de masa seca celular de hasta 16,7 g/L con un contenido de P(3HB) de 0,6 g⁻¹ tras sólo 24 h de cultivo.

2.6.4 Extracción con fluidos supercríticos.

Los fluidos supercríticos tienen propiedades fisicoquímicas únicas, como su alta densidad, y baja viscosidad, que los posicionan como disolventes de extracción adecuados. El dióxido de carbono supercrítico (SCO₂) es el más utilizado debido a su baja toxicidad, a su bajo costo, disponibilidad, inercia y no inflamabilidad. Posee una temperatura crítica (31,1 °C) y una presión (72,9 bar) moderada (Kunasundari & Sudesh, 2011). Por encima de la temperatura y la presión críticas, el CO₂ tiene propiedades líquidas y gaseosas (Ryan et al., 2020).

Cabe destacar que la eficiencia del tratamiento con fluidos supercríticos es en la disrupción de las células bacterianas y en la eliminación de compuestos hidrofóbicos. Todo esto depende de parámetros como la presión, la temperatura y en algunos casos el tipo de modificador que se emplea. En esta técnica empleando un modificador, un gas como el CO₂ se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente orgánico a temperatura moderada y aumenta la polaridad del gas.

En la literatura se han encontrado investigaciones de la extracción de PHA utilizando SCO₂, pero todavía falta seguir estudiando esa técnica, ya que se encuentra poca información y resultan en conclusiones inconsistentes.

Hejazi y sus colegas (Hejazi, Vasheghani-farahani, & Yamini, 2003) reportaron la desintegración de la biomasa de *Ralstonia eutropha* para liberar scl-PHA puro. Para la recuperación del polímero se utilizaron los siguientes parámetros: 100 min de exposición,

una presión de 200 atm; temperatura de 40°C; y 0,2 mL de metanol. Usando estas condiciones, se reporta un rendimiento máximo de recuperación de PHB del 89%. Hampson y Ashby (Hampson & Ashby, 1999) informaron la extracción y purificación de polihidroxicanoatos de longitud de cadena media (mcl-PHA) a partir de células liofilizadas de *P. resinovorans*. Obteniendo una recuperación del polímero del 42.4%.

Existen otros métodos para extraer el PHAs de las células, como la extracción utilizando líquidos iónicos, flotación por aire disuelto, digestión enzimática, entre otros.

3. Metodología

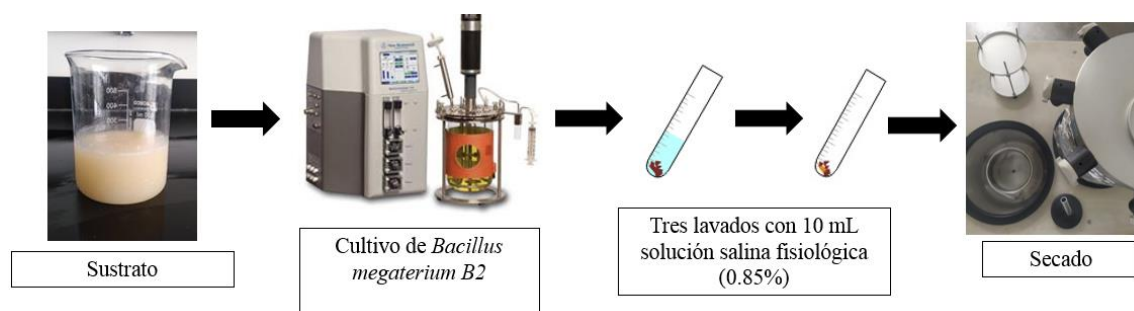
3.1 Producción del polihidroxibutirato a partir de *Bacillus megaterium* B2 y cuantificación de la biomasa.

Para la reactivación, adaptación y crecimiento de *Bacillus megaterium* B2 se siguió la metodología establecida por (Cardozo et al., 2015). Los cultivos de *Bacillus megaterium* B2 se realizaron en un biorreactor de 7.5 L con un volumen inicial de trabajo de 4 L. Se utilizó un medio nutricional básico compuesto por KH_2PO_4 1.5 g/L, Na_2HPO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, de acuerdo con la relación C/N y elementos traza en solución 100 mg/L [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.25 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L; H_3BO_4 , 0,23 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7$, 0,2 g/L; y HCl, 10 mL] (Mesa Beltrán, Romero Isaza, Quintero Silva, & Lambis Benítez, 2021). Se trabajó con una temperatura de 34°C, pH 7 controlado por una solución buffer de KOH 2M, oxigenación de 1L/min de aire y agitación de 400 rpm. Como única fuente de carbono se utilizó una mezcla en partes iguales de mucílago de cacao obtenido de los residuos del proceso de fabricación de celulosa con mucílago de cacao fermentado por 3 días.

Para la cuantificación de la biomasa bacteriana. Pasadas las 36 horas de crecimiento se tomaron 30 mL del medio del cultivo en tubos cónicos secos previamente pesados y se centrifugaron (UNIVERSAL 320R) a 7500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se realizaron tres lavados con 10 mL solución salina fisiológica (0.85%). Una vez terminados los lavados, se eliminó el sobrenadante y los tubos con la biomasa húmeda se colocaron en un equipo de liofilización por 48 horas. Posteriormente se volvieron a pesar los tubos de manera que por diferencia de peso se obtuvo el contenido de biomasa y la concentración de biomasa en g/L.

Figura 4.

Esquema general del procedimiento para la producción y cuantificación de la biomasa.

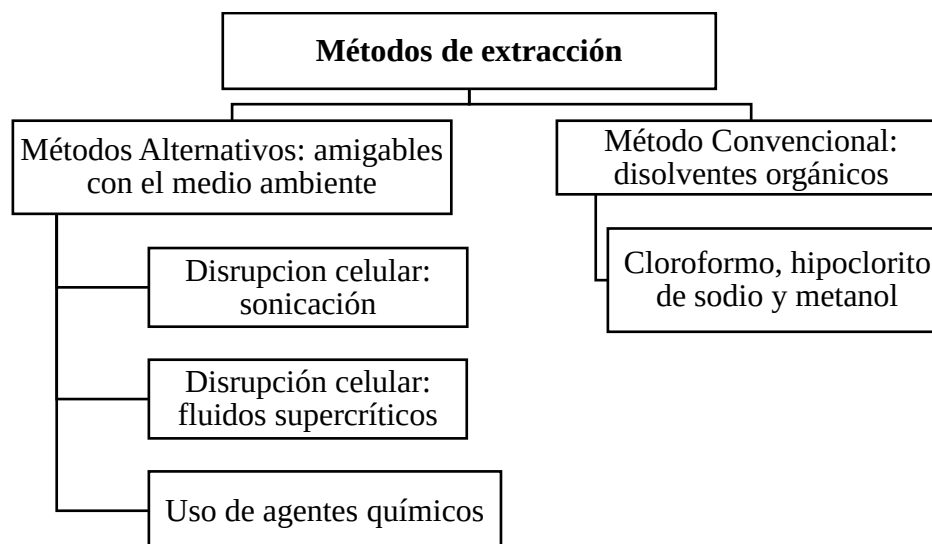


3.2 Extracción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de *Bacillus megaterium* B2.

Para la extracción del PHB se utilizó el modelo presentado en la figura 5.

Figura 5.

Modelos empleados para la extracción del PHB de la biomasa de Bacillus megaterium B2.

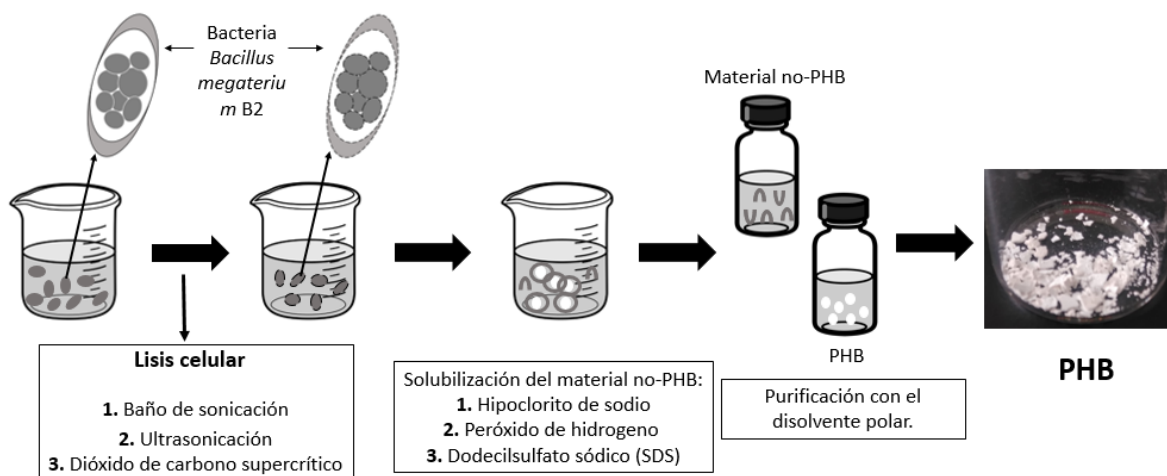


3.2.1 Extracción con los métodos alternativos.

Para la extracción con los métodos alternativos, se llevaron a cabo los pasos que se muestran en la figura 6. Para realizar la disrupción celular de la bacteria *Bacillus megaterium* B2, se estudiaron 3 técnicas diferentes, el baño de sonicación, la ultrasonificación y el dióxido de carbono supercrítico. Una vez que se libera el contenido intracelular, se obtiene una mezcla de biopolímero y restos celulares. Para solubilizar el material no-PHB, se seleccionaron dos agentes químicos, el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno. Se realizó un estudio de cada agente químico en diferentes concentraciones. El agente químico en conjunto con el dodecilsulfato sódico removi6 las impurezas provenientes de los restos celulares. Por último, se utiliz6 un disolvente polar, en este caso el etanol para retirar restos de las soluciones anteriores y remover lípidos de bajo peso molecular.

Figura 6.

*Esquema del procedimiento para la extracción del polihidroxibutirato a partir de *Bacillus megaterium* B2 utilizando los métodos alternativos.*



3.2.2 Extracción con los métodos alternativos: *disrupción celular.*

3.2.2.1 Baño de sonicación. Una mezcla de 300 mg de biomasa seca y 20 mL de agua tipo I, se sometió a sonicación (Marca: BRANSONIC 3510R-MTH, USA; Frecuencia: 42 kHz; Potencia: 100 W) para romper las células, este proceso se realizó por 15 minutos a 90 °C.

El uso del baño de sonicación ha sido reportado previamente (Gamboa Suarez, 2019) (Arikawa, Sato, Fujiki, & Matsumoto, 2017) como una técnica para la lisis celular de la biomasa.

3.2.2.2 Ultrasonificación. Una mezcla de 600 mg de biomasa y 40 mL de agua tipo I se sometió a ultrasonificación para romper las células. El proceso se realizó utilizando una sonda ultrasónica operada a 20 kHz y 50% de amplitud (Marca: Sonics; Modelo: VCX500;

Potencia: 500 W) en 10 ciclos de 60s de sonicación y descanso. El recipiente se mantuvo refrigerado durante el proceso para evitar la hidrólisis del polímero.

Figura 7.

Procesador ultrasónico (Marca: Sonics; Modelo: VCX500).



3.2.2.3 Tratamiento con CO₂ supercrítico. Se mezclaron 4 g de biomasa seca con perlas de vidrio de 3 mm para aumentar el área de superficie y la transferencia de masa entre el polímero y el CO₂. Luego se cargó el recipiente de alta presión con la muestra contenida en un dedal. Se controló la temperatura del sistema a 40°C. A continuación el recipiente se presurizó a una presión de 1200 psi. Después de eso se aisló el recipiente por 15 minutos para permitir que el sistema se acercara al equilibrio. Después de que la cantidad necesaria de CO₂ pasó por el reactor con un caudal controlado 2,5 mL/min, el recipiente se despresurizó y se recuperó el polímero.

Figura 8.

Equipo de extracción con CO₂ supercrítico.



3.2.3 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos.

3.2.3.1 Efecto de la concentración de los agentes químicos sobre la recuperación de PHB. La solución obtenida después del proceso de disrupción celular (baño de sonicación y ultrasonificación) se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos a 4°C, para recoger en un precipitado los restos celulares y el biopolímero. Seguidamente, se realizó un estudio de las concentraciones de cada agente químico para remover el material no-PHB. El estudio de las concentraciones de los agentes hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno se realizó agregando 6 mL del agente a 300 mg del precipitado obtenido después de la disrupción celular en las siguientes concentraciones:

Tabla 1.

Variaciones de las concentraciones para los agentes químicos.

Agente químico	Concentraciones
Hipoclorito de sodio	5%,10% y 15%
Peróxido de hidrogeno	10%, 20% y 30%

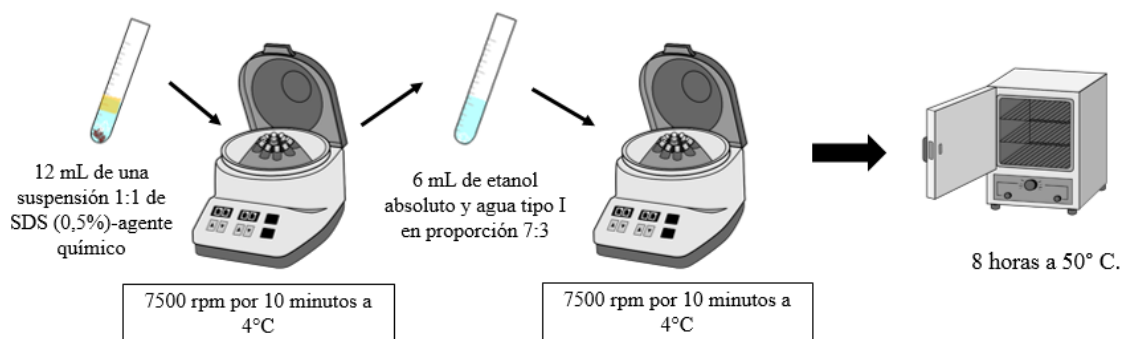
El recipiente que contenía la solución precipitado-agente químico se mantuvo en un baño refrigerado en el menor tiempo posible. Seguidamente se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C. Por último, el producto obtenido se liofilizó por 48 horas y se tomó el peso seco de la hojuela de PHB.

3.2.4 Extracción con el agente surfactante y purificación con el disolvente polar.

Una vez establecido el agente químico con su respectiva concentración. Se procedió a lavar dos veces el precipitado que contenía el polímero y los restos celulares con 12 mL de una suspensión 1:1 de SDS (0,5%)-agente químico a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante resultante y la hojuela de PHB resultante se lavó dos veces con 6 mL de etanol absoluto y agua tipo I en proporción 7:3 a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente la hojuela de PHB lavada se secó a 50°C por 8 horas. Para los lavados se colocó la solución en un agitador vórtex para suspender las muestras.

Figura 9.

Esquema para el procedimiento de extracción con SDS-agente químico y posterior purificación con etanol.



Cuando los tubos se sacaron del horno, se tomó el peso seco del tubo con la hojuela de PHB, de manera que al restarle el peso del tubo vacío, se obtuvo el peso del PHB extraído. Se reportó su concentración en g/L. El porcentaje de acumulación de PHB (%PHB) se estimó como la composición porcentual de PHB presente en la biomasa celular, utilizando la siguiente fórmula:

$$\%PHB = [PHB \text{ (g/L)} / \text{biomasa seca (g/L)}] * 100$$

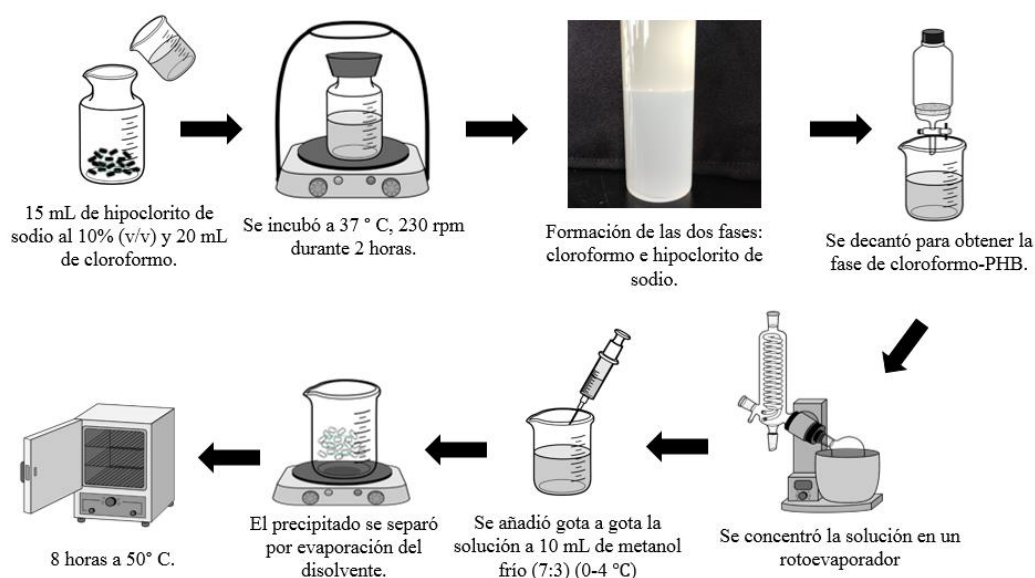
Cada paso se realizó por triplicado. Cabe destacar que se evaluó el proceso de extracción con el agente químico, el surfactante y la posterior purificación con las muestras obtenidas después de cada técnica de ruptura celular.

3.2.5 Extracción convencional usando disolventes orgánicos.

2.1.1.1 Extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol. Para la extracción del PHB se seleccionó el método de (Zhang et al., 2013) con algunas modificaciones. A 300 mg de biomasa seca, se le adicionaron 15 mL de hipoclorito de sodio de sodio al 10% (v/v) y 20 mL de cloroformo (99%). La mezcla se incubó a 37 ° C con con agitación de 230 rpm durante 2 horas. Una vez disueltos los restos celulares en el hipoclorito de sodio se procedió a agregar la mezcla en un embudo de decantación de 250 mL para separar las fases. La fase orgánica (cloroformo) se separó y se concentró en rotovapor hasta aproximadamente 2,0 a 3,0 mL. El extracto concentrado se añadió gota a gota a 10 mL de metanol frío (70% v/v) (0-4 °C), la solución se mantuvo a una temperatura de 0 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se observó un precipitado blanco en la interface del metanol y el cloroformo. El precipitado se separó por evaporación del disolvente y se llevó al horno por 8 horas a 50° C.

Figura 10.

Esquema para la recuperación del biopolímero por medio del método de extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol.



El porcentaje de recuperación de PHB se halló de la misma forma como se determinó en la sección 4.2.4. El método de cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol se seleccionó porque según la literatura da buenos resultados de recuperación del polihidroxibutirato de la biomasa celular (Pradhan et al., 2017). Adicionalmente, este método de extracción se usó como modelo de comparación de las purezas y rendimientos del PHB obtenidos con los métodos alternativos. Además, los resultados también se compararon con el patrón de poli[(R)-3-ácido hidroxibutírico] comercial (Sigma-Aldrich) número CAS: 29435-48-1.

3.3 Pruebas de solubilidad.

Para la prueba de solubilidad se pesaron en tubos de vidrio 100 mg del polímero obtenido después de cada método de extracción y se adicionaron 5 mL del disolvente

(cloroformo o tetrahidrofurano). La solución se calentó a varias temperaturas (40, 50 y 60 °C) durante 20 minutos. Las pruebas con cada disolvente se realizaron por triplicado.

3.4 Obtención de películas bioplásticas.

Se utilizó una solución de polímero con una concentración de 0,05 g/ml de PHB en cloroformo para preparar las películas. El polihidroxibutirato se disolvió en cloroformo a 60°C en un equipo Soxhlet, durante aproximadamente 15 minutos. Luego, 5 mL de la solución se vertieron en cajas Petri de vidrio y se llevaron a un desecador durante 24 horas. Las películas formadas después de la evaporación del solvente se lavaron con etanol: agua (1:1) para remover cualquier depósito que hubiera quedado en la superficie. Por último, las películas se secaron al vacío y se mantuvieron en el desecador hasta su uso.

3.5 Caracterización de PHAs.

Al biopolímero extraído se le realizaron los siguientes análisis en la Universidad Industrial de Santander y en el Parque Tecnológico Guatiguará, para determinar sus propiedades estructurales y térmicas. Para los estudios de caracterización se utilizó como referencia una muestra de poli[(R)-3-ácido hidroxibutírico] comercial (Sigma-Aldrich) número CAS: 29435-48-1.

3.5.1 Análisis elemental.

El análisis del porcentaje del carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en las muestras del biopolímero se realizó en un equipo Thermo Scientific (Modelo. Flash 2000). Se colocaron 5 mg de las muestras en el equipo y se utilizó como patrón la sulfaminoamida.

3.5.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR).

Los espectros de IR se tomaron en el rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} usando un espectrofotómetro infrarrojo (Shimadzu IR Prestige – 21). Se colocó una pequeña cantidad de las muestras en el módulo ATR (reflexión total atenuada).

3.5.3 Análisis termogravimétrico (TGA).

La temperatura de degradación térmica de las muestras se midieron por el análisis termogravimétrico en un instrumento Mettler Toledo TGA / DSC STARe. Los análisis se realizaron en un rango de temperatura ambiente hasta 400° C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y una atmosfera de nitrógeno.

3.5.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Las propiedades térmicas como punto de fusión (T_m), el punto de degradación (T_d) y la entalpia de fusión (ΔH) del polímero obtenido con cada método de extracción se determinaron utilizando calorimetría diferencial de barrido (Mettler Toledo TGA / DSC STARe). Se utilizó una velocidad de calentamiento de 10°C/min, en un rango de 25° C a 400°C y con una atmosfera de nitrógeno.

3.5.5 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Para el análisis MALDI se utilizó un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser de Nd: YAG ($\lambda=355$ nm). Los experimentos de MALDI se hicieron con el instrumento ajustado en modo positivo (lineal y reflectron).

Se preparó la solución del polímero disolviendo 1 mg de PHB en 250 μL de cloroformo. La solución se sometió a calentamiento y agitación para asegurar que el polímero se disolviera. La muestra se preparó mezclando 30 μL de la matriz trans-2- [3- (4-terc-butilfenil) -2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB) (5mM), con un volumen de 10 μL del analito (se realizó el mismo proceso con cada una de las muestras obtenidas por cada método de extracción). La muestra se agitó en un vórtex por 5 minutos. Luego, se depositó 1 μL de la mezcla en un target de acero pulido (MALDI-TARGET Bruker, Billerica, MA) donde se terminó de evaporar el solvente.

3.5.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN ^1H se registraron disolviendo el polímero extraído en cloroformo deuterado a una concentración de 10 mg/mL y se analizó en un espectrómetro Bruker Avance III, 400 MHz a 27°C.

4. Discusión de resultados

4.1 Producción del polihidroxitirato a partir de *Bacillus megaterium* B2 y cuantificación de la biomasa.

Para el proceso de fermentación se seleccionó una relación C/N de 10 lo que resultó en una producción de biomasa de 17,38 g/L.

El proceso de recuperación del biopolímero de la biomasa se dividió en tres partes: pretratamiento, extracción y purificación. El pretratamiento a la biomasa húmeda consistió en realizar lavados con una solución de cloruro de sodio al 0.5%. Este tratamiento removió el medio de cultivo, permitió que las células se deshidrataran, debilitando la firmeza de la

pared celular y la envoltura, por lo tanto facilitó el siguiente paso que es el proceso de extracción. Khosravi y Vasheghani (Khosravi-darani & Vasheghani-farahani, 2004) realizaron el pretratamiento con cloruro de sodio, expusieron las células a NaCl 140 mM y las calentaron a 60°C por 1 h.

El proceso de secado de la biomasa es un aspecto que debe tenerse en cuenta. Chen y su equipo (Chen, Xu, Yang, & Gu, 2001) utilizaron biomasa seca a temperaturas mayores de 60 °C para recuperar el PHB. Sin embargo, el peso molecular del producto fue menor que el polímero recuperado con la biomasa liofilizada. La razón de la diferencia de rendimientos entre cada proceso de secado, es porque la degradación del PHB puede ocurrir a 60°C y también los materiales celulares se unen fuertemente al PHB. (Khosravi-darani & Vasheghani-farahani, 2004).

En este trabajo el secado de la biomasa celular, necesario para hallar el peso seco, se realizó mediante liofilización. La liofilización evita que los materiales celulares se adhieran al PHB facilitando su recuperación. Después de extraído el biopolímero de las células, el material se secó en una estufa a 50°C, para determinar el peso seco del PHB. Como el paso final para la recuperación del polímero fue el lavado con una solución de etanol y agua (7:3). Esta solución se elimina por evaporación a temperaturas menores de 60°C. Al utilizar una temperatura de 50°C se evita la degradación del biopolímero y desde un punto de vista de ahorro este proceso tiene un menor consumo de energía y su funcionamiento es práctico y cómodo. Se tomó este camino para el secado de las muestras debido a que la calidad del producto y la tasa de recuperación no deben verse influidas por el método de secado.

4.2 Extracción de polihidroxibutirato a partir de *Bacillus megaterium* B2.

4.2.1 Extracción con los métodos alternativos: *disrupción celular*.

A partir de la biomasa seca, es necesario destruir la membrana celular para extraer las inclusiones de PHB del citoplasma celular. Como en el citoplasma el gránulo de PHB está rodeado por una capa de proteínas (Kunasundari & Sudesh, 2011). El enlace de hidrogeno intramolecular en peptidoglucano proporciona resistencia a la pared bacteriana, lo que dificulta su ruptura (Dubey et al., 2018). Sin embargo, los métodos de disrupción celular con irradiación por ultrasonidos o por tratamiento con fluidos supercríticos pueden romper la pared celular bacteriana fácilmente sin ninguna descarga al medio ambiente.

Tabla 2.

Comparación de los rendimientos obtenidos con cada método de disrupción celular.

	Biomasa (g/L) antes del proceso de disrupción celular	Biomasa (g/L) después del proceso de disrupción celular	%Biomasa
Baño de sonicación	5,16	5,10	98,85
Ultrasonicación	6,04	5,84	96,69
Dióxido de carbono supercrítico	5,38	4,04	75,12

Con los resultados de la tabla 2, se puede evidenciar que en el método de disrupción celular donde se observa mayor pérdida de la muestra es el cual se utilizó dióxido de carbono supercrítico. El 24,88% de muestra que se perdió pudo ser debido a un error humano al transferir la muestra al dedal de tela. También es posible que las altas presiones que se manejan en el equipo pudieron haber influido en la degradación de la biomasa. Por otra parte,

el uso del baño de sonicación tuvo el menor impacto en la remoción de biomasa (1,15%) seguido por la ultrasonificación (3,31%). La pérdida de biomasa masa puede ser el resultado de degradación de biomoléculas (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos) como resultado del proceso de cavitación.

4.2.2 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos- hipoclorito de sodio.

Después de que el contenido celular es liberado por la alteración de la membrana celular es necesario extraer el biopolímero de la cápside que lo contiene dentro de la célula. Existen varias alternativas como la disolución directa del polímero utilizando solventes orgánicos o la disolución de la parte de la biomasa residual no PHB. Típicamente, el proceso de extracción depende de criterios técnicos, económicos y ambientales.

En nuestro caso, se prefirió la solubilización de la biomasa -y no la solubilización del biopolímero- como estrategia de extracción. La solubilización se logra utilizando hipoclorito de sodio, que debido a sus características de agente oxidante, baja volatilidad, y bajo costo puede ser usado para descomponer la biomasa no-PHB. Cuando los componentes hidrófilos del material celular no-PHB se convierten en sustancias hidrosolubles, el biopolímero puede recogerse fácilmente utilizando técnicas de separación como la centrifugación (Koller & Niebelschütz, 2013).

4.2.2.1 Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre la recuperación de PHB. La Tabla 3 muestra el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre la cantidad de biopolímero recuperado.

Tabla 3.*Estudio del efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la recuperación de PHB.*

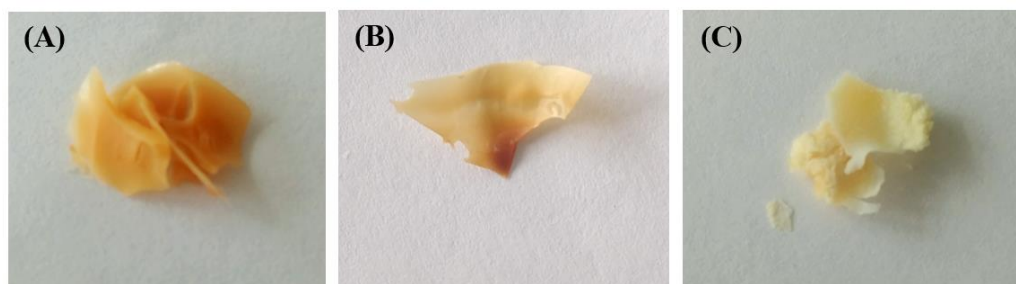
	Biomasa (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
Hipoclorito de sodio (5%)	2,754	1,734	61,699
Hipoclorito de sodio (10%)	6,185	2,593	41,925
Hipoclorito de sodio (15%)	3,130	0,333	10,649

Analizando los datos obtenidos en la tabla 3, el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo cuando se utilizó una concentración de hipoclorito de sodio al 5%. Sin embargo, visualmente (Figura 11A) la hojuela de PHB obtenida demuestra por el color que contiene bastantes impurezas ocasionadas por restos celulares que no se disolvieron en la solución de hipoclorito de sodio. Por otro lado el porcentaje de recuperación obtenido con la concentración de 15% es baja. Indicando que en altas concentraciones el hipoclorito de sodio produce la escisión de la cadena polimérica, lo que provoca la degradación del PHB. La digestión de la materia celular utilizando una concentración de hipoclorito de sodio del 10% presentó un porcentaje de recuperación del 41,925% y un cambio de coloración en la muestra (Figura 11B). Indicando que a una concentración del 10% se logró eliminar gran parte de los residuos celulares. Se utilizó un enfriamiento externo para controlar la temperatura y la espuma que genera la reacción exotérmica de la biomasa con el hipoclorito de sodio, para así evitar la degradación del polímero.

Figura 11.

Concentraciones del hipoclorito de sodio empleadas para solubilizar la biomasa residual.

(A) 5%, (B) 10% y (C) 15%.



En reportes anteriores Heinrich y su equipo (Heinrich, Madkour, Al-ghamdi, Shabbaj, & Steinbüchel, 2012) trabajaron con una concentración de hipoclorito de sodio al 13% para la extracción de poli(3-hidroxibutirato) de células de *Ralstonia eutropha* H16 a gran escala. Se obtuvo una tasa de recuperación máxima del 91,32%.

4.2.3 Extracción con métodos alternativos: extracción con agentes químicos – peróxido de hidrogeno.

El peróxido de hidrogeno es un agente oxidante fuerte con potencial para emplearse como agente en la extracción del polihidroxibutirato. Una de las ventajas del peróxido de hidrogeno es que no deja ningún residuo en el producto y es más benigno para el medio ambiente. Por estas razones, es un buen candidato para reemplazar el hipoclorito de sodio.

Los radicales oxigenados originados por el peróxido de hidrógeno pueden degradar la cadena de peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Además, la degradación o eliminación de las proteínas, y del ácido nucleico resultante de la disrupción de las células es

importante para evitar la formación de soluciones de alta viscosidad que pueden interferir en el proceso de purificación (Jose et al., 2008).

El peróxido de hidrógeno se ha estudiado en la extracción del polihidroxibutirato de *Cupriavidus necator* con rendimiento del 66.10% (Rooy, Wahyuni, Syamsiah, & Ismail, 2007). Por otro lado el peróxido de hidrogeno también se ha aplicado en el tratamiento de efluentes para la eliminación de contaminantes inorgánicos y orgánicos (Jose et al., 2008).

4.2.3.1 Efecto de la concentración de del peróxido de hidrogeno sobre la recuperación de PHB. Al igual que el hipoclorito de sodio, se utilizaron concentraciones de peróxido de hidrogeno de 10, 20 y 30% v/v para el tratamiento de la biomasa. Los resultados del rendimiento se evidencian en la tabla 4. El aumento de la concentración del peróxido de hidrogeno no afecta significativamente los rendimientos de PHB, que oscilan entre 70 y 65%. Esto indica que el peróxido de hidrogeno no solubiliza eficientemente los restos de detritos celulares. La figura 12 soporta esta observación, pues la muestra del biopolímero presenta una coloración amarillenta.

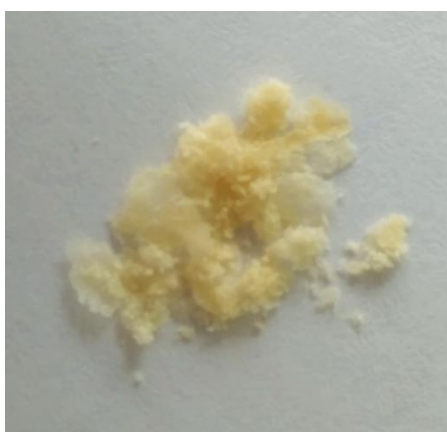
Tabla 4.

Estudio de las concentraciones del agente químico peróxido de hidrogeno para solubilizar la biomasa residual.

	Biomasa (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
Peróxido de hidrogeno (10%)	5,251	3,689	70,252
Peróxido de hidrogeno (20%)	1,493	0,983	65,848
Peróxido de hidrogeno (30%)	2,811	1,734	61,699

Figura 12.

Biopolímero obtenido de la extracción utilizando peróxido de hidrogeno al 10% como agente químico.



Considerando que no se observa un efecto significativo en la apariencia y rendimientos del polímero a medida que se aumenta la concentración de peróxido de

hidrógeno, se seleccionó el tratamiento con hipoclorito de sodio como solvente para la extracción. Sin embargo, para mejorar la remoción de los restos celulares, se consideró utilizar una combinación de hipoclorito de sodio y dodecilsulfato sódico (SDS) en la suspensión celular.

4.2.4 Extracción con el agente surfactante y purificación con el disolvente polar.

Se propuso el uso del surfactante porque en el centro de estudios de investigaciones ambientales (CEIAM) ya se han realizado pruebas para la recuperación del polihidroxibutirato utilizando dodecilsulfato sódico (SDS). El surfactante solubiliza el material celular no polimérico, como los lípidos de bajo peso molecular.

Tras terminado el proceso de extracción, se realizaron lavados con etanol, ya que es un disolvente polar suave que da lugar a un producto puro, inodoro e incoloro. Además, con este proceso de solubilización y precipitación se mejora considerablemente la pureza del polímero, porque se remueven residuos de las soluciones que se utilizaron con anterioridad.

Utilizando este enfoque, se procedió a realizar lavados utilizando una combinación de SDS e hipoclorito de sodio. Posteriormente se realizaron lavados con etanol para la purificación. Este proceso se realizó para las muestras obtenidas después de cada método de disrupción celular.

Tabla 5.

Rendimientos obtenidos al variar el proceso de disrupción celular y utilizando la combinación de SDS, NaClO y C₂H₅OH.

	Biomasa (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
Baño de sonicación + SDS + NaClO + C₂H₅OH	3,32	1,34	40,28
US + SDS + NaClO + C₂H₅OH	4,78	1,65	34,59
SCO₂ + SDS+ NaClO + C₂H₅OH	12,20	2,76	22,65

Con los resultados indexados en la tabla 5 se puede observar que el método alternativo donde se utilizó como técnica de disrupción celular el baño de sonicación y como solventes el SDS, hipoclorito de sodio y el etanol presentó el mayor rendimiento con un 40,28%. El siguiente método en orden descendiente en cuanto al porcentaje de extracción fue en el cual se empleó ultrasonificación como técnica de disrupción celular y como solventes el SDS, hipoclorito de sodio y el etanol con un 34,59%. El porcentaje de 22,65% obtenido con el método de dióxido de carbono supercrítico, hipoclorito de sodio y etanol pudo ser debido a que el equipo de dióxido de carbono supercrítico maneja presiones altas, lo que puede ocasionar escisiones en la cadena del polímero.

Si bien se ha informado que varias especies *Bacillus* acumulan entre el 9 y el 44,5% de peso en células secas de PHB, todo esto dependiendo del medio de cultivo y del sustrato (Borah, Thakur, & Nigam, 2002).

4.2.5 Extracción convencional usando disolventes orgánicos.

4.2.5.1 Extracción con cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol. En este procedimiento el uso de los productos químicos produjeron lisis en la célula, destruyendo la pared celular, y también actuaron en la posterior solubilización del PHB liberado. El hipoclorito de sodio cuando se combinó con el cloroformo ayudó a la solubilización del PHB. El ion cloruro de los disolventes halogenados solubilizó el PHB y el NaOCl evitó la contaminación del PHB con proteínas y otros compuestos al neutralizar los aminoácidos, lo que resultó en la formación de sal y agua (Kurian & Das, 2021).

Tabla 6.

Rendimiento obtenido utilizando el método convencional usando cloroformo, hipoclorito de sodio y metanol.

	Biomasa (g/L)	PHB (g/L)	%PHB
CHCl₃ + NaClO + CH₃OH	4,09	1,69	41,37

Comparando el rendimiento obtenido de 41,37% para el método donde se utilizó CHCl₃ + NaClO + CH₃OH (tabla 6), con el valor obtenido 40,28% para el método de baño de sonicación + SDS + NaClO + C₂H₅OH (tabla 5), se puede observar que el valor del rendimiento del método convencional es mayor. Esto pudo haberse generado porque el agente químico al entrar en contacto con el polímero durante varios minutos, lleva a que se rompan enlaces en el polímero y que se disminuya el peso molecular. No obstante, en la extracción con el método convencional, cuando los productos químicos realizan la disrupción celular, el PHB inmediatamente entra en contacto con el cloroformo. Provocando que

disminuya el tiempo de contacto del polímero con el hipoclorito de sodio y evitando su degradación.

En la figura 13 se encuentra la evidencia fotográfica donde se muestran los polímeros obtenidos con cada método de extracción. Se observa que tanto el color como la textura son semejantes al patrón de PHB (figura 13 (B), (C), (D)), dando un buen indicio que las muestras se encuentran puras. A continuación, se procedió a realizar la caracterización de las muestras para corroborar la pureza y la identidad del polihidroxibutirato.

Figura 13.

Muestra obtenida por extracción con Baño de sonicación + SDS + NaClO + C₂H₅OH (A), extracción con US + SDS + NaClO + C₂H₅OH (B), extracción con SCO₂ + SDS + NaClO + C₂H₅OH (C), extracción con CHCl₃ + NaClO + CH₃OH (D) y patrón de PHB (E).



Cabe destacar que el producto obtenido por el método de baño de sonicación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol presentó una coloración amarillenta (figura 13A). Indicando que este proceso no fue lo suficientemente eficaz para eliminar los restos celulares. Incluso

esto se puede corroborar comparando los resultados del % PHB cuando se implementa la técnica de disrupción celular (tabla 5).

4.3 Pruebas de solubilidad.

La solubilidad es una de las propiedades más importantes de los materiales poliméricos. La solubilidad del producto obtenido después de los procesos de disrupción celular, disolución de la biomasa y purificación se determinó a diferentes temperaturas con cloroformo y tetrahidrofurano.

Con los resultados obtenidos en la tabla 7, se pudo evidenciar que las muestras extraídas con los métodos de US + SDS + NaClO + C₂H₅OH, SCO₂ + SDS + NaClO + C₂H₅OH y CHCl₃ + NaClO + CH₃OH son solubles en los dos disolventes a una temperatura de 60°C. Caso contrario con el estándar de PHB que es insoluble en tetrahidrofurano a las temperaturas de 40, 50 y 60°C. La muestra extraída del método Baño de sonicación + SDS + NaClO + C₂H₅OH no se solubilizó con ningún disolvente en ninguna temperatura, esto pudo ser debido por la alta carga de residuos celulares que aún presenta la muestra.

Tabla 7.

Pruebas de solubilidad del biopolímero obtenido con cada método de extracción y del estándar de PHB, con variaciones en las temperaturas de los dos diferentes tipos de disolventes. I: Insoluble, S: soluble, PS: parcialmente soluble.

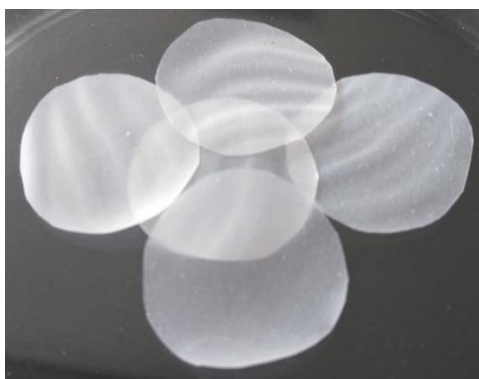
	Cloroformo			Tetrahidrofurano		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
Baño de sonicación						
+ SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	I	I	I	I	I	I
US + SDS + NaClO						
+ C ₂ H ₅ OH	S	S	S	I	PS	S
SCO₂ + SDS+						
NaClO + C ₂ H ₅ OH	S	S	S	I	PS	S
CHCl₃ + NaClO +						
CH ₃ OH	S	S	S	I	PS	S
Patrón de PHB	I	PS	S	I	I	I

4.4 Obtención de películas bioplásticas.

Los resultados anteriores de solubilidad son fundamentales para que con el producto final se puedan fabricar películas plásticas para empaques por medio de técnicas como el solvent-casting. Este tipo de técnica es comúnmente utilizada y se caracteriza por utilizar un disolvente para solubilizar el material polimérico. Luego de tener una mezcla en estado líquido, esta es vertida en un recipiente de vidrio, con el fin de evaporar el disolvente y a su vez obtener una película.

Figura 14.

Películas bioplásticas preparadas a partir del biopolímero recuperado de la biomasa celular.



En la figura 14 se muestran las películas del polímero recuperado con el método de extracción US + SDS + NaClO + C₂H₅OH. Preparadas por medio del método solvent-casting (con cloroformo).

4.5 Caracterización de PHAs.

4.5.1 *Análisis elemental.*

Mediante el análisis elemental se puede determinar el contenido de C, H, N, S en la muestra. La presencia de restos celulares puede correlacionarse con el contenido de nitrógeno que arroja el análisis elemental. En la tabla 8 se muestra el análisis elemental de los biopolímeros obtenidos después de cada proceso del tratamiento de extracción.

Se utilizó una estimación aproximada de las purezas de los polímeros obtenidos asumiendo que la suma de todos los porcentajes de los elementos es del 100%, tomando como base los valores teóricos del PHB (C: 55,8% - O: 37,2% y H: 7,02%)

Tabla 8.

Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa con los diferentes métodos de disrupción celular.

	%C	%H	%N	%pureza
Baño de sonicación	47,19	6,69	6,69	6,34
Ultrasonificación	48,46	7,07	6,72	5,92
Dióxido de carbono supercrítico	45,06	6,59	7,04	1,44

Con los valores obtenidos del %N, y del % de pureza se observa que el proceso de disrupción celular no elimina restos de proteínas celulares por lo que se procede a analizar

las muestras después del paso de extracción con la suspensión SDS-hipoclorito de sodio (10%).

Tabla 9.

Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa con los dos agentes químicos.

	%C	%H	%N	%pureza
Hipoclorito de sodio + SDS	43,11	7,071	3,59	49,74
Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) + SDS	44,60	7,05	6,67	6,62

En la tabla 9 están indexados los resultados obtenidos cuando se implementaron los agentes químicos (hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno) en compañía del dodecilsulfato sódico. Se observa claramente que al utilizar el peróxido de hidrogeno, el %N no disminuye por lo que la muestra aún contiene impurezas. Por el contrario al utilizar el hipoclorito de sodio si se redujo el %N. Este fenómeno puede estar relacionado con la solubilidad de las proteínas en los disolventes y la variación de la solubilidad con la temperatura. Con los resultados obtenidos de pureza y rendimiento se continuó utilizando hipoclorito de sodio como agente químico para la extracción.

Por último se caracterizaron por análisis elemental las muestras después del proceso de extracción y de purificación (tabla 10).

Tabla 10.

Análisis elemental comparativo de la muestra extraída de la biomasa y de la muestra patrón de Sigma.

	%C	%H	%N	%pureza
Baño de sonicación				
+ SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	42,12	6,94	3,45	51,7
US + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	54,33	6,788	0,03	99,58
SCO₂ + SDS+ NaClO + C₂H₅OH	31,17	5,65	0,82	88,52
CHCl₃ + NaClO + CH₃OH	50,33	6,957	0,29	95,94
Estándar de PHB	66,77	7,674	0,12	98,32

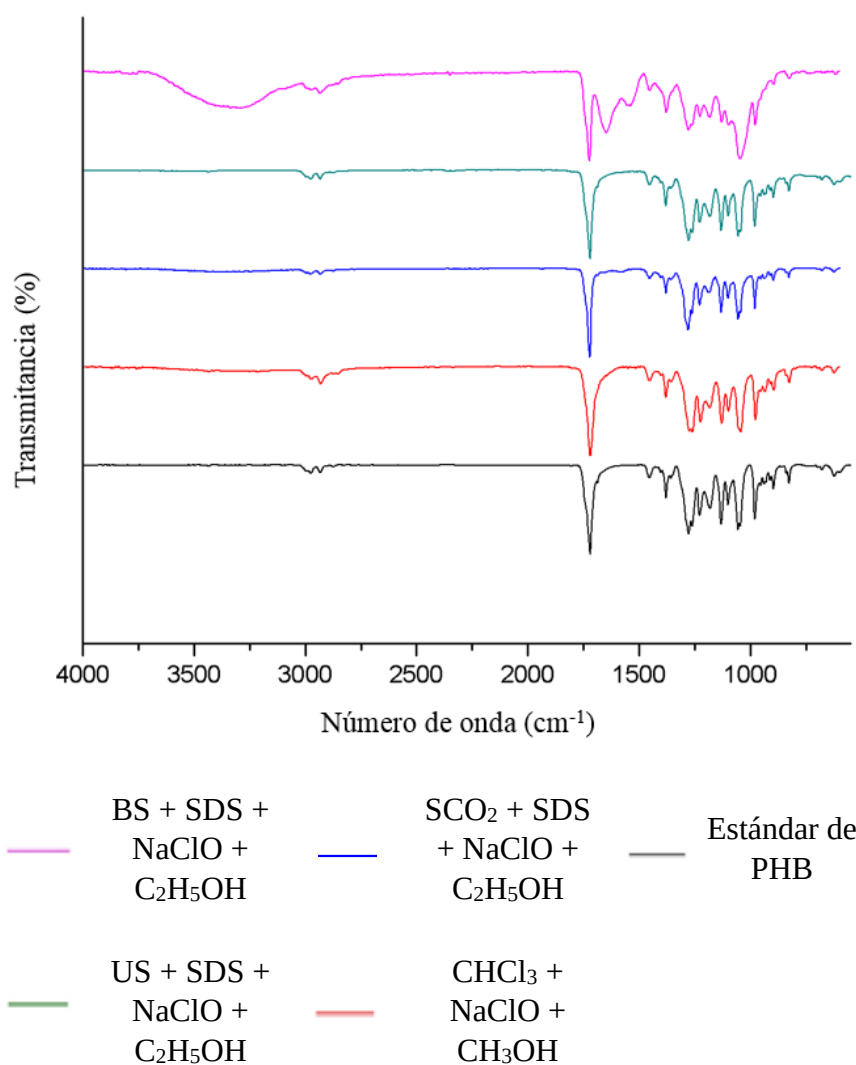
Se puede observar en la tabla 10 un cambio significativo en el %N y por ende en la pureza. Por lo que se puede inferir que tanto el proceso de disrupción celular como el proceso de extracción con SDS-hipoclorito de sodio y purificación son esenciales para obtener un polímero con un alto porcentaje de pureza. El método de extracción donde se implementó la ultrasonicación, dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol presentó una pureza del 99.58%. Siendo el método donde más se eliminaron impurezas causadas por los detritos celulares. Incluso superando los porcentajes de pureza correspondiente al patrón de PHB y al método convencionalmente utilizado en la literatura. El método de baño de sonicación,

SDS, hipoclorito de sodio y etanol se descartó porque aunque presentó un rendimiento del 40,28%, fue el que obtuvo un menor porcentaje de pureza.

Análisis espectroscopia infrarroja (IR).

Figura 15.

Caracterización por FTIR del polímero obtenido por cada técnica de extracción.



En la figura 15 se muestran los espectros FTIR del estándar de polihidroxibutirato y de los polímeros extraídos de la biomasa por medio de los tres diferentes métodos alternativos y por el método convencional.

Todas las muestras mostraron la banda cerca de $1720\text{-}1726\text{ cm}^{-1}$, que es responsable de la vibración de estiramiento del carbonilo del éster ($\text{C}=\text{O}$). Cuya presencia por debajo de 1730 cm^{-1} se asocia a la región cristalina de los homopolímeros de PHB (Gahlawat & Soni, 2019). Además, los picos de absorción de los grupos metileno (CH_2) y metilo (CH_3) se observan en la región de $2500\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$, concretamente las señales a 2932 y 2975 cm^{-1} . Las bandas 1277 cm^{-1} y 1227 cm^{-1} se deben a la vibración de estiramiento C-O-C presente en la muestra (Martínez-herrera et al., 2020b).

Tabla 11.

Resumen de los resultados de FTIR del PHB extraído por los diferentes métodos de extracción y del estándar de PHB.

Banda	Número de onda en cm⁻¹				
	PHB de BS + SDS + NaClO + C₂H₅OH	PHB de US + SDS + NaClO + C₂H₅OH	PHB de SCO₂ + SDS + NaClO + C₂H₅OH	PHB de CHCl₃ + NaClO + CH₃OH	Estándar de PHB
O-H	3329	-	-	-	-
Estiramiento CH ₃	2975	2975	2975	2975	2975
Estiramiento CH ₂	2933	2932	2932	2932	2932
Tensión C=O	1723	1723	1722	1719	1722
Flexión asimétrica de CH ₂ – CH ₃	1452-1378	1454-1379	1454-1379	1452-1379	1454- 1379
Estiramiento del enlace C- O-C	1277-1227	1277-1227	1279-1227	1275-1223	1277- 1227
Estiramiento del enlace C-C	1046-978	1054-980	1054-980	1043-977	1054-980
Flexión N-H	1647- 1539	-	-	-	-

De acuerdo con lo observado en la tabla 11, se registra un patrón de bandas similar en la muestra de referencia y en las muestras que se evaluaron con cada tratamiento. Por otro lado con el método en el que se utilizó Baño de sonicación (BS) + SDS + NaClO + C₂H₅OH, se evidencia la aparición de las bandas 1647- 1524 cm⁻¹ que corresponden a la flexión N-H. Representando que al utilizar este método no se obtiene una buena eliminación de los restos celulares.

Por ultimo cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre las propiedades y características del biopolímero cuando se emplearon los métodos de extracción alternativos comparando con el método convencional y con la muestra de referencia.

4.5.2 *Análisis termogravimétrico (TGA).*

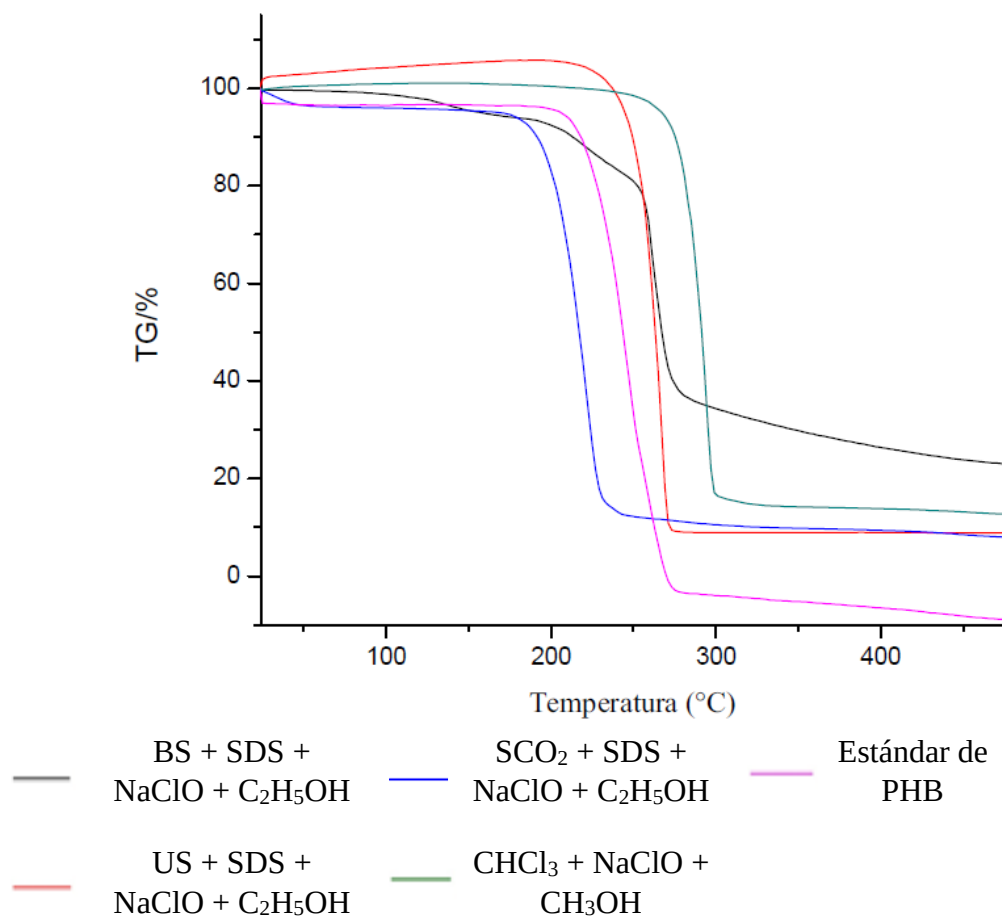
En la técnica experimental del análisis termogravimétrico se mide la masa en función de la temperatura o del tiempo. Para el caso de los polímeros esta técnica propone las condiciones de procesabilidad del material y su aplicación final (Israni, Venkatachalam, Gajaraj, Varalakshmi, & Shivakumar, 2020). Por lo que es importante determinar la estabilidad térmica y el patrón de descomposición de la muestra en términos de pérdida de peso.

En los perfiles de degradación obtenidos por el análisis termogravimétrico (figura 16) se observa que el PHB sintetizado por el método de baño de sonicación (BS), dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol presenta una pérdida de peso (en el rango de temperatura de 120-130°C) que corresponde a la evaporación de los disolventes físicamente absorbidos en el polímero. La próxima pérdida de peso la presentan todos los biopolímeros sintetizados y el estándar de PHB, que corresponde a la degradación térmica del PHB. Esta se produce rápidamente cerca al punto de fusión debido al proceso de escisión aleatoria de la cadena

(que implica la escisión de los enlaces C=O y C-O en los enlaces éster por β -escisión) (Pradhan et al., 2017).

Figura 16.

Curvas termogravimétricas de la degradación térmica del PHB estándar y del PHB obtenido por los diferentes métodos de extracción.



Las temperaturas de degradación de los polímeros recuperados de la biomasa residual (tabla 12) exceptuando el polímero donde se utilizó dióxido de carbono supercrítico presentan valores mayores que el obtenido con el estándar de PHB. El valor más alto de temperatura de degradación es el de 273,1°C que corresponde al método de baño de

sonicación (BS), dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol. Sin embargo, observando el perfil de degradación (figura 16) la curva muestra picos u hombros diferentes a lo esperado, por lo tanto, se deduce que hay presencia de impurezas o compuestos ajenos al PHB. La temperatura de 239,0 °C que corresponde al método de ultrasonificación, dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol, presenta el mejor perfil de degradación sin hombros diferentes a los esperados. Además, es la temperatura más cercana a la temperatura del método de la dispersión hipoclorito de sodio y cloroformo.

El último paso donde se observa pérdida de peso en el rango de temperatura de 270-300°C contribuye a la descomposición del polímero, dando lugar a la formación de ácido crotónico.

Tabla 12.

Propiedades térmicas adquiridas a partir del análisis TGA para cada método de extracción empleado en este trabajo, comparando los resultados obtenidos con la literatura.

	Degradación (°C)	Descomposición (°C)	Masa residual %	Referencia
BS + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	273,1	277,6	22,55	En este trabajo
US + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	239,0	273,0	8,80	En este trabajo
SCO ₂ + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	183,6	240,8	7,91	En este trabajo
CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH	246,4	292,1	28,61	En este trabajo
Estándar De PHB	210,6	270,6	-	En este trabajo
Dispersión de CHCl ₃ + NaClO	255,9	271,6	2,5	(Israni et al., 2020)

En la tabla 12 se observan todos los datos cuantitativos de las propiedades térmicas de los polímeros recuperados de la biomasa por cada método de extracción, comparando los valores con los encontrados en la literatura. El porcentaje de masa residual que queda al final del proceso térmico puede representar residuos de óxidos metálicos y cenizas de sales inorgánicas.

Entre todos los polímeros recuperados de la biomasa, se observa que el PHB extraído con el método de ultrasonificación, dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol tiene

una mayor estabilidad térmica indicada por temperaturas relativamente más altas. La poca variación de temperaturas que existe comparando con el patrón y con los valores hallados en la literatura se debe al tipo de microorganismo y al sustrato utilizado.

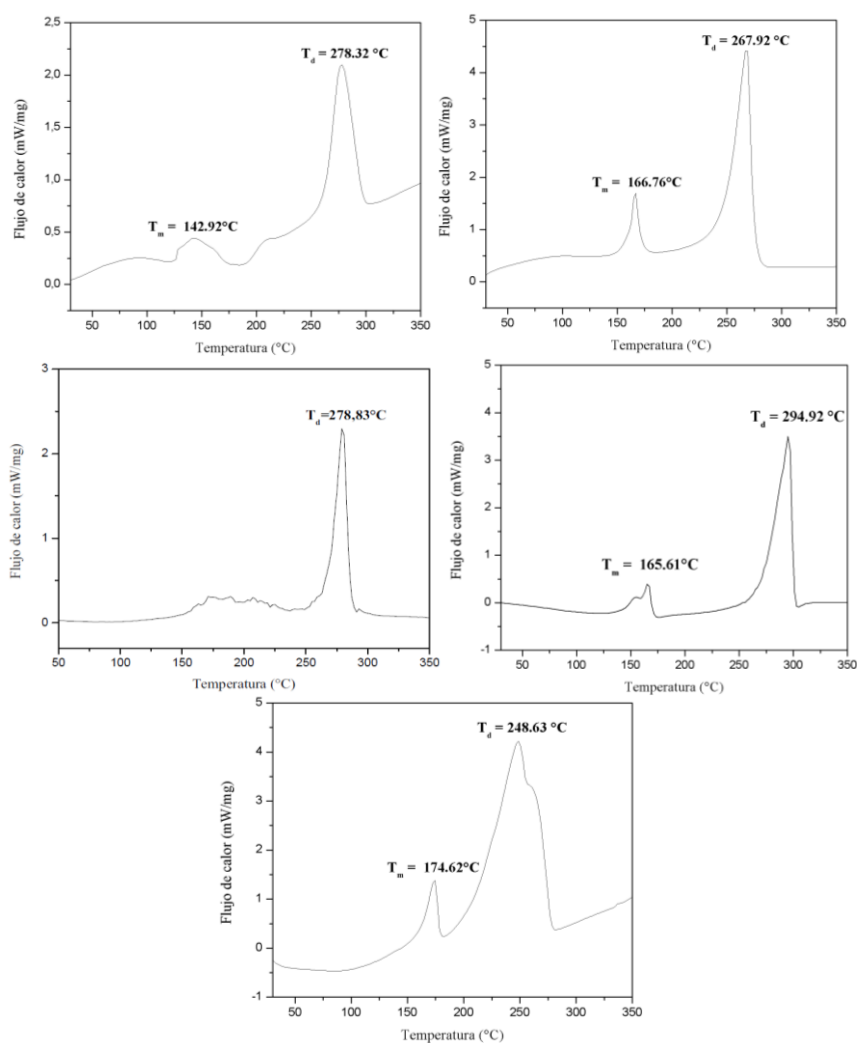
4.5.3 *Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).*

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que proporciona análisis cuantitativos de las propiedades finales de los materiales. Por medio de esta técnica se estudia los procesos donde se presentan una variación de entalpía como calores específicos, puntos de ebullición y fusión, entalpías de reacción, etc. (Pradhan, 2018).

Se empleó la técnica de DSC para analizar las transiciones térmicas del polímero ya que es un parámetro importante para identificar las aplicaciones potenciales de este biomaterial. En los termogramas DSC se reportan dos picos endotérmicos que corresponden a la temperatura de fusión (T_m) y a la temperatura de degradación (T_d) para el polihidroxibutirato recuperado utilizando diferentes métodos de extracción (figura 17). En el análisis de los termogramas se puede inferir que las temperaturas de fusión si se vieron afectadas significativamente por el método de extracción utilizado. Asimismo, los termogramas A y E (figura 17) presentan una variación en la línea base, esto puede ser debido a un cambio en la capacidad calorífica o en la masa de la muestra. (Rámirez Perez & Sánchez vargas, 2019).

Figura 17.

Termogramas de Calorimetría diferencial de barrido (DSC). PHB extraído utilizando BS + SDS + NaClO + C₂H₅OH (A), PHB extraído utilizando US + SDS + NaClO + C₂H₅OH (B), PHB extraído utilizando SCO₂ + SDS + NaClO + C₂H₅OH (C), PHB extraído utilizando CHCl₃ + NaClO + CH₃OH (D) y estándar de PHB (E).



En la tabla 13 se muestran todos los datos indexados de los termogramas. Midiendo el área del pico que tenemos para la fusión del polímero hallamos la entalpía de fusión de la muestra (ΔH_m). No se pudo calcular la entalpía de fusión del PHB recuperado de la muestra

donde se utilizó dióxido de carbono supercrítico, hipoclorito de sodio y etanol debido a que la zona donde saldría el pico de fusión (figura 17(c)) presentó varios picos. Indicando que la muestra contiene impurezas.

Tabla 13.

Propiedades térmicas adquiridas a partir del análisis DSC para cada método de extracción empleado en este trabajo, comparando los resultados obtenidos con la literatura.

	T_m (°C)	T_d (°C)	ΔH_m (J/g)	Referencia
BS+ SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	142.92	278.32	20.67	En este trabajo
Ultrasonicación + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	166.76	267.92	33.27	En este trabajo
SCO ₂ + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	-	278,83	-	En este trabajo
CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH	165.61	294.92	23,64	En este trabajo
Estándar de PHB	174.62	248.63	38.05	En este trabajo
Disrupción mecánica (mortero) + CHCl ₃ + CH ₃ OH	175.8	285	51.87	(Xiao, Jiao, Xiao, & Jiao, 2011)
CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH	159.4	NR	32.4	(Pérez-arauz, Aguilar-rabiela, Vargas-torres, & Rodríguez-hernández, 2019)

El termograma DSC (figura 17(B)) del biopolímero extraído con ultrasonificación, dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol mostró una temperatura de fusión de 166.76 °C y una entalpía de fusión de 33.27. Por medio de esta técnica de extracción se obtuvieron las propiedades térmicas más cercanas a los valores obtenidos con el estándar de PHB. Asimismo, los valores de las temperaturas de degradación del PHB obtenido con los diferentes métodos de extracción empleados en este trabajo son mayores que la temperatura de degradación del estándar de PHB (tabla 13). Demostrando que el PHB producido tiene una mayor resistencia a la degradación térmica en comparación con el estándar de PHB.

La razón detrás de las variaciones del punto de fusión, podría ser debido a la diferencia en la cristalinidad y en el peso molecular del polímero. El medio de crecimiento y el protocolo de extracción influyen en la resistencia térmica debido a la formación de PHB con diferentes pesos moleculares (Martínez-herrera et al., 2020b). Los valores obtenidos del punto de fusión utilizando los métodos de extracción a comparación del PHB comercial, indica que el polímero recuperado de la bacteria *Bacillus megaterium* B2 tiene un bajo peso molecular. No obstante, al tener un bajo peso molecular indica una baja cristalinidad y en consecuencia baja flexibilidad y resistencia a la tensión mecánica. Por lo que el biopolímero obtenido sería adecuado para la fabricación de botellas de plástico, envases de alimentos y películas resistentes al agua (Hsu, 2013).

Pérez y su equipo (Pérez-arauz et al., 2019) reportaron resultados similares en diferentes condiciones ambientales para la producción de PHAs con temperaturas de fusión en el rango de 146 a 153 °C.

4.5.4 *Análisis espectrometría de masas (MALDI-TOF).*

La elección de la ionización por desorción laser asistida por una matriz (MALDI) para el análisis de polímeros sintéticos o de origen natural suele proporcionar iones cuasimoleculares intactos y con carga simple en un rango de masas esencialmente limitado (Gross, 2004). Una de las características más relevantes de todos los materiales poliméricos es que su espectro de masas tendrá un comportamiento similar a una distribución Gaussiana o una campana de Gauss (Montaudo, Samperi, & Montaudo, 2006).

Los parámetros más importantes que se pueden determinar mediante MALDI son el peso molecular promedio en número (M_n) y el peso molecular promedio en peso (M_w) que se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

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

Donde M_i representa el peso de una cadena de polímero y N_i es el número de cadenas con ese mismo peso molecular. Los valores del peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso se pueden relacionar para hallar la distribución del peso molecular y de esta manera explicar la polidispersidad (PD). La polidispersidad se halla mediante la siguiente ecuación:

$$PD = \frac{M_w}{M_n}$$

En las figuras 18 y 19 se observan los espectros de masas en modo reflectrón y lineal respectivamente de la muestra extraída con el método donde se empleó la ultrasonificación, el

surfactante dodecilsulfato sódico, hipoclorito de sodio y etanol, ambos espectros de masas van desde las masas 1000 a 6000. En el modo lineal se permite ver la presencia de especies a mayores masas. Sin embargo, en este caso comparando el rango de masas de las figuras 18 y 19 se observa que no hay una gran diferencia entre los resultados obtenidos entre el modo lineal y el modo reflectrón. Esto se puede corroborar con los espectros en modo lineal y reflectrón del patrón de PHB (figuras 20 y 21). Por ende se escogió el modo reflectrón para tomar los espectros de las muestras faltantes.

Figura 18.

Espectro de masas de la muestra extraída con ultrasonificación + SDS + NaClO + C₂H₅OH en modo reflectrón.

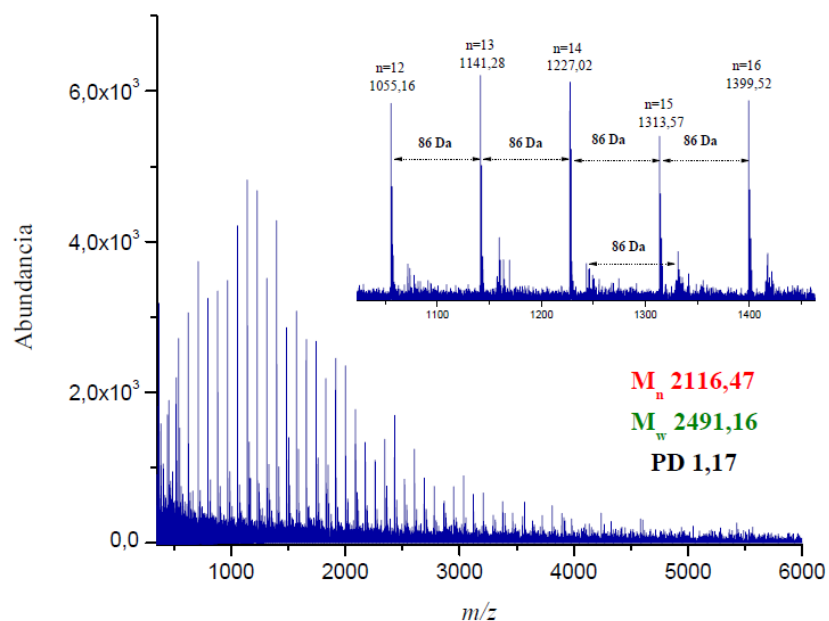
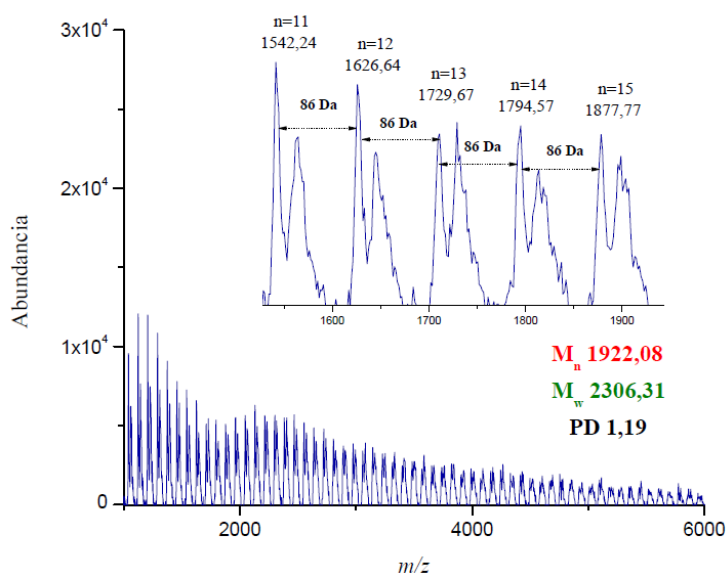


Figura 19.

Espectro de masas de la muestra extraída con ultrasonificación + SDS + NaClO + C₂H₅OH en modo lineal.

**Figura 20.**

Espectro de masas de la muestra extraída con SC₂O + SDS + NaClO + C₂H₅OH en modo reflectrón.

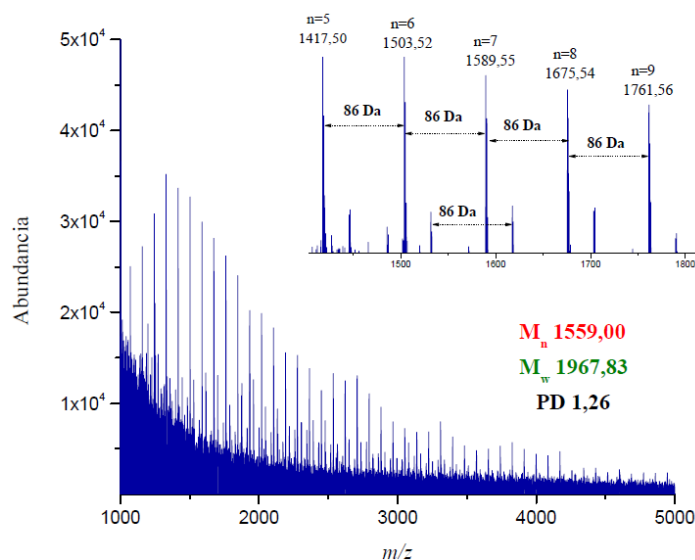
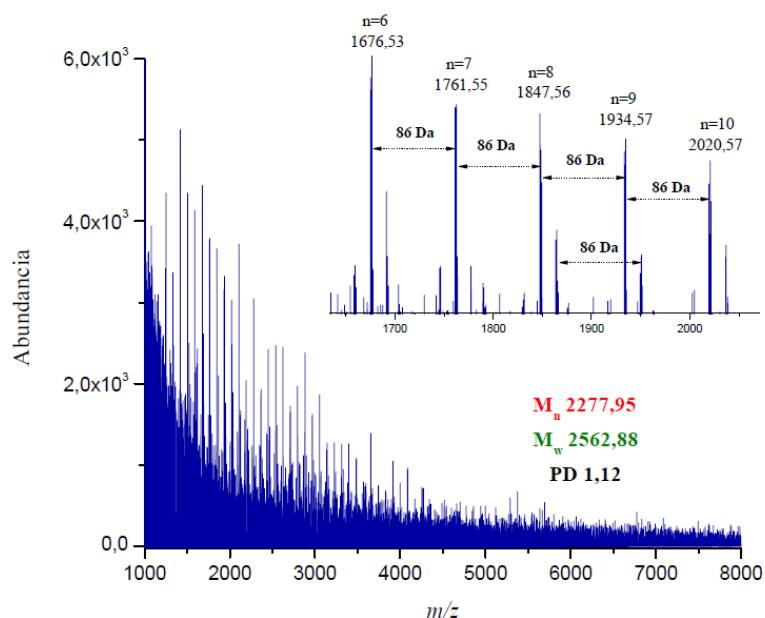


Figura 21.

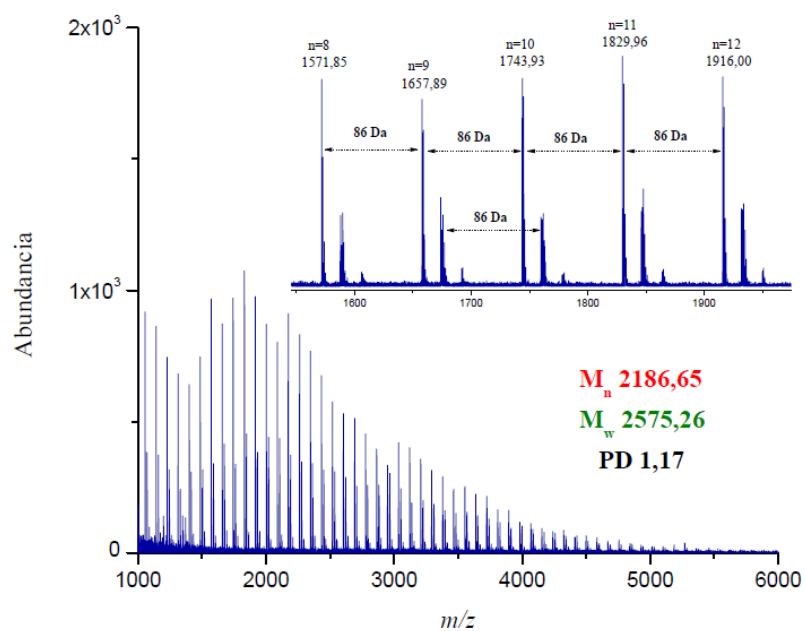
Espectro de masas de la muestra extraída con $\text{CHCl}_3 + \text{NaClO} + \text{CH}_3\text{OH}$ en modo reflectrón.



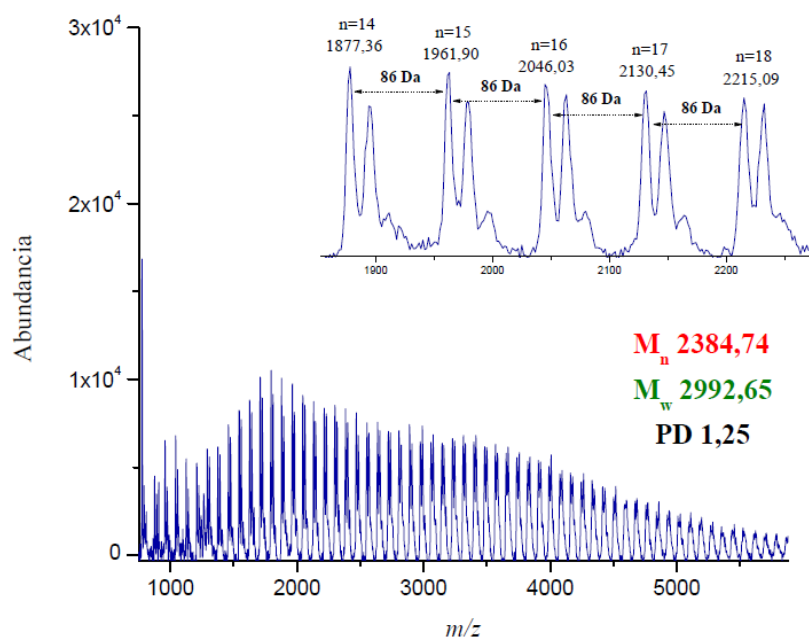
Para los espectros de las muestras extraídas tanto de los métodos alternativos como del método convencional presentaron una distribución gaussiana característica de los polímeros. Por otra parte, se detectaron señales de aductos de sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y de potasio $[\text{M}+\text{K}]^+$, debido a que estos elementos se encuentran presentes en el caldo de cultivo donde crece la bacteria productora de PHB. Cuando se realiza un acercamiento a cada espectro, se puede observar el mismo comportamiento de una repetición monotónica (86 Da) de unidades monoméricas que corresponden al ácido 3-hidroxibutírico. La técnica MALDI permite observar que la estructura es única y pertenece al homopolímero con la formula molecular $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n$, donde n puede variar de 10 hasta 50 unidades. Gracias a esta información se puede clasificar el polímero como un poliéster de longitud de cadena corta (tipo scl-PHB).

Figura 22.

Espectro de masas del patrón de PHB en modo reflectrón.

**Figura 23.**

Espectro de masas del patrón de PHB en modo lineal.



Cabe destacar que lo importante de los espectros (figuras 18-23) es el efecto de los métodos de extracción utilizados en el peso molecular promedio en número (M_n) y en la polidispersidad (PD). En la tabla 14 se indexan los resultados obtenidos en modo reflectrón para cada método.

Tabla 14.

Resumen de los resultados del análisis por espectrometría de masas del PHB sintetizado por Bacillus megaterium B2 y del estándar de PHB.

Método de extracción	M_n	PD
US + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	1559,00	1,26
SCO ₂ + SDS + NaClO + C ₂ H ₅ OH	2116,47	1,17
CHCl ₃ + NaClO + CH ₃ OH	2277,95	1,12
Patrón de PHB	2186,65	1,17

Para todos los métodos, la polidispersidad de los polímeros extraídos muestra la diferenciación que se presenta por los pesos moleculares y la amplitud de las distintas cadenas de una muestra de polímero. Normalmente el valor de la polidispersidad es ≥ 1 , ningún polímero tiene un valor de polidispersidad igual a 1, debido a que eso significa que todas las cadenas son iguales.

Los valores obtenidos para el patrón de PHB, para el método convencional y para el método donde se utiliza US + SDS + NaClO + C₂H₅OH, muestra que independientemente del disolvente, el tiempo de extracción o la técnica para la disrupción celular, los pesos

moleculares promedios de los polímeros extraídos no se vieron afectados de forma significativa. No obstante, la extracción con $\text{SCO}_2 + \text{SDS} + \text{NaClO} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ se observa por el valor del peso molecular promedio y por el valor de la polidispersidad que hay una pérdida de masa molar debido a la escisión aleatoria y del extremo de la cadena de las macromoléculas de PHB.

Heinrich y su equipo (Heinrich et al., 2012) extrajeron el polihidroxibutirato de una cepa recombinante de *S. blattae* ATCC 33430 con un método de extracción usando hipoclorito de sodio al 13% obteniendo un porcentaje de recuperación del 9,8% (p/p) y una polidispersidad de 1,45.

Aunque no se pudo calcular el peso molecular del polihidroxibutirato por medio de MALDI, los resultados obtenidos del MALDI confirmaron la estructura del polímero y determino con precisión las masas de los monómeros.

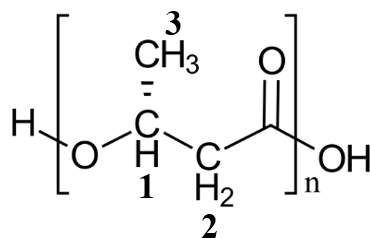
4.5.5 *Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN)*

Con los resultados de las caracterizaciones obtenidos anteriormente, se descarta el método donde se utilizó dióxido de carbono supercrítico, SDS, hipoclorito de sodio y etanol. Por lo que el método que tiene potencial para recuperar el polímero de las células es el cual se utiliza ultrasonificación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol.

Por resonancia magnética nuclear se procedió a estudiar las preferencias conformacionales del PHB obtenido por el método de ultrasonificación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol.

Figura 24.

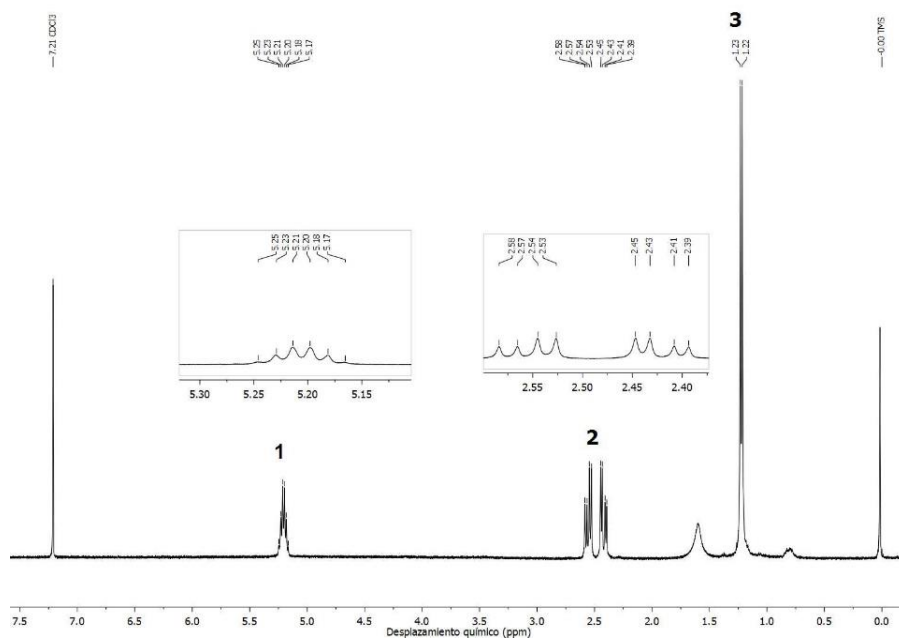
Estructura del polihidroxitirato enumerado con sus respectivos protones.



En la figura 24 se enumeraron los protones del monómero de PHB para la asignación de las señales.

Figura 25.

Espectro ¹H-RMN del polihidroxitirato extraído con el método de ultrasonificación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol.



El espectro de ^1H -RMN del polihidroxibutirato extraído por el método de ultrasonificación, SDS, hipoclorito de sodio y etanol, mostró la presencia de tres grupos de señales características del homopolímero PHB. Se evidencia el doblete en $\delta = 1.18$ y 1.24 ppm debido al grupo metilo **(3)** acoplado a un protón **(1)**. El doblete de cuadruplete a $\delta = 2.35$ y 2.60 ppm, atribuido al grupo metileno **(2)** adyacente a un carbono quiral, y el multiplete a $\delta = 5.14$ y 5.24 ppm debido al grupo metino **(1)**. El pico adicional observado en el rango $\delta = 1.54$ a 1.60 puede atribuirse a la presencia residual de agua.

5. Conclusiones

La especie *Bacillus* fue capaz de consumir y bioconvertir eficazmente el mucilago de cacao en polihidroxibutirato (PHB). Para el proceso de extracción del polihidroxibutirato a partir del microorganismo *Bacillus megaterium* B2 se desarrolló un método amigable con el medio ambiente y rentable. En el paso de la disrupción celular, el ultrasonido fue el que presentó menor pérdida de biomasa. El hipoclorito de sodio, el dodecilsulfato sódico y el etanol eliminaron eficazmente los restos celulares con un porcentaje de recuperación del polímero del 34,59% cercano al 41,37% obtenido con la extracción utilizando solventes clorados. A partir del análisis elemental se evidencio que el porcentaje de pureza del PHB recuperado resultó ser del 99,58% para el método de extracción donde se utilizó ultrasonificación, hipoclorito de sodio, dodecilulfato sódico y etanol. Incluso este método alternativo superó en pureza al patrón de PHB.

Por FTIR se confirmaron la presencia de los grupos funcionales requeridos en el PHB. Los resultados de la caracterización por DSC y TGA mostraron diferencias significativas en las propiedades térmicas de los polímeros recuperados con cada método de extracción. En

los resultados de TGA se evidencio una mejor estabilidad térmica para los polímeros sintetizados que para el estándar de PHB. Por MALDI-TOF se confirmó la identidad como polihidroxibutirato. Además, por ^1H -RMN se puede concluir que las células de *Bacillus megaterium* B2 cultivadas con mucílago de cacao como fuente de carbono producen PHA exclusivamente en forma de PHB. La razón probable detrás de las diferencias en los resultados obtenidos por TGA, DSC Y MALDI-TOF podría deberse a la variación en la cristalinidad y el peso molecular de la matriz polimérica. Sin embargo, por el método donde se empleó ultrasonificación, hipoclorito de sodio, dodecilsulfato sódico y etanol las propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas del PHB son similares a las del PHB estándar y al PHB extraído con solventes clorados.

6. Recomendaciones

Se recomienda en los próximos estudios aumentar la productividad y el porcentaje de acumulación variando el régimen de alimentación y el efecto de la concentración de carbono-nitrógeno. Además, escalar la producción a un nivel mayor de 4 L para poder implementar el método de extracción a mayor escala.

Adicionalmente, para complementar la información aportada por el MALDI, se podría implementar la técnica de la cromatografía de penetración con gel (GPC). La cual brinda información sobre el tamaño aproximado de los polímeros, aunque la confiabilidad del método es baja y depende de la solubilidad de los monómeros.

Por último para la aplicación en un futuro de las películas bioplásticas de PHB, se recomienda ampliar los estudios sobre el tema y realizar pruebas de las propiedades mecánicas.

Referencias bibliográficas

- Abid, S., & Banat, I. M. (2018). International Biodeterioration & Biodegradation Polyhydroxyalkanoates : Characteristics , production , recent developments and applications, 126(January 2017), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Annur, K. A. I. M. S. M., & Gumel, T. H. A. M. (2015). Ultrasound-Assisted Rapid Extraction of Bacterial Intracellular in Medium Mixture of Solvent / Marginal Non-solvent. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1833-4>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.003>
- Biology, M., Olavide, U. P. De, & Ctra, E. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams . A review Bernab e, 205. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Borah, B., Thakur, P. S., & Nigam, J. N. (2002). The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- b -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017, 776–783.
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pf, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids, (March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26612>

- Brigham, C. (2018). *Biopolymers : Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. Green Chemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3>
- Cannon, M. C. (2001). PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*, 183(14), 4235–4243. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4235>
- Cardozo, M., Escalante, H., Se, N., Moreno, P., Yan, C., 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, 32(6).
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorujos por medio de bacterias*. Universidad de Granada.
- Chae, Y., & An, Y. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem : A review *. *Environmental Pollution*, 240, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.008>
- Chen, Y., Xu, Q., Yang, H., & Gu, G. (2001). Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant – chelate aqueous system, 36, 773–779.
- Colombo, B., Calvo, M. V., Sciarria, T. P., Scaglia, B., Kizito, S. S., Imporzano, G. D., & Adani, F. (2019). Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes. *Waste Management*, 95, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.052>

- Cornish, K., & Xie, W. (2012). *Natural Rubber Biosynthesis in Plants : Rubber Transferase. Natural product biosynthesis by microorganisms and plants Part A* (1st ed., Vol. 515). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394290-6.00004-5>
- Dinjaski, N., & Prieto, A. (2015). Smart polyhydroxyalkanoate nanobeads by protein based functionalization. *Nanomedicine*, 11(4), 885–899. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.018>
- Dubey, S., Bharmoria, P., Gehlot, P. S., Agrawal, V., Kumar, A., & Mishra, S. (2018). 1-Ethyl-3-methylimidazolium Diethylphosphate Based Extraction of Bioplastic “polyhydroxyalkanoates” from Bacteria: Green and Sustainable Approach. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(1), 766–773. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03096>
- Dwivedi, R., Pandey, R., Kumar, S., & Mehrotra, D. (2020). Journal of Oral Biology and Craniofacial Research Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone sca ff olds, 10(November 2019), 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.004>
- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., De Aragão, G. M. F., & Reis, M. A. M. (2009). Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454–461. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900034>
- Gahlawat, G., & Soni, S. K. (2019). Study on Sustainable Recovery and Extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Produced by *Cupriavidus necator* Using Waste Glycerol for Medical Applications, 33(1), 99–110. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1471>

- Gonzalez Gutierrez, M. G. (2008). *Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género Bacillus de origen marino*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Grage, K., Mcdermott, P., & Rehm, B. H. A. (2017). Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials. *Microbial Cell Factories*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0823-5>
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry* (1st ed.). Berlin, Heidelberg.
- Hampson, J. W., & Ashby, R. D. (1999). Extraction of Lipid-Grown Bacterial Cells by Supercritical Fluid and Organic Solvent to Obtain Pure Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoates, 76(11), 1371–1374.
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly (3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite, 1–6.
- Hejazi, P., Vasheghani-farahani, E., & Yamini, Y. (2003). Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly (-hydroxybutyrate) Recovery.
- Hsu, S. H. H. (2013). Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate, 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2503-3>
- Israni, N., & Shivakumar, S. (2019). *Chapter 13. Polyhydroxybutyrate: development and applications as a biodegradable biotextile. Materials for Biomedical Engineering: Biopolymer Fibers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00014-5>

Israni, N., Venkatachalam, P., Gajaraj, B., Varalakshmi, K. N., & Shivakumar, S. (2020).

Whey valorization for sustainable polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus megaterium*: Production, characterization and in vitro biocompatibility evaluation.

Journal of Environmental Management, 255(December 2019), 109884.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109884>

Jose, D. V. S. Æ., Filomena, M., Elda, A. R. Æ., Silva, S., Maiorano, A. E., & Biopolymers,

P.--butyrate Á. (2008). Purification of polyhydroxybutyrate produced by

Burkholderia cepacia IPT64 through a chemical and enzymatic route, 771–775.

<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9537-x>

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial

polyhydroxyalkanoates, 40(September 2003), 607–619.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>

Khosravi-darani, K., & Vasheghani-farahani, E. (2004). Effect of Process Variables on

Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly (R - hydroxybutyrate) Recovery.

Koller, M., & Niebelschütz, H. (2013). Strategies for recovery and purification of poly [(R

) -3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass, 1, 549–

562. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300021>

Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial

polyhydroxyalkanoates, 5(7), 620–634.

<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>

- Kurian, N. S., & Das, B. (2021). International Journal of Biological Macromolecules Comparative analysis of various extraction processes based on economy , eco-friendly , purity and recovery of polyhydroxyalkanoate : A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183(May), 1881–1890. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007>
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic, 63(1), 21–53.
- Madkour, M. H., Heinrich, D., Alghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2013). PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules*, 14(9), 2963–2972. <https://doi.org/10.1021/bm4010244>
- Martínez-herrera, R. E., Alemán-huerta, M. E., Almaguer-cantú, V., Rosas-flores, W., Martínez-gómez, V. J., Quintero-zapata, I., Rivera, G., & Rutiaga-quiñones, O. M. (2020a). International Journal of Biological Macromolecules Ef fi cient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound, 164, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.101>
- Martínez-herrera, R. E., Alemán-huerta, M. E., Almaguer-cantú, V., Rosas-flores, W., Martínez-gómez, V. J., Quintero-zapata, I., Rivera, G., & Rutiaga-quiñones, O. M. (2020b). International Journal of Biological Macromolecules Ef fi cient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.101>

- Mesa Beltrán, É. S., Romero Isaza, S. P., Quintero Silva, M. J., & Lambis Benítez, L. E. (2021). *Ajuste de las condiciones nutricionales del medio de cultivo en la producción de polihidroxibutirato (PHB) por Bacillus megaterium B2 a partir de residuos líquidos de cacao*. Universidad Industrial de Santander.
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Charan, C., & Samantaray, D. (2017). Bacillus and biopolymer : Prospects and challenges, 12(October), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Montaudo, G., Samperi, F., & Montaudo, M. S. (2006). Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS, 31, 277–357. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.12.001>
- Pérez-arauz, A. O., Aguilar-rabiela, A. E., Vargas-torres, A., & Rodríguez-hernández, A. (2019). Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil, 20(January). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>
- Pernicova, I., Kucera, D., Nebesarova, J., Kalina, M., & Novackova, I. (2019). Bioresource Technology Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected Halomonas strains. *Bioresource Technology*, 292(July), 122028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>
- Pradhan, S. (2018). Production , ultrasonic extraction , and characterization of poly (3 - hydroxybutyrate) (PHB) using Bacillus megaterium and Cupriavidus necator, (May), 1–9. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>

- Pradhan, S., Borah, A. J., Poddar, M. K., Dikshit, P. K., Rohidas, L., & Moholkar, V. S. (2017). Microbial Production , Ultrasound – Assisted Extraction and Characterization of Biopolymer Polyhydroxybutyrate (PHB) from Terrestrial (*P . hysterophorus*) and Aquatic (*E . crassipes*) Invasive Weeds Department of Chemical Engineering , 2 Center for Energy , Indian Institute of Technology Department of Chemical Engineering , National Institute of Technology (NIT),. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.117>
- Rámirez Perez, L. A., & Sánchez vargas, D. (2019). *Evaluación de diferentes mezclas de polihidroxibutirato (P3HB) con aditivos para la obtención de un material polimérico*. Fundación Universidad de América.
- Rilfors, L., Wieslander, A. K. E., & Stahl, S. (1978). Lipid and Protein Composition of Membranes of *Bacillus megaterium* Variants in the Temperature Range 5 to 70 ° C, *135*(3), 1043–1052.
- Rivera-briso, A. L., & Serrano-aroca, Á. (2018). Enhancement Strategies for Advanced Applications, 1–28. <https://doi.org/10.3390/polym10070732>
- Rooy, S. L. De, Wahyuni, E. T., Syamsiah, S., & Ismail, J. (2007). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLY-HYDROXYBUTYRATE (PHB) IN *CUPRIAVIDUS NECATOR*, *7*(3), 243–248.
- Rujni, M. (2020). *Biodegradable plastics*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00005-0>
- Ryan, S., Fathi, A., Bahramian, B., Manavitehrani, I., Mcclure, D. D., Valtchev, P., Schindeler, A., Dehghani, F., & Kavanagh, J. M. (2020). *The Journal of Supercritical*

- Fluids A green process for the purification of biodegradable poly (β - hydroxybutyrate). *The Journal of Supercritical Fluids*, 135(October 2017), 84–90.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.007>
- Saavedra-Sanabria, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 1–51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118645>
- Schmid, M. T., Song, H., Raschbauer, M., Emerstorfer, F., Omann, M., Stelzer, F., & Neureiter, M. (2019). Utilization of desugarized sugar beet molasses for the production of poly (3- hydroxybutyrate) by halophilic *Bacillus megaterium* uyuni S29. *Process Biochemistry*, 86(August), 9–15.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.001>
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review, 25, 148–175.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>
- Thomas, C., & Roy, I. (2018). Tissue Engineering : Polyhydroxyalkanoate-Based Materials and Composites Tissue Engineering : Polyhydroxyalkanoate-Based Materials and Composites, (July 2019). <https://doi.org/10.1201/9781351019422-140000458>
- Vásquez, Z. S., Carvalho, D. P. De, Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, P. Z. De, Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes, A., & Soccol, C. R. (2019).

- Biotechnological approaches for cocoa waste management : A review, 90, 72–83.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Viuda-martos, M., Delgado-ospina, J., Lucas-gonz, R., & Martuscelli, M. (2021). Heliyon Bioactive compounds and techno-functional properties of high- fi ber co-products of the cacao agro-industrial chain, 7(December 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06799>
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., & Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*, (iv).
- Wang, B., Sharma-shivappa, R. R., Olson, J. W., & Khan, S. A. (2013). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops & Products*, 43, 802–811. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.011>
- Xiao, N., Jiao, N., Xiao, N., & Jiao, N. (2011). Formation of Polyhydroxyalkanoate in Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria and Its Relationship to Carbon Source and Light Availability Formation of Polyhydroxyalkanoate in Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria and Its Relationship to Carbon Source and Light Availability □. <https://doi.org/10.1128/AEM.05955-11>
- Yousuf, R. G. (2017). NOVEL POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION USING A WASTE DATE SEED FEEDSTOCK.
- Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H., & Gozan, M. (2019). Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18(June 2018), 101019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.057>

Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using bacillus megaterium R11. *Bioresource Technology*, 147, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.029>