

Evaluación de la cáscara de papaya como sustrato nutricional para la producción de bioplástico
en bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA)

Julián Ricardo González Corredor

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Dr. William Fernando Hidalgo Bucheli

Químico. Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A Dios, fuente inagotable de calma en la tormenta, aliento incesante en la fatiga, por su presencia que nunca falla y por la luz que me guio en cada paso de este camino.

A mis queridos padres, Héctor González y Yaniz Corredor, cimientos y faros de mi vida, quienes me criaron con un amor que no conoce límites, me guiaron con una sabiduría impecable y me enseñaron a soñar, a creer que el esfuerzo es la semilla de todo logro. Gracias por forjar en mí el hombre que soy; por ser mi motor. Este triunfo es, y siempre será, suyo.

A mi incondicional hermano, David González, por ser la perfecta definición de hermano y amigo. Por cada momento compartido, por cada risa, por cada partido de tenis que nos unió. Gracias por tu consejo certero y tu inquebrantable fortaleza. A ti, mi querido Pequeño Pedrete mis victorias también serán siempre tuyas.

A la Química, por ser refugio donde encontré pasión y esperanza. Por cada noche en vela, por cada experimento fallido y cada pequeña victoria. Por la alegría inmensa de entender un poco más.

Agradecimientos

A mi director Dr. William Hidalgo, cuya invaluable sabiduría, perspicaz guía y su completo compromiso fueron pilares fundamentales en cada etapa de nuestra investigación. Gracias por la oportunidad de realizar mi trabajo de grado en su laboratorio, espacio donde pude consolidar mi carácter científico y mi vocación por la ciencia.

A mi Alma mater, la Universidad Industrial de Santander (UIS), por haberme acogido como mi segundo hogar durante estos años de formación. Por su infraestructura, por sus recursos y facilidades que pusieron a mi disposición, y por ser el espacio donde pude crecer no solo como profesional, sino también como persona. Guardare siempre un profundo respeto y cariño por esta institución que me abrió sus puertas.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica de Productos Naturales y al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). Por haberme brindado sus espacios, la infraestructura y el ambiente propicio para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

A mi equipo, la Selección de Tenis de mesa UIS, por ser mi fuga en momentos difíciles. Gracias por cada entrenamiento que despejo mi mente y por despertar en mí, el espíritu competitivo. A mis compañeros de equipo.

A mi entrenador Juan Pablo, quien más que un guía en el deporte, fue un maestro de vida. Gracias por su exigencia y por su amistad incondicional, por enseñarme que la disciplina y la pasión son tan importantes en el laboratorio como en la mesa de juego.

A ti, Isa, compañera indispensable en este viaje. Gracias por ser parte fundamental de mi carrera, por tu sabiduría para hacerme crecer, y por ser faro y ancla. Este logro, sin duda, también es tuyo.

A mis compañeras de laboratorio Melisa, Gabby, Yuliany, Ana y Jhoanna, por su compañía constante, por las risas compartidas, y por cada palabra de aliento que me recordó que no estaba solo en este proceso.

A Wen, por llegar inesperadamente a mi vida y recordarme que, entre ecuaciones y experimentos, también hay que saber disfrutar del camino, gracias por tu amistad sincera, por ser refugio, por ser esa brisa que refresca y calma.

Tabla de contenido

Introducción	17
1. Objetivos	20
2. Marco teórico	21
2.1 Plásticos biodegradables y polihidroxicarboxilatos (PHA)	21
2.1.1 Polihidroxicarboxilatos (PHA): Generalidades	22
2.1.2 Propiedades físicas y químicas	23
2.1.3 Tipos de PHA y aplicaciones	24
2.2 Producción de PHA	29
2.2.1 Procesos y tecnologías de producción	29
2.2.2 Fuentes de carbono para la síntesis de PHA	30
2.2.3 Microorganismos productores de PHA y condiciones óptimas	31
2.2.4 Biosíntesis de PHA	33
2.3.1 Métodos químicos	35
2.3.2 Métodos físicos	35
2.3.3 Métodos biológicos	36
2.4 Uso de residuos agrícolas en la producción de PHA	37
2.4.1 Importancia de los residuos como materia prima	37
2.4.2 Caracterización de residuos agrícolas para la producción de PHA	38
2.4.3 Aprovechamiento y valorización potencial de la cáscara de papaya	39
2.4.4 <i>Carica papaya</i> : cultivo y generalidades	40
2.4.5 Residuos de papaya, un subproducto subestimado	41
2.4.6 Producción de PHA a partir de diversas matrices agroindustriales.	42
2.5.1 Impacto ambiental de la producción de PHA	44
2.5.2 Comparación con la producción convencional de plásticos	45
3. Antecedentes	46
4. Metodología	54
Etapa 1: Recolección y preparación de la muestra de cáscara de papaya	55

4.1 Materia prima	55
4.2 Preparación de la muestra de cáscara de papaya.....	55
4.2.1 Secado y triturado de la cáscara de papaya	55
4.2.2 Hidrólisis ácida y preparación del extracto acuoso de la cáscara de papaya.....	57
4.3 Determinación del contenido de azúcares reductores totales y proteínas en el extracto acuoso e hidrolizado de la cáscara de papaya.	58
4.3.1 Preparación del reactivo ácido 3.5-dinitrosalicílico (DNS).....	58
4.3.2 Preparación de la curva de calibración de dextrosa.....	59
4.3.3 Cuantificación de azúcares reductores totales	60
4.3.4 Cuantificación de carbohidratos totales.....	60
4.3.5 Identificación y cuantificación de azúcares por UPLC-MS	61
4.4 Cuantificación de proteínas solubles en los extractos acuoso e hidrolizado.....	63
4.4.1 Preparación del reactivo de Bradford	63
4.4.2 Preparación del reactivo de Buffer fosfato (pH 7)	63
4.4.3 Preparación de la curva de calibración con Albúmina de suero bovino (BSA)	63
4.5 Tratamiento con carbón activado.	64
4.6 Cuantificación de compuestos fenólicos por método de Folin-Ciocalteu.....	65
4.7 Análisis fisicoquímico de la cáscara de papaya	66
Etapas 2: Activación de cepa bacteriana y preparación de medios de cultivo modificados.....	68
4.8 Preparación de medio de cultivo y repique	68
4.9 Preparación de medio de activación e inoculación del cultivo	69
4.10 Preparación y ajuste de medios de cultivo modificados.	70
4.11 Ensayo preliminar de fermentación en medios modificados y monitoreo de crecimiento bacteriano	71
Etapas 3: Obtención de biomasa bacteriana, acumulación y extracción de PHA	72
4.12 Diseño de experimentos (Diseño central compuesto– respuesta de superficie CCD-RSM)	72
4.12.1 Preparación de medios de cultivo líquidos modificados según el diseño experimental (DCC-RSM).....	72
4.12.2 Efecto de la temperatura de incubación.....	73
4.12.3 Efecto del pH inicial.	73
4.12.4 Efecto de la relación de inóculo.	73
4.12.5 Efecto de la concentración de extracto de cáscara de papaya como fuente de carbono.	74

4.12.6 Estratificación experimental por bloques (Bloques 1-5)	74
4.13 Determinación de la biomasa seca	74
4.14 Identificación y extracción del PHA producido por el aislado bacteriano	75
4.12.6 Parámetros de fermentación.	76
4.15 Análisis estadístico	77
Etapa 4: Verificación y validación de las condiciones de cultivo optimizadas según CCD-RSM y análisis instrumental.....	78
4.16 Preparación de medio optimizado, fermentación y extracción del biopolímero.....	78
4.17 Curva de consumo de fuente de carbono en medio optimizado.....	78
4.18 Caracterización mediante FTIR	79
4.19 Caracterización mediante MALDI-TOF/TOF.....	79
5. Análisis de resultados y discusión.....	82
5.1 Preparación de la materia prima: Deshidratación y caracterización	82
5.2 Selección y justificación del método de preparación del sustrato de fermentación.....	84
5.2.1 Evaluación del tiempo de extracción para el extracto acuoso	86
5.2.2 Análisis comparativo de los métodos de pretratamiento	87
5.3 Caracterización del sustrato (extracto acuoso).....	90
5.3.1 Perfil de carbohidratos por UPLC-MS	90
5.3.2 Composición fisicoquímica y perfil de minerales de la cáscara de papaya.....	94
5.4 Adecuación de los hidrolizados ácidos mediante adsorción con carbón activado.	96
5.4.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano.	98
5.4.2 Producción preliminar de biomasa y rendimientos de extracción de PHA	100
5.5 Optimización de la producción de PHA mediante diseño central compuesto (DCC-RSM).	101
5.5.1 Ajuste y validación del modelo matemático.....	103
5.5.2 Efecto de los factores experimentales sobre la respuesta.	105
5.5.3 Análisis de las interacciones entre factores.	108
5.6 Ecuación del modelo matemático, optimización factorial y validación experimental.....	111
5.7 Caracterización del proceso optimizado y del biopolímero	115
5.7.1 Cinética de consumo de sustrato bajo condiciones de optimización.....	115
5.7.2 Identificación de grupos funcionales clave por espectroscopía infrarroja (FTIR).	117
5.7.3 Caracterización molecular por MALDI-TOF/TOF-MS.	118
6. Conclusiones	122

Referencias bibliográficas..... 124
Apéndices..... 138

Lista de Figuras

Figura No. 1 Estructura general de los polihidroxialcanoatos (R = grupos alquilo C1-C13, x = C1 - C4).....	24
Figura No. 2 Estructura del Poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (PHBV)	26
Figura No. 3 Placa de fijación ósea de dos pernos fabricada en PHB	26
Figura No. 4 Biodegradación de botella de PHA, tipo Biopol™, mediante incubación en lodo durante 80 días	27
Figura No. 5 Biodegradación de película de acolchado de PHB para agricultura expuesta en plantaciones de soja: (a) película original, (b) 45 días de exposición, (c) 70 días de exposición. 28	
Figura No. 6 Hilo de PHB, jersey y detalle del tejido confeccionado por tejeduría de punto por trama	29
Figura No. 7 Vías biosintéticas principales de PHA.....	33
Figura No. 8 Tendencia en las publicaciones que involucran residuos orgánicos como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA).....	50
Figura No. 9 Mapa de agrupación que correlaciona las palabras clave mas influyentes según los resultados suministrados por de Scopus.	51
Figura No. 10 Esquema metodológico.....	54
Figura No. 11 Cambios físicos en la cáscara de papaya durante el secado.	83
Figura No. 12 Cinética de deshidratación de la cáscara de papaya a 50 °C.	84
Figura No. 13 Comparación visual de los extractos.	85
Figura No. 14 Mecanismo de reacción para la deshidratación de D-glucosa en medio ácido para formar 5-hidroximetilfurfural (HMF).....	86

Figura No. 15 Perfil cromatográfico obtenido por UPLC-QDa del extracto acuoso de cáscara de papaya.	91
Figura No. 16 Espectro de masas de la señal cromatográfica en $t_r= 4.94$ min obtenida por UPLC-QDa.....	92
Figura No. 17 Espectros de masas (ESI-) correspondientes a los picos cromatográficos en $t_r = 1.83$ min (A) y $t_r = 5.25$ min (B).....	94
Figura No. 18 Eficacia del tratamiento de detoxificación con carbón activado para la remoción de compuestos fenólicos en los diferentes extractos.....	97
Figura No. 19 Curvas de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en los diferentes extractos de cáscara de papaya. (EA: Extracto Acuoso; EH: Extracto Hidrolizado; TC: Tratado con Carbón Activado; NT: No Tratado).....	99
Figura No. 20 Análisis Box-Cox para confirmar el efecto de la transformación sobre la respuesta	104
Figura No. 21 Gráficos de superficie de respuesta (3D) y de contorno (2D).	109
Figura No. 22 Comparación de los parámetros productivos finales entre el sustrato optimizado de extracto acuoso de papaya (EA (ROP)) y el control con glucosa (Control (C)).....	112
Figura No. 23 Curvas de crecimiento bacteriano comparando las réplicas del ensayo de optimización con extractos de papaya (ROP 1, 2, 3) y los controles con glucosa (C 1, 2, 3).	114
Figura No. 24 Cinética de consumo de Carbohidratos Totales y Carbohidratos Reductores por <i>B. thuringiensis</i> durante la fermentación en el medio optimizado a base de extracto acuoso de papaya.	115
Figura No. 25 Espectros de FTIR del biopolímero producido por <i>B. thuringiensis</i>	117

Figura No. 26 Espectros de masas MALDI-TOF: (A) estándar comercial de P(3HB), (B) polímero obtenido de cáscara de papaya, y (C) polímero obtenido de glucosa.....	119
Figura No. 27 Detalle del espectro de masas mostrando la serie de picos principal con una diferencia de 86 Da, correspondiente a la unidad repetitiva de 3-hidroxi-butirato.....	120

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación por grupos de PHA según la longitud de la cadena del monómero.	24
Tabla 2. Porcentajes de acumulación total de PHA utilizando residuos de frutas como única fuente de carbono.....	43
Tabla 3. Ecuaciones parámetro para caracterización de señales MALDI-MS TOF/TOF.....	82
Tabla 4. Concentración de azúcares reductores (g/L) en el extracto acuoso de cáscara de papaya en función del tiempo de extracción.	87
Tabla 5. Resumen de la Composición Química de los Extractos de Cáscara de Papaya.....	87
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica y perfil de minerales de la cáscara de papaya.	94
Tabla 7. Resultados de producción de biomasa y PHA tras 72 horas de fermentación en los diferentes extractos de cáscara de papaya.....	100
Tabla 8. Matriz del Diseño Central Compuesto y resultados experimentales para la producción de PHA.....	102
Tabla 9. Resultados del experimento de validación bajo condiciones óptimas, comparando el sustrato de extracto acuoso de papaya (ROP) con un control de glucosa (C).	112
Tabla 10. Propiedades de distribución molecular de los polímeros analizados, calculadas a partir de las dos series de oligómeros observados.....	121
Tabla 11. Comparación entre masas teóricas y experimentales de PHB biosintetizados a partir de cáscara de papaya con monómeros repetitivos de 75 Da y 86 Da.	121

Lista de Apéndices

Apéndice. 1 Cáscaras de papaya provenientes de distintos lugares de recolección. Disposición para secado al sol.	139
Apéndice. 2 cáscaras de papaya seca, reducción de tamaño y pulverizado.....	139
Apéndice. 3 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo DNS para la determinación de azúcares reductores totales en cáscara de papaya.....	139
Apéndice. 4 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración DNS.....	140
Apéndice. 5 Curva de calibración DNS.....	140
Apéndice. 6 Soluciones patrón para la determinación de la curva de calibración del ensayo Antrona para determinación de carbohidratos totales en cáscara de papaya.	140
Apéndice. 7 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Antrona.....	141
Apéndice. 8 Curva de calibración Antrona.....	142
Apéndice. 9 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración para el análisis UPLC de sacarosa.....	142
Apéndice. 10 Áreas promedio de las señales cromatográficas obtenidas para las soluciones patrón de sacarosa para el análisis por UPLC.....	142
Apéndice. 11 Curva de calibración de sacarosa (UPLC).....	143
Apéndice. 12 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo Bradford para la determinación de proteínas en cáscara de papaya.	143
Apéndice. 13 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Bradford.....	144

Apéndice. 14 Curva de calibración Bradford.	144
Apéndice. 15 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo Folin-Ciocalteu para la determinación de proteínas en cáscara de papaya.	145
Apéndice. 16 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Folin-Ciocalteu.	145
Apéndice. 17 Curva de calibración Folin-Ciocalteu.	146
Apéndice. 18 Soluciones patrón y absorbancias para la preparación de la curva de calibración McFarland para la el ajuste de los inóculos.	146
Apéndice. 19 Curva de calibración McFarland.	147
Apéndice. 20 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para extractos acuosos.	147
Apéndice. 21 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para extractos hidrolizados y extracto acuoso seleccionados.	148
Apéndice. 22 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la concentración de Proteínas Solubles (g/L).	148
Apéndice. 23 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la Concentración de Compuestos Fenólicos (ppm).	149
Apéndice. 24 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la Concentración de Compuestos Fenólicos (ppm) en los diferentes tratamientos con carbón activado.	149
Apéndice. 25 Diseño central compuesto (DCC) propuesto por el software Desing-Expert®...	150
Apéndice. 26 Curva de extracción acuosa de azúcares en diferentes.	151
Apéndice. 27 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 1 (30°C).	152
Apéndice. 28 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 2 (37°C).	152
Apéndice. 29 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 3 (44°C).	153

Apéndice. 30 Curva de crecimiento para el único ensayo del Bloque 4 (23°C).....	153
Apéndice. 31 Efecto de la transformación logarítmica sobre las estadísticas de ajuste.	154
Apéndice. 32 Efecto de la transformación logarítmica sobre la homocedasticidad de la varianza de los residuos.....	154
Apéndice. 33 Efecto de la transformación sobre la normalidad de los residuos transformación sobre las respuestas predichas vs. respuestas actuales.	155
Apéndice. 34 Gráfico distancia de Cook para determinar valores atípicos.	155
Apéndice. 35 Resumen de ajustes para modelos: lineal, dos interacciones (2FI), cuadrático y cubico.....	155
Apéndice. 36 Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático ajustado a la Productividad Volumétrica de PHA.	156
Apéndice. 37 Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la productividad volumétrica determinada en los ensayos de validación.	156
Apéndice. 38 Parámetros experimentales de optimización según DCC-RSM.	157
Apéndice. 39 Análisis confirmatorio mediante intervalo de predicción 95%.	157

Resumen

Título: Evaluación de la cáscara de papaya como sustrato nutricional para la producción de bioplástico en bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA)*

Autor: Julián Ricardo González Corredor**

Palabras Clave: Bioplástico, polihidroxicanoatos, cáscara de papaya, *Bacillus thuringiensis*.

Descripción: Los plásticos convencionales, derivados de recursos fósiles, son ampliamente utilizados en la industria y en nuestro diario vivir, sin embargo, su naturaleza no renovable y su alta resistencia a la biodegradación generan gran acumulación de residuos con efectos negativos sobre ecosistemas y la salud. En respuesta a esta problemática, los bioplásticos tipo polihidroxicanoatos (PHA), producidos intracelularmente por diversos microorganismos como reserva de carbono y energía, representan una alternativa sostenible para la sustitución de plásticos de origen fósil. No obstante, su alto costo de producción asociado principalmente a los sustratos empleados, ha limitado fuertemente su competitividad. Bajo este contexto, el aprovechamiento de subproductos agrícolas, como los residuos de frutas y verduras, representan una estrategia clave para reducir costos de producción, fomentar la economía circular y mitigar la contaminación ambiental. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar y optimizar la producción de PHA utilizando un extracto de cáscara de papaya con una cepa nativa bacteriana de *Bacillus thuringiensis*, mediante un diseño central compuesto por superficies de respuesta (CCD – RSM). Este análisis permitió establecer las condiciones óptimas de cultivo (31 °C, pH 5.6, 10.10 g/L en azúcares reductores y 4.0% v/v de inóculo), bajo las cuales la cepa *Bacillus thuringiensis* produjo una acumulación total de 2.67 g/L de PHA, con un notable porcentaje de acumulación del 80.8% (p/p) y una productividad volumétrica de $0.0371 \frac{g \cdot L}{h}$. El biopolímero obtenido fue caracterizado mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FITR) y espectrometría de masas ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI TOF/TOF-MS), confirmando su identidad como poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)), con una distribución molecular monodispersa y parámetros comparables a los de un estándar comercial. Estos resultados resaltan el potencial uso de la cáscara de papaya como fuente de carbono renovable y económica para la producción sostenible de bioplásticos tipo polihidroxicanoatos, contribuyendo a la valorización de residuos y a la economía regional.

*Trabajo de grado

** Facultad, de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Título académico completo de mayor rango: Doctor en Química

Abstract

Title: Evaluation of papaya peel as a nutritional substrate for bioplastic production in polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria*

Author: Julián Ricardo González Corredor**

Keywords: Bioplastic, polyhydroxyalkanoates, papaya peel, *Bacillus thuringiensis*.

Description: Conventional plastics, derived from fossil resources, are widely used in industry and in our daily lives, however, their non-renewable nature and high resistance to biodegradation generate a large accumulation of waste with negative effects on ecosystems and health. In response to this problem, polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics, produced intracellularly by various microorganisms as a carbon and energy reserve, represent a sustainable alternative for the replacement of fossil plastics. However, their high production cost, mainly associated with the substrates used, has severely limited their competitiveness. In this context, the use of agricultural by-products, such as fruit and vegetable waste, represents a key strategy to reduce production costs, promote the circular economy and mitigate environmental pollution. The present research aimed to evaluate and optimize the production of PHA using a papaya peel extract with a bacterial strain of *Bacillus thuringiensis*, by means of a central design composed of response surfaces (CCD - RSM). This analysis allowed establishing the optimal culture conditions (31 °C, pH 5.6, 10.10 g/L in reducing sugars and 4.0% v/v inoculum), under which the *Bacillus thuringiensis* strain produced a total accumulation of 2.67 g/L PHA; with a yield of 80.8% p/p and a volumetric productivity of $0.0371 \frac{g \cdot L}{h}$. The obtained biopolymer was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FITR) and matrix-assisted laser ionization/desorption mass spectrometry (MALDI TOF/TOF-MS), confirming its identity as poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)), with a monodisperse molecular distribution and parameters comparable to those of a commercial standard. These results demonstrate the potential of papaya peel as a renewable and economical carbon source for the sustainable production of polyhydroxyalkanoate-type bioplastics, contributing to the valorization of waste and to the regional economy.

*Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Full academic title of highest rank: Doctor in Chemistry

Introducción

La elevada contaminación ambiental de medios terrestres y marinos, debido a la masiva producción de polímeros generados a partir de recursos fósiles, representa una fuerte amenaza para los ecosistemas naturales y desata diversos problemas para la salud pública en general. El aumento desenfrenado en la producción y comercialización de polímeros de toda índole ha alcanzado cifras de producción nunca antes vistas. En 2022, se produjeron aproximadamente 413.8 millones de toneladas métricas, lo que representó un mercado mundial de 712 mil millones de dólares, con perspectivas de triplicarse para el año 2060(Statista, 2024). Actualmente, China lidera esta industria, seguida por Estados Unidos y Canadá (Collantes et al., 2017). Específicamente, en Colombia el consumo per cápita (consumo promedio por persona) ronda los 24 kg por año, lo que representa un consumo total de 1.3 millones de toneladas anuales, cifra de la cual el 56% corresponde a plásticos de un solo uso, como empaques y envases de tereftalato de polietileno (PET). Siendo el polietileno (PE), poliestireno (PS) y el polipropileno (PP), los principales tipos de plásticos que abarcan la mayor parte del mercado y que tienen una gran demanda industrial (EMR, 2025).

La alta resistencia a la degradación y durabilidad de los plásticos sintéticos los han convertido en un desecho difícil de eliminar y reciclar; la crisis actual por plásticos revela que solo se recicla el 9% de lo que se consume, mientras que el porcentaje restante termina en ecosistemas naturales generando desafíos ambientales significativos (Walker & Fequet, 2023). En particular los plásticos representan una amenaza para la salud pública, con efectos altamente perjudiciales en sistemas vitales como el renal, gastrointestinal y respiratorio, atribuidos especialmente a la exposición a microplásticos (Prata et al., 2020). Estas micropartículas, con tamaños entre 5 nm y 100 nm, se originan mediante la fragmentación progresiva de los polímeros sintéticos por procesos

de erosión del material. Su disposición representa un gran desafío debido a su masiva dispersión por los ecosistemas, en específico por la gran variedad de vías de exposición (agua principalmente, aire y algunos alimentos), sus prolongados tiempos de degradación que superan los 100 años y su capacidad para acumularse en la cadena trófica (Campanale et al., 2020; Smith et al., 2018).

De este modo, la necesidad urgente de formular proyectos orientados a mitigar los problemas derivados de la contaminación de polímeros fósiles ha impulsado el desarrollo de materiales alternativos, como las fibras vegetales y los bioplásticos. Dentro de este último grupo se encuentra los biopolímeros tipo polihidroxicanoatos (PHA), los cuales constituyen una alternativa prometedora para la producción limpia y sostenible de bioplásticos, gracias a su biodegradabilidad y a su origen renovable (Getino et al., 2024). No obstante, la producción de PHA enfrenta importantes desafíos económicos, especialmente relacionados con la obtención de fuentes de carbono que sean tanto eficientes como sostenibles.

En este contexto, los residuos agrícolas (para el caso particular de esta investigación, la cáscara de papaya), emergen como una alternativa prometedora al ofrecer múltiples ventajas: representa una fuente de carbono renovable, de fácil adquisición y de muy bajo costo. Por ello, se perfila como una solución ambiental atractiva dentro de los sistemas de gestión de residuos, al tiempo que permiten obtener biopolímeros competitivos que podrían eventualmente sustituir a los plásticos convencionales de origen fósil (Costa et al., 2022).

Adicionalmente, en concordancia con el marco regulatorio nacional, específicamente la ley 2232 de 2022 , que establece medidas para la reducción gradual de la producción y consumo de ciertos productos plásticos de un solo uso y su sustitución por alternativas sostenibles (Ministerio de Relaciones Exteriores - Normograma [LEY 2232 de 2022 Congreso Nacional], 2022) , este proyecto de investigación evaluó el potencial uso de la cáscara de papaya como sustrato para la

producción de biopolímeros tipo PHA utilizando el microorganismo nativo, *Bacillus thuringiensis*. Asimismo, se optimizó el proceso de fermentación y se analizó su implementación, desde un enfoque biotecnológico, como estrategia sostenible en la producción de biopolímeros.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la cáscara de papaya como sustrato potencial para la producción de bioplástico tipo PHA en microorganismo *Bacillus thuringiensis*.

1.2 Objetivos específicos

Determinar la composición y propiedades fisicoquímicas de la cáscara de papaya.

Evaluar y optimizar diferentes condiciones de preparación de medio de cultivo y fermentación microbiana.

Determinar el rendimiento en la producción de polihidroxialcanoatos bajo condiciones óptimas de cultivo microbiano.

Identificar el biopolímero obtenido mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) y MALDI TOF-TOF.

2. Marco teórico

2.1 Plásticos biodegradables y polihidroxialcanoatos (PHA)

La implementación de los plásticos ha sido un proceso evolutivo que abarca aproximadamente dos siglos. Aunque, en comparación con otros materiales, los plásticos son relativamente modernos, su aplicación en diversos campos ha permitido avances tecnológicos sin precedentes tanto que, hoy en día, es prácticamente imposible vivir nuestra cotidianeidad sin ellos. Desde hace cerca de 70 años, la industria del plástico ha crecido de manera desenfrenada, impactando directa o indirectamente la vida de todos los seres vivos que habitan la tierra (Montero Clara & Mejia Fabiola, 2008).

El término "plástico" abarca una amplia gama de materiales sintéticos y semisintéticos que contribuyen a una vida más limpia, fácil, segura y eficiente (Andrady & Neal, 2009). Estos materiales poliméricos se caracterizan por su capacidad para ser moldeados y procesados de diversas formas, los cuales se producen principalmente a partir de reservas fósiles, como el petróleo (Bucknall, 2020). Los plásticos se clasifican en dos categorías principales: termoestables y termoplásticos. Los termoplásticos pueden reciclarse, fundirse y remodelarse mientras que los termoestables, una vez endurecidos, no pueden reprocesarse (Bewley et al., 2010). Pese a que muchos materiales poliméricos son reciclables, el aumento exponencial en su fabricación y uso ha superado la capacidad de recolección y gestión de estos residuos, generando una problemática alarmante en términos de reciclaje y contaminación ambiental (Rinanda et al., 2023).

Como alternativa viable a esta problemática surgieron los plásticos biodegradables, los cuales, a diferencia de los tradicionales, pueden fabricarse a partir de fuentes renovables y

sostenibles. Además, son capaces de descomponerse en productos inocuos para el medio ambiente (Di Bartolo et al., 2021).

Los bioplásticos se clasifican principalmente según su origen y sus características biodegradables, dividiéndose en tres grandes categorías: polímeros obtenidos a partir de biomasa (polisacáridos como almidón y celulosa, proteínas como caseína y gluten), polímeros derivados de fuentes renovables de origen biológico (como el ácido poliláctico, producido a partir de monómeros de ácido láctico) y polímeros sintetizados por microorganismos, como los polihidroxicanoatos (PHA) (Kuddus & Roohi, 2021).

2.1.1 Polihidroxicanoatos (PHA): Generalidades

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres lineales biosintetizados por microorganismos bajo condiciones de estrés nutricional. En respuesta a este estrés, los PHA se almacenan intracelularmente como reserva de carbono o energía. Estos biopolímeros son completamente biodegradables, biocompatibles y presentan propiedades mecánicas similares a los polímeros tradicionales, de modo que, los hace ideales para ser procesados y transformados en diferentes productos e insumos comerciales (Kourmentza et al., 2017). La biosíntesis puede realizarse de forma natural por bacterias como *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas putida* y su estructura química varía según el tipo de sustrato y las condiciones de cultivo (Koller et al., 2017). Entre los tipos de PHA más comunes se encuentran el polihidroxi butirato (PHB) y sus copolímeros, como el polihidroxi butirato-co-valerato (PHBV), los cuales ofrecen propiedades mecánicas similares al polipropileno (PP) y sus derivados (Chen, 2009).

2.1.2 Propiedades físicas y químicas

Los PHA constituyen una familia de biopolímeros con propiedades físicas y químicas únicas que los hacen atractivos para diversas aplicaciones. Estas características varían según el tipo de polímero. Por ejemplo, el polihidroxibutirato (PHB) presenta una cristalinidad entre el 60-80%, lo que le confiere alta resistencia a la deformación mecánica, muy similar a la del polipropileno. Sin embargo, esta alta cristalinidad también lo hace frágil y quebradizo limitando así sus posibles aplicaciones (Barham et al., 1984).

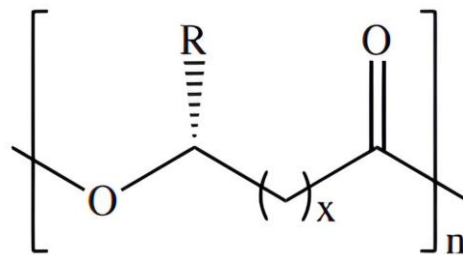
Por otra parte, los PHA presentan propiedades térmicas particulares, con temperaturas de fusión que normalmente oscilan entre los 50°C y 180°C, dependiendo de su estructura química. Por ejemplo, el PHB tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 175°C, mientras que los copolímeros como el polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) presentan temperaturas de fusión más bajas. En términos de empleabilidad, una menor temperatura de fusión facilita su procesamiento industrial y reduce su fragilidad. Por lo tanto, la variabilidad en las propiedades térmicas permite adaptar los PHA a aplicaciones específicas que abarcan desde la industria de envases y productos desechables hasta insumos médicos de alta complejidad y calidad (Doi et al., 1995).

Químicamente, los PHA son estables en condiciones ambientales normales; sin embargo, se degradan rápidamente en presencia de microorganismos específicos, lo que los hace especialmente útiles en productos de corta vida útil o de uso inmediato. Esta propiedad degradativa es una de las más relevantes, ya que los PHA se descomponen en dióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, o en metano en condiciones anaeróbicas, sin dejar residuos tóxicos al medio ambiente (Tokiwa & Calabia, 2004).

2.1.3 Tipos de PHA y aplicaciones

La estructura general de los polihidroxicanoatos se muestra en la **Figura 1**. Está compuesta por un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, los cuales forman enlaces de tipo éster y que dan lugar a cadenas monoméricas cortas, medianas o largas (García et al., 2013). De ahí su denominación como poliésteres, ya que se derivan de la unión de varios monómeros de ácidos hidroxicanoicos. Actualmente se han identificado alrededor de 150 monómeros de PHA, con pesos moleculares entre 50 000 y 1 000 000 Da, y se clasifican en grupos según el número de carbonos de los monómeros que los conforman (Ver Tabla 1). Adicionalmente, se han reportado más de 300 especies bacterianas capaces de sintetizar estos polímeros (Sánchez Safont, 2013).

Figura No. 1 Estructura general de los polihidroxicanoatos (R = grupos alquilo C1-C13, x = C1 - C4)



Nota: Tomado de *Bioprocess development for the robust production of polyhydroxyalkanoates* (p.24), por A. Ferre, 2018.

Tabla 1. Clasificación por grupos de PHA según la longitud de la cadena del monómero.

<i>Grupo R</i>	<i># Carbonos</i>	<i>PHA específico</i>	<i>Grupo</i>
metil	C4	Poli(3-hidroxi butirato)	Longitud de cadena corta (SCL)
etil	C5	Poli(3-hidroxi valerato)	
propil	C6	Poli(3-hidroxi hexanoato)	Longitud de cadena media

<i>Grupo R</i>	<i># Carbonos</i>	<i>PHA específico</i>	<i>Grupo</i>	
metil	C4	Poli(3-hidroxiбутирато)	Longitud de cadena corta (SCL)	
etil	C5	Poli(3-hidroxi valerato)		
butil	C7	Poli(3-hidroxiheptanoato)	(MCL)	
pentil	C8	Poli(3-hidroxi octanoato)		
hexil	C9	Poli(3-hidroxi nonanoato)		
heptil	C10	Poli(3-hidroxi decanoato)		
octil	C11	Poli(3-hidroxi undecanoato)		
nonil	C12	Poli(3-hidroxi dodecanoato)		
decil	C13	Poli(3-hidroxi tridecanoato)		
undecil	C14	Poli(3-hidroxi tetradecanoato)		
dodecil	C15	Poli(3-hidroxi pentadecanoato)		Longitud de cadena larga (LCL)
tridecil	C16	Poli(3-hidroxi hexadecanoato)		
n	Cn	Poli(3-hidroxi n)		

Nota: Adaptado de *Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review* (p. 708), por Giin et al., 2014.

Los PHA más comunes contienen entre 3 y 5 átomos de carbono en su unidad monomérica. Entre ellos se encuentran el Poli(3-hidroxi butirato) (PHB) y el copolímero Poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (PHBV) (**Figura 2**), que son sintetizados frecuentemente por microorganismos como *Cupriavidus necator* y *Haloferax mediterranei* (Güell Ferré, Anna, 2018).

Nota: Tomado de *Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) Films and Plates in Defect Covering of the Osseus Skull in a Rabbit Model* (p.6) por (B et al., 2002)

Otra industria de gran relevancia para este tipo de polímeros es la de empaques y embalajes. Los PHA se utilizan para producir películas, botellas y contenedores biodegradables. Su resistencia a la humedad y capacidad para ser procesados térmicamente los convierten en una alternativa competitiva frente a sus homólogos derivados del petróleo y otras fuentes no renovables. Gracias a sus propiedades biodegradables (**Figura 4**), estos biopolímeros representan una opción viable para combatir la contaminación generada por los plásticos convencionales de un solo uso no biodegradables (Khanna & Srivastava, 2005).

Figura No. 4 Biodegradación de botella de PHA, tipo BiopolTM, mediante incubación en lodo durante 80 días

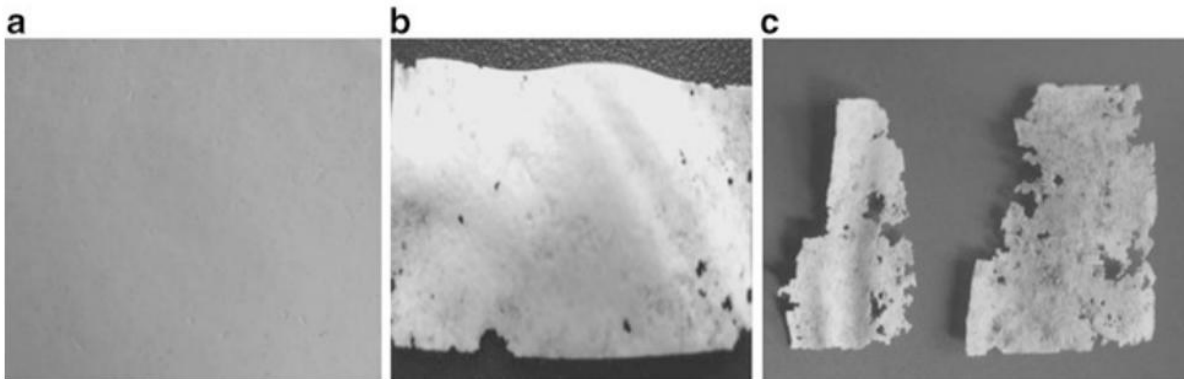


Nota: Tomado de novel polyhydroxybutyrate (PHB) production using a waste date seed feedstock

Fuente: (Yousuf & Yousuf, 2017)

En la agricultura, los PHA se emplean para fabricar películas de acolchado termoplásticas que se degradan naturalmente en el suelo, reduciendo así la contaminación por plásticos (Amelia et al., 2019). Estas películas no solo protegen los cultivos de insectos, hongos y malezas, sino, además, liberan nutrientes de manera controlada, mejorando la fertilidad del suelo (Mooney, 2009) (Figura 5).

Figura No. 5 Biodegradación de película de acolchado de PHB para agricultura expuesta en plantaciones de soja: (a) película original, (b) 45 días de exposición, (c) 70 días de exposición.

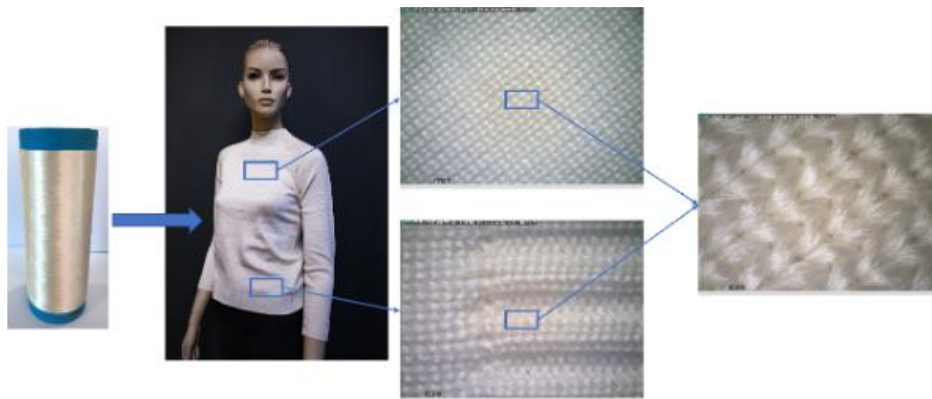


Nota: Tomado de *Electrospun Mats: From White to Transparent with a Drop* por (Cimadoro et al., 2018)

Por su parte la industria textil también se ha beneficiado de estos biopolímeros. Se están explorando fibras biodegradables para la producción de ropa sostenible, ya que su resistencia mecánica y flexibilidad las convierten en una alternativa prometedora y sustentable frente a fibras sintéticas contaminantes, como el poliéster. Por ejemplo, el copolímero el poli (3-hidroxibutirato-co-3hidroxihexanoato) (PHBHHx) se usa actualmente para fabricar hilos y telas que combinan alta flexibilidad, impermeabilidad, durabilidad y biodegradabilidad, ideales para la confección de uniformes quirúrgicos de un solo uso (Bugnicourt et al., 2014). En este contexto, la empresa AITEX (Alicante, España) ha alcanzado un logro significativo mediante el proyecto PHB@TEX,

desarrollando con éxito tejidos biodegradables y sostenibles basados en el biopolímero PHB (AITEK, 2022).

Figura No. 6 Hilo de PHB, jersey y detalle del tejido confeccionado por tejeduría de punto por trama



Nota: Tomado de *Electrospun Mats: From White to Transparent with a Drop* por RETEMA, 2024

2.2 Producción de PHA

2.2.1 Procesos y tecnologías de producción

La producción de polihidroxialcanoatos se lleva a cabo mediante fermentación microbiana. Se ha demostrado que microorganismos bacterianos como *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas putida* convierten sustratos de carbono en polímeros intracelulares a través de dos fases principales: una fase de crecimiento, en la que estos microorganismos se multiplican exponencialmente, y una fase de acumulación, en la que las condiciones limitantes de nutrientes como nitrógeno, fósforo, y carbono inducen la síntesis de PHA a través de diversas vías metabólicas (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Actualmente existen tres procesos de fermentación utilizados en la producción de PHA: Batch (por lotes), fed-batch (alimentación por lotes) y continuo. Cada una de estos procesos presenta ventajas y desventajas. La fermentación batch es la más simple, pero tiene limitaciones en términos de productividad volumétrica y control. Por otra parte, la fermentación fed-batch permite un mayor control sobre la acumulación de PHA, al poder limitar los nutrientes selectivamente, lo cual se traduce en mayores rendimientos. Por último, la fermentación continua, aunque es la menos común, resulta útil para la producción masiva a gran escala, ya que permite un flujo permanente y constante de sustratos durante periodos prolongados de tiempo (Tao et al., 2024).

En los últimos años se han desarrollado tecnologías alternativas a la fermentación tradicional, con el objetivo de mejorar la producción, eficiencia y costos de los PHA. Destacan los biorreactores de alta densidad celular, que permiten alcanzar concentraciones celulares muy elevadas y, por ende, una mayor productividad de PHA (Koller et al., 2017). Asimismo, en el ámbito de laboratorio se están explorando y aplicando técnicas de ingeniería metabólica para modificar cepas microbianas mejorando su capacidad de acumulación de PHA. Estos avances no solo ayudan a reducir los costos y los tiempos de producción y procesamiento, sino que también permiten obtener PHAs con propiedades específicas, como mayor o menor rigidez, resistencia térmica o degradación según la fuente de carbono utilizada (Madison & Huisman, 1999).

2.2.2 Fuentes de carbono para la síntesis de PHA

Las fuentes de carbono son un factor clave en la producción de PHA, ya que determinan directamente tanto el costo como la sostenibilidad del proceso. Los sustratos comúnmente más utilizados son los azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa; ácidos grasos vegetales; y residuos agrícolas, como cáscaras de frutas, pulpas mal procesadas, bagazo de caña o líquidos lixiviados de

diversas matrices, etc. Estos últimos resultan especialmente atractivos ya que reducen los costos de producción y promueven la economía circular, transformando desechos sin ningún valor comercial en productos de alto impacto industrial (Victoria et al., 2021) .

Adicionalmente, se han explorado diversas fuentes de carbono no convencionales, como glicerol crudo, un subproducto de la industria del biodiesel y metano, que puede ser convertido en PHA por bacterias metanotróficas. Estas fuentes no solo son económicas, sino que también contribuyen significativamente a la reducción de residuos industriales. En particular, el glicerol crudo puede ser utilizado efectivamente por cepas como *C. necator* para producir PHA (Kumar et al., 2015). Otra fuente prometedora es el dióxido de carbono, que puede ser captado y convertido por cianobacterias fotosintéticas. Este recurso no solo contribuye a mitigar un gas de efecto invernadero, sino que también reduce la dependencia de recursos fósiles. Sin embargo, este enfoque aún presenta limitaciones importantes, ya que la productividad del proceso es baja en comparación con otras fuentes de carbono, lo cual restringe su aplicación a gran escala por el momento; no obstante, se proyecta como una alternativa viable a mediano plazo (Gonzalez-Fernandez et al., 2015).

2.2.3 Microorganismos productores de PHA y condiciones óptimas

Los PHA son producidos por una amplia variedad de bacterias que los acumulan como reserva de carbono y energía en condiciones de estrés nutricional. Entre los microorganismos más estudiados se encuentran: *C. necator*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium* y *Azobacter vinelandii*. Cada una de estas especies presenta características particulares únicas que las hacen adecuadas para diferentes tipos de sustratos y condiciones de cultivo (Koller et al., 2017).

Cupriavidus necator es el microorganismo más utilizado industrialmente para la producción de PHA, debido a su gran capacidad de acumulación: puede almacenar hasta el 90% de su peso seco en condiciones óptimas. Esta bacteria metaboliza una amplia variedad de fuentes de carbono, desde azúcares simples hasta ácidos grasos complejos, lo que la hace versátil y eficiente para la producción a gran escala. Cabe destacar que produce principalmente PHB, un homopolímero con propiedades mecánicas similares al polipropileno (PP), que le incrementa su interés e investigación industrial (G. Q. Chen, 2009b).

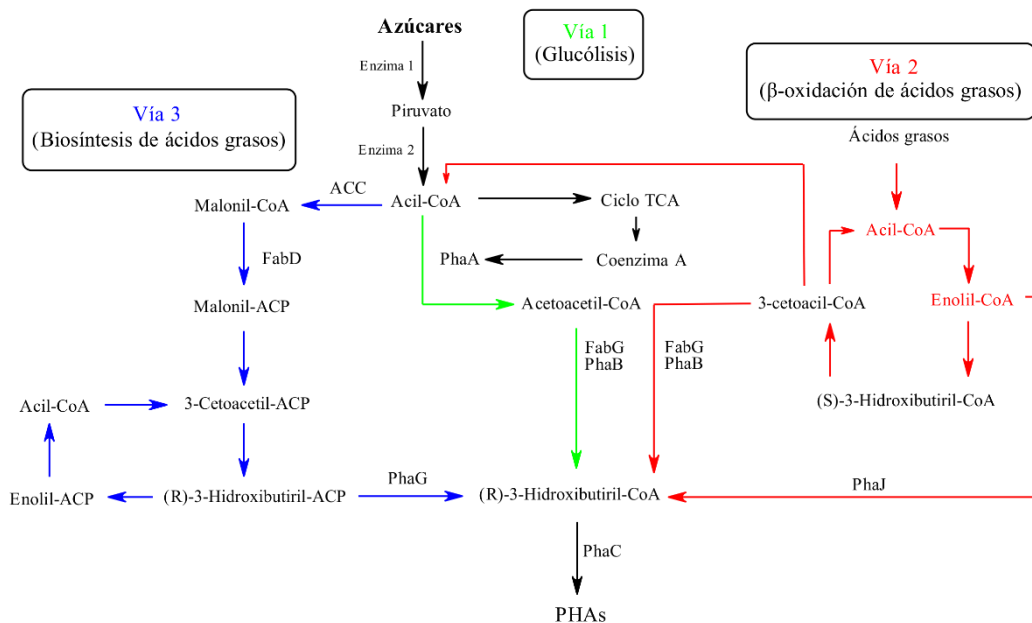
Las condiciones óptimas para la producción de PHA varía según la cepa bacteriana y el sustrato utilizado. En general, se requiere un pH entre 6.5 y 7.5, temperaturas de entre 30°C y 37°C, y alta concentración de oxígeno disuelto. Estos parámetros son críticos para el crecimiento, ya que un pH fuera del rango óptimo puede inhibir la actividad metabólica y reducir la productividad del proceso (Rehman & Aftab, 2016). Adicionalmente, la relación carbono/nitrógeno (C/N) del medio, puede favorecer o perjudicar la síntesis de PHA; una relación C/N alta favorece la acumulación de PHA, debido a que limita la disponibilidad de nitrógeno, por el contrario, una baja relación C/N promueve el crecimiento celular, pero reduce la acumulación de PHA (Koller et al., 2017). La concentración de fósforo también es importante: en *Bacillus megaterium*, su limitación induce la síntesis de PHA, aunque una reducción excesiva puede inhibir el crecimiento celular (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Por último, la disponibilidad de oxígeno es esencial para mantener una actividad metabólica estable. Se recomienda una saturación de oxígeno disuelto en el rango 20% y 40%. Si bien en fermentaciones a pequeña escala este factor no es tan crítico, en procesos industriales a gran escala el control de oxigenación es un desafío clave, ya que concentraciones insuficientes pueden limitar significativamente el crecimiento bacteriano (Guanha et al., 2021).

2.2.4 Biosíntesis de PHA

El proceso de biosíntesis de los polihidroxicanoatos (PHA) involucra una serie de reacciones enzimáticas, que son principalmente facilitadas por sintasas específicas de PHA en microorganismos. Estas rutas son vitales para la fabricación de plásticos biodegradables, dado que proporcionan una opción ecológica frente a los plásticos petroquímicos tradicionales. Se puede categorizar la biosíntesis de los PHA en diversas rutas dependiendo del tipo de fuentes de carbono y los intermediarios metabólicos empleados (Samrot et al., 2021).

Hasta la fecha, se han identificado ocho vías, de las cuales sobresalen tres como las principales (G.-Q. Chen, 2010)(Figura No. 7).

Figura No. 7 Vías biosintéticas principales de PHA



En la vía 1 (glucólisis), los azúcares son la fuente de carbono. Primero, estos carbohidratos simples son convertidos en piruvato mediante la glucólisis y posteriormente en acetil-CoA. Luego dos moléculas de Acetil-Coa son combinadas mediante la enzima PhaA para formar una molécula

de acetoacetyl-CoA. Estos por medio de la reductasa PhaB los convierte el acetoacetyl-CoA en (R)-3-hidroxiacetyl-CoA utilizando NADPH, finalmente el (R)-3-hidroxiacetyl-CoA es polimerizado para producir PHAs. Se destaca que una concentración excesiva de coenzima A, inhibe la Pha A, induciendo al acetyl-CoA hacia el ciclo de ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs, TCA) para producción de energía y crecimiento celular (Nelson & Cox, 2018). No obstante, bajo condiciones de estrés nutricional, es decir, exceso de carbono y limitación de nitrógeno o fósforo, se activan los sistemas enzimáticos de producción de PHA al encontrar que la concentración de la coenzima A no es lo suficientemente alta como para inhibir la PhaA, conduciendo una acumulación intracelular de PHA (Jung & Lee, 2000).

En la vía 2 (β -oxidación de ácidos grasos), los ácidos grasos son la fuente de carbono. En este proceso, inicialmente, los ácidos grasos son convertidos en Acil-CoA utilizado en las reacciones de β -oxidación (Talley & Mohiuddin, 2023). Cuatro intermediarios clave regulan el proceso de síntesis de pHA, por ejemplo, enoil-CoA y 3-cetoacil-CoA son catalizados para formar (R)-3-hidroxiacetyl-CoA, el cual posteriormente es polimerizado para generar PHA.

Por último, la vía 3 (biosíntesis de ácidos grasos), utiliza carbohidratos simples como fuente de carbono. En donde el acetyl-CoA, se convierte en malonil-CoA por acción de la acetyl-CoA carboxilasa (ACC). Posteriormente, la ACP-transacilasa convierte al malonil-CoA en malonil-ACP el cual es utilizado en la síntesis de ácidos grasos (Kusuma et al., 2024). Por otro lado, el (R)-3-hidroxiacetyl-ACP es formado y convertido en coenzima A por la transacilasa PhaG. Finalmente, el (R)-3-hidroxiacetyl-CoA se polimeriza para formar PHA (Miu et al., 2022). Se resalta que la polimerización final en todas las 3 vías es catalizada por la PHA sintasa o Pha C.

2.3 Métodos de extracción y purificación de PHA

La extracción y purificación de los PHA es una etapa crucial para su productividad, ya que determina la calidad y algunas propiedades finales del biopolímero. Estos métodos deben ser eficientes, económicos y sostenibles. Dado que los PHA se acumulan intracelularmente en forma de gránulos, existen diferentes técnicas para la extracción y purificación, los cuales se clasifican en métodos químicos, físicos y biológicos.

2.3.1 Métodos químicos

Los métodos químicos son los más utilizados en la industria debido a su alta eficiencia y escalabilidad. Consisten en el uso de solventes orgánicos como cloroformo, diclorometano o acetona, ya que los PHA son solubles en estos compuestos, mientras que los demás componentes celulares no lo son. Una vez disueltos, los PHA se precipitan mediante la adición de etanol o metanol y se purifican por filtración con membrana o centrifugación. Este procedimiento es efectivo, rápido y de complejidad relativamente baja, permitiendo obtener un PHA de alta pureza; Sin embargo, presenta desventajas importantes, como el elevado costo de los solventes y su impacto ambiental negativo (Didion et al., 2024). Otra técnica es la digestión alcalina, que emplea principalmente hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH) para romper las membranas celulares y liberar los gránulos. Este método resulta más económico que el uso de solventes orgánicos, no obstante, puede degradar parcialmente el PHA, afectando así sus propiedades mecánicas (Anis et al., 2013).

2.3.2 Métodos físicos

Los métodos físicos son más respetuosos con el medio ambiente, ya que no requieren productos químicos nocivos. Uno de los métodos más comunes es la ruptura mecánica de las células, mediante homogeneización a alta presión o molienda de bolas. Este procedimiento es

efectivo para liberar los gránulos intracelulares de PHA, aunque existe el riesgo de dañar las cadenas poliméricas del PHA reduciendo la calidad del producto (Kunasundari & Sudesh, 2011). Otra técnica física utilizada es la extracción por ultrasonido, que emplea ondas de alta frecuencia para romper las células y liberar los PHA. Este método es menos invasivo y dañino para el polímero, permitiendo obtener un PHA de alta calidad. No obstante, presenta limitaciones en su escalabilidad debido al alto costo de los equipos y al elevado consumo energético (Pradhan et al., 2017).

2.3.3 Métodos biológicos

Los métodos biológicos representan una alternativa sostenible para la extracción de PHA, ya que se utilizan enzimas o microorganismos para lisar las células. Por ejemplo, el empleo de proteasas y lipasas permite degradar las proteínas y los lípidos celulares, dejando intactos los gránulos de PHA. Esta técnica es la más respetuosa con el medio ambiente, ya que no requiere solventes ni métodos mecánicos lo cual no genera residuo tóxico alguno, sin embargo, es lento y costoso con lo cual la eficiencia y la relación costo – beneficio se ve impactada de forma negativamente significativa. Existe otra técnica biológica el cual usa bacterias autolíticas, es decir que son capaces de lisar por sí mismas sus células bajo condiciones controladas, este método es prometedor puesto que no requiere solventes orgánicos, ni métodos mecánicos, pero su aplicación a gran escala aún está en desarrollo (CBDS., 2019; López Martínez et al., 2011).

2.4 Uso de residuos agrícolas en la producción de PHA

2.4.1 Importancia de los residuos como materia prima

La contaminación ambiental derivada del manejo y disposición inadecuada de los plásticos ha impulsado la búsqueda de sustitutos sostenibles, derivados de materias primas limpias y eficientes. En este contexto, el uso de residuos agrícolas como sustratos para la producción de PHA constituye una estrategia viable y sostenible, que aborda simultáneamente dos de los principales problemas que la humanidad enfrenta actualmente. Residuos agrícolas como cáscaras de frutas, alimentos que no cumplen los estándares de calidad, lixiviados y otros productos ricos en carbohidratos y proteínas pueden ser aprovechados y metabolizados directamente por microorganismos productores de PHA. Esta estrategia no solo reduce los costos operacionales de producción, sino que también revaloriza materiales que, de otro modo, no tendrían ningún valor comercial (Naranjo Vasco, 2010) .

En el caso particular de Colombia, el aprovechamiento de estas materias primas representa una excelente oportunidad para promover la sostenibilidad, más en un país con una gran producción agrícola. Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en 2022 se generaron aproximadamente 12 millones de toneladas de residuos agrícolas, incluyendo cáscaras de frutas, bagazo de caña de azúcar y rastrojos de cultivos como plátano y yuca. Estos residuos, que tradicionalmente se arrojan a vertederos o se incineran, constituyen una valiosa oportunidad para la producción de biopolímeros, al mismo tiempo que reducen el impacto ambiental y generan insumos comerciales que fortalecen la industria y la económica colombiana (Naranjo Vasco, 201).

2.4.2 Caracterización de residuos agrícolas para la producción de PHA

La caracterización de los residuos agrícolas es un paso primordial para determinar la viabilidad de la materia prima como sustrato nutricional para el proceso de fermentación bacteriana. Un estudio del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) determinó que los residuos agrícolas más comunes, como bagazos y pulpas, contienen entre un 40 y un 70 % de carbohidratos aprovechables, entre un 5 y un 15 % proteínas y entre un 1 y un 5% de lípidos. Estas características los convierten en potenciales vectores de investigación (Victoria et al., 2018).

Por ejemplo, una investigación realizada por la Universidad Nacional de Colombia analizó la composición química de los rastrojos de plátano, uno de los cultivos más abundantes e importantes del país. Los resultados mostraron que estos residuos están compuestos por aproximadamente 45% celulosa, 25% hemicelulosa y 10% lignina. Mediante procesos de hidrólisis enzimática, fue posible convertir el 80% de estos carbohidratos en azúcares fermentables. Aunque el objetivo principal de esta investigación era la obtención de biogás por fermentación bacteriana anaerobia, los tratamientos aplicados a estas matrices pueden ser homologados directamente para la producción de PHA, lo cual demuestra el potencial de estos residuos en diversas áreas de la academia investigativa (Durán Hernández, 2020).

Además de la composición química, también es de suma importancia evaluar la disponibilidad de nutrientes y la presencia de posibles inhibidores bacterianos. Algunos residuos agrícolas contienen compuestos inhibidores propios del fruto, del manejo agrícola o derivados de degradación, así como otros adquiridos externamente; por ejemplo, a través del uso de químicos y pesticidas durante el cultivo, la cosecha o el transporte. Por este motivo, es fundamental realizar pretratamientos adecuados para minimizar los posibles efectos adversos en los procesos de fermentación.

2.4.3 Aprovechamiento y valorización potencial de la cáscara de papaya

La elección de diversas matrices agroindustriales como materia prima para estudios de valorización se fundamenta como se mencionó anteriormente, por sus propiedades fisicoquímicas, no obstante, la cáscara de papaya se posiciona como una fuente prometedora para diversas aplicaciones puesto que presenta algunas particularidades.

Se compone por una gran cantidad de polisacáridos fermentables y compuestos bioactivos, lo que la convierte en un recurso valioso para procesos biotecnológicos. Específicamente, se reportan contenidos de carbohidratos totales en la cáscara de papaya entre 60-70% con una parte significativa de celulosa, hemicelulosa y pectinas (Suneetha et al., 2017). Estos polisacáridos son de particular interés puesto que pueden ser hidrolizados en azúcares simples, sirviendo como sustratos en procesos fermentativos para la fabricación de biocompuestos o biocombustibles (Jacqueline & Velvizhi, 2024). Adicionalmente, se reportan contenidos entre un 10-15% de proteínas, y entre un 0.5-3% de lípidos, lo que le confiere un perfil nutricional más relevante en comparación de otros residuos (Lu et al., 2021). Se han caracterizado antioxidantes naturales como carotenoides y flavonoides, compuestos con propiedades beneficiosas para la salud y de gran interés en la industria alimentaria y farmacéutica (M. Leitão et al., 2023)

En comparación con otras matrices lignocelulósicas, como la cáscara de mango, o el bagazo de caña de azúcar, la cáscara de papaya se posiciona como una fuente de carbono rica en nutrientes. Sin embargo, un factor crucial que resalta es su bajo contenido en lignina, la cual, al ser una molécula compleja, dificulta los procesos hidrolíticos de la celulosa y hemicelulosa; por tanto, su concentración baja o nula permite que las etapas de hidrólisis, recuperación de azúcares y posterior fermentación sean significativamente más eficientes y rentables (dos Santos et al., 2014). Estas características fisicoquímicas, combinadas con su alta disponibilidad y bajo costo

hacen de la cáscara de papaya una materia prima ideal para su valorización en el desarrollo de productos de valor agregado como los biopolímeros.

2.4.4 *Carica papaya*: cultivo y generalidades

La papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo tropical de relevancia global con un alto impacto socioeconómico particular para Colombia, posicionándose actualmente como el vigesimotercer productor mundial (Murcia, 2023). Esta actividad agrícola es fundamental en algunos departamentos del país, puesto que genera miles de empleos para las familias que viven del campo. A nivel global, la papaya es la tercera fruta tropical más producida, alcanzando un máximo histórico de 15 Mt producidas en el año 2023, superada solo por el mango y la piña (OCDE-FAO, 2024). El consumo mundial de papaya en 2024 fue estimado en aproximadamente 14 Mt, siendo India el mayor consumidor.

En Colombia, la mayor parte de la producción de papaya es destinada al consumo interno. No obstante, se evidencian exportaciones anuales por alrededor de 467 000 Kg, generando ventas por alrededor de 816 000 USD. Sumando ambos mercados (tanto ventas internas como exportaciones) el aporte económico total del cultivo asciende a 4 millones de USD anuales (Tridge, 2022). Actualmente, la variedad más cultivada corresponde al Híbrido Taniung-1, el cual se caracteriza por su alta producción, ideal para los diferentes pisos térmicos del país, pulpa roja y un aroma muy característico, con alto contenido de azúcar, resistencia a las largas rutas de transporte terrestre y de gran aceptación en los mercados locales (Mesa, 2017).

La producción de papaya en Colombia se concentra en algunos departamentos, en especial, Córdoba aporta 38.97% de la producción total nacional con 61 178 toneladas, siendo municipios como Valencia, Tierralta, Montería y Cereté los más importantes del departamento, (DANE,

2019). Sin embargo, esta concentración localizada genera una gran vulnerabilidad, por ejemplo, en diciembre de 2023, en la zona del Alto Sinú (Valencia – Tierralta) se presentó una sobreproducción causando pérdidas estimadas en 13 mil millones de pesos (COP) y el desperdicio de aproximadamente 27 toneladas de fruta (Barrios, 2023). Por otra parte, departamentos como el Valle del Cauca contribuyen con aproximadamente 16.59% (28 599 toneladas), este departamento destaca por su eficiencia ya que produce 68.3 toneladas por hectárea, superando a Córdoba con 67.7 toneladas por hectárea (Mesa, 2017). El meta representó el 11.30% (19 470 toneladas) con una producción distribuida entre los municipios de Cabuyaro y Puerto Concordia, seguido de Antioquia aportando 6.47% (11 153 toneladas) y finalmente Magdalena con el 5.30% (9 136 toneladas) (DANE, 2019). Cabe destacar que estos datos corresponden al año 2016 puesto que entidades como el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) y la Unidad de Planificación Rural Agropecuaria (UPRA) desde dicho año no reportan cifras con este nivel de detalle.

En cuanto a las exportaciones, los principales destinos en 2023 fueron Aruba generando beneficios por 204 000 USD, Emiratos Árabes Unidos con 156 000 USD, Curazao con 112.000 USD, Reino Unido con 84.500 USD y España con 74.600 USD. Los mercados de más rápido crecimiento con respecto a ese año fueron Emiratos Árabes Unidos, España y Alemania con un aumento conjunto de más de 241 000 USD.

2.4.5 Residuos de papaya, un subproducto subestimado.

A pesar de su valor nutricional y económico, el procesamiento y el consumo de la papaya generan una considerable cantidad de residuos, particularmente la cáscara y las semillas, que actualmente carecen por completo de un valor comercial significativo, y son en su gran mayoría desechados. Se estima que la cáscara y las semillas constituyen entre el 15% y 20% del peso total

del fruto (Sánchez, 2018), Por lo tanto, considerando la producción anual de papaya en Colombia, se puede inferir que una cantidad significativa (entre 53 000 y 80 000 toneladas) de cáscaras y semillas de papaya son potencialmente desperdiciados. Esta gran cantidad de residuos no solo representa una carga ambiental considerable, sino también una oportunidad muy poco explorada para valorizar el desarrollo de nuevos productos que tengan gran valor e interés comercial como los plásticos biobasados(OEC, 2025).

2.4.6 Producción de PHA a partir de diversas matrices agroindustriales.

Diversos estudios han demostrado la viabilidad de los residuos agroindustriales como fuente de carbono sostenibles para la producción de biopolímeros. Entre los residuos más comunes encontramos las pulpas y cáscaras de frutas como manzana, banano, naranja, uva, mango etc, (Tabla 2). Entre estos, la cáscara de banano destaca como uno de los residuos más estudiados, siendo el foco de numerosas publicaciones. Un ejemplo de ello es el trabajo de Kulkarni et al., (2015) quienes se reportaron un rendimiento del 71% de PHB utilizando extractos acuosos de cáscara de banano fermentados con la cepa *Halomonas campisalis MCM B-1027*. Por otro lado, investigaciones reportadas por Sukan et al., (2014), exploran diferentes métodos de extracción de azúcares en cáscaras de naranja, los cuales posteriormente son fermentados mediante *Bacillus subtilis*, alcanzando una producción de 1.24g/L para el homopolímero PHB, correspondiente a un rendimiento aproximado del 40%. Otros estudios se han centrado en la riqueza de azúcares de diferentes orujos de frutas. Por ejemplo, Follonier et al. (2014) encontraron que los orujos de albaricoque, cereza y uva solaris eran particularmente prometedores con recuperaciones de azúcares de 47, 49 y 106 g/L, respectivamente. Finalmente, tras la fermentación con la cepa *Pseudomonas resinovorans*, las uvas Solaris demostraron ser un sustrato de crecimiento muy prometedor, arrojando un rendimiento de proceso de 21.3 g de PHA por cada litro de hidrolizado

de orujo utilizado, un valor muy superior al obtenido por el orejo de albaricoque (1.4 g PHA/L orujo).

Estos ejemplos resaltan la gran versatilidad de las diferentes matrices agroindustriales como fuentes de carbono sostenibles. Sus características fisicoquímicas únicas permiten la producción de biopolímeros de alto interés industrial. Es por ello, que estos subproductos representan materias primas valiosas que merecen ser evaluadas e investigadas minuciosamente para determinar su impacto específico en la producción de PHA, ya que cada residuo agroindustrial puede influir en la naturaleza química del tipo de PHA biosintetizado.

Tabla 2. Porcentajes de acumulación total de PHA utilizando residuos de frutas como única fuente de carbono.

Desecho	Microorganismo	Biomasa (g/L)	PHA (%)	PHB (%)	3HV (%)	PHBV (%)	PHA (g/L)	Referencia
Pulpa de manzana	<i>Cupriavidus necator</i> , <i>Pseudomonas citronellolis</i>	6.93	-	43.7	-	-	3.03	(Rebocho et al., 2019)
Cáscara de banano	<i>Halomonas campilasis</i>	0.514	-	-	-	23.8	2.1	(Kulkarni et al., 2015)
Cáscara de naranja	<i>Halomonas campilasis</i>	0.776	-	-	-	13.6	0.329	
Cáscara de banano	<i>Bacillus spp</i>	7.8	-	26.92	-	-	2.1	(Getachew & Woldeesenbet, 2016)
Cáscara de uva	<i>Bacillus cereus</i>	2.82	-	18.8	-	-	0.53	(Anderl et al., 2021)
Uvas	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	6.1	23,3	-	-	-	1.42	(Follonier et al., 2014, 2015)

Uvas	<i>Pseudomonas putida</i>	7.9	41,1	-	-	-	5.8	
Cáscara de Mango	<i>Bacillus thuringiensis</i>	7.86	-	51.3	-	-	4.03	(Gowda & Shivakumar, 2014)
Cáscara de Naranja	<i>Recombinant Bacillus subtilis</i>	3.02	-	41	-	-	1.24	(Sukan et al., 2014)
Cáscara de Papaya	<i>Bacillus subtilis</i>	15	-	77.67	-	-	11.65	(Rao et al., 2019)
Cáscara de Naranja	<i>Bacillus subtilis</i>	19.39	-	49.93	-	-	9.68	
Cáscara de Piña	<i>Cupriavidus necator</i>	5.3	-	12,7	-	-	0.7	(Sukruansuwan & Napathorn, 2018)
Corazón de Piña	<i>Cupriavidus necator</i>	6.1	-	35.6	-	-	2.1	
Pulpa de piña	<i>Bacillus cereus</i>	2.467	-	40.54	-	-	1	(Suwannasing et al., 2015)
Cáscara de Melón	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	68.72	-	32.9	-	-	22.61	(Valdez-Calderón et al., 2022)
Cáscara de Papaya	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	86.36	-	27.47	-	-	23.72	
Cáscara de Naranja	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88.58	-	26.58	-	-	23.38	
Cáscara de Banano	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	82.77	-	30.34	-	-	25.11	

2.5 Sostenibilidad y evaluación de la producción de PHA

2.5.1 Impacto ambiental de la producción de PHA

La producción de PHA se plantea como una alternativa sostenible frente a los plásticos derivados del petróleo. No obstante, es necesario evaluar su ciclo de vida completo, para evitar reproducir los mismos errores asociados a la disposición final de los plásticos tradicionales. Esta evaluación debe considerar todas las etapas, desde la obtención de materias primas hasta la disposición final, ya sea en plantas de reciclaje o en vertederos. Como se expuso previamente, uno

de los mayores atributos de los PHA es su alta biodegradabilidad. Su periodo de desintegración, que varía desde meses a pocos años, contrasta con los cientos de años que puede durar un polímero convencional en el ambiente. Adicionalmente, los PHA se degradan en condiciones naturales, como el suelo, agua dulce y salada, sin necesidad de procesos industriales complejos (García et al., 2013).

Sin embargo, la producción de PHA no está exenta de algunos impactos ambientales. Por ejemplo, fuera del laboratorio el cultivo de algunas materias primas como la caña de azúcar, arroz, maíz pueden generar deforestaciones masivas y pérdidas de biodiversidad, sin mencionar las emisiones de gases de efecto invernadero que estas suponen. Adicionalmente los procesos de fermentación y extracción consumen energía y agua que contribuyen a la huella de carbono global.

No obstante, cabe resaltar que, en comparación con la fabricación de plásticos convencionales, el impacto ambiental de los PHA es significativamente menor. Por ejemplo, se ha estimado que la producción de PHA a partir de azúcares refinados genera aproximadamente 2.5 kg de CO₂ equivalente por cada kilogramo de PHA, mientras que un polímero tradicional como el polietileno genera alrededor de 6 kg de CO₂ equivalente por cada kg de plástico (Akiyama et al., 2003). Para mitigar estos impactos, se han planteado estrategias como el uso de residuos agroindustriales y subproductos industriales como materias primas, lo cual no solo reduce los costos de producción, sino que disminuye considerablemente la huella ambiental.

2.5.2 Comparación con la producción convencional de plásticos

Según la Agencia Internacional de Energía (IEA), la producción de plásticos convencionales representa aproximadamente el 6% del consumo mundial de petróleo y es

directamente responsable de unas 1.7 gigatoneladas de emisiones de CO₂ al año (International Energy Agency, 2021).

En comparativa, la producción de PHA tiene un impacto ambiental notablemente menor, especialmente cuando se emplean sustratos renovables y procesos optimizados. En el año 2007 se reportó un análisis del ciclo de vida de algunos polímeros (como polipropileno y polietileno) derivados del petróleo con ácido hidroxibutírico de origen bacteriano, encontrando que, los polímeros bio-basados generan aproximadamente un 50% menos de gases de efecto invernadero (GEI) que la producción de polietileno. Adicionalmente, los PHA no liberan microplásticos durante su degradación, lo cual reduce su impacto sobre los ecosistemas marinos y terrestres (Harding et al., 2007).

Actualmente, la producción de PHA aún enfrenta desafíos en términos de eficiencia energética y costos operacionales. Los procesos de fermentación y extracción requieren grandes cantidades de agua y energía, lo que puede aumentar la huella ambiental si no se emplean fuentes renovables. No obstante, el desarrollo de nuevas tecnologías y mejoras en la eficiencia aseguran que, con el tiempo, los PHA se consolidarán como una alternativa segura, económica y ambientalmente sostenible para reducir la dependencia de los polímeros derivados del petróleo.

3. Antecedentes

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son una familia de biopolímeros que han sido objeto de estudio por sus propiedades similares a los plásticos tradicionales de origen fósil y su naturaleza biodegradable. Su descubrimiento se remonta por primera vez a 1923 por el científico francés Maurice Lemoigne, quien documentó la producción de una película sintética la cual identificó como ácido 3-oxibutírico en la bacteria *Bacillus subtilis* (Laranja & Bossier, 2020). Posteriormente

en 1926, Lemoigne logró aislar gránulos intracelulares de células de *Bacillus megaterium* utilizando cloroformo como solvente de extracción, demostrando que estas formaciones correspondían a un biopolímero, al que caracterizó como poli(3-hidroxiбутirato) (PHB). En ese mismo estudio, Lemoigne también observó que los diferentes niveles de acumulación de PHB dependían estrictamente de la composición química de los medios de crecimiento (Hopewell et al., 2009; Philip et al., 2007).

Décadas posteriores, en 1958, Macrae y Wilkinson demostraron que la función principal del PHB en las células era actuar como reserva de carbono y energía (Lenz & Marchessault, 2005). A principios de la década de 1960, se empezó reconocer el verdadero potencial industrial de los PHA y se registraron las primeras patentes por James Baptist; sin embargo, surgieron las primeras limitaciones, relacionadas con baja eficiencia de síntesis, altos costos, baja pureza del biopolímero y rendimientos de extracción deficientes (Baptist & Werber, 1960). En 1974, Wallen y Rohwedder documentaron la producción de otros polímeros diferentes a los PHB, como el polihidroxi valerato (PHV), polihidroxi hexanoato (PHHx) y polihidroxi heptanoato (PHHp) utilizando distintas matrices microbianas (Anjum et al., 2016). En la década de 1980, la empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI), registro una patente para la producción industrial, extracción y procesado de biopolíesteres empleando la bacteria *Cupriavidus necator* como microorganismo sintetizador, logrando una acumulación del 80% en biopolímero. En las últimas dos décadas, diferentes empresas han escalado la producción estos biopolímeros para distintas aplicaciones. Sin embargo, se denota que la capacidad de producción de estas empresas es todavía pequeña ya que producen alrededor de 10000-50000 Ton/año de biopolímero (Ramezani et al., 2015).

El uso de residuos frutales y vegetales como materia prima para la producción de PHA ha surgido como una alternativa sostenible frente a los plásticos derivados del petróleo. Estos residuos

son ricos en carbohidratos, fibras, lo que los hace adecuados como sustratos para fermentación bacteriana (Koller et al., 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que residuos agroindustriales como el suero de leche hidrolizado y el glicerol proveniente del biodiesel pueden inducir la producción de copolímeros P(3HB-co-3HV) con un contenido 8–10% de hidroxivalerato, a la vez que reducen los costos. Guzmán et al., (2017) reportaron el uso de almidón proveniente de cáscaras de papa, con bacterias halófilas (*Halomonas sp. M4CI*), obteniendo rendimientos de 0.016 g/L de biopolímero.

Liu et al., (2021) destacaron el potencial de los residuos de manzana especialmente la cáscara, por su riqueza en pectina y azúcares para producir PHA, aunque señalaron que su costo de producción seguía siendo superior al de los plásticos convencionales, por lo que consideraron crucial optimizar los procesos para mejorar la viabilidad. En la misma línea investigativa, Rao et al., (2019), optimizaron el proceso con diversas cáscaras de frutas y vegetales, logrando mediante el microorganismo *Bacillus subtilis* MTCC 144 una acumulación de 13.5g/L de PHA a partir cáscaras de sandía, con un rendimiento del 78.6%, y una disminución en los costos operativos del 25%.

Un estudio pionero realizado por Umesh et al. (2017), evidenció el potencial de la cáscara de papaya como sustrato de carbono para la producción de PHA mediante *Bacillus subtilis*, alcanzando una concentración máxima de 4.2g/L. Sin embargo, este estudio complementó la cáscara con sacarosa como fuente de carbono adicional para mejorar el rendimiento, lo que indica que la cáscara de papaya por sí sola no aportaba suficientes carbohidratos disponibles para una fermentación óptima en las condiciones evaluadas.

Si bien el uso de residuos agrícolas como sustratos potenciales para la producción de PHA ha aumentado significativamente en los últimos años, su implementación a escala industrial

todavía enfrenta grandes desafíos. Cada matriz agroindustrial (pulpas, cáscaras, semillas, líquidos lixiviados, etc.) requiere de procesos específicos de pretratamiento y la selección adecuada de cepas bacterianas. Avances recientes, como los presentados por Paduvari & Somashekara, (2025), muestran que la combinación de la ingeniería genética con estrategias de optimización de medios fermentativos podría mejorar la eficiencia de conversión de estos sustratos en PHA. Esta integración biotecnológica no solo mejoraría la relación costo-beneficio, sino que también facilitaría el escalado industrial de PHA derivados no solo de la cáscara de papaya, sino también de otras matrices agrícolas.

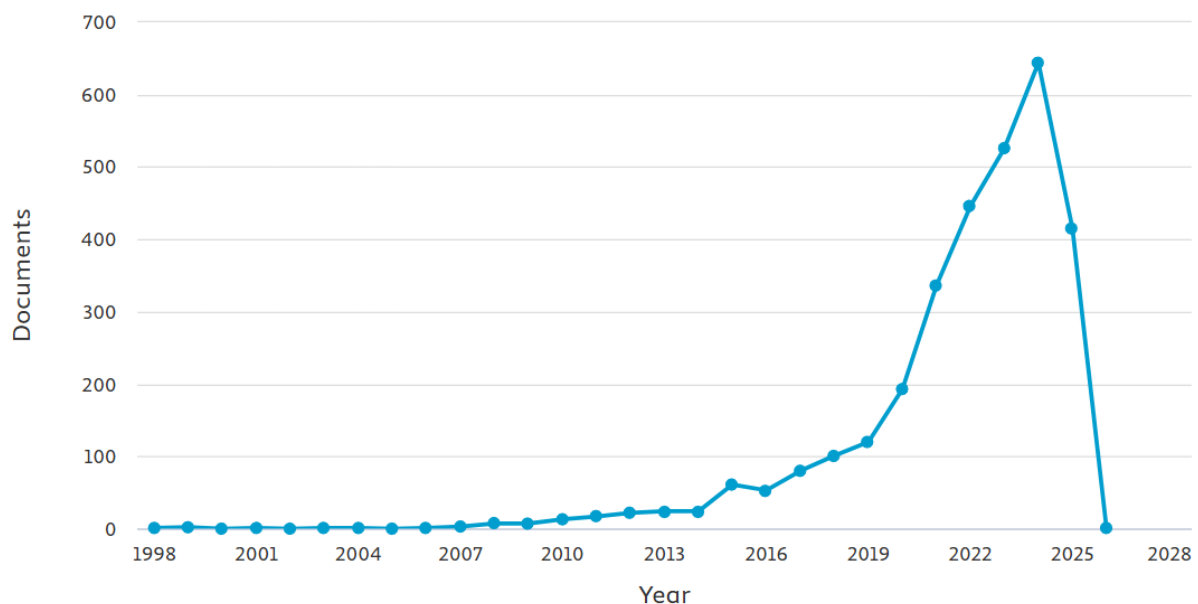
Por otra parte, con el fin de identificar las tendencias investigativas y los principales aportes científicos en la producción de PHA, se realizó una búsqueda bibliográfica en la base datos Scopus, a través de su herramienta “búsqueda avanzada”, en la cual se usaron dos palabras clave: “polyhydroxyalkanoates” y “organic waste”. Este análisis permitió analizar la evolución del interés académico en estas áreas, instituciones más involucradas, autores destacados y dispersión geográfica de la información, encontrando que desde el año 1998 hasta la fecha (julio de 2025) se han publicado un total de 1300 artículos, 1168 revisiones, 536 capítulos de libro entre otros (Scopus, 2025).

Como se observa en la **Figura No. 8**, se evidencia una evolución bastante pronunciada en el número de publicaciones relacionadas con PHA y residuos orgánicos en los últimos 10 años, especialmente a partir del 2019. El año con mayor número de publicaciones corresponde al 2024 con más de 600 publicaciones, no obstante, para el año en curso (2025) presenta una caída abrupta con apenas 415 documentos publicados. Se destacan autores como Maria A.M. Reis (afiliación actual universidad nueva de Lisboa, Lisboa, Portugal) y S.K. Bhatia (afiliación actual, universidad konkuk, Seúl, Corea del Sur) con más de 30 documentos publicados cada uno, enfocados en el

aprovechamiento de residuos agrícolas y aceites para la obtención de biopolímeros. Actualmente las tres instituciones con más producción científica bajo estas áreas son la universidad de ciencias de Malasia (penang, Malasia) (65 publicaciones), Ministerio de educación de china (65 publicaciones) y la Universidad nueva de Lisboa (Lisboa, Portugal) (52 publicaciones). No obstante, ninguna institución latinoamericana figura entre las principales, lo cual revela una carencia investigativa sobre esta temática. Esta tendencia también se evidencia al analizar la producción científica por país, donde la India lidera con más de 800 documentos, seguido de China con alrededor de 450 y otras naciones como Malasia, Italia y Estados Unidos, sin que ningún país latinoamericano aparezca en los diez primeros lugares, pese al gran potencial agrícola de muchos de ellos.

Figura No. 8 Tendencia en las publicaciones que involucran residuos orgánicos como fuente de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA)

Documents by year



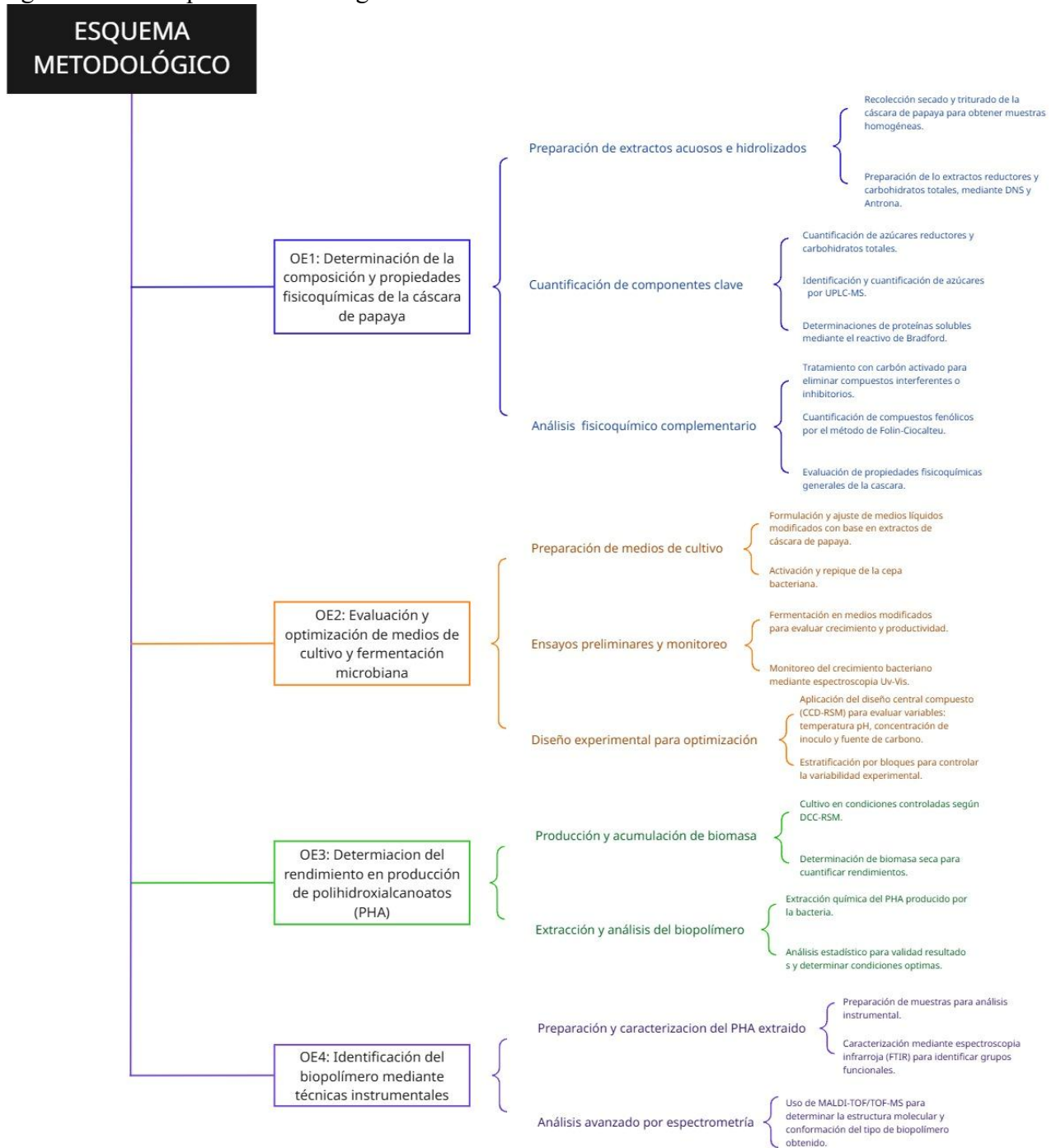
Esta exploración confirma que la investigación mundial en este campo no solo abarca aspectos técnicos de producción, sino también su impacto ambiental, económico y social, lo cual refuerza la premisa de explorar residuos agroindustriales como fuente sostenible para la producción de biopolímeros.

Por otra parte, mediante Scopus se realizó una nueva búsqueda utilizando las palabras clave “polyhydroxyalkanoates” y “papaya peels”, lo cual arrojó un total de 161 documentos relacionados. Sin embargo, al analizar detalladamente los resultados, se evidenció que únicamente una sola publicación reportó de manera directa la producción de PHA a partir de cáscaras de papaya como sustrato nutricional (Umesh et al., 2017), lo cual expone la mínima exploración que ha tenido este residuo como fuente de carbono. Esto contrasta con la gran cantidad de estudios que han sido explorados en otras matrices, destacándose las cáscaras de plátano por su alta disponibilidad en carbohidratos fermentables y su masiva comercialización (Kourmentza et al., 2017; Sudesh & Iwata, 2008), cáscaras de mango ricas en pectina y azúcares simples (Pandey et al., 2024; Vilas-Franquesa et al., 2024), cáscaras de naranjas y otros cítricos aprovechados por su alto contenido en sacarosa y hemicelulosa (Davaritouchae et al., 2023; Hou et al., 2025), así como cáscaras de piña que también han mostrado un marcado potencial para la síntesis microbiana de PHA (Bunkaew et al., 2023; Suwannasing et al., 2015). Por lo tanto, la escasa información disponible sobre el aprovechamiento de la cáscara de papaya como sustrato para la producción de biopolímeros, en conjunto con la consideración de que en Latinoamérica son muy limitados los reportes sobre la obtención de PHA a partir de residuos agroindustriales (en comparación con regiones europeas y asiáticas), resaltan la necesidad de explorar el gran potencial regional en cuanto a la generación de biomásas a partir de estos subproductos.

De modo que, la selección de la cáscara de papaya como sustrato nutricional fermentativo no solo corresponde a su composición química favorable o a sus propiedades bioactivas, sino también a su potencial como estrategia de valorización de residuos agrícolas en Colombia. Su aprovechamiento podría promover la economía circular en las cadenas agrícolas nacionales, alienándose con los objetivos de sostenibilidad económica, social y ambiental que hoy presenta una alta demanda por parte del sector productivo del país, generando a su vez conocimiento científico pionero en este ámbito.

4. Metodología

A continuación, se presenta el esquema metodológico que resume las principales etapas experimentales realizadas en la presente investigación y su correspondencia de acuerdo a sus objetivos específicos (OE) (Figura No. 10):
 Figura No. 10 Esquema metodológico.



Etapa 1: Recolección y preparación de la muestra de cáscara de papaya

4.1 Materia prima

La recolección de cáscaras de papaya se realizó en cuatro puntos estratégicos del área metropolitana de Bucaramanga, seleccionados por su alta concentración de comercios dedicados a la venta y distribución de frutas. Los sitios elegidos fueron: las casetas fruteras en la entrada principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), la plaza central, la plaza de mercado, La Concordia y por último la plaza de mercado Guarín. Esta selección tuvo como objetivo garantizar la obtención de una muestra significativa y representativa, considerando la diversidad en cuanto al origen del desecho, dado que la fruta proviene de distintos proveedores de la región.

Una vez recolectadas las cáscaras (2 kg – 3 kg aproximadamente por cada jornada de recolección), fueron depositadas en bolsas resellables tipo Ziploc, las cuales para asegurar su integridad y prevenir contaminación cruzada fueron etiquetadas detalladamente con la fecha, hora y lugar para garantizar la trazabilidad experimental y se transportó manteniendo cadena de frío hasta el laboratorio

4.2 Preparación de la muestra de cáscara de papaya

Las cáscaras frescas recolectadas fueron sometidas a un lavado exhaustivo con agua destilada, con el fin de remover suciedad, restos de pulpa en descomposición, y otros contaminantes. Una vez lavadas, las cáscaras fueron secadas cuidadosamente con toallas de papel para eliminar el exceso de humedad superficial.

4.2.1 Secado y triturado de la cáscara de papaya

Para el secado de las cáscaras de papaya fueron aplicados dos enfoques: un secado al ambiente (secado tradicional) y un secado en horno para obtener una curva de secado por

gravimetría. Esta doble metodología tuvo como propósito deshidratar adecuadamente la mayor cantidad de muestra posible para su almacenamiento, y, por otro lado, caracterizar la cinética de pérdida de humedad mediante un secado controlado (manteniendo la temperatura constante a 50°C).

Las cáscaras de papaya lavadas se cortaron en tiras (aprox. 2 cm x 10 cm), se dispusieron sobre una rejilla metálica, la cual se cubrió con una tela mosquitera para evitar la deposición de polvo o insectos durante el secado (Apéndice 1). Este método artesanal de secado al sol, reportado en investigaciones previas como técnica viable para deshidratar frutas y vegetales (A. Kumar et al., 2018), consistió en exponer las tiras directamente al sol durante siete días consecutivos. Durante este periodo, se monitorizó visualmente; disminución evidente de tamaño, pardeamiento en la coloración original y aumento en la fragilidad de las cascaras.

En simultáneo, se realizó el ensayo específico de curva de secado en horno, con el fin de cuantificar la pérdida de humedad a lo largo del tiempo bajo condiciones controladas. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente cinco porciones representativas de cáscara de papaya fresca previamente lavadas, las cuales fueron pesadas cuidadosamente y dispuestas en un horno de secado (UN 30, Memmert, Alemania) a una temperatura constante de 50°C. Las mediciones gravimétricas fueron realizadas en intervalos de tiempo de 0, 24, 48, 72, 96 y 144 horas, permitiendo posteriormente graficar la cinética de pérdida de humedad para determinar el punto de equilibrio.

Una vez completado el secado, la totalidad de las cáscaras fueron trasladada al laboratorio, donde fueron trituradas manualmente utilizando pistilo y mortero hasta obtener un triturado homogéneo (250-50 μm), esto con el fin de reducir el tamaño de partícula y facilitar su almacenamiento y posterior análisis. Finalmente, el material triturado de papaya seca fue almacenado en frascos de vidrio herméticos a una temperatura de -30°C, asegurado su

conservación hasta el momento de su uso (Apéndice 2). La ecuación empleada para calcular la pérdida de masa porcentual se presenta en la ecuación 1.

$$\% \text{ pérdida de masa} = \frac{(\text{Peso Inicial} - \text{Peso en el tiempo}) (g)}{\text{Peso Inicial} (g)} \times 100 \text{ (Ecuacion 1)}$$

4.2.2 Hidrólisis ácida y preparación del extracto acuoso de la cáscara de papaya

Con el fin de liberar los azúcares presentes en la cáscara de papaya seca para su posterior cuantificación, se evaluaron dos tratamientos: i) hidrólisis ácida de la cáscara de papaya, ii) extracción acuosa. La metodología para la hidrólisis ácida se basó en lo descrito por Świątek et al. (2020) con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon tres soluciones de ácido clorhídrico (HCl) al 1%, 2% y 3% (v/v). Por cada tratamiento, se pesaron 0.5 g del material seco de cáscara de papaya (triturado) y se suspendieron en 10 mL de la respectiva solución ácida (relación 0.5:10 p/v). Las mezclas resultantes se transfirieron a vasos de precipitado tapados con papel aluminio y se sometieron a autoclave a 121°C durante 15 minutos para favorecer la hidrólisis. Posteriormente, cada muestra fue filtrada usando tela para café con el fin de separar material sólido grueso, y el líquido filtrado fue centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación fue transferido a un tubo Falcón de 15 mL, y se repitió el proceso de centrifugación dos veces más al sobrenadante para asegurar la remoción de sólidos. El extracto hidrolizado (codificado como EH) fue almacenado en frascos herméticos y conservados en nevera (4°C) hasta su posterior análisis.

En paralelo, como control metodológico, se preparó un extracto acuoso (codificado como EA) modificando la metodología reportada por Kumar et al. (2012). Para ello, se calentaron 100 mL de agua tipo I hasta alcanzar temperatura de ebullición, a la que se le añadieron 5 g de la

muestra de cáscara de papaya. La mezcla se mantuvo bajo agitación lenta durante 30 minutos para favorecer la extracción de azúcares solubles. Posteriormente, el extracto fue filtrado con tela para café y la masa hidratada residual exprimida manualmente para recuperar el máximo volumen posible. Este extracto acuoso fue sometido exactamente al mismo procedimiento de centrifugación descrito anteriormente hasta obtener un líquido claro con bajo contenido de sólidos en suspensión, el EA fue almacenado en refrigeración.

4.3 Determinación del contenido de azúcares reductores totales y proteínas en el extracto acuoso e hidrolizado de la cáscara de papaya.

4.3.1 Preparación del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

La preparación del reactivo DNS se realizó siguiendo la metodología descrita por Burgos Montañez, (2020), con las adaptaciones necesarias para este estudio. Inicialmente se pesaron 1.6 g de hidróxido de sodio (NaOH), 43.8 g de tartrato de Na-K y 1.0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. El NaOH fue disuelto en un vaso de precipitados con aproximadamente 50 mL de agua Tipo I, agitando hasta su completa disolución. Posteriormente, se añadió lentamente el tartrato de Na-K, manteniendo la agitación magnética para asegurar la homogeneidad de la solución, la cual tomó una apariencia transparente y uniforme. Una vez obtenida la solución base, el vaso de precipitados fue cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz, y se agregó el ácido 3,5-dinitrosalicílico de manera gradual. Esta mezcla resultante se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con agua Tipo I. Finalmente, se etiquetó la solución y se dejó en agitación continua durante toda la noche en un frasco ámbar, una vez obtenida una solución homogénea, se almacenó en refrigeración hasta su posterior uso.

4.3.2 Preparación de la curva de calibración de dextrosa

La curva de calibración de azúcares reductores se realizó siguiendo la metodología propuesta por Burgos et al. (2020). Como estándar externo se utilizó una solución stock de dextrosa anhidra (99% de pureza, Merck), preparada disolviendo exactamente 0.075 g de dextrosa en agua Tipo I y aforando hasta un volumen final de 25 mL, obteniendo una concentración inicial de 3 g/L. A partir de la solución stock, se prepararon las respectivas diluciones para establecer seis puntos de calibración dentro de un rango de concentraciones conocido y adecuado para el método, siendo entre 0.2 g/L y 3 g/L (Apéndice 3).

Para cada punto de la curva, se tomaron 250 μL de la solución correspondiente y se depositaron en tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio para proteger a la reacción de la luz. Posteriormente se añadieron 250 μL del reactivo DNS previamente preparado, las mezclas se llevaron a calentamiento en baño María (100°C) durante aproximadamente 8 minutos para desarrollar el color característico. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron los tubos y se enfriaron rápidamente mediante un baño de hielo por 5 min, seguidamente se añadieron 2.5 mL de agua Tipo I a cada tubo y se agitaron en un vortex hasta lograr homogenizar la solución.

Finalmente, de cada tubo, se tomaron alícuotas de 200 μL , las cuales se depositaron en orden ascendente de concentración sobre una microplaca de 96 pozos. La lectura de absorbancia se realizó a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (BioTek Epoch, Agilent Technologies, EE. UU). Con los datos obtenidos se construyó la respectiva curva de calibración graficando las absorbancias promedio contra las concentraciones establecidas (Apéndice 4), verificando la linealidad mediante el coeficiente de determinación R^2 (Apéndice 5). Cabe resaltar que todos los experimentos de cuantificación, incluyendo los posteriores a esta curva se realizaron

por triplicado tanto experimental como técnico con el fin de obtener reproducibilidad con un bajo índice de desviación estándar (Burgos Montañez, 2020).

4.3.3 Cuantificación de azúcares reductores totales

La cuantificación de azúcares reductores totales en las muestras se realizó sobre los sobrenadantes de ambos tratamientos EH y EA. Para ello, se empleó la misma metodología colorimétrica de DNS descrita en la sección anterior (4.3.2). Las muestras EH y EA fueron diluidas previamente en una proporción 1:20 (extracto:agua) con el fin de asegurar que las lecturas de absorbancia quedaran dentro del rango lineal determinado en la curva de calibración (0.2g/L a 3.0 g/L). Posterior a la reacción con el reactivo DNS, se tomaron alícuotas de cada tubo, las cuales se dispusieron en una microplaca de 96 pozos para la lectura de absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro de microplacas (EPOCH Agilent Technologies, EE.UU.). Las concentraciones en azúcares reductores en las muestras fueron calculadas aplicando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración, los resultados fueron expresados en gramos por litro (g/L). Todos los análisis se realizaron por triplicado, tanto experimental como técnico.

4.3.4 Cuantificación de carbohidratos totales

Para la determinación de carbohidratos totales en los extractos, se realizó mediante la técnica colorimétrica basada en el reactivo de antrona, siguiendo la metodología descrita por Plummer, (1978). Para preparar el reactivo de antrona, se disolvieron lentamente 0.2 g de antrona en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado (97% v/v) previamente enfriado (~4°C), manteniendo la mezcla en baño con hielo y agitación constante para evitar la degradación térmica del reactivo. La solución obtenida fue homogenizada completamente y almacenada en refrigeración, protegida de la luz en un frasco ámbar envuelto en papel aluminio, hasta su uso.

Para la curva de calibración, se prepararon soluciones estándar de sacarosa en agua Tipo I con concentraciones de 0, 10, 20, 40, 40, 60, 80, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los extractos de papaya fueron previamente diluidos en una relación 1:120 con agua tipo I para ajustar su concentración al rango lineal de la curva de calibración.

Posteriormente, se dispuso 1 mL de cada estándar y de cada extracto diluido en tubos de ensayo previamente cubiertos en papel aluminio para evitar foto degradación. A cada tubo sellado se le adicionaron 5 mL del reactivo de antrona, y las mezclas se homogenizaron mediante agitación en vortex durante 30 segundos. Los tubos se incubaron en baño María durante 15 minutos a una temperatura entre 90-100°C monitoreada constantemente mediante termómetro para mantener fijo el factor temperatura.

Finalizado el tiempo de incubación, los tubos fueron retirados del baño y enfriados a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, en condiciones oscuras y si agitación. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de 200 μL de cada reacción a una microplaca de 96 pozos de fondo plano.

Las mediciones de absorbancia se realizaron de inmediato a una longitud de onda de 620 nm utilizando un lector de microplacas (EPOCH Agilent Technologies, EE.UU.). Todas las muestras y estándares fueron analizados por triplicado. Los datos obtenidos de la curva de calibración (Apéndice 6, 7) se emplearon para calcular la concentración total de carbohidratos en las muestras, expresada en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.5 Identificación y cuantificación de azúcares por UPLC-MS

El análisis de carbohidratos presentes en el extracto acuoso de cáscara de papaya se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un detector de masas simple

cuadrupolo. Se llevo a cabo en un sistema UPLC de la casa Waters, modelo ACQUITY UPLC-H-Class Plus (Waters, Milford, MA, USA), acoplado a un gestor de muestras FTN-H y a un gestor de disolventes cuaternarios. La separación cromatográfica se realizó en una columna amidada AQCUIITY UPLC BEH Amide Column, 130Å, 1.7 μm , 2.1mm x 50mm (Waters, Milford, MA, USA), manteniendo la temperatura de la columna a 26 °C.

El análisis se realizó siguiendo la metodología reportada por (Benvenuti, 2022), con algunas modificaciones. La fase móvil empleada consistió en agua Tipo I y acetonitrilo ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) en proporción 50:50 y 0.01% v/v de hidróxido de amonio como agente ionizante a un caudal de 0.3 mL/min en condiciones isocráticas. El volumen de inyección fue de 0.5 μL y la detección se realizó mediante un detector de masas de simple cuadrupolo ACQUITY QDa (Waters, Milford, MA, EEUU). La adquisición de iones se efectuó en modo negativo (ESI-), empleando un voltaje de cono de 15 V, energía de capilar de 0.80 kV y una temperatura de la fuente fue de 120°C.

Para la cuantificación, se preparó una curva de calibración de seis puntos utilizando sacarosa como estándar, en un rango de concentraciones entre 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las soluciones estándar se prepararon en $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50:50, v/v), filtradas con membrana PTFE de 0.22 μm y transferidas a viales ámbar para HPLC.

El extracto acuoso de cáscara de papaya se obtuvo disolviendo 1 g de polvo seco en 20 mL de agua tipo I. Asumiendo una concentración inicial aproximada de 10 g/L de azúcares totales, el extracto fue posteriormente diluido en proporción 1:2000 con $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50:50, v/v), filtrado con membrana PTFE de 0.22 μm y transferido a un vial ámbar. El tiempo total de corrida por muestra se estableció en 12 minutos. Las mediciones se realizaron en modo SIR (Single ion recording), monitorizando los iones característicos de las especies de carbohidratos previamente identificadas. Todas las muestras, así como los estándares, fueron analizados por triplicado. Los promedios de

las áreas cromatográficas obtenidas para cada punto de la curva estándar fueron empleados para la construcción de la curva de calibración, esto con el fin de cuantificar la sacarosa presente en EA (Apéndice 9 y 10).

4.4 Cuantificación de proteínas solubles en los extractos acuoso e hidrolizado

4.4.1 Preparación del reactivo de Bradford

El reactivo Bradford fue preparado siguiendo la metodología descrita por (Cabra et al., 2013). Inicialmente, se pesaron 10 mg de azul de Coomassie G-250 y se disolvieron en 5 mL de etanol (95%, v/v), asegurando una mezcla homogénea mediante agitación constante. Posteriormente. Se adicionaron 10 mL de ácido fosfórico (85%, v/v), finalmente se completó el volumen a un aforo de 100 mL con agua Tipo I. La solución obtenida fue centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos para eliminar cualquier precipitado no disuelto, y el sobrenadante fue trasvasado a un frasco ámbar debidamente etiquetado para ser almacenado en nevera hasta su uso.

4.4.2 Preparación del reactivo de Buffer fosfato (pH 7)

El buffer fosfato a pH 7 se preparó siguiendo la metodología por (Cabra et al., 2013). Para ello, se disolvieron 0.33 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 0,65 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en 50 mL de agua Tipo I, utilizando agitación continua hasta homogenización completa. La mezcla fue transferida a un matraz aforado de 100 mL y aforado hasta la marca con agua Tipo I. La solución preparada se mantuvo a temperatura ambiente.

4.4.3 Preparación de la curva de calibración con Albúmina de suero bovino (BSA)

Para la cuantificación de proteínas, se construyó una curva de calibración utilizando albumina de suero bovino (BSA) como patrón externo, mediante la metodología propuesta por Cabra et al., (2013). Inicialmente, se pesaron 4 mg de BSA y se disolvieron completamente en 4

mL de agua Tipo I, obteniendo una solución madre con una concentración inicial de 1mg/mL. A partir de esta solución inicial, se prepararon diluciones para cubrir un rango de concentraciones entre 200 µg/mL y 1400 µg/mL.

Las diluciones preparadas correspondieron a las siguientes concentraciones 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 µg/mL. Cada una de estas soluciones se llevó a un volumen final de 1.4 mL, utilizando el buffer fosfato preparado en la sección anterior para ajustar las concentraciones finales de las diluciones (Apéndice 14).

Seguidamente, se tomaron alícuotas de 40 µL de las diluciones preparadas, así como de las muestras EH y EA, para adicionar inmediatamente 2 mL de reactivo Bradford preparado en la sección 4.4.1. Las mezclas fueron homogenizadas mediante agitación suave, y las muestras se incubaron protegidas de la luz a temperatura ambiente (23°C) durante 5 minutos. Posteriormente, las absorbancias tanto de las diluciones como de las muestras fueron medidas en un lector de microplacas, a una longitud de onda de 595 nm, para posteriormente, construir con los datos obtenidos, la curva de calibración para determinar la concentración de proteínas en los extractos evaluados, los cuales fueron expresados en µg/mL (Apéndice 15).

4.5 Tratamiento con carbón activado.

Con la finalidad de mejorar la calidad de los extractos hidrolizados y evitar posibles interferencias en los análisis posteriores (cuantificación de azúcares) o limitar su potencial como sustrato fermentativo, los extractos fueron sometidos a un tratamiento con carbón activado (1-2 mm, Merck millipore) con el propósito de eliminar posibles interferentes en la matriz (polifenoles, pigmentos, derivados del furano, entre otros), siguiendo la metodología descrita por Arminda et al., (2021). Este procedimiento permitió clarificar las soluciones y reducir concentraciones de

compuestos no deseados que podrían afectar significativamente el crecimiento bacteriano o alterar mediciones espectrofotométricas.

Para ello, se prepararon mezclas manteniendo una relación entre el volumen del hidrolizado y la cantidad de carbón activado granular del 5% (m/v). Las muestras fueron dispuestas en un agitador orbital (JPSHID40, JPinglobal, Colombia) a 100 rpm, una temperatura de 40°C durante 60 minutos para garantizar una adecuada adsorción de los compuestos interferentes o inhibitorios. Finalizado el tiempo de tratamiento, se utilizó tela para queso (gasa de algodón de mallado fino, grado alimenticio) como medio de filtrado inicial, debido a su alta permeabilidad para líquidos y su capacidad para retener partículas sólidas pequeñas. Las muestras fueron filtradas con tela para queso, y posteriormente centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos para eliminar sólidos suspendidos. Finalmente, los sobrenadantes se recolectaron en tubos Falcon y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis posterior. Se resalta que, este tratamiento fue aplicado tanto a los extractos acuosos como a los hidrolizados.

4.6 Cuantificación de compuestos fenólicos por método de Folin-Ciocalteu.

Se aplicó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu para evaluar la presencia de compuestos fenólicos totales en los extractos acuosos e hidrolizados. La cuantificación de fenoles totales es importante, ya que estos compuestos presentes en el medio de fermentación, pueden actuar como inhibidores en procesos de fermentación bacteriana (Kauffmann & Castro, 2023).

En la determinación se empleó ácido gálico (pureza > 98 %, Merck, Alemania) como estándar de calibración externa. Inicialmente, se preparó una solución stock de ácido gálico con una concentración de 1000 ppm en agua Tipo I, a partir de la cual se realizaron diluciones para construir una curva de calibración, con concentraciones de 30, 45, 60, 85, 100 y 120 ppm (A Agbor

et al., 2014). Posteriormente, se dispusieron 150 μL de los puntos de calibración en tubos de ensayo, a los cuales se añadieron en estricto orden, y con agitación entre cada adición 860 μL de una solución de carbonato de sodio al 7.5% (m/v) y 430 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido 1:10 con agua Tipo I.

Las mezclas fueron incubadas protegiéndolas de la luz por 1 hora a temperatura ambiente (Apéndice 17). Posteriormente, se registraron por triplicado las absorbancias de los experimentos de reacción (puntos de calibración y muestras) a una longitud de onda de 765 nm en un lector de microplacas (Apéndice 18). Los resultados fueron expresados en mg/L utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración construida.

4.7 Análisis fisicoquímico de la cáscara de papaya

El análisis fisicoquímico de la cáscara de papaya se realizó a través del Laboratorio Químico de Consultas Industriales (LQCI), organismo de extensión adscrito a la escuela de química de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Este laboratorio cuenta con acreditación por parte de instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) bajo la norma ISO/IEC 17025, así como certificación otorgada por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y el Instituto Nacional de Salud (INS), lo que garantiza la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Para la determinación de sodio, potasio, calcio y magnesio inicialmente las muestras fueron secadas en estufa a 70-80°C hasta masa constante, posteriormente se trituro y tamizo para asegurar homogeneidad. A tubos de digestión tarados fueron añadidos entre 0.5 y 1.0g de muestra, agua destilada, H₂O₂ 30 % v/v, HNO₃ 65 % (ultrapuro) y HCl 30 % (ultrapuro), para luego iniciar la digestión asistida por microondas (con control de tiempo, temperatura y potencia). Una vez

finalizo el ciclo, el digestado fue trasvasado a recipientes previamente pesados, y ajustados a un volumen específico, finalmente el análisis se llevo a cabo por FLAA en un equipo de absorción atómica (AA240FS, Agilen Technologies, EE. UU), la metodología analítica se ejecutó bajo protocolos internos validados y basados en la norma UNE 1134:1995.

El secado de la muestra para la determinación de humedad se llevó a cabo en estufa de aire (FD 53/E2, Binder, Alemania) y su determinación gravimétrica mediante balanza analítica (ML240/01, Meltter Toledo, EE. UU), para ello se secaron capsulas y tapas de aluminio a 130°C para pesarlas posteriormente una vez enfriadas, se dispusieron 2-3 g de muestra triturada en las capsulas y llevadas a secado por 60 minutos a 130°C. Transcurrido el tiempo de secado se cubrieron las capsulas y llevadas de inmediato a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, el método analítico fue llevado a cabo mediante la metodología AACC International 44-15.02 (Moisture – Air Oven Methods).

Para la determinación de cenizas inicialmente se acondicionaron crisoles y tapas calcinándolos y enfriándolos en desecador para pesarlos una vez alcancen temperatura ambiente. Posteriormente se dispusieron porciones de 3 g y se calcinaron en mufla a 525°C hasta obtención de una ceniza clara. Los calcinados fueron enfriados en desecador hasta temperatura ambiente e inmediatamente pesados. La metodología analítica fue ejecutada con base en AOAC Official Method 940.26- Ash fruits and Fruits Products.

Etapa 2: Activación de cepa bacteriana y preparación de medios de cultivo modificados

4.8 Preparación de medio de cultivo y repique

El microorganismo utilizado en esta investigación fue previamente aislado y caracterizado, a partir de muestras de suelo húmedo en Bucaramanga (Santander). La cepa seleccionada para las pruebas corresponde a una bacteria nativa identificada como *Bacillus thuringiensis*, identificada por su capacidad para producir polihidroxiclcanoatos (PHA). La identificación taxonómica se realizó mediante secuenciación del gen ribosomal 16S reportada en la investigación de ,correspondiente a una bacteria aerobia grampositiva, no estricta, de la familia Bacillaceae, clasificada dentro del grupo 1 del género *Bacillus* (Sauka H & Benintende B, 2008) e identificada como *Bacillus thuringiensis* (codificada como C01).

El mantenimiento y repique de la cepa se realizó mediante el medio sólido Luria Bertani (LB), preparado en agua Tipo I, homogeneizado en caliente y esterilizado en autoclave (JPA40LH, JP Inglobal, Colombia) a 121°C y 20 psi durante 20 minutos. Posteriormente en condiciones estériles, dentro de una cabina de flujo laminar, el medio estéril aún caliente fue vertido en cajas Petri de vidrio y se dejó enfriar hasta su gelificación (Sanz Cervera, 2014)

Posteriormente, se sembró por agotamiento en estrías con asa bacteriológica una sola colonia de la cepa previamente aislada. Las cajas Petri inoculadas se incubaron a 30°C durante 72 horas, tras lo cual se verificó la pureza del cultivo mediante inspección visual, comprobando la ausencia de colonias contaminantes (Menes et al., 2022).

4.9 Preparación de medio de activación e inoculación del cultivo

Para la activación de la cepa *Bacillus thuringiensis*, se empleó un medio líquido enriquecido, formulado según la metodología descrita por Carolina et al., (2022). El medio de activación estuvo compuesto por: peptona (17g/L), dextrosa anhidra (2g/L), NaCl (5g/L) y K_2HPO_4 (2.5g/L), todos disueltos en agua Tipo I. Los componentes se pesaron con precisión, se homogenizaron en caliente mediante agitación magnética, y la solución final se dispuso en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, el cual fue sellado con papel aluminio. Posteriormente, el medio fue esterilizado en autoclave a 121°C y 20 psi durante 20 minutos.

Una vez esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, el medio de cultivo fue inoculado utilizando para ello, una cabina de flujo laminar. Para ello, se tomó un loop de una colonia bacteriana previamente repicada sobre medio LB, utilizando un asa bacteriológica estéril, y transferida inmediatamente al matraz con el medio de activación líquido. El matraz inoculado fue sellado con papel aluminio estéril y parafilm para evitar contaminación cruzada. El cultivo de activación fue incubado durante 24 horas a 30°C y 150 rpm en un agitador Orbital Digital (JPSHID40, JPinglobal, Colombia)

Con el fin de estandarizar la concentración del inóculo a adicionar a los medios de fermentación, se utilizó la escala de turbidez de McFarland, la cual fue preparada a partir de la metodología descrita por Gayathiri, (2018). En el cual, se miden las absorbancias a 595 nm mediante un lector de microplacas (EPOCH Agilent Technologies, EE.UU.) a diferentes soluciones conformadas por cantidades exactas de $BaCl_2$ y H_2SO_4 descritas en el Apéndice 20. Posteriormente, se construyó una curva de calibración para corroborar la linealidad. El cultivo fue ajustado a una turbidez equivalente a 2 unidades McFarland, mediante diluciones sucesivas con

agua estéril Tipo I, logrando una concentración celular aproximada de 6×10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) por unidad de volumen en mL (Apéndice 21).

4.10 Preparación y ajuste de medios de cultivo modificados.

Para evaluar el efecto del sustrato derivado de la cáscara de papaya como fuente alternativa de carbono en fermentaciones bacterianas, se prepararon dos medios de cultivo a partir de un medio mínimo de sales (MSM). Este medio estuvo compuesto por extracto de levadura (1 g/L), fosfato mono potásico (KH_2PO_4 , 2 g/L), fosfato disódico (Na_2HPO_4 , 7 g/L), sulfato de magnesio (MgSO_4 , 0.2 g/L), una solución de metales traza (1 mL/L); la solución de metales (por litro): 10g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.25g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sulfato de amonio (NH_4)₂SO₄ (1 g/L), todos disueltos en agua Tipo 1. En los medios preparados, la fuente de carbono tradicional (glucosa) fue reemplazada por los extractos previamente tratados (EH y EA). La concentración de azúcares reductores presentes en ambos medios líquidos fue cuantificada posteriormente mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) bajo la misma metodología descrita en la sección 4.3.3. Tanto en el caso de los EH y EA, las concentraciones iniciales en azúcares reductores solían superar los 10 g/L. Por lo tanto, para estandarizar las condiciones experimentales, dichas soluciones fueron diluidas empleando $V_1C_1 = V_2C_2$, y adicionando únicamente agua tipo I hasta obtener una concentración final aproximada de 10 g/L.

A partir de lo planteado, se prepararon por triplicado medios modificados de 100 mL, en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los medios líquidos fueron ajustados a pH neutro (pH 7.0) utilizando soluciones de NaOH o HCl al 1M según fuese necesario. La homogenización de los medios se realizó en plancha de calentamiento con agitación magnética constante, hasta obtener un líquido traslúcido y homogéneo. Finalmente, los medios preparados se cubrieron con papel aluminio, y se esterilizaron en autoclave manual a 120°C y 20 psi durante 15 minutos, procurando

no exceder el tiempo de esterilización para evitar la degradación térmica de los azúcares presentes. Transcurrido el tiempo, los medios fueron enfriados a temperatura ambiente y almacenados bajo condiciones estériles hasta su posterior inoculación.

4.11 Ensayo preliminar de fermentación en medios modificados y monitoreo de crecimiento bacteriano

La evaluación preliminar de la capacidad de *B. thuringiensis* para crecer en estos medios modificados con extractos de cáscara de papaya (EH y EA), se llevaron cabo mediante fermentaciones controladas. Los medios de cultivo modificados fueron inoculados con una porción de 2 mL (2% v/v) de medio de activación inoculado con *B. thuringiensis* previamente ajustado a una turbidez en la escala 2 de McFarland. Los biorreactores se incubaron a 30°C durante 72 horas en un agitador orbital Digital (JPSHID40, JPinglobal, Colombia) a 150 rpm. Como control experimental, se utilizó MSM con dextrosa anhidra (10 g/L) como fuente de carbono, el cual fue esterilizado, inoculado e incubado bajo las mismas condiciones descritas para los medios modificados.

El monitoreo del crecimiento bacteriano fue realizado mediante espectrofotometría UV-Vis para construir una curva cinética de crecimiento. En intervalos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas, se tomaron alícuotas de 200 µL de cada cultivo, las cuales fueron diluidas en relación 1:4 con agua tipo I para evitar absorbancias mayores a 1. Las muestras diluidas previamente homogenizadas para evitar sedimentación fueron dispuestas en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. La densidad óptica fue registrada a 595 nm mediante un lector de microplacas, (EPOCH Agilent Technologies, EE.UU.) por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los datos. Los resultados se expresaron mediante curvas de crecimiento (densidad óptica vs tiempo) para cada biorreactor.

Etapa 3: Obtención de biomasa bacteriana, acumulación y extracción de PHA

4.12 Diseño de experimentos (Diseño central compuesto– respuesta de superficie CCD-RSM)

El diseño de experimentos fue planteado y optimizado mediante el software estadístico *Desing-Expert® (Version 13.0, Stat-Ease inc, EE. UU)*(Versión 13.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EE. UU) ampliamente utilizado para la optimización de procesos biotecnológicos. Se empleó un enfoque de superficie de respuesta (RSM) basado en un diseño central compuesto (CCD) de tres niveles (mínimo, central y máximo). Para evaluar simultáneamente los efectos y las interacciones entre factores, las variables independientes fueron establecidas como: X₁- Temperatura de incubación (°C), X₂-pH del medio, X₃-concentración inicial de azúcares reductores (g/L) y X₄- relación de inóculo (%v/v). Como variable de respuesta (Y) se estableció el rendimiento de biopolímero extraído (g/L). El diseño experimental generó un total de 30 ensayos experimentales, combinando 8 experimentos axiales, 16 experimentos factoriales y 6 experimentos como réplicas en el punto central, permitiendo evaluar los efectos individuales, efectos de interacción y posibles curvaturas dentro del espacio experimental definido (Apéndice 23).

4.12.1 Preparación de medios de cultivo líquidos modificados según el diseño experimental (DCC-RSM)

La preparación de los medios de cultivo líquidos modificados, ajustados a las condiciones de establecidas por el CCD-RSM, se realizó siguiendo el protocolo de la sección 4.7, con las modificaciones específicas correspondientes a cada combinación experimental. Con base en los resultados de los ensayos preliminares, se determinó que el medio de fermentación a optimizar

sería aquel formulado a partir del extracto acuoso de cáscara de papaya como fuente de principal de carbono.

A estos medios modificados se les adicionaron las cantidades de sales del MSM previamente descritas, disolviendo los componentes en caliente mediante plancha de calentamiento con agitación magnética hasta obtener una solución homogénea y translúcida. La concentración de azúcares reductores en cada biorreactor se ajustó cuantitativamente de acuerdo a los niveles experimentales establecidos en el diseño, mediante el método colorimétrico de DNS según la metodología experimental establecida en la sección 4.3.3.

Finalmente, los medios líquidos preparados se esterilizaron en autoclave manual bajo las mismas condiciones previamente mencionadas (20 psi, 120 °C y 15 min).

4.12.2 Efecto de la temperatura de incubación.

La variable experimental física correspondiente a la temperatura de incubación fue evaluada en tres niveles: 27°C, 30°C y 37°C, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de crecimiento.

4.12.3 Efecto del pH inicial.

El pH inicial del medio de cultivo se ajustó usando soluciones de ácido clorhídrico (HCl) 1M y solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1M, representando tres condiciones experimentales: medio ácido (5.5), medio neutro (7.0) y medio básico (8.5).

4.12.4 Efecto de la relación de inóculo.

La influencia de la relación de inóculo sobre la fermentación fue evaluada adicionando diferentes porcentajes en volumen (% v/v) de inóculo bacteriano previamente ajustado a una turbidez equivalente a 2 McFarland (6×10^8 UFC/mL). Las concentraciones de ensayo fueron: 2%,

4% y 6% v/v, asegurando que el volumen final de fermentación se mantuviera constante en todos los ensayos, con lo cual el volumen de inóculo adicionado remplazo proporcionalmente el volumen de medio de cultivo correspondiente.

4.12.5 Efecto de la concentración de extracto de cáscara de papaya como fuente de carbono.

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono, se prepararon medios de cultivo con tres niveles de concentración de azúcares reductores disueltos, equivalentes a 10, 20 y 30 g/L.

4.12.6 Estratificación experimental por bloques (Bloques 1-5)

Los experimentos fueron organizados mediante un diseño por bloques, en función de las variaciones de temperatura definidas por el CCD-RSM. De este modo, se establecieron cinco bloques experimentales independientes, cada uno definidos por un nivel térmico específico: Bloque 1 (30°C), Bloque 2 (37°C), Bloque 3 (44°C), Bloque 4 (51°C) y Bloque 5 (23°C). Esta estratificación permitió evaluar de forma organizada los efectos específicos de la temperatura sobre la producción de PHA. Cada bloque incluyó réplicas experimentales aleatorizadas para garantizar la robustez de los resultados.

4.13 Determinación de la biomasa seca

Finalizadas las 72 horas de fermentación, la biomasa bacteriana fue separada del medio de cultivo mediante centrifugación en tubos Falcón de 50 mL a 6000 rpm (4000g) durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. El pellet celular obtenido se lavó tres veces con alícuotas de 40 mL de agua tipo I, realizando una centrifugación bajo las mismas condiciones entre cada resuspensión con el fin de eliminar residuos del medio líquido (sales). La biomasa lavada se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL previamente pesados y fueron secados en un termo mezclador (HM-100 Pro,

DLAB Scientific Malasia) durante 72 horas, hasta alcanzar peso constante. La biomasa seca se cuantificó por diferencia gravimétrica (masa final – masa inicial del Eppendorf). El resultado fue expresado en gramos de biomasa seca por litro de medio de cultivo (g/L). Finalmente, la biomasa deshidratada fue homogenizada mediante trituración en mortero con pistilo hasta obtener un polvo fino, el cual fue almacenado en tubos Eppendorf de 2 mL debidamente etiquetados para su uso posterior.

4.14 Identificación y extracción del PHA producido por el aislado bacteriano

La extracción de PHA se realizó a partir de lo reportado por Yasin & Al-Mayaly. (2021) con algunas modificaciones. Fueron pesados 30 mg de biomasa seca en polvo en balanza analítica de precisión (0.1mg) (HR 250-A, A&D Company, Tokio,) y posteriormente dispuestos en tubos Falcón de 15 mL. A cada muestra se adicionaron 5.2 mL de cloroformo, seguido de un tratamiento con ultrasonido (Easy 30 H, Elma Schmidbauer GmbH, Alemania) a 30°C durante 15 minutos, para facilitar la lisis celular y la solubilización del bioplástico tipo PHA. Posteriormente, fueron incorporados 2.1 mL de hipoclorito de sodio (5% v/v) para digerir los componentes celulares no poliméricos; la matriz se homogenizó en vortex a máxima capacidad por 10 minutos y luego se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se observaron tres fases: una capa superior acuosa, que fue desechada; una fase intermedia con residuos celulares, y una fase inferior orgánica rica en PHA, la cual fue extraída cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Esta fase orgánica se recolectó en tubos Eppendorf de 2mL, previamente etiquetados y pesados, estos fueron dispuestos en una cabina de extracción para evaporar el cloroformo a temperatura ambiente durante 24 horas. Trascorrido este tiempo, se registró nuevamente el peso y se verificó la

presencia de un sólido blanquecino; la cantidad de PHA obtenido se determinó mediante diferencia gravimétrica y se expresó en términos de % de extracción.

4.12.6 Parámetros de fermentación.

Tras finalizar cada fermentación, se calcularon los siguientes parámetros de rendimiento para evaluar la eficiencia del proceso (Quintero-Silva et al., 2024).

Concentración de biomasa seca.

La concentración de biomasa celular seca (X), es expresada en gramos por litro (g/L) y se determinó gravimétricamente según la Ecuación 2:

$$X \text{ (g/L)} = \frac{\text{Cantidadde biomasa seca (g)}}{\text{Volumen de cultivo (L)}} \text{ (Ecuación 2)}$$

Rendimiento PHA-biomasa.

Representa la eficiencia ($Y_{p/x}$) con la que la biomasa celular convierte los recursos metabólicos en el producto de interés, se expresa en (g/g) y se determinó según la Ecuación 3:

$$Y_{p/x} = \frac{(\text{Masa PHA final} - \text{Masa PHA inicial}) \text{ (g)}}{(\text{Masa Biomasa seca final} - \text{Masa Biomasa seca inicial}) \text{ (g)}}$$

$$= \frac{\Delta p}{\Delta x} \text{ (Ecuación 3)}$$

Concentración de PHA.

La concentración de PHA es una medida directa de la cantidad de biopolímero acumulado en el volumen de cultivo expresada en gramos por litro (g/L). Se determinó según la Ecuación 4:

$$\text{PHA (g/L)} = Y_{p/x} * X \text{ (Ecuación 4)}$$

Productividad Volumétrica de PHA (Q_p).

Principal variable de respuesta, representa la velocidad global del proceso. Se expresa en gramos de PHA por litro de cultivo por hora, se calculó con la ecuación 5.

$$Q_p = \frac{(\text{Masa PHA final} - \text{Masa PHA inicial}) (g)}{\text{horas de fermentacion} - \text{volumen de fermentacion}}$$

$$= \frac{\Delta p}{T * V} \text{ (Ecuación 5)}$$

4.15 Análisis estadístico

Dado que el diseño experimental se basó en un sistema de diseño central compuesto, la necesidad de réplicas se abordó estratégicamente mediante la inclusión de puntos centrales (6), lo cual permitió prescindir de la realización de experimentos por triplicado en cada uno de los puntos factoriales y axiales. Las diferencias estadísticamente significativas existentes entre las variables experimentales y sus interacciones se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, estudio que fue realizado por el mismo software estadístico Desing-Expert® (Version 13.0, Stat-Ease inc, EE. UU) (Versión 13.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Para el análisis preliminar y la visualización de los datos iniciales se utilizó Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA), mientras que los gráficos y tablas finales se digitalizaron mediante Origin2024b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU).

Etapa 4: Verificación y validación de las condiciones de cultivo optimizadas según CCD-RSM y análisis instrumental

4.16 Preparación de medio optimizado, fermentación y extracción del biopolímero

El medio de fermentación para validar la optimización de los resultados experimentales se preparó siguiendo los parámetros determinados por el software Desing-Expert® (Version 13.0, Stat-Ease inc, EE. UU) (Version 13.0, Stat-Ease inc, EE. UU), de acuerdo con los procedimientos metodológicos descritos en la sección 4.7. La fermentación se llevó a cabo durante 72 horas, con registros de densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. Finalmente, la extracción del biopolímero se realizó de la misma forma siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.14, con el fin de garantizar la coherencia entre la manipulación de biomasa del diseño central y el ensayo de optimización.

4.17 Curva de consumo de fuente de carbono en medio optimizado.

Se realizó un seguimiento temporal del consumo de carbohidratos utilizando los métodos colorimétricos de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y Antrona. El muestreo se tomó directamente de los biorreactores en tiempos definidos a las 0, 24, 48, 72 horas de fermentación. En cada punto, se extrajeron 4 mL de cultivo por biorreactor, los cuales se depositaron en tubos Eppendorf estériles y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, con el objetivo de separar la biomasa bacteriana del sobrenadante líquido. La preparación de las muestras para el análisis se realizó mediante diluciones con agua tipo I: una dilución 1:20 para las muestras destinadas al ensayo de DNS y una dilución 1:120 para las utilizadas en el método de antrona. El análisis se llevó a cabo siguiendo los mismos protocolos de las secciones 4.3.3 y 4.3.4 (cuantificación de azúcares reductores totales y cuantificación de carbohidratos totales, respectivamente). Cada punto de muestreo fue recolectado y analizado por triplicado, utilizando las curvas de calibración respectivas para determinar

cuantitativamente la concentración de azúcares presentes en el medio de cultivo durante las distintas etapas de fermentación.

4.18 Caracterización mediante FTIR

Se utilizó un espectrómetro infrarrojo (FT/IR-4X, Jasco Inc, Japon) acoplado a un módulo ATR (PRO 4X, Jasco Inc, Japón) el cual incorpora un diamante monolítico de alto rendimiento. El espectrómetro presenta un rango espectral de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ en el cual fueron programados barridos automáticos con una duración fija de 1:30 min y una resolución de 4 cm^{-1} . Posteriormente, los espectros obtenidos fueron procesados y visualizados mediante el software Spectra Manager Ver 2.5 (Jasco Inc, Japón) y software de código abierto Spectragryph Ver1.2.16 (Spectroscopy Ninja, Alemania).

4.19 Caracterización mediante MALDI-TOF/TOF

Para la caracterización del biopolímero obtenido, se empleó espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando un equipo MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado con un láser Nd:YAG de 355 nm operado a 1 kHz. Previamente al análisis, los biopolímeros obtenidos (fermentación de optimización, control con glucosa como fuente carbono y patrón de PHB) fueron sometidos a un proceso de limpieza, que consistió en lavados secuenciales con $0.5\text{ }\mu\text{L}$ de hexano, acetona y éter etílico, dejándolos en reposo por 30 minutos, seguido de centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet residual fue secado en su totalidad en cabina de extracción.

Posteriormente, se tomó una pequeña porción de cada pellet procesado (aproximadamente 5 mm^2), los sólidos fueron dispuestos en viales ámbar para HPLC y se adicionó 1mL de cloroformo

a cada vial. Seguidamente, fueron sometidos a un baño en ultrasonido con calentamiento leve (30°C) durante 45 minutos, hasta observar completa solubilidad del sólido. Como agente cationizante, se utilizó una solución de acetato de sodio preparado en metanol/cloroformo (proporción 1:4) con una concentración de 1 µg/mL.

La matriz seleccionada fue DCTB (*trans*-2-3[3-4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden]malononitrilo) en cloroformo (5mg/mL ~14,910 µM). La preparación de las muestras se realizó mezclando, en tubos Eppendorf de 0.2 mL, 5 µL de matriz, 5 µL de polímero disuelto y 1 µL del agente cationizante. La mezcla fue homogenizada por vortex y se depositó por duplicado 1 µL de esta mezcla sobre la placa de análisis (MTP 384 target plate polished stainless Steel).

El análisis fue llevado a cabo en modo reflectron positivo, con un rango de detección de 1000 a 5000 m/z , ganancia del detector fue ajustada a 20.0 kV, voltaje de la fuente iones a 25.0 kV, reflectron a 25.0 kV y una extracción de iones pulsada de 100 ns. La tasa de muestreo se estableció en 0.5 Gs/s y se aplicó un suavizado en tiempo real (alto) para mejorar la calidad del espectro. Finalmente, el posterior análisis de los datos espectrales se realizó con el software FlexAnalysis (Bruker Daltonics),

A partir de los espectros obtenidos, se calcularon los parámetros clásicos para la caracterización de la distribución de masas moleculares de polímeros, los cuales fueron:

- Masa molecular promedio en número (M_n): El cual representa el promedio aritmético de las masas moleculares de todas las cadenas poliméricas en una muestra (Croxatto et al., 2012; Payne & Grayson, 2018).
- Masa molecular promedio en peso (M_w): El cual refleja el promedio ponderado por la masa de cada cadena polimérica, de modo que las moléculas de mayor tamaño

contribuyen en mayor proporción al valor final (Croxatto et al., 2012; Payne & Grayson, 2018).

- Índice de polidispersidad (PDI). Este cuantifica la amplitud de la distribución de masas moleculares de un polímero. Un PDI igual a 1 indica que todas las cadenas tienen el mismo tamaño y se infiere que es una cadena monodispersa, mientras que un índice mayor a 1.5 reflejan heterogeneidad (Auch et al., 2019; Rahmani Del Bakhshayesh et al., 2020).
- Grado de polimerización promedio en número (DP_n); Indica el numero promedio de unidades repetitivas por cadena, calculado como M_n/M_0 donde M_0 es la masa del aducto repetitivo (Panda et al., 2014).
- Grado de polimerización promedio en peso (DP_w). Expresa el promedio ponderado por peso del número de unidades repetitivas por cadena, resulta más sensible a la presencia de cadenas poliméricas de gran tamaño M_w/M_0 (Panda et al., 2014).

Dado que se trata de una técnica espectroscópica, las ecuaciones se establecen utilizando las intensidades relativas (I_i) de las señales observadas en los espectros MALDI-MS-TOF/TOF, en lugar del número absoluto de moléculas (N_i) de cada especie. Este enfoque difiere de los métodos no espectroscópicos o técnicas coligativas, donde el número absoluto de moléculas es la magnitud directamente medida (Walterová & Horský, 2011) (Tabla 3).

Tabla 3. Ecuaciones parámetro para caracterización de señales MALDI-MS TOF/TOF

Parámetro	Ecuación
Masa molecular promedio en número (M_n)	$M_n = \frac{\sum I_i M_i}{\sum I_i}$
Masa molecular promedio en peso (M_w)	$M_w = \frac{\sum I_i M_i^2}{\sum I_i M_i}$
Índice de polidispersidad (PDI)	$PDI = \frac{M_w}{M_n}$
Grado de polimerización promedio en número (DP_n)	$DP_n = \frac{M_n}{M_0}$
Grado de polimerización promedio en peso (DP_w)	$DP_w = \frac{M_w}{M_0}$

Siendo I_i = Intensidad relativa; M_i =Masa molecular; M_i^2 = Cuadrado de la masa molecular M_0 = Masa del monómero repetitivo. Fuente: Autor de la investigación.

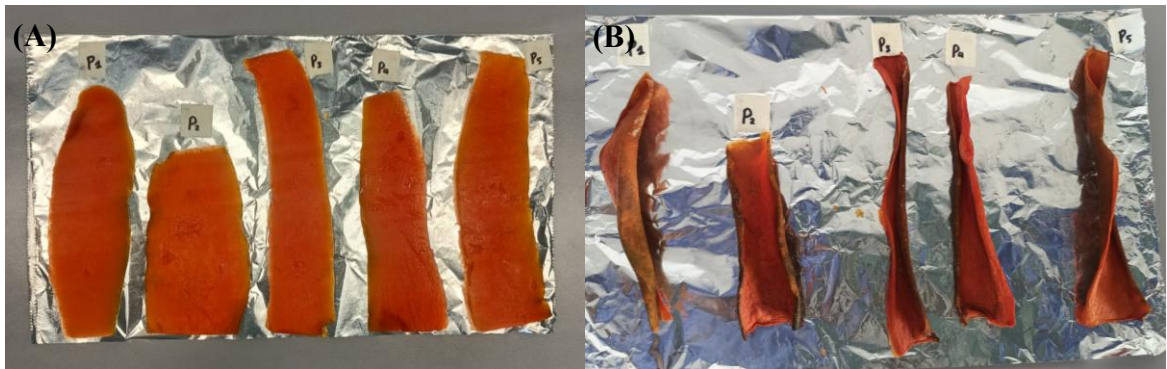
5. Análisis de resultados y discusión

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando cáscara de papaya como única fuente de carbono. Durante la fase experimental se recolectaron un total de 35 Kg de materia fresca provenientes de los diferentes puntos de muestreo en el área metropolitana de Bucaramanga.

5.1 Preparación de la materia prima: Deshidratación y caracterización

El pretratamiento inicial de la materia prima consistió en su deshidratación con el fin de facilitar el almacenamiento, molienda y estandarización de los ensayos posteriores. Para caracterizar este proceso, se realizó un análisis cinético en el cual fueron tomados cinco muestras de cáscara aleatorias con diferente peso y tamaño (denominadas M1, M2, M3, M4 y M5) las cuales fueron sometidas a un proceso de secado en horno a 50°C.

Figura No. 11 Cambios físicos en la cáscara de papaya durante el secado.



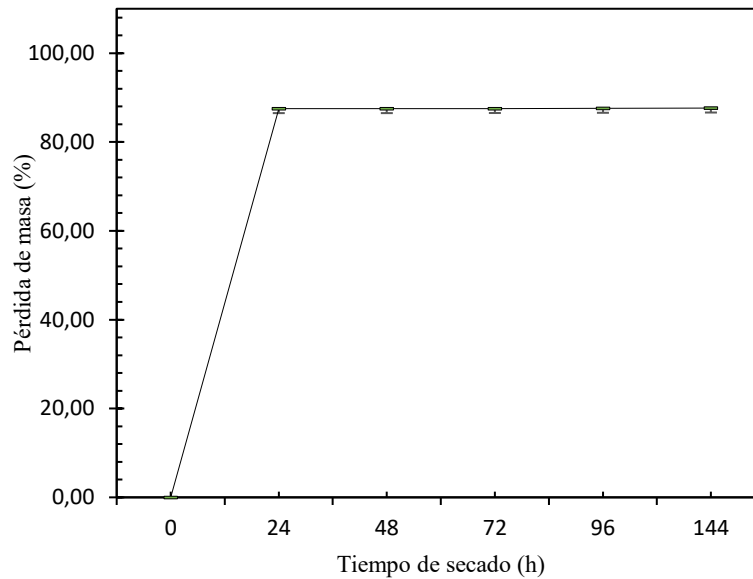
NOTA: (A) Evaluación visual de las cáscaras antes del proceso de secado, (B) posterior al secado.

Como se observa en la Figura No 11, las cáscaras frescas, caracterizadas por su color naranja brillante, redujeron drásticamente su tamaño tras el secado y tornaron hacia tonalidades pardas y rojizas oscuras.

El análisis gravimétrico (Figura No.12) mostró que la mayor pérdida de agua ocurrió en las primeras 24 horas, con una reducción del $87.5 \pm 0.056\%$ de la masa inicial. A partir de este punto, la velocidad de secado disminuyó considerablemente, alcanzando un peso prácticamente constante a las 72 horas. La pérdida de masa final promedio fue del $87.6 \pm 0.036\%$ tras 144 horas, confirmando el elevado contenido de humedad inicial de la cáscara de papaya.

Este proceso de deshidratación constituye un paso esencial para preservar la estabilidad microbiológica del sustrato durante el almacenamiento y garantizar su dosificación homogénea en etapas posteriores (Saini et al., 2019).

Figura No. 12 Cinética de deshidratación de la cáscara de papaya a 50 °C.



Nota: Cada punto representa el promedio de la pérdida de masa porcentual de las cinco muestras de cáscara seleccionadas aleatoriamente.

5.2 Selección y justificación del método de preparación del sustrato de fermentación.

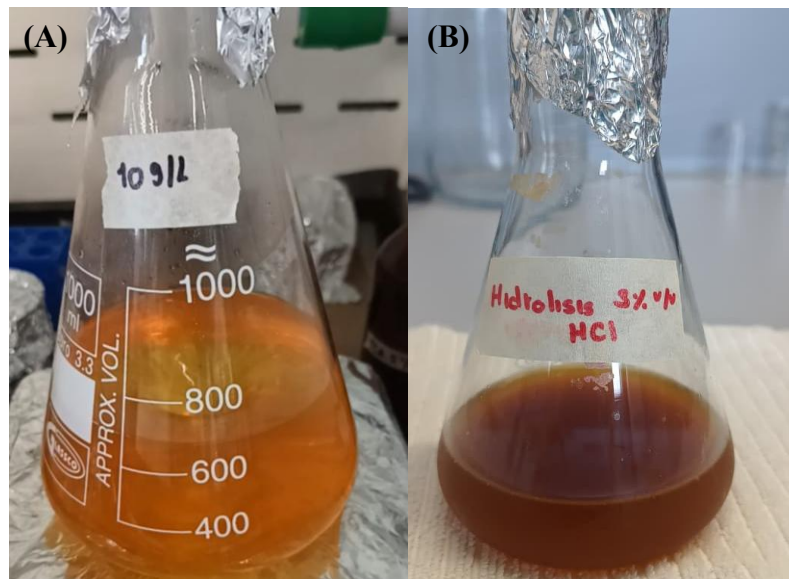
Para obtener un sustrato líquido fermentable a partir de triturado de cáscara de papaya, se compararon dos estrategias fundamentales: una extracción por difusión a una temperatura de 90-100°C y una hidrólisis química con ácido clorhídrico (HCl). El objetivo fue identificar el método con el mejor balance entre una alta extracción de azúcares y una baja generación de compuestos inhibitorios para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (C01).

Las diferencias más notorias fueron apreciadas por inspección visual (Figura No. 13). Mientras que la extracción acuosa produjo un líquido translúcido de color naranja claro, la hidrólisis ácida generó un extracto opaco de tonalidad marrón oscuro, cuya intensidad aumentaba con la concentración del ácido. Este pardeamiento indica la ocurrencia de reacciones de degradación de carbohidratos, principalmente reacciones de Maillard y caramelización de

azúcares, procesos que son fuertemente inducidos por las drásticas condiciones de hidrólisis (121°C, pH ácido, y 20 PSI) (Chandler et al., 2012).

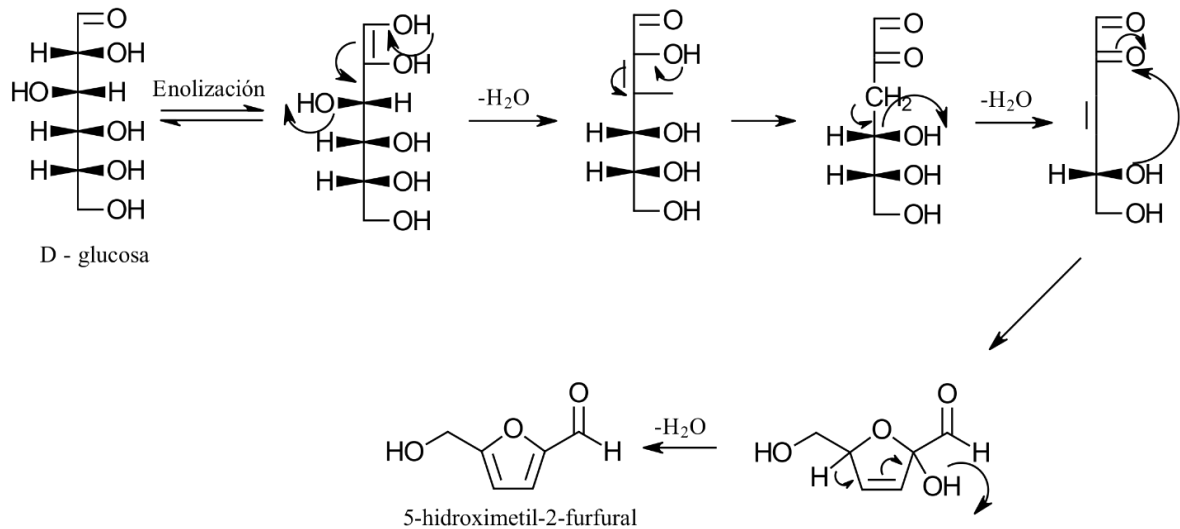
Como consecuencia, se forman compuestos derivados como el 5-hidroximetifurfural (HMF) a partir de hexosas y furfurales a partir de pentosas como se ilustra en la Figura No. 14. Ambos metabolitos reconocidos por su fuerte actividad inhibitoria al interferir en rutas metabólicas de microorganismos (Belitz & Grosh, 1997).

Figura No. 13 Comparación visual de los extractos.



Nota: (A) Extracto acuoso, traslúcido y de color naranja. (B) Extracto hidrolizado con HCl al 3% (p/v), opaco y de color marrón oscuro.

Figura No. 14 Mecanismo de reacción para la deshidratación de D-glucosa en medio ácido para formar 5-hidroximetilfurfural (HMF)



5.2.1 Evaluación del tiempo de extracción para el extracto acuoso

La optimización del tiempo de extracción con agua caliente se realizó con el fin de maximizar la recuperación de azúcares solubles (Tabla 4). Se ensayaron cuatro tiempos de exposición (15, 30, 60 y 120 minutos), más un control a temperatura ambiente expuesto durante 30 minutos sobre el cual el análisis de varianza de una vía (ANOVA) confirmó un efecto significativo del tiempo sobre la concentración de azúcares ($p < 0.0001$) con detalles presentados en el Apéndice 20.

La prueba de Tukey permitió determinar que la extracción a 30, 60 y 120 minutos (10.98 ± 0.162 g/L, 11.15 ± 0.173 g/L y 11.8 ± 0.138 g/L, respectivamente, de azúcares reductores en solución) fueron estadísticamente significativas con respecto al tratamiento de 15 minutos ($8,643 \pm 0.334$ g/L). Por ello, se seleccionó 30 minutos como el tiempo óptimo, al maximizar la extracción de azúcares sin incrementar innecesariamente la duración del proceso de extracción.

Tabla 4. Concentración de azúcares reductores (g/L) en el extracto acuoso de cáscara de papaya en función del tiempo de extracción.

Tratamiento (min)	[Azúcares reductores] (g/L)
Control	5.423±0.103 ^d
15	8.643 ± 0.334 ^c
30	10.982 ± 0.162 ^b
60	11.159 ± 0.173 ^b
120	11.8 ± 0.138 ^{ab}

Nota. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p<0.05)

5.2.2 Análisis comparativo de los métodos de pretratamiento

Una vez se determinó el tiempo óptimo de extracción en medio acuoso, se comparó este extracto (30 min) con los hidrolizados ácidos al 1% v/v, 2% v/v y 3%v/v. Se evaluaron tres parámetros críticos: concentración de azúcares reductores, concentración de proteínas solubles y concentración de compuestos fenólicos (Tabla 6).

Tabla 5. Resumen de la Composición Química de los Extractos de Cáscara de Papaya.

Tratamiento	Azúcares reductores (g/L)	Proteínas solubles (g/L)	Compuestos fenólicos (ppm)
EA	10.98 ± 0.16 ^a	0.759 ± 0.019 ^a	37.52 ± 1.44 ^d
EH 1%	11.07 ± 0.11 ^b	0.683 ± 0.087 ^{ab}	501.24 ± 4.5 ^b
EH 2%	11.55 ± 0.16 ^c	0.626 ± 0.100 ^{bc}	520.07 ± 7.45 ^c
EH 3%	12.08 ± 0.24 ^c	0.530 ± 0.15 ^c	549.99 ± 5.56 ^a

Nota. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p<0.05).

5.2.2.1 Efecto sobre la liberación de azúcares reductores.

El ANOVA (Apéndice 21) mostró diferencias estadísticamente significativas del método de extracción sobre la concentración de azúcares reductores (F-valor 155.27, p-valor<0.001). Para identificar las diferencias específicas entre los tratamientos, la prueba T demostró que, si bien los EH al 2%v/v y 3%v/v produjeron concentraciones de azúcares significativamente mayores que los demás tratamientos (p-valor<0.0001), la diferencia observada entre el EA (10.98±0.16 g/L) y EH 1% (11.07±0.11 g/L) no fue estadísticamente significativa (p-valor = 0.464). Este hallazgo es fundamental, puesto que indica que la extracción acuosa, es tan eficaz para la liberación de azúcares como el tratamiento hidrolítico más leve.

Cabe destacar que la cuantificación en los hidrolizados ácidos puede estar sobre estimada, debido a que los subproductos de degradación (como HMF) también reaccionan con el reactivo DNS, generando lecturas incorrectas (efectos indirectos de medida) Deshavath et al., (2020). Esto implica que la disponibilidad real de carbohidratos fermentables en los extractos ácidos podría ser mucho menor de lo reportado.

5.2.2.2 Efecto sobre la liberación de proteínas solubles.

El contenido de proteínas solubles también se vio afectado por el método de extracción (F-valor = 17.11, p-valor=0.001) (Apéndice 22). El extracto acuoso presentó la concentración más alta (0.759 ± 0.019 g/L), significativamente mayor que los hidrolizados al 2% y 3%. Esta reducción observada en los EH se atribuye a la hidrólisis ácida de enlaces peptídicos, que genera fragmentos pequeños y aminoácidos libres menos detectables por el ensayo Bradford (Stoscheck, 1990; Agyei et al., 2016). Esto no implica una pérdida total de nitrógeno, sino una alteración de la estructura proteica que podría afectar la biodisponibilidad de nutrientes para el microorganismo.

5.2.2.3 Efecto sobre la liberación de compuestos fenólicos.

El análisis de compuestos fenólicos mostro la diferencia más determinante (Apéndice 23) (F-valor = 40179.51, p-valor < 0.001). El extracto acuoso registró apenas 37.52 ± 1.44 ppm, mientras que el hidrolizado más suave (1%v/v) supero las 500 ppm. Cada tratamiento se agrupó en categorías estadísticas distintas, confirmando la magnitud de esta variación.

Los compuestos fenólicos liberados bajo condiciones ácidas poseen una reconocida actividad citotóxica. Una amplia variedad de ellos presenta una naturaleza hidrofóbica lo que les permite insertarse en la membrana, alterar la fluidez, comprometer el transporte de protones y generar estrés oxidativo (Bylka & Irena Matlawska, 2003; Donadio et al., 2021; Bustos, 2017). En consecuencia, los niveles detectados en los hidrolizados (>500ppm) son suficientes para anticipar una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano.

Por lo tanto, la evidencia estadística y bioquímica respalda la extracción acuosa como el método más adecuado para la preparación del sustrato. Aunque la hidrólisis ácida puede incrementar levemente el rendimiento aparente de azúcares, este beneficio se ve anulado por la degradación de proteínas y, especialmente por la acumulación de compuestos fenólicos que podrían afectar el objetivo de este estudio. El extracto acuoso, en contraste, ofrece un balance favorable con alta disponibilidad de carbono, conservando nutrientes y ausencia de inhibidores bacterianos en niveles críticos, convirtiéndolo en el sustrato más idóneo para las fases posteriores de la investigación.

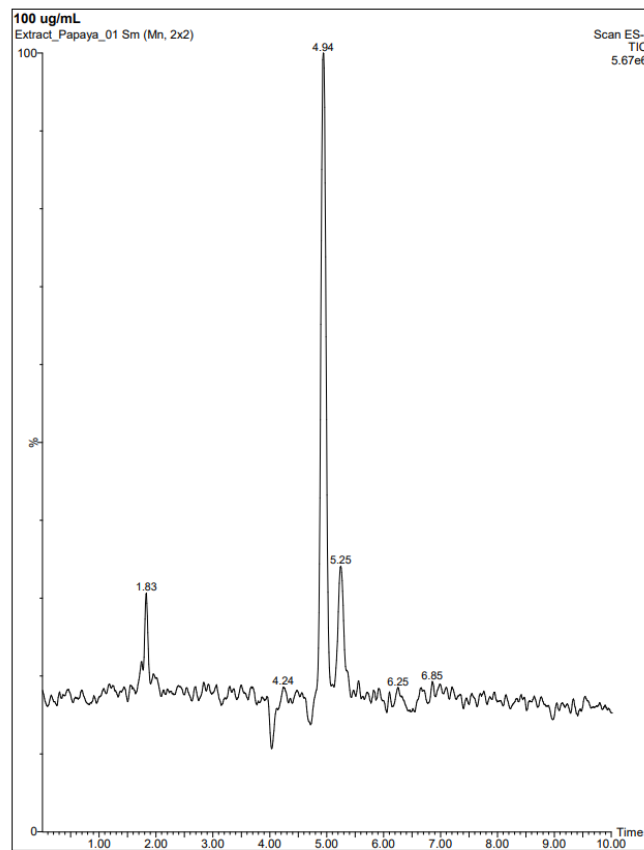
5.3 Caracterización del sustrato (extracto acuoso)

Con el EA como método de pretratamiento más adecuado, se procedió a una caracterización detallada de su composición, con el fin de evaluar su potencial como medio fermentativo.

5.3.1 Perfil de carbohidratos por UPLC-MS

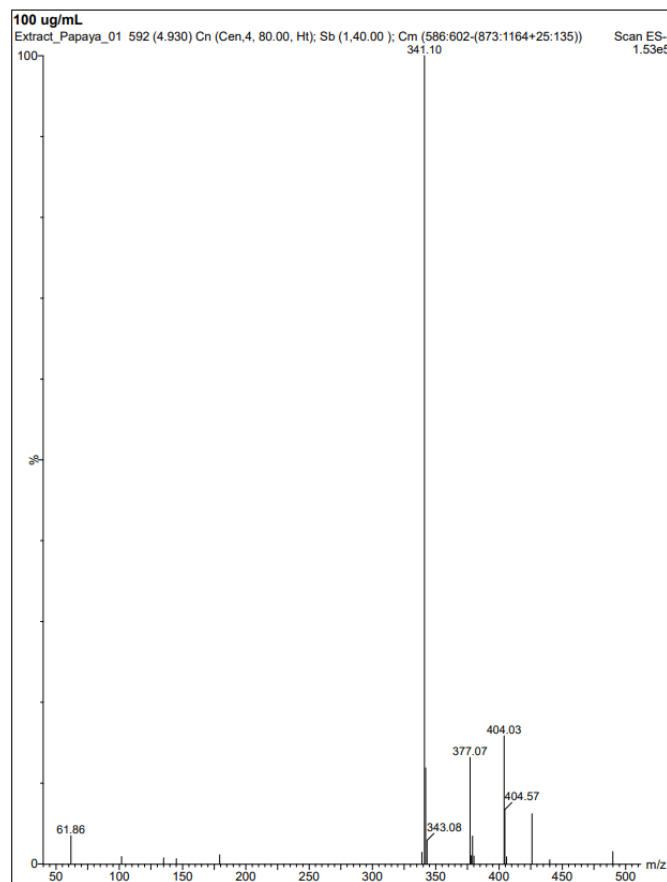
El análisis de carbohidratos se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un detector de masas (UPLC-MS-QDa), con el objetivo de identificar y cuantificar los azúcares solubles clave disponibles en el extracto. El cromatograma resultante (Figura No.18) evidenció tres señales principales con tiempos de retención (t_r) en 1.83, 4.94 y 5.25 minutos.

Figura No. 15 Perfil cromatográfico obtenido por UPLC-QDa del extracto acuoso de cáscara de papaya.



La señal más intensa, con $t_r=4.94$ min fue identificada de manera concluyente como maltosa (por comparación con patrón estándar). Esta identificación se sustentó en el espectro de masas en modo de iones negativo (ESI-), el cual mostró un ion molecular deprotonado del tipo $[M-H]^-$ con una relación m/z de 341.10, correspondiente a la fórmula molecular de la maltosa $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Figura No. 19). La cuantificación, basada en la curva de calibración (Apéndice 11), permitió determinar una concentración de 14.76 ± 0.71 mg/g de maltosa (respecto al peso seco de cáscara de papaya) en el EA.

Figura No. 16 Espectro de masas de la señal cromatográfica en $t_r= 4.94$ min obtenida por UPLC-QDa



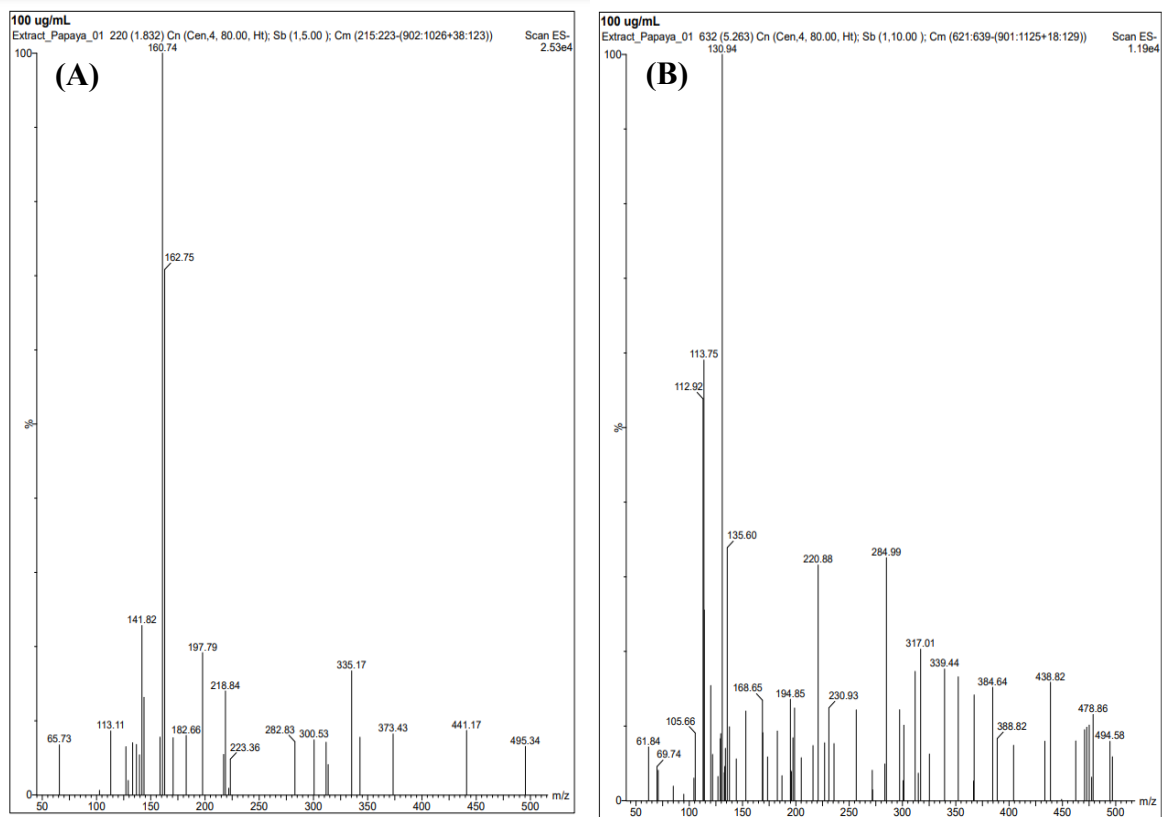
La alta concentración de maltosa, como el principal disacárido presente en la muestra, tiene implicaciones metabólicas relevantes. Específicamente, bacterias del género *Bacillus* poseen la enzima maltasa, que hidroliza el enlace glucosídico de la maltosa, liberando sus dos monómeros constituyentes de glucosa (Reid & Abratt, 2005). Mientras que la glucosa puede incorporarse de manera directa a la glucólisis. Las dos señales restantes en t_r 1.83 y 5.25 min, aunque no pudieron ser confirmadas con certeza, pueden ser asignadas hipotéticamente analizando sus espectros de masas.

La señal en $t_r=1.83$ min presenta un ion molecular en m/z 160.74. Este valor es altamente consistente con una hexosa ($C_6H_{12}O_6$, masa 180.16 g/mol), es probable que la glucosa o su isómero

la fructosa, hayan perdido una molécula de agua durante la ionización para formar un aducto [Hexosa-H₂O-H]⁻. De manera análoga, la señal en $t_r = 5.25$ min, con un ion principal en m/z 130.94, se relaciona hipotéticamente con una pentosa (C₅H₁₀O₅, masa=150.13 g/mol), como la xilosa o la arabinosa, que ha experimentado el mismo proceso de deshidratación.

La ausencia de los iones moleculares [M-H]⁻ en m/z 179 (para las hexosas) y m/z 149 (para las pentosas), es una prueba clave que respalda esta hipotética asignación. Tal como lo demostraron J. L. Chen et al., (2016) en su estudio sobre la estabilidad de los carbohidratos, la reacción de deshidratación en la fuente de iones (ESI) es un proceso tan rápido y energéticamente favorable para los azúcares, que la intensidad del ion molecular intacto se reduce drásticamente, a menudo por debajo del límite de detección. Esto provoca que el ion deshidratado, al ser más estable en fase gaseosa, se convierta en la especie dominante y más fácilmente detectable.

Figura No. 17 Espectros de masas (ESI-) correspondientes a los picos cromatográficos en $t_r = 1.83$ min (A) y $t_r = 5.25$ min (B).



5.3.2 Composición fisicoquímica y perfil de minerales de la cáscara de papaya.

Adicionalmente se evaluó la composición fisicoquímica y minerales presentes en la cáscara de papaya para valorar su aporte nutricional en la fermentación. Resultados presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica y perfil de minerales de la cáscara de papaya.

Parámetro	Resultado	Unidad
Humedad	3.87	%
Cenizas	7.57	%
Calcio	34035.63	mg Ca/kg
	3.404	%Ca
Magnesio	5720.15	mg Mg/kg
	0.572	%Mg

Sodio	1756.58	mg Na/kg
	0.176	%Na
Potasio	40081.57	mg K/kg
	4.008	%K

Nota: Análisis realizado por el LQCI adscrito a la UIS.

El contenido de cenizas (7.57%) fue considerablemente alto en comparación con residuos de otras frutas, como cáscara de naranja (4.92%), o piña (4.5-5.0%) (Dias et al., 2020), lo cual refleja una reserva mineral particularmente rica.

Dentro de los cationes el potasio (K^+) fue el más abundante (40081.57 mg/kg). Este ion es crucial para mantener la presión osmótica y el pH citoplasmático, además de actuar como cofactor de enzimas glucolíticas como la piruvato quinasa (Oria-Hernández et al., 2005; Sheng H-W, 200 C.E.). El Calcio (Ca^{2+}), con una concentración de 34035.63 mg/Kg, ocupó el segundo lugar en abundancia, siendo fundamental para la estabilidad de la pared celular en bacterias Gram-positivas, además de participar en el proceso de esporulación (Sinnelä et al., 2019). Seguidamente el magnesio (Mg^{2+}) con 5720.15 mg/kg, estabiliza estructuras ribosomales y ácidos nucleicos, actuando como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas dependientes de ATP (Groisman et al., 2013) Finalmente, el sodio (Na^+) con 1756.58 mg/Kg, fue el catión menos abundante de los cuantificados, el cual también cumple funciones importantes en la fisiología bacteriana, principalmente en el mantenimiento del equilibrio osmótico, la participación en el transporte de nutrientes a través de la membrana celular. Adicionalmente, es crucial para la generación de gradientes electroquímicos necesarios para los procesos de transporte y señalización celular

En conjunto, esta composición mineral representa una ventaja biotecnológica significativa frente a otros sustratos. Indica que la cáscara de papaya no solo es materia de desecho, al contrario, representa un posible medio de cultivo naturalmente enriquecido, que puede suplir parte de los

micronutrientes esenciales para un crecimiento bacteriano robusto, reduciendo potencialmente la necesidad de suplementos externos (Macêdo et al., 2019).

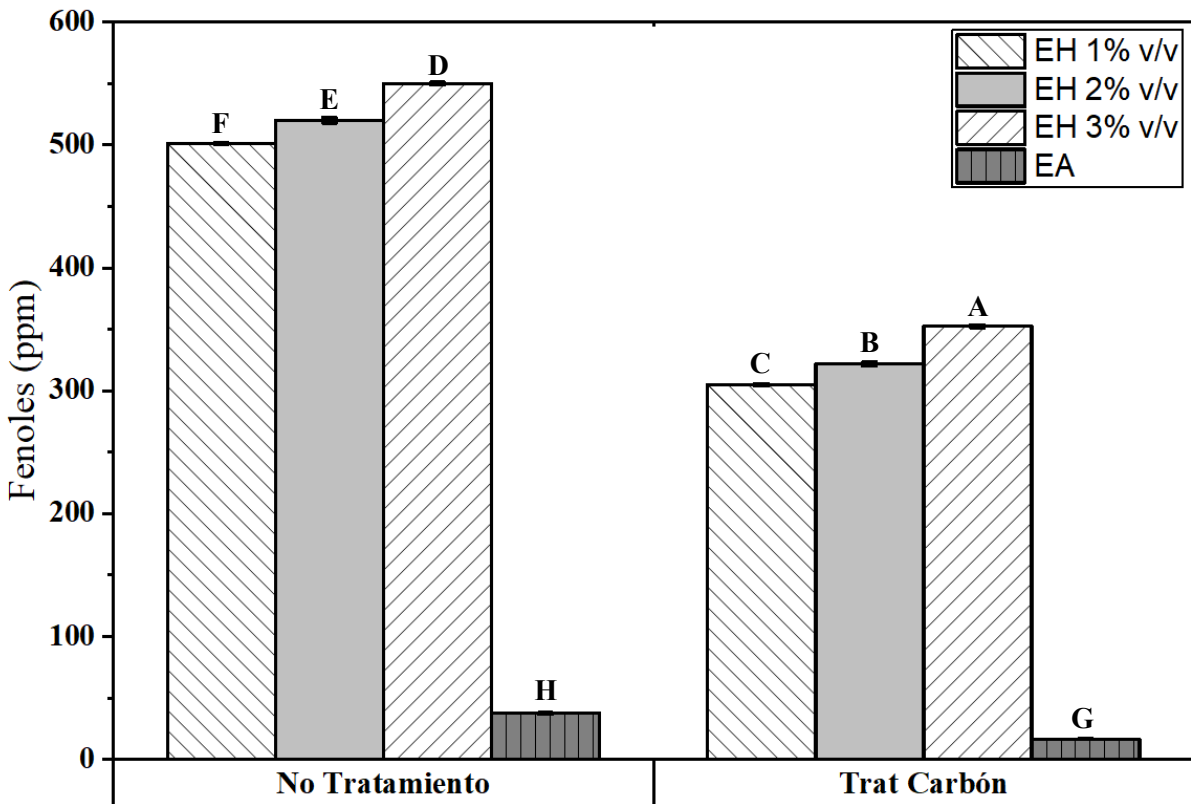
5.4 Adecuación de los hidrolizados ácidos mediante adsorción con carbón activado.

El análisis comparativo previo (Sección 5.2) reveló que la hidrólisis ácida, si bien maximizaba la liberación de azúcares, generaba concentraciones de compuestos fenólicos superiores a 500 ppm. Niveles tan elevados de estos compuestos son reconocidamente por su actividad inhibitoria para muchos microorganismos, ya que pueden alterar la integridad de la membrana celular e interrumpir rutas metabólicas clave, comprometiendo así la viabilidad del sustrato para la fermentación (Bouarab-Chibane et al., 2019). Por lo tanto, se evaluó una etapa de acondicionamiento con carbón activado granular, como estrategia para reducir s la carga de inhibidores y determinar si era posible mejorar la calidad de los hidrolizados.

El tratamiento consistió en la adsorción con carbón activado al 5% (p/v). Para determinar su eficacia, se cuantificó la concentración de fenoles totales antes y después del proceso, tanto en los hidrolizados ácidos (EH) como en el extracto acuoso seleccionado (EA). El ANOVA mostró un efecto estadísticamente significativo (F-valor = 25509.26, p-valor < 0.001), confirmando el impacto del tratamiento. Los resultados de las comparaciones múltiples de Tukey deajo en

evidencia el drástico efecto en la concentración de fenoles para cada uno de los tratamientos, cuyos detalles se presentan en el Apéndice 24.

Figura No. 18 Eficacia del tratamiento de detoxificación con carbón activado para la remoción de compuestos fenólicos en los diferentes extractos.



Nota: Comparación de la concentración de compuestos fenólicos totales (ppm) en el extracto acuoso (EA) y los hidrolizados ácidos (EH) antes (No Tratamiento) y después (Trat Carbón) del proceso de adsorción. Cada barra representa el promedio de tres réplicas y las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

El tratamiento con carbón activado redujo significativamente la concentración de fenoles en los hidrolizados, alcanzando disminuciones del 39%, 38% y 36% para los hidrolizados al 1%, 2% y 3%, respectivamente. Este efecto se debe a la alta superficie específica y la naturaleza porosa

del carbón activado, que favorece la adsorción de compuestos aromáticos como los polifenoles (Bernal et al., 2017).

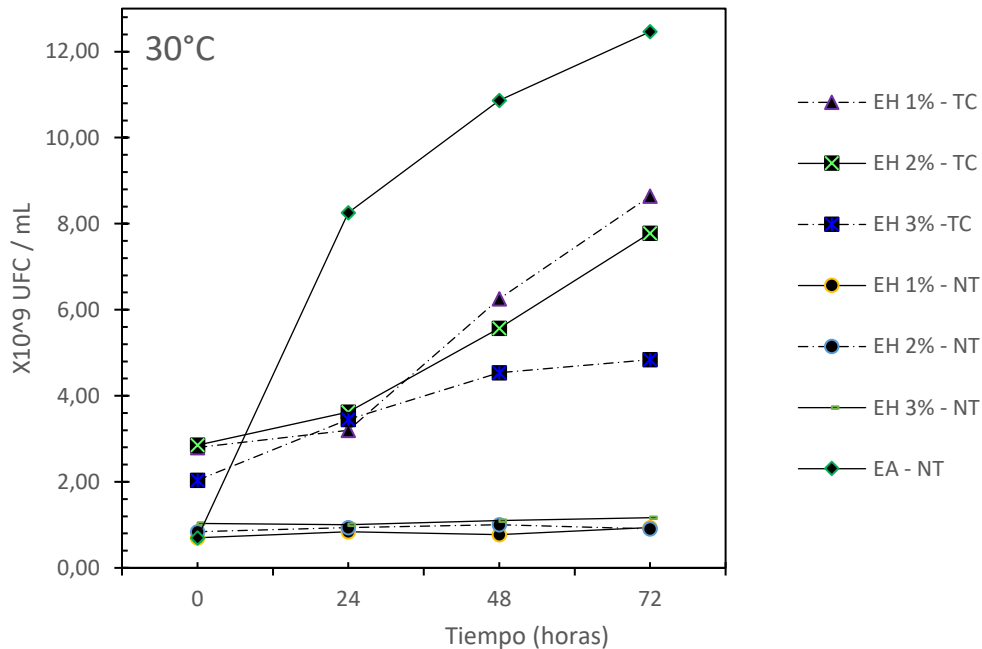
Sin embargo, a pesar de esta significativa reducción, las concentraciones residuales de fenoles en los hidrolizados tratados con carbón activado (EH-TC) (305-352 ppm) se mantuvieron muy por encima de las observadas en los extractos acuosos sin tratamiento (EA-NT) (37.52 ppm) y aún más, sobre los extractos acuosos con tratamiento (EA-TC)(16.43 ppm). Adicionalmente se destaca que los niveles de fenoles residuales en los EH-TC se encuentran en rangos reportados como bacteriostáticos capaces de inducir estrés metabólico en bacterias (Santos et al., 2021).

En consecuencia, aunque el acondicionamiento con carbón activado es una estrategia eficaz para mitigar la concentración de inhibidores de los EH, no es suficiente para reducir su carga a los niveles excepcionalmente bajos que presenta de forma natural los EA. Esta diferencia fundamental en la composición química establece una hipótesis clara de que el EA ofrecerá un desempeño superior como medio de fermentación, no solo comparado con los extractos hidrolizados sin tratamiento (EH-NT), sino también en comparación con los EH-TC

5.4.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano.

Tras la caracterización de los sustratos y la aplicación del tratamiento de acondicionamiento, se evaluó el desempeño biológico de cada uno de los extractos (acuosos e hidrolizados) en fermentaciones con *Bacillus thuringiensis* (C01). El crecimiento celular fue monitoreado durante 72 horas (figura No.22)

Figura No. 19 Curvas de crecimiento de *B. thuringiensis* en los diferentes extractos de cáscara de papaya. (EA: Extracto Acuoso; EH: Extracto Hidrolizado; TC: Tratado con Carbón Activado; NT: No Tratado).



El EA promovió un crecimiento caracterizado por una corta fase de adaptación y una fase exponencial pronunciada que inició antes de las 24 horas. La alta tasa de crecimiento observada en esta fase permitió obtener densidades celulares superiores a 1.2×10^{10} UFC/mL. Este perfil cinético refleja un medio de cultivo rico en nutrientes libre de inhibidores, donde la asimilación de la fuente de carbono es eficiente y se destina principalmente a la generación de biomasa.

En contraste, los EH-NT mostraron un crecimiento celular severamente inhibido, casi inexistente. Las densidades celulares permanecieron en niveles similares al inóculo inicial (1.8×10^7 UFC/mL), confirmando el efecto adverso que estos extractos generan sobre el microorganismo. Incluso después del tratamiento, los EH presentaron un crecimiento limitado. En este medio se observó una prolongada fase de adaptación (fase lag) que se extendió más allá de las 24 h, seguida de un crecimiento exponencial lento y limitado. Esta cinética refleja un entorno metabólicamente

restrictivo, en el cual el microorganismo podría destinar gran parte de su energía a mecanismos de tolerancia y respiración celular, como la síntesis de enzimas oxidativas (laccasa o peroxidasa) encargadas de la eliminación y asimilación de polifenoles o la restauración de la integridad de membrana, según lo reportado por (Bouarab-Chibane et al., 2019; Dai et al., 2021).

5.4.2 Producción preliminar de biomasa y rendimientos de extracción de PHA

Una vez evaluada la cinética de crecimiento en los diferentes sustratos, se procedió a cuantificar la producción final de biomasa y el rendimiento de PHA. Estos parámetros son cruciales para determinar la viabilidad real de cada extracto como medio fermentativo. Los resultados obtenidos tras 72 horas de incubación en los diversos extractos de cascara de papaya se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de producción de biomasa y PHA tras 72 horas de fermentación en los diferentes extractos de cáscara de papaya.

Fermentación (0.5:10)	Biomasa seca (g/L) ($\langle x \rangle \pm CI (95\%)$)	Acumulación % p/p	PHA (g/L) ($\langle x \rangle \pm CI (95\%)$)
EH 1% -TC	2.594±0.055 ^c	54.60 ^c	1.416±0.095 ^b
EH 2% -TC	2.292±0.157 ^d	42.00 ^d	0.969±0.102 ^c
EH 3% -TC	1.347±0.142 ^e	34.30 ^e	0.462±0.083 ^d
EH 1% - NT	0 ^f	0 ^f	0 ^e
EH 2% - NT	0 ^f	0 ^f	0 ^e
EH 3% - NT	0 ^f	0 ^f	0 ^e
EA – NT	3.694±0.040 ^a	62.00 ^a	2.290±0.171 ^a
EA – TC	3.503±0.138 ^b	61.00 ^b	2.231±0.014 ^a

Nota. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

El EA-NT alcanzó la mayor acumulación de biomasa (3.694±0.040 g/L) y el mayor porcentaje de acumulación de PHA (62.05%), confirmando que su composición química constituye un medio óptimo para el crecimiento bacteriano. La comparación con los hidrolizados

tratados revela un contraste significativo. A pesar de presentar concentraciones de azúcares similares, la producción de biomasa y PHA fue mucho menor. Esto se explica por la carga metabólica generada por los inhibidores residuales, que obligan a desviar ATP y NADH hacia mecanismos de defensa en lugar de biosíntesis, creando un cuello de botella metabólico en el cual no se aprovecha eficientemente la fuente de carbono disponible por el sustrato (Tikent et al., 2024; Gundlapalli & Ganesan, 2025).

Adicionalmente, se observa una correlación inversa entre la concentración de ácido empleada para la hidrólisis y la producción de biomasa. Esto sugiere que la hidrólisis ácida no solo libera inhibidores fenólicos, sino que también degrada compuestos termolábiles como vitaminas (vitamina A, C y E), o genera inhibidores no fenólicos que no son eficientemente adsorbidos por el carbón activado, reduciendo aún más la calidad general del sustrato.

En conjunto, los datos confirman que la viabilidad biológica de un sustrato agroindustrial depende más de su pureza química y riqueza nutricional que de su concentración neta de carbohidratos. Por lo tanto, bajo este criterio, el EA se establece como el sustrato más prometedor para el proceso de optimización.

5.5 Optimización de la producción de PHA mediante diseño central compuesto (DCC-RSM).

A partir del extracto acuoso, se desarrolló la etapa central de esta investigación: La optimización multivariada de las condiciones de cultivo para maximizar la producción de PHA. Para ello, se empleó una metodología de superficie de respuesta (RSM) con un diseño central compuesto (DCC) que permitió evaluar cuatro factores experimentales clave: Temperatura (A), concentración inicial de azúcares (B), pH inicial (C) y concentración de inóculo (D) (Apéndice

25). La variable de respuesta principal se definió como la productividad volumétrica (Q_p) expresada en $g L^{-1}h^{-1}$, ya que integra de manera directa la eficiencia global del proceso.

Los resultados experimentales de los 30 ensayos, incluyendo biomasa seca, porcentaje de acumulación de PHA y valores de Q_p se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Matriz del Diseño Central Compuesto y resultados experimentales para la producción de PHA.

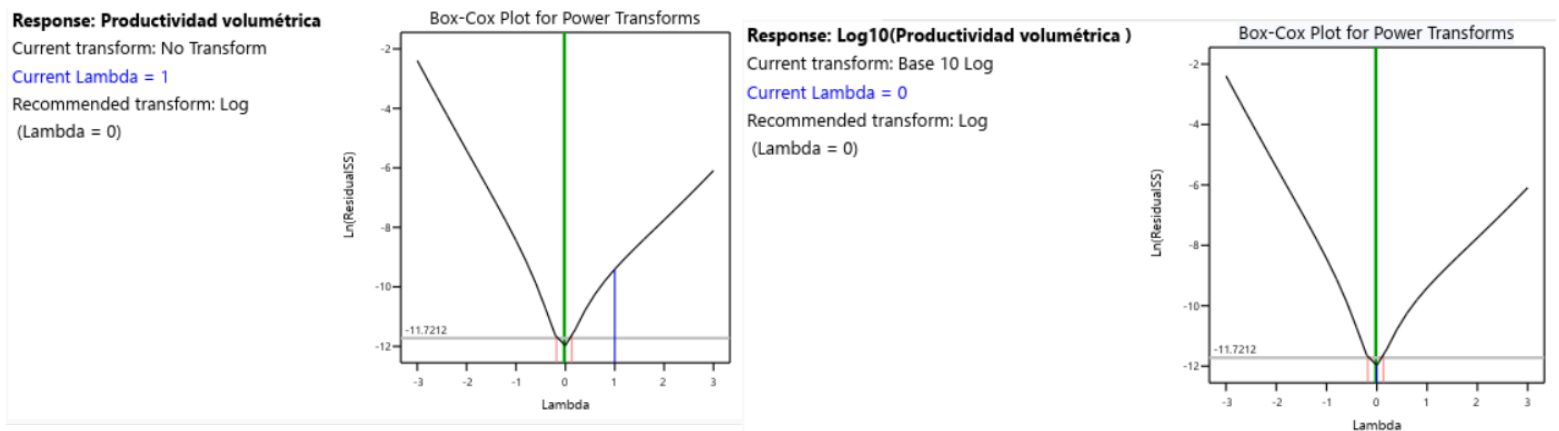
Ensayo	$Y_{p/x}$ ($g.L^{-1}$)	Biomasa seca ($g.L^{-1}$)	% Acumulación ((mg PHA extraído/ mg biomasa seca utilizada) *100)	PHA ($g.L^{-1}$)	Q_p ($g.L^{-1}h^{-1}$)
RUN 1	0.72	3.47	72.07	2.50	0.035
RUN 2	0.53	2.88	53.00	1.52	0.021
RUN 3	0.47	3.45	47.00	1.62	0.022
RUN 4	0.46	3.92	46,33	1.82	0.025
RUN 5	0.74	3.46	74.34	2.57	0.036
RUN 6	0.43	3.48	43.00	1.50	0.021
RUN 7	0.55	3.07	55.00	1.69	0.023
RUN 8	0.46	3.63	46.00	1.67	0.023
RUN 9	0.28	2.40	27.91	0.67	0.009
RUN 10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RUN 11	0.29	1.82	29.32	0.53	0.007
RUN 12	0.47	2.44	46.51	1.21	0.016
RUN 13	0.50	2.54	50.00	1.27	0.018
RUN 14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RUN 15	0.49	2.39	49.66	1.19	0.016
RUN 16	0.52	2.45	52.46	1.23	0.018
RUN 17	0.60	2.25	59.69	1.34	0.019
RUN 18	0.48	2.46	48.14	1.22	0.016
RUN 19	0.51	2.37	51.21	1.19	0.017
RUN 20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RUN 21	0.51	0.89	51.15	0.44	0.018
RUN 22	0.49	0.74	49.33	0.37	0.006
RUN 23	0.22	0.89	22.33	0.20	0.005
RUN 24	0.23	0.85	23.27	0.20	0.003
RUN 25	0.26	1.00	26.00	0.26	0.003
RUN 26	0.23	0.95	23.33	0.22	0.003
RUN 27	0.26	0.53	25.67	0.14	0.003

RUN 28	0.22	0.69	22.33	0.15	0.002
RUN 29	0.51	2.81	50.95	1.43	0.002
RUN 30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

5.5.1 Ajuste y validación del modelo matemático.

A partir de los 30 ensayos experimentales, se generó un conjunto de datos que reflejó la compleja interacción entre las condiciones de cultivo y la productividad volumétrica de PHA. Para modelar esta relación, se seleccionó una regresión polinómica de segundo orden, un modelo estándar para diseños centrales compuestos que permiten capturar curvaturas y efectos de interacción sobre la respuesta la variable de respuesta se ajustó mediante una regresión polinómica de segundo orden. Previo a este ajuste, fue indispensable verificar que las respuestas cumplieran con los supuestos fundamentales del ANOVA, principalmente la normalidad en la distribución de los residuos (Apéndice 33) y la homocedasticidad de los mismos (Apéndice 32). Un análisis preliminar de los datos reveló que estos supuestos no se cumplían. Para corregirlo, se utilizó un análisis Box-Cox con el fin de determinar la transformación matemática más adecuada para la variable de respuesta. Del cual se determinó que la transformación óptima era la logarítmica (Log_{10}) (Figura No.22).

Figura No. 20 Análisis Box-Cox para confirmar el efecto de la transformación sobre la respuesta



Nota. A) Análisis para la variable de respuesta sin transformar, donde el valor Lambda óptimo (línea verde) se encuentra en cero, recomendando una transformación logarítmica. (B) Análisis de confirmación para la variable de respuesta ya transformada (Log10), mostrando que el Lambda actual (línea azul) y el óptimo ahora son coincidentes.

El ANOVA del modelo cuadrático (Apéndice 36), aplicado a los datos transformados, evidenció un ajuste estadísticamente significativo. El p-valor obtenido para el modelo fue inferior a 0.0001, lo cual es considerablemente menor que el nivel de significancia estándar (<0.05). Esto permitió rechazar la hipótesis nula (que postula que los factores no tienen efecto sobre la respuesta) (Bittner, 2022; Sawyer, 2009) La robustez del ajuste se reflejó en un F-valor = 492.45, el cual representa la razón entre la varianza explicada por el modelo (señal) y la varianza residual (ruido), indicando que la correlación encontrada es 492 veces superior al ruido experimental, lo cual confirma un ajuste altamente consistente.

La calidad del ajuste se corroboró mediante los coeficientes de determinación. El R^2 - ajustado = 0.9958 indicó que el modelo explica el 99.58% de la variación observada, mientras que el R^2 - predicho de 0.9902, confirmó su elevada capacidad para predecir nuevos parámetros

minimizando el riesgo de sobre ajuste. De modo que, la estrecha concordancia entre ambos parámetros valida que el modelo no solo describe adecuadamente los datos experimentales, sino que también predice con precisión nuevas observaciones (Apéndice. 31).

Es importante destacar que ciertos puntos axiales propuestos por el diseño, correspondientes a condiciones biológicamente inviables como: concentración de azúcares de 0 g/L, relación de inóculo 0% v/v, un pH de 4.0 o una temperatura de 51°C, fueron eliminados del modelo. La inclusión de estos ensayos, que arrojaban una productividad nula, habría comprometido los supuestos fundamentales del ANOVA, principalmente la normalidad y la homocedasticidad de los residuos, sesgando así la capacidad predictiva del modelo en la región de interés. Para compensar la eliminación de estos puntos y mantener la simetría del diseño, se realizaron réplicas adicionales en el punto central. Esta estrategia permitió mantener la robustez estadística sin reducir el tamaño muestral, y centrar el poder predictivo del modelo en el espacio experimental donde la producción de PHA es posible.

Por lo tanto, estos diagnósticos estadísticos confirman que el modelo matemático es sólido, confiable y altamente predictivo, constituyendo una herramienta idónea para la optimización del proceso fermentativo de PHA.

5.5.2 Efecto de los factores experimentales sobre la respuesta.

El análisis de los factores individuales permitió descifrar la influencia y las posibles consecuencias bioquímicas de cada condición de cultivo sobre la productividad volumétrica de PHA.

5.5.2.1 Efecto de la temperatura (Factor A).

La temperatura, fue con diferencia, el factor experimental más influyente del proceso como lo demuestra su F-valor = 1281.05 y su p-valor < 0.0001. El término cuadrático (A^2) también resultó altamente significativo (p-valor < 0.0001), confirmando una respuesta no lineal con un punto óptimo bien definido. Los resultados experimentales señalaron un intervalo óptimo de 30 a 37 °C. Este hallazgo es consistente con el comportamiento fisiológico general de *Bacillus thuringiensis*, un microorganismo mesófilo cuyo aparato enzimático, incluyendo enzimas clave como la PHA sintasa (PHA A, B, C) operan de manera eficiente en este intervalo térmico (Erkmen, 2022; Zhou et al., 2023). Temperaturas superiores, como 44°C, provocaron una disminución drástica en la productividad volumétrica, fenómeno atribuible a la desnaturalización parcial de proteínas y al incremento de la fluidez de la membrana celular, lo que obliga al microorganismo a destinar mayor gasto energético para el mantenimiento de la homeostasis celular (Moon et al., 2023). En contraste, el aumento desde 23°C hasta 30°C mejoró notablemente la productividad, posiblemente a la mayor energía cinética de las moléculas y por ende, al incremento en la frecuencia de colisiones enzima-sustrato (Schumann, 2003). Finalmente, la condición de 51°C fue considerada inviable, ya que un estrés térmico tan severo colapsa los sistemas de respiración y provoca muerte celular masiva (Daniel et al., 1996; Younas et al., 2015)

5.5.2.2 Efecto de la concentración de azúcares (Factor B)

La concentración inicial de fuente de carbono resultó ser un factor significativo (p-valor < 0.0001), con un efecto cuadrático (B^2) también diferencial (p-valor < 0.0009). El intervalo óptimo fue ubicado entre 10 y 20 g/L, siendo 10 g/L la concentración asociada a la de mayor eficiencia. En cambio, niveles superiores (30 a 40g/L) redujeron drásticamente la productividad. Este fenómeno puede atribuirse a dos mecanismos bioquímicos: En primer lugar, la inhibición por

sustrato, donde el exceso de carbono satura las enzimas de transporte de membrana, generando un desequilibrio metabólico por sobre flujo (Hoffmann & Bremer, 2016); y en segundo lugar, al estrés osmótico, ya que un medio hipertónico induce la plasmólisis (perdida y salida de agua celular), forzando un desvío energético y recursos metabólicos hacia la osmorregulación en lugar de destinarlos al crecimiento y producción de PHA (Tan et al., 2021; Yang et al., 2025).

5.5.2.3 Efecto del pH (Factor C)

El pH inicial del medio también demostró ser un factor crítico (p-valor < 0.0001), con un efecto cuadrático altamente significativo (p-valor < 0.0001). La mayor productividad se alcanzó a condiciones ligeramente ácidas (pH 5.5), probablemente porque este entorno puede inducir un desvío de carbono hacia la síntesis de PHA como estrategia de almacenamiento bajo estrés fisiológico (Szacherska et al., 2022).

Este comportamiento es consistente con lo observado por Villano et al. (2010) en *Clostridium tyrobutyricum* donde el pH funciona como un interruptor metabólico que desvía el flujo de carbono entre la producción de butirato (producto deseado) o el lactato y acetato. Análogamente para el microorganismo y el tipo de sustrato empleado (*B. thuringiensis* (C01) – Cáscara de papaya), un pH ligeramente ácido parece ser la condición óptima que mantiene un balance redox (NADH/NAD⁺) el cual es favorable para las enzimas de la ruta biosintética de PHA. Por el contrario, aunque el microorganismo toleró condiciones alcalinas (pH 10), la productividad disminuyó, posiblemente porque mantener un pH intracelular en medio básico demanda mayor gasto energético (ATP), reduciendo los recursos destinados a la producción de biomasa y PHA.

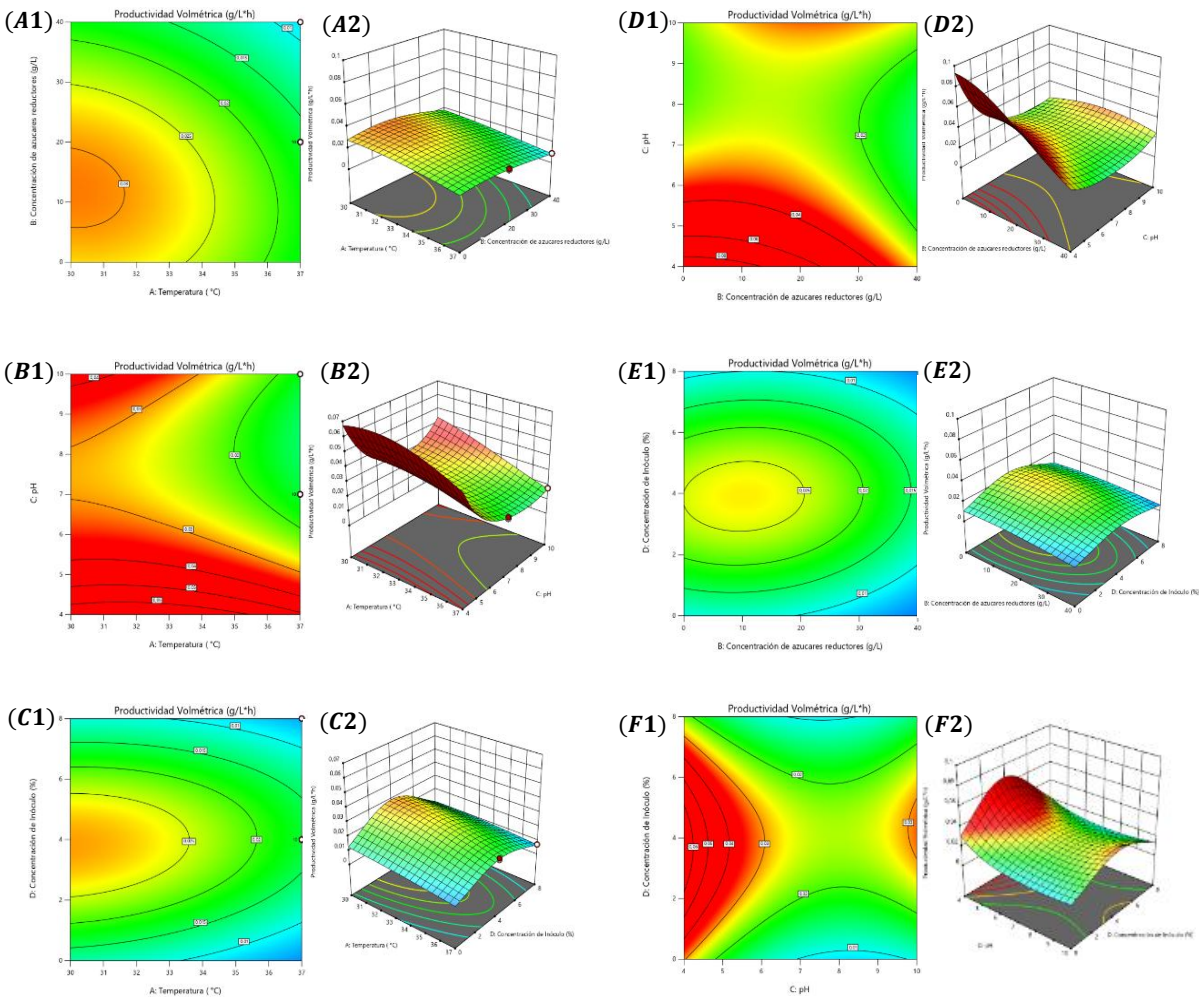
5.5.2.4 Efecto de la concentración de inóculo (Factor D).

Particularmente, el efecto lineal del inóculo no fue significativo (p -valor = 0.1794), indicando que, dentro del rango estudiado (2 - 8% v/v) *B. thuriniensis* (C01) puede iniciar el crecimiento eficientemente desde diferentes volúmenes celulares sin comprometer la fermentación, No obstante, el termino cuadrático (D^2) fue altamente significativo (p -valor < 0.00001), revelando la existencia de un punto óptimo. Adicionalmente se observó que una alta densidad inicial resultó en una menor productividad. Este comportamiento puede atribuirse a la rápida competencia por nutrientes limitantes como el nitrógeno o el fósforo. Un consumo acelerado de estos elementos pudo haber inducido una fase estacionaria prematura. Antes de que se generara suficiente biomasa para la acumulación de PHA, limitando así la productividad volumétrica final (Vu et al., 2021).

5.5.3 Análisis de las interacciones entre factores.

Si bien el análisis de los factores individuales es informativo, la optimización real del sistema depende de las interacciones entre factores y sus niveles. El ANOVA identificó tres interacciones estadísticamente significativas: temperatura-concentración de azúcares (AB), temperatura-pH (AC) y concentración de azúcares-pH (BC). Para poder visualizar estas interacciones fueron elaborados gráficos de superficie de respuesta tridimensionales y sus correspondientes contornos bidimensionales como se muestra en la Figura No 23.

Figura No. 21 Gráficos de superficie de respuesta (3D) y de contorno (2D).



Nota: Efectos entre interacciones de los factores sobre la Productividad Volumétrica (Q_p) de PHA. (A1,A2) Interacción Temperatura-Azúcares; (B1,B2) Interacción Temperatura-pH; (C1,C2) Interacción Temperatura-Inóculo; (D1,D2) Interacción Azúcares-pH; (E1,E2) Interacción Azúcares-Inóculo; (F1,F2) Interacción pH-Inóculo.

5.5.3.1 Interacción temperatura-concentración de azúcares (AB)

Con p -valor = 0.0003 esta interacción reveló que la productividad depende críticamente de la combinación de temperatura y disponibilidad de carbono. A bajas temperaturas ($<27^{\circ}\text{C}$), la productividad fue mínima independientemente de la concentración de azúcares. No obstante, alrededor de $30\text{--}33^{\circ}\text{C}$ se observó una fuerte dependencia donde concentraciones entre $10\text{--}15\text{ g/L}$

maximizan la productividad. A temperaturas superiores al punto óptimo, un exceso de azúcares resultó perjudicial para el rendimiento.

5.5.3.2 Interacción temperatura-pH (AC)

Las superficies B1 y B2 (p-valor=0.0003), mostraron que el pH depende fuertemente de la temperatura de fermentación. La máxima productividad se alcanza en un rango estrecho cercano a los 30-33°C y un pH ligeramente ácido entre 5.5-6.0. En regiones fuera de este rango, la productividad disminuye abruptamente. Por ejemplo, a 37°C, el microorganismo resulta ser mucho más sensible a un pH ácido.

5.5.3.3 interacción concentración de azúcares-pH (BC)

Esta fue la interacción más significativa (p-valor=0.00001). Las superficies demostraron que la máxima productividad requiere una combinación precisa de concentración de azúcares y pH ácido. Esto se ve reflejado en la región de baja concentración y pH ácido. Bajo estas condiciones, la célula bacteriana enfrenta un estrés controlado que estimula la síntesis de PHA. En contraste, la combinación pH ácido – alta temperatura genera un doble desafío (bombeo activo de protones y osmorregulación), comprometiendo la homeostasis y reduciendo la capacidad para sintetizar PHA (Albert & Brown, 2015)

Las demás interacciones (AD, BD, CD) no fueron estadísticamente significativas, lo que indica que, dentro de los rangos experimentales evaluados, el volumen de inóculo actúa de manera independiente con respecto a los otros tres factores estudiados.

5.6 Ecuación del modelo matemático, optimización factorial y validación experimental

El análisis factorial culminó en la formulación de un modelo matemático predictivo que describe la relación entre los factores de cultivo (A: temperatura, B: concentración de azúcares, C: pH y D: volumen de inóculo) y la productividad volumétrica de PHA (Y). El modelo corresponde a una ecuación polinómica cuadrática de segundo orden, expresada en términos de los factores codificados:

Ecuación 4. Modelo matemático cuadrático para la optimización numérica de la productividad volumétrica de PHA.

$$\begin{aligned}
 PHA (Y) = \{ & -1.60 - (0.1230 \times A) - (0.1334 \times B) - (0.1322 \times C) - (0.0190 \times D) \\
 & - (0.0285 \times AB) - (0.0289 \times AC) + (0.0129 \times AD) + (0.1278 \times BC) \\
 & - (0.0455 \times BD) + (0.0077 \times CD) - (0.0516 \times A^2) - (0.1058 \times B^2) \\
 & + (0.2179 \times C^2) - (0.3708 \times D^2) \}
 \end{aligned}$$

La optimización numérica realizada por medio del software Desing-Expert®, determinó las condiciones exactas que maximizaban la respuesta. El modelo predijo el punto óptimo bajo las siguientes condiciones: temperatura de 31.4°C, concentración de azúcares inicial de 10.10 g/L, pH inicial de 5.63 y 4% v/v de inóculo, con una productividad volumétrica óptima de 0.0408 $\frac{g}{L \cdot h}$ y máxima deseabilidad de la respuesta (Desirability = 1.00) (Apéndice 31).

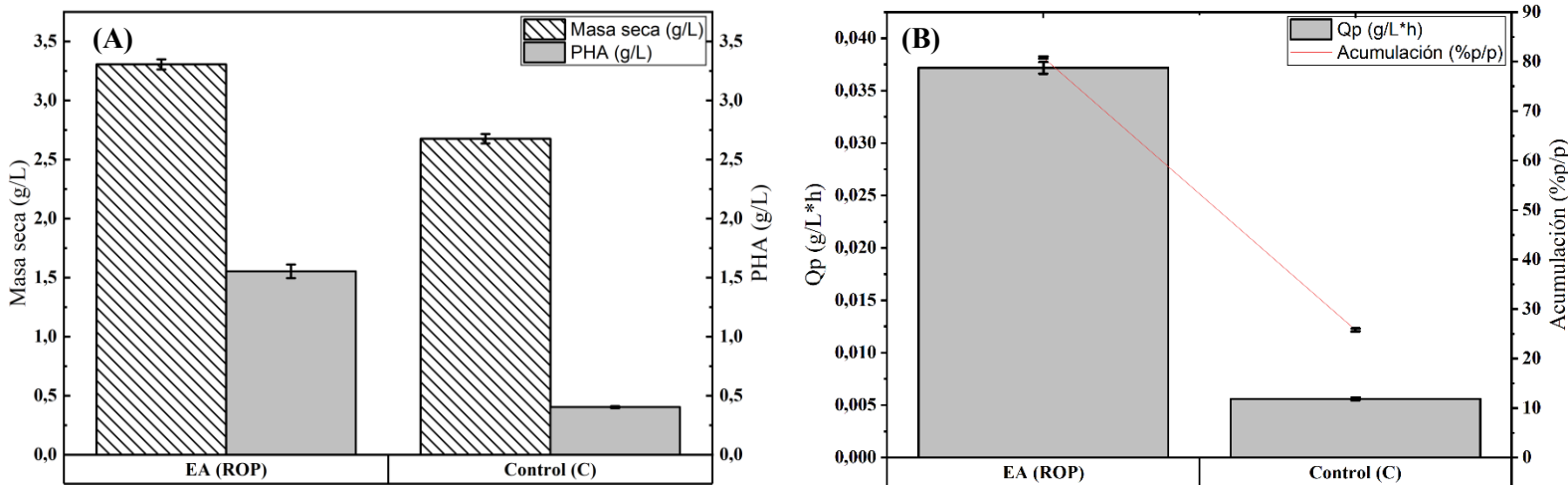
Para validar la robustez del modelo, se ejecutaron ensayos experimentales por triplicado bajo las condiciones óptimas predichas, tanto para el extracto acuoso de cáscara de papaya (codificado como ROP 1, ROP 2 y ROP 3) como para un medio con glucosa como control (C1, C2 y C3), resultados que son presentados en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del experimento de validación bajo condiciones óptimas, comparando el sustrato de extracto acuoso de papaya (ROP) con un control de glucosa (C).

Ensayo	Biomasa seca (g/L)	Acumulación de PHA (% p/p)	PHA (g/L)	Q_p g.L ⁻¹ h ⁻¹
ROP 1	3.38	81.2	2.75	0.038
ROP 2	3.31	80.7	2.67	0.037
ROP 3	3.23	80.54	2.61	0.036
C 1	1.66	25.33	0.42	0.005
C 2	1.46	26.33	0.39	0.005
C 3	1.54	25.66	0.4	0.005

La productividad volumétrica promedio obtenida en la validación fue de $0.0371 \pm 0.0010 \frac{g}{L \cdot h}$, valor que se encuentra dentro del intervalo de predicción del modelo (95% de confianza: PI low = 0.03592 y PI high = 0.05325). Adicionalmente, error relativo respecto al predicho fue de apenas 9%, confirmando la validez del modelo como herramienta predictiva (Apéndice 36)

Figura No. 22 Comparación de los parámetros productivos finales entre el sustrato optimizado de extracto acuoso de papaya (EA (ROP)) y el control con glucosa (Control (C)).



Nota: **(A)** compara la concentración final de biomasa seca (eje y izquierdo) y de PHA (eje y derecho). **(B)** compara la productividad volumétrica (Q_p , eje y izquierdo) y el porcentaje de acumulación de PHA (eje y derecho). Todos los valores representan el promedio de tres réplicas y las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

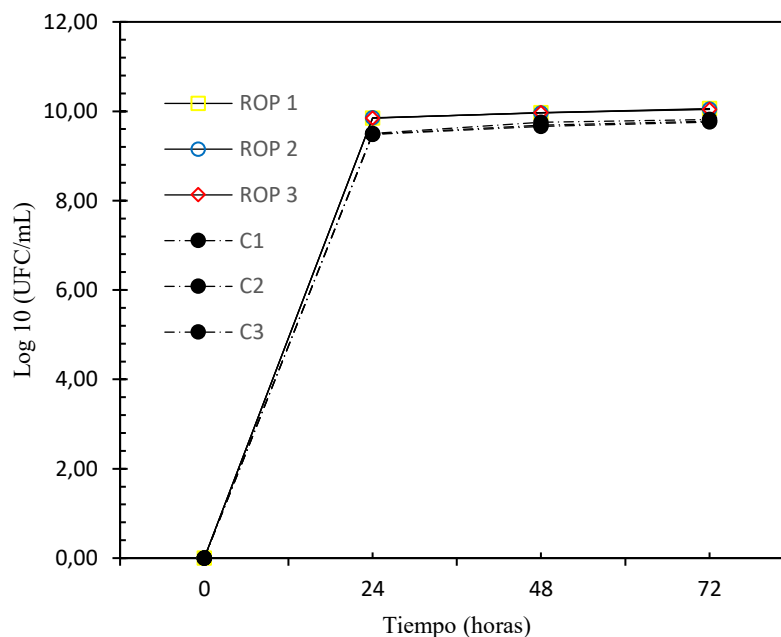
De forma contundente, el extracto acuoso de papaya (ROP) superó al control de glucosa.

La productividad con cáscara de papaya resultó 6.6 veces superior (p -valor <0.0001), con un PHA intracelular promedio de 2.68 ± 0.070 g/L y una acumulación del 80.8% p/p. Este rendimiento posiciona a la cáscara de papaya como un sustrato altamente competitivo.

Comparativamente, Doan Van et al. (2020) reportaron con *Bacillus megaterum* D8 y almidón de yuca cruda una acumulación de PHA de 66.2%, mientras que Umesh et al. (2017), alcanzaron 4.2 g/L de PHA con residuos de papaya (cáscaras) usando *Bacillus subtilis*. Sin embargo, es fundamental destacar una diferencia metodológica clave. Dicho resultado se obtuvo empleando un medio de cultivo que fue suplementado adicionalmente con una fuente de carbono pura (glucosa) además del propio hidrolizado. En contraste, los resultados de la presente investigación se lograron usando el extracto acuoso de cáscara de papaya como única y exclusiva fuente de carbono, sin ningún tipo suplementación más allá de las sales minerales componentes del medio mínimo de sales.

Si bien, la concentración de PHA reportada por Umesh et al. (2017) es nominalmente superior, los hallazgos de esta investigación resultan muy relevantes desde una perspectiva biotecnológica, al demostrar el elevado potencial de la cáscara de papaya como sustrato limpio e integral, capaz de sostener tanto el crecimiento celular como una alta tasa de acumulación de biopolímero (>80% p/p) sin necesidad de suplementar con carbohidratos purificados. Esto representa un beneficio económico y ambiental, considerando que la fuente de carbono es uno de los principales costos operativos en la producción de biopolímeros.

Figura No. 23 Curvas de crecimiento bacteriano comparando las réplicas del ensayo de optimización con extractos de papaya (ROP 1, 2, 3) y los controles con glucosa (C 1, 2, 3).



Complementariamente la significancia estadística fue corroborada mediante ANOVA (p -valor < 0.0001). La prueba T agrupó los tratamientos en categorías distintas, confirmando diferencias entre las medias de los grupos (Apéndice 36). En conjunto, estos hallazgos evidencian que la riqueza nutricional del extracto de cáscara de papaya (carbohidratos, proteínas, péptidos y minerales como K, Ca, Mg y Na) otorga ventajas sobre la glucosa pura, al reducir la necesidad de

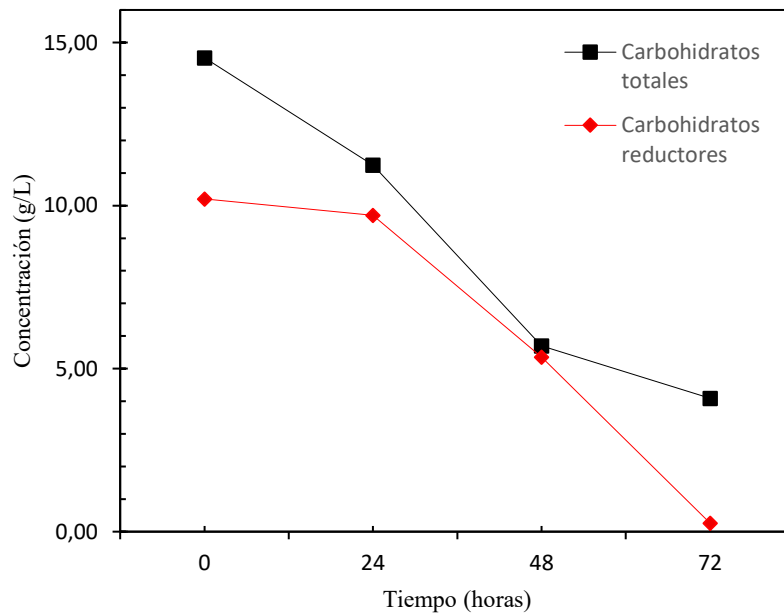
síntesis *de novo* de macromoléculas y redirigir más carbono y energía hacia la biosíntesis de PHA (Verlinden et al., 2007).

5.7 Caracterización del proceso optimizado y del biopolímero

5.7.1 Cinética de consumo de sustrato bajo condiciones de optimización.

Para comprender la dinámica metabólica durante la fermentación optimizada, se monitorizó el consumo de carbohidratos a lo largo de 72 horas. Se cuantificaron carbohidratos totales por medio del método de antrona y azúcares reductores por método DNS. Resultados que se muestran en la Figura No. 21.

Figura No. 24 Cinética de consumo de Carbohidratos Totales y Carbohidratos Reductores por *B. thuringiensis* durante la fermentación en el medio optimizado a base de extracto acuoso de papaya.



Al inicio de la fermentación ($t=0h$), el medio contenía una concentración de 14.53 g/L de carbohidratos totales, de los cuales 10.20 g/L fueron asignados como azúcares reductores según el método colorimétrico DNS. Al finalizar el proceso ($t=72 h$), se observó un consumo del 97.4% de

los azúcares reductores y 71.7% de los carbohidratos totales. Este perfil presentó una aparente contradicción con el análisis por (LC-MS) (sección 5.3.1) que identificó la sacarosa (un azúcar no reductor) como el principal carbohidrato del extracto.

La explicación de este fenómeno radica en la estrategia metabólica del microorganismo. *Bacillus thuringiensis*, así como otras especies del género, secreta la enzima invertasa (β -fructofuranosidasa), la cual hidroliza la sacarosa extracelularmente en sus monómeros constituyentes: glucosa y fructosa (ambos azúcares reductores) (Lincoln et al., 2018) En consecuencia, el método DNS no cuantificó directamente los azúcares originales presentes en el extracto acuoso, si no la fracción de monosacáridos liberados y consumidos de manera simultánea por el microorganismo.

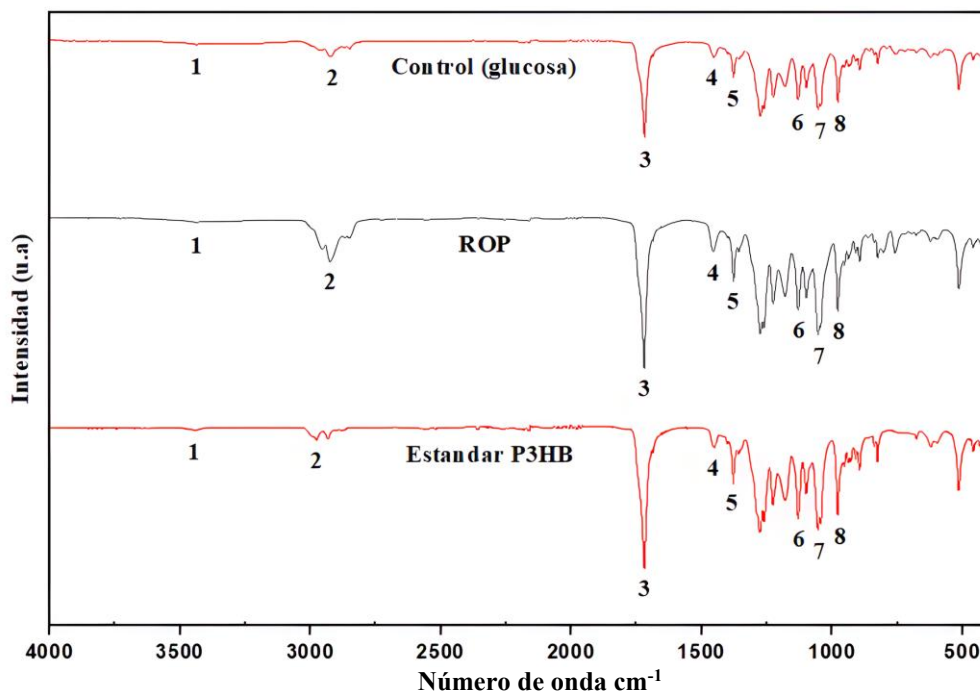
El análisis de las tasas de consumo reveló dos fases metabólicas distintas. Durante las primeras 24 horas coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial, la velocidad de consumo de azúcares reductores fue de $0.40 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. En este periodo, la célula metabolizó estos monosacáridos de fácil asimilación para generar biomasa. Sin embargo, entre las 24 y 72 horas, la velocidad de consumo disminuyó drásticamente a $0.20 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. En este punto de inflexión, el sustrato comienza a agotarse actuando como un interruptor fisiológico. La limitación de la fuente de carbono preferencial induce un estado de estrés que hace que el metabolismo orientado al crecimiento, induzca a otro orientado al almacenamiento. Es en esta segunda fase donde se activa la ruta biosintética de los PHA, el cual utiliza los carbohidratos restantes y el Acetil-CoA acumulado como precursores directos para la síntesis del biopolímero como reserva de carbono (Reid & Abratt, 2005; Verlinden et al., 2007). Finalmente se establece la hipótesis de que los 4.11 g/L de carbohidratos totales residuales detectados al término del proceso fermentativo,

corresponden probablemente a oligómeros derivados de la pectina, cuya complejidad estructural dificulta su asimilación por parte de la bacteria.

5.7.2 Identificación de grupos funcionales clave por espectroscopía infrarroja (FTIR).

Como se observa en la Figura No.22, los espectros infrarrojos obtenidos para las réplicas ROP 1, 2 y 3, así como para el control con glucosa son totalmente idénticos. Esta notable similitud indica contundentemente que el biopolímero sintetizado a partir de cáscara de papaya como sustrato es estructuralmente análogo al producido con una fuente de carbono de referencia como la glucosa.

Figura No. 25 Espectros de FTIR del biopolímero producido por *B. thuringiensis*.



Nota: Se comparan los polímeros obtenidos del ensayo de optimización con extracto de papaya (ROP), el control con glucosa y un estándar de PHB (Sigma Aldrich 99% pureza).

El análisis detallado de los espectros revela la presencia de bandas de transmitancia características del Poli(3-hidroxiбутirato) [P(3HB)], el tipo más común de PHA. Se relaciona a continuación cada banda con los grupos funcionales específicos en la unidad monomérica del P(3HB).

A 2930 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas se encuentran los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) de los grupos metilo que conforman el esqueleto del polímero (Trakunjae et al., 2021).. Posteriormente a 1720 cm^{-1} se encuentra la señal más importante y diagnóstica, perteneciente a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O) dentro de la función éster. Su alta intensidad es característica de este grupo funcional, y su aparición en el espectro es una prueba irrefutable de la presencia de un poliéster alifático como el P(3HB) (Barham et al., 1984). Finalmente, en la región de la huella dactilar comprendida entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ se observan múltiples bandas ($1275\text{-}1130$, 1054 y 977) asociadas a las vibraciones de tensión de los enlaces carbono-oxígeno (C-O) del grupo éster y a las vibraciones de carbono-carbono (C-C) del esqueleto consistentes con la estructura de P(3HB) (Ramezani et al., 2015).

En conjunto, la presencia de estas bandas diagnósticas asociadas a grupos funcionales puntuales y la coincidencia análoga cualitativa respecto al estándar de referencia de Sigma Aldrich, confirman tentativamente que el biopolímero sintetizado a partir de la cáscara de papaya es Poli(3-hidroxiбутirato).

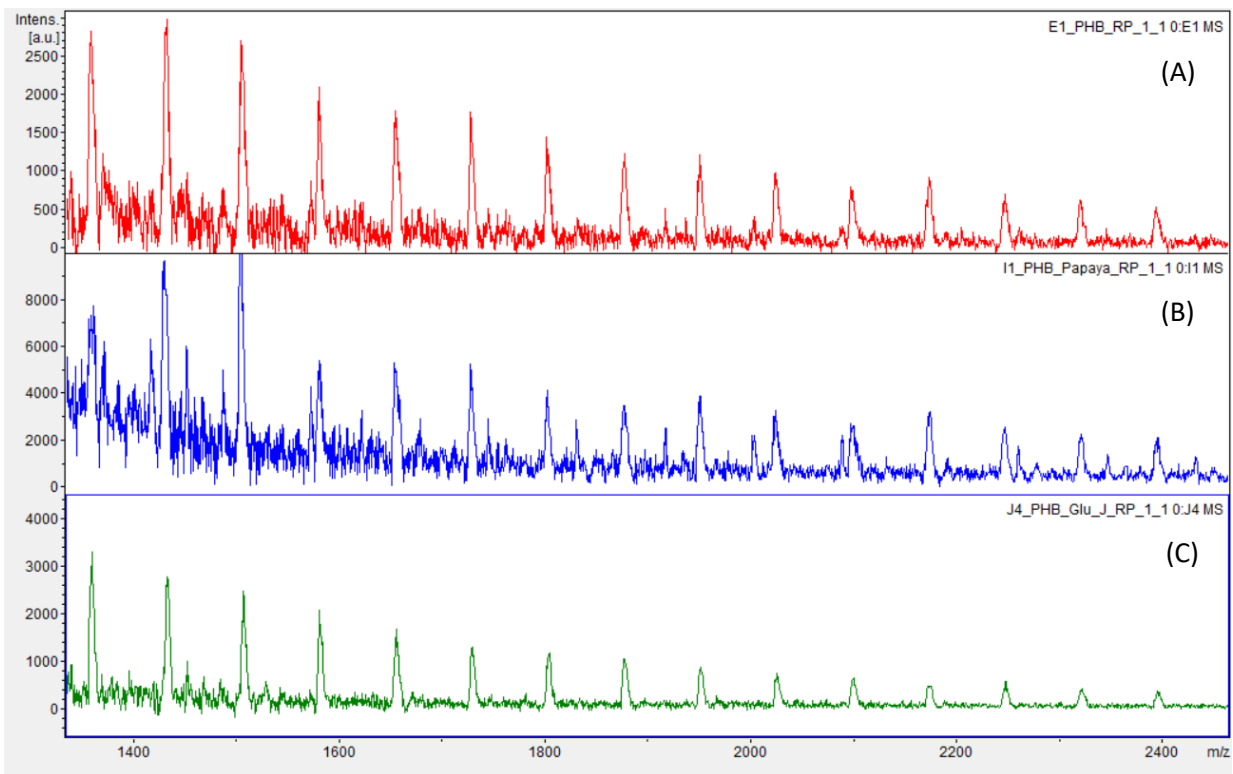
5.7.3 Caracterización molecular por MALDI-TOF/TOF-MS.

Con el fin de confirmar la identidad estructural del biopolímero obtenido sintetizado y caracterizar sus propiedades moleculares, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Este estudio permitió determinar la distribución de masas, el peso molecular

promedio, el grado de polimerización y la naturaleza de las unidades repetitivas. Para ello se analizó un polímero obtenido en la fermentación optimizada (ROP), un polímero de control producido a partir de glucosa, y un estándar comercial de Poli(3-hidroxiбутirato).

Los espectros de masas obtenidos (Figura No. 26), muestran una notable similitud en el patrón de aparición de las señales entre el estándar comercial y los polímeros experimentales, lo cual constituye una evidencia cualitativa inicial de que los biopolímeros biosintetizados por *B. thuringiensis* (C01) son, en efecto, P(3HB).

Figura No. 26 Espectros de masas MALDI-TOF: (A) estándar comercial de P(3HB), (B) polímero obtenido de cáscara de papaya, y (C) polímero obtenido de glucosa.

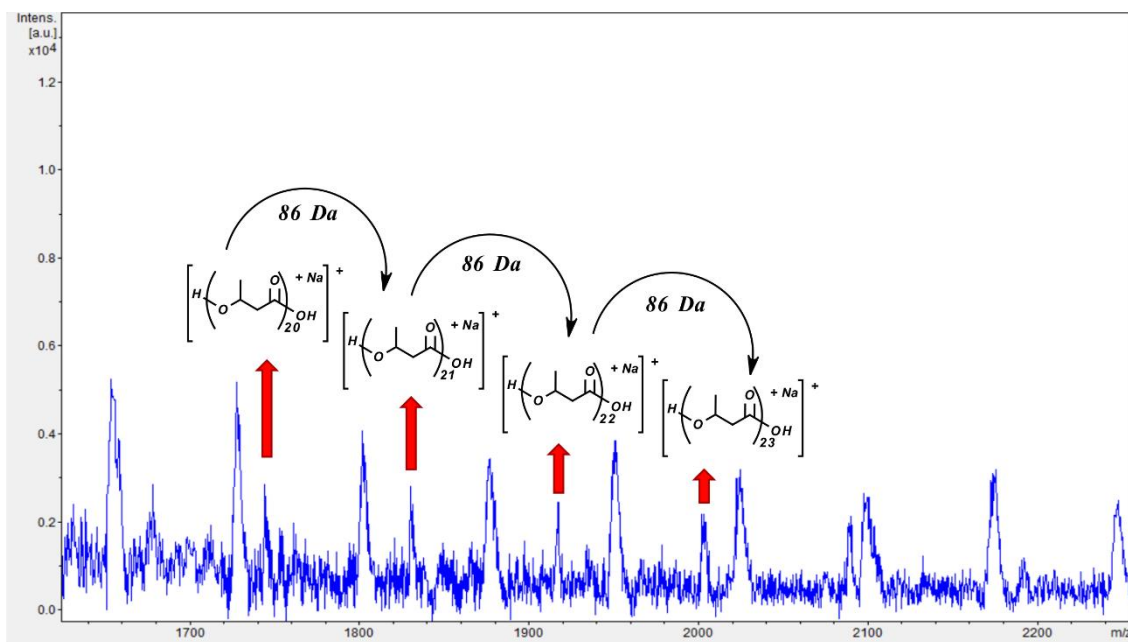


El análisis detallado de los espectros reveló la presencia de dos familias de picos, ambos en forma de aductos de sodio $[M+Na]^+$.

La serie contaminante (PDMS = 74 Da), con picos de mayor intensidad presento una perdida monomérica periódica aproximadamente de 74 Da. Esta masa es característica de del polidimetilsiloxano (PDMS), un contaminante. Su posible origen es la degradación de los septos de los viales de muestra durante la etapa de preparación del analito que contenía cloroformo y que fue sometido a un proceso de ultrasonido con calentamiento a 45°C, que extrajo estos oligómeros de siloxano.

La segunda serie presentó señales con pedidas de 86 Da (Figura No. 29), corresponde a la unidad monomérica del 3-hidroxitirato con fórmula $C_4H_6O_2$. Esta masa de 86 Da corresponde inequívocamente a la unidad monomérica del 3-hidroxitirato ($C_4H_6O_2$). Esta repetitividad confirma que la estructura primaria del polímero sintetizado es Poli(3-hidroxitirato) cuya fórmula molecular propuesta es $[(C_4H_6O_2)_n]Na^+$.

Figura No. 27 Detalle del espectro de masas mostrando la serie de picos principal con una diferencia de 86 Da, correspondiente a la unidad repetitiva de 3-hidroxitirato.



A partir de las intensidades de los picos de cada serie, se calcularon los parámetros de distribución molecular, resumidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades de distribución molecular de los polímeros analizados, calculadas a partir de las dos series de oligómeros de 86 Da.

Muestra	M_n	M_w	PDI	DP_n	DP_w
Estándar PHB	2063,1573	2076,3693	1,0064	23,9902	24,1438
Cáscara de papaya	2076,9831	2088,8135	1,0057	24,151	24,2885
Glucosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: La serie de 86 Da para la muestra de Glucosa no fue claramente resuelta o sus intensidades fueron insuficientes para un cálculo fiable.

El resultado más relevante es el índice de polidispersidad (PDI), que en polímero obtenido de cascara de papaya resulto excepcionalmente bajo que en todas las muestras resultó excepcionalmente bajo (1.0057). Este valor cercano a 1.0 indica que las cadenas poliméricas son prácticamente monodispersas, reflejando una alta homogeneidad y un proceso biosintético altamente controlado por *Bacillus thuringiensis* (C01). Asimismo, los valores de M_n y M_w del polímero obtenido de la cáscara de papaya fueron muy similares a los del estándar comercial,

Finalmente, se realizó la confirmación definitiva del polímero comparando las masas teóricas calculadas con las masas experimentales obtenidas en modo reflectron para una alta exactitud (Tabla 11.)

Tabla 11. Comparación entre masas teóricas y experimentales de PHB biosintetizados a partir de cáscara de papaya con monómeros repetitivos de 75 Da y 86 Da.

Muestra	Fórmula molecular	n	m/z teórico	m/z experimental
Monómero repetitivo 86 Da				
Cáscara de papaya	$[(C_4H_6O_2)_n]Na^+$	21	1829.9728	1830.371

Se observó una excelente concordancia para la serie principal de 86 Da. Específicamente para una cadena de 21 monómeros, la diferencia entre la masa teórica (1829.97 Da) y la experimental (1830.37Da) fue de tan solo 0.4Da. Este bajo error relativo y la alta precisión respaldan la identidad del biopolímero sintetizado a partir de la cáscara de papaya como Poli(3-hidroxiбутирато).

6. Conclusiones

La presente investigación demostró que la cáscara de papaya constituye una fuente de carbono viable, económica y ambientalmente sostenible para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) mediante fermentación con *Bacillus thuringiensis* (C01). Este residuo rico en azúcares, permitió obtener altos rendimientos de biopolímero sin necesidad de recurrir a tratamientos químicos agresivos, alcanzando una acumulación máxima de 2.67g/L y una productividad volumétrica de $0.0371 \frac{g}{L \cdot h}$ con un 80.8% p/p de acumulación relativa en condiciones óptimas de fermentación, establecidas mediante un diseño central compuesto basado en superficies de respuesta.

Las condiciones ideales determinadas fueron: 31.4°C de temperatura, 10 g/L en concentración de azúcares, pH 5.5 y 4%v/v de inóculo. Los ensayos preliminares demostraron que las suspensiones acuosas de cáscara de papaya superaron a los hidrolizados ácidos en rendimiento, evidenciando que la hidrólisis previa no constituye un paso indispensable para la extracción de azúcares fermentables.

El análisis FTIR confirmó la presencia de grupos funcionales característicos del poli(3-hidroxiбутирато) [P(3HB)]. Esta hipótesis fue validada por la caracterización mediante MALDI-

TOF/TOF-MS, la cual revelo la presencia de una serie principal de oligómeros con unidad monomérica de 86 Da (correspondiente al 3-hidroxi-butirato). Los pesos moleculares determinados a partir de esta serie ($M_w = 2077\text{Da}$ y $M_n=2089\text{ Da}$) y grados de polimerización ($DP_{n-w}=24$) resultaron análogos a los del estándar comercial de PHB. Se detecto la presencia de una serie adicional con una unidad de 74 Da, la cual se atribuyó a la contaminación de la muestra por PDMS, con lo cual fue excluida para los cálculos de propiedades moleculares. Asimismo, los bajos valores de índice de Polidispersidad ($PDI=1.0057$) reflejaron la excepcional homogeneidad y monodispersidad del biopolímero sintetizado por *Bacillus thuringiensis* (C01).

En conjunto, estos resultados consolidan la viabilidad del aprovechamiento de la cáscara de papaya como sustrato alternativo en bioprocesos enfocados en la producción de bioplásticos de alta calidad. Además de aportar conocimiento científico sobre la biosíntesis de PHA a partir de residuos, esta investigación contribuye al desarrollo de soluciones sostenibles para la sustitución de polímeros derivados del petróleo por alternativas 100% biodegradables y menos contaminantes, promoviendo a su vez, la valorización de residuos agroindustriales comúnmente desechados en la región de Santander.

Referencias bibliográficas

- A Agbor, G., Vinson, J. A., & Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>
- AITEX. (2022, June). *PHB@TEX - TEXTILE PRODUCTION FROM BIOPOLYMERS*. https://www.aitex-es.translate.google.com/translate/goog/portfolio/phbtex-textile-production-from-biopolymers/?lang=en&x_tr_sl=en&x_tr_tl=es-419&x_tr_hl=es-419&x_tr_pto=sc
- Akiyama, M., Tsuge, T., & Doi, Y. (2003). Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00400-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00400-7)
- Amelia, T. S. M., Govindasamy, S., Tamothran, A. M., Vigneswari, S., & Bhubalan, K. (2019). Applications of PHA in agriculture. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*, 347–361. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_13
- Andler, R., Pino, V., Moya, F., Soto, E., Valdés, C., & Andreeßen, C. (2021). Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 98–111. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>
- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>
- Anis, S. N. S., Iqbal, N. M., Kumar, S., & Al-Ashraf, A. (2013). Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioengineered*, 4(2), 115–118. <https://doi.org/10.4161/BIOE.22350>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Arminda, M., Josué, C., Cristina, D., Fabiana, S., & Yolanda, M. (2021). Use of activated carbons for detoxification of a lignocellulosic hydrolysate: Statistical optimisation. *Journal of Environmental Management*, 296, 113320. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.113320>
- Auch, C., Harms, M., & Mäder, K. (2019). How changes in molecular weight and PDI of a polymer in amorphous solid dispersions impact dissolution performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 372–382. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.12.012>
- B, K., H, B., W, S., M, B., W, S., C, K., D. Benherend, & K, S. (2002, May). *Polyhydroxybuttersäure (PHB)-Folien und -Platten zur Defektdeckung des knöchernen Schädels im Kaninchenmodell. Laryngo-Rhino-Otologie*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12001025/>. <https://doi.org/10.1055/s-2002-28343>

- Baptist, J. N., & Werber, F. (1960). *Molded product containing poly-beta-hydroxybutyric acid and method of making*. 106–160.
- Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19(9), 2781–2794. <https://doi.org/10.1007/BF01026954/METRICS>
- Barrios, J. F. (2023, December 13). *Cultivadores de papaya en Córdoba pierden \$13 mil millones por sobreproducción*. <https://www.eltiempo.com/colombia/otras-ciudades/cultivadores-de-papaya-en-cordoba-pierden-13-mil-millones-por-sobreproduccion-835124>
- Belitz, H.-D. ., & Grosh, Werner. (1997). *Química de los alimentos* (Maria Otilia Lopez Buesa, Ed. & Trans.; 2a ed.). Acribia. <https://www.casadellibro.com.co/libro-quimica-de-los-alimentos-2-ed/9788420008356/574222>
- Benvenuti, M. E. (2022). *Analysis of Food Sugars in Various Matrices Using UPLC with Refractive Index (RI) Detection*.
- Bernal, V., Giraldo, L., & Moreno Piraján, J. C. (2017). Adsorción de compuestos fenólicos sobre carbones activados modificados químicamente: efecto del sustituyente en el anillo aromático en las interacciones carbón activado-adsorbato. *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada*, ISSN 0001-9704, Vol. 74, N°. 579, 2017, Págs. 194–201, 74(579), 194–201. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6142346&info=resumen&idioma=SPA>
- Bewley, L., Morris, G. D. L., & Alperowicz, N. (2010). Plastics. *Chemical Week*, 172(25). https://doi.org/10.1007/978-3-031-10127-4_9
- Bittner, A. (2022). *Analysis-of-variance (ANOVA) Assumptions Review: Normality, Variance Equality, and Independence*. 28–33. https://doi.org/10.47461/ISOES.2022_BITTNER
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 440698. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00829/BIBTEX>
- Bucknall, D. G. (2020). Plastics as a materials system in a circular economy: Plastics in the Circular Economy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 378(2176). <https://doi.org/10.1098/RSTA.2019.0268>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Bunkaew, K., Khongkool, K., Lertworapreecha, M., Umsakul, K., Sudesh, K., & Chanasit, W. (2023). Valorization of pineapple peel waste for sustainable polyhydroxyalkanoates production. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 51(3), 257–267. <https://doi.org/10.48022/MBL.2305.05009>

- Burgos Montañez, L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Bylka, W., & Irena Matlawska. (2003). *Natural flavonoids as antimicrobial agents*. https://www.researchgate.net/publication/228800384_Natural_flavonoids_as_antimicrobial_agents
- Cabra, T., Rubiano, P., Constanza, C., & Jorge Tadeo Lozano, U. (2013). *TOTAL PROTEIN OF CRUDE EXTRACTS AND QUANTIFICATION THE NATIVE Bacillus thuringiensis STRAINS ISOLATED FROM BOYACÁ AND CUNDINAMARCA* (Vol. 3, Issue 2).
- Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 1212, 17(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17041212>
- Carolina, D., Trujillo, R., & De Grado, T. (2022). *DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE Stenotrophomonas rhizophila USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS CAMILO ANTONIO MOYA VALDERRAMA*.
- Chen, G. Q. (2009a). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Chen, G. Q. (2009b). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/B812677C>
- Chen, G.-Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Monographs*, 14, 17–37. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_2
- Chen, J. L., Lee, C., Lu, I. C., Chien, C. L., Lee, Y. T., Hu, W. P., & Ni, C. K. (2016). Theoretical investigation of low detection sensitivity for underivatized carbohydrates in ESI and MALDI. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(12), 1180–1186. <https://doi.org/10.1002/JMS.3889>
- Ciencias Biológicas Y De La Salud Departamento El Hombre Y Su Ambiente, D. DE, Loyola Martínez, F., & Genaro, D. (2019). *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO Uso de un sistema lítico para facilitar la recuperación del bioplástico polihidroxibutirato (PHB) producido por Azotobacter vinelandii QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)*.
- Cimadoro, J., Ribba, L., Ledesma, S., & Goyanes, S. (2018). Electrospun Mats: From White to Transparent with a Drop. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(10), 1800237. <https://doi.org/10.1002/MAME.201800237>
- Collantes, I. R., Melissa, D., Leyva, P., Jean, S., Mejía, P., Dadir, S., & Muro, R. R. (2017). *Planeamiento estratégico de la industria peruana del plástico*. Pontificia Universidad Católica del Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/9037>
- Costa, P., Basaglia, M., Casella, S., & Favaro, L. (2022). Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit and Vegetable Waste Processing. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 5529, 14(24), 5529. <https://doi.org/10.3390/POLYM14245529>

- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00298.X>
- Dai, S., Yao, Q., Yu, G., Liu, S., Yun, J., Xiao, X., Deng, Z., & Li, H. (2021). Biochemical Characterization of a Novel Bacterial Laccase and Improvement of Its Efficiency by Directed Evolution on Dye Degradation. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 633004. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.633004/BIBTEX>
- DANE. (2019). *Boletín mensual Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria*.
- Davaritouchaee, M., Mosleh, I., Dadmohammadi, Y., & Abbaspourrad, A. (2023). One-Step Oxidation of Orange Peel Waste to Carbon Feedstock for Bacterial Production of Polyhydroxybutyrate. *Polymers*, *15*(3), 697. <https://doi.org/10.3390/POLYM15030697/S1>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, *156*, 180–185. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.045>
- Di Bartolo, A., Infurna, G., & Dintcheva, N. T. (2021). A review of bioplastics and their adoption in the circular economy. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13081229>
- Dias, P. G. I., Sajiwanie, J. W. A., & Rathnayaka, R. M. U. S. K. (2020). Chemical Composition, Physicochemical and Technological Properties of Selected Fruit Peels as a Potential Food Source. *International Journal of Fruit Science*, *20*(S2), S240–S251. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1717402>
- Didion, Y. P., Vargas, M. V. G. A., Tjaslma, T. G., Woodley, J., Nickel, P. I., Malankowska, M., Su, Z., & Pinelo, M. (2024). A novel strategy for extraction of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) from engineered *Pseudomonas putida* using deep eutectic solvents: Comparison with traditional biobased organic solvents. *Separation and Purification Technology*, *338*, 126465. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2024.126465>
- Doan Van, T., Tran Thi, L., & Pham Thi Hong, H. (2020). PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM RAW CASSAVA STARCH BY *Bacillus megaterium* D8. *Journal of Science Natural Science*, *65*(10), 73–81. <https://doi.org/10.18173/2354-1059.2020-0050>
- Doi, Y., Kitamura, S., & Abe, H. (1995). Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, *28*(14), 4822–4828. https://doi.org/10.1021/MA00118A007/ASSET/MA00118A007.FP.PNG_V03
- Donadio, G., Mensitieri, F., Santoro, V., Parisi, V., Bellone, M. L., De Tommasi, N., Izzo, V., & Piaz, F. D. (2021). Interactions with microbial proteins driving the antibacterial activity of flavonoids. *Pharmaceutics*, *13*(5), 660. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050660/S1>
- Durán Hernández, D. M. (2020). *Aprovechamiento energético de la codigestión anaeróbica de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos y residuos de cosecha de plátano para la producción de biogás*. UNAL.

- EMR. (2025). *Mercado de Plástico en Colombia, Cuota, Informe 2025-2034*.
<https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-de-plastico-en-colombia>
- Esquivel, V., & Gomez, G. (2007, October). *Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa*.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022007000400005
- Follonier, S., Goyder, M. S., Silvestri, A. C., Crelier, S., Kalman, F., Riesen, R., & Zinn, M. (2014). Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 42–52.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.05.061>
- Follonier, S., Riesen, R., & Zinn, M. (2015). Pilot-scale production of functionalized mcl-PHA from grape pomace supplemented with fatty acids. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 113–121. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2251>
- García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, G., Antonio, J., & López, C. (2013a). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, G., Antonio, J., & López, C. (2013b). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- GAY, P., & DELOBBE, A. (1977). Fructose transport in *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 79(2), 363–373. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1977.TB11817.X>
- Gayathiri, E. (2018, April 2). *Study of the Enumeration of Twelve Clinical Important Bacterial Populations at 0.5 McFarland Standard*.
https://www.researchgate.net/publication/334724574_Study_of_the_Enumeration_of_Twelve_Clinical_Important_Bacterial_Populations_at_05_McFarland_Standard?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYXVwYm91IjoX2RpcmVjdCJ9fQ
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13104-016-2321-Y/FIGURES/6>
- Getino, L., Martín, J. L., & Chamizo-Ampudia, A. (2024). A Review of Polyhydroxyalkanoates: Characterization, Production, and Application from Waste. *Microorganisms*, 12(10), 2028.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12102028>
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., & Molinuevo-Salces, B. (2015). Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, 896–906.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.09.095>

- Gowda, V., & Shivakumar, S. (2014). Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 55–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100009>
- Groisman, E. A., Hollands, K., Kriner, M. A., Lee, E. J., Park, S. Y., & Pontes, M. H. (2013). Bacterial Mg²⁺ Homeostasis, Transport, and Virulence. *Annual Review of Genetics*, 47, 625. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-051313-051025>
- Guanca, M. A., Realpe-Delgado, M. E., & García-Celis, J. (2021). Obtención polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión. *Informador Técnico*, 86(1), 111–135. <https://doi.org/10.23850/22565035.3692>
- Güell Ferré, Anna. (2018). *Process development for the robust production of polyhydroxyalkanoates - Research Explorer The University of Manchester*. <https://research.manchester.ac.uk/en/studentTheses/process-development-for-the-robust-production-of-polyhydroxyalkan>
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casos, I. (2017). Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109–118. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2017.02.03>
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H., & Harrison, S. T. L. (2007). Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- β -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2007.02.012>
- Hoffmann, T., & Bremer, E. (2016). *Management of osmotic stress by Bacillus subtilis: genetics and physiology*.
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: Challenges and opportunities. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 2115–2126). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311>
- Hou, J., Cheng, L., Zhang, S., Zhang, X., Zheng, X., & Zhang, Q. (2025). Production of polyhydroxyalkanoate from new isolated bacteria of *Acidovorax diaphorobacter* ZCH-15 using orange peel and its underlying metabolic mechanisms. *Bioresource Technology*, 418, 131949. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2024.131949>
- International Energy Agency. (2021). *World Energy Outlook: Vol. I*.
- Jacqueline, P. J., & Velvizhi, G. (2024). Substantial physicochemical pretreatment and rapid delignification of lignocellulosic banana, pineapple and papaya fruit peels: A study on physical-chemical characterization. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 37, 101347. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2023.101347>
- Jung, Y. M., & Lee, Y. H. (2000). Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(3), 266–270. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80080-8)

- Kamaev, P. P., Iordanskii, A. L., & Startsev, O. V. (1999). Study of the kinetics of water sorption by biocompatible poly(3-hydroxybutyrate) membranes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(1), 49–51. <https://doi.org/10.1007/BF02508417/METRICS>
- Kauffmann, A. C., & Castro, V. S. (2023). Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 645, 12(4), 645. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12040645>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.01.053>
- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., & Varila, P. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), 561–565. <https://doi.org/10.1021/BM049478B>,
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017a). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. In *New Biotechnology* (Vol. 37, pp. 24–38). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017b). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, 37, 24–38. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2016.05.001>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017a). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. In *Bioengineering* (Vol. 4, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017b). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering* 2017, Vol. 4, Page 55, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING4020055>
- Kulkarni, S. O., Kanekar, P. P., Jog, J. P., Sarnaik, S. S., & Nilegaonkar, S. S. (2015). Production of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 784–789. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.09.028>
- Kumar, A., Bukya, K., & Mani, A. (2018). *Trend & Prospects in Processing of Horticultural Crops*. TodayandTomorrow'sPrintersandPublishers. https://www.researchgate.net/publication/328074248_Solar_drying_of_fruits_and_vegetables
- kumar, C., Mythily, R., & Chandraju, S. (2012). A rapid and sensitive extraction of sugars from papaya peels (*Carica Papaya*). *DerPharmaChemica*, 1631–1636. https://www.researchgate.net/publication/266485897_A_rapid_and_sensitive_extraction_of_sugars_from_papaya_peels_Carica_Papaya
- Kumar, P., Ray, S., Patel, S. K. S., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2015). Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.046>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/EXPRESSPOLYMLET.2011.60>
- Kusuma, H. S., Sabita, A., Putri, N. A., Azliza, N., Illiyanasafa, N., Darmokoesoemo, H., Amenaghawon, A. N., & Kurniawan, T. A. (2024). Waste to wealth: Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste for a sustainable packaging paradigm. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 9, 100225. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHMS.2024.100225>
- Laranja, J. L. Q., & Bossier, P. (2020). Poly-Beta-Hydroxybutyrate (PHB) and Infection Reduction in Farmed Aquatic Animals. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 457–482. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15147-8_35
- Lenz, R. W., & Marchessault, R. H. (2005). Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1021/BM049700C>
- Lincoln, L., More, S. S., & Reddy, S. V. (2018). Purification and biochemical characterization of β -d-fructofuranosidase from *Bacillus subtilis* LYN12. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5). <https://doi.org/10.1111/JFBC.12592>
- Liu, H., Kumar, V., Jia, L., Sarsaiya, S., Kumar, D., Juneja, A., Zhang, Z., Sindhu, R., Binod, P., Bhatia, S. K., & Awasthi, M. K. (2021). Biopolymer poly-hydroxyalkanoates (PHA) production from apple industrial waste residues: A review. *Chemosphere*, 284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131427>
- Lopez Martinez, V., Diaz Fernandez, E., Garcia Gonzalez, P., Garcia Lopez, J. L., Duque Martin de Oliva, E., & Ramos Martin, J. L. (2011). *SISTEMA DE AUTOLISIS CELULAR PARA EL PROCESADO DE LA BIOMASA BACTERIANA EN LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN PSEUDOMONAS PUTIDA KT2440*.
- Lu, B., University, Z., Ningyang Li, C., Zhao, C., Liu, H., Li, L., Matkowski, A., Aline Priscilla Gomes da Silva, P., Amin Ismail, B., Amir Reza Jassbi, M., Ana Sanches-Silva, I., Anca Miron, P., Avi Shpigelman, R., Gulcin Sagdicoglu Celep, I. A., Bernhard Hennig, T., Carlos Cespedes Acuña, U. L., Christian Carpéné, C., Daniel Granato, F., Daniela Andrea Ramirez, B., ... Korea Yoshinori Marunaka, S. (2021). *Nutritional profile of papaya peels, pulp, and seeds (Carica papaya L.)*. <https://doi.org/10.13039/501100001871>
- Macêdo, W. V., Sakamoto, I. K., Azevedo, E. B., & Damianovic, M. H. R. Z. (2019). The effect of cations (Na⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺) on the activity and structure of nitrifying and denitrifying bacterial communities. *Science of The Total Environment*, 679, 279–287. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.397>
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999>
- Mathuriya, A. S., & Yakhmi, J. V. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics and Their Applications. *Handbook of Ecomaterials*, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_84-1

- McMurry, John. (2012). *Química orgánica*. Cengage Learning.
https://books.google.com/books/about/Qu%C3%ADmica_org%C3%A1nica.html?hl=es&id=okQZdnD_MvQC
- Menes, J., Garmendia, G., Martínez, A., & Vero, S. (2022). *Manual de prácticas de microbiología general*. Universidad de la Republica.
- Mesa, N. (2017). *Alternativas biológicas y no convencionales para el manejo de las poblaciones de Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) en papaya Tainung-1 bajo condiciones del Valle del Cauca*. <http://ipt.sibcolombia.net/cr->
- Mier, C. (2022). *Identificación y caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoato (PHA) aisladas de muestras de suelos del departamento de Santander*. [Universidad Industrial de Santander]. <https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/12091>
- Ministerio de Relaciones Exteriores - Normograma [LEY 2232 de 2022 Congreso Nacional] (2022). https://www.cancilleria.gov.co/sites/default/files/Normograma/docs/ley_2232_2022.htm#5
- Miu, D. M., Eremia, M. C., & Moscovici, M. (2022). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as Biomaterials in Tissue Engineering: Production, Isolation, Characterization. *Materials*, 15(4), 1410. <https://doi.org/10.3390/MA15041410>
- Montero Clara, & Mejia Fabiola. (2008). *Escuela Tecnológica Instituto Técnico Central Resumen*. <http://www.salobillarpool.com/xprepository/bi->
- Mooney, B. P. (2009). The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal*, 418(2), 219–232. <https://doi.org/10.1042/BJ20081769>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271–282. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.07.010>
- Murcia, J. D. (2023). Colombia está dentro del podio de los mayores productores de papaya en la región | Agronegocios.co. *AGRINEGOCIOS*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/colombia-esta-dentro-del-podio-de-los-mayores-productores-de-papaya-en-la-region-3646138>
- Naranjo Vasco, J. M. (2010). *PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES*. Universidad Nacional de Colombia.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehninger Principios De Bioquímica (7a ed.)*. EditorialOmega.
- OCDE-FAO. (2024). OCDE/FAO Perspectivas Agrícolas 2025-2030. *OECD Publishing*. <https://doi.org/10.1787/47a9fa44-es>
- OEC. (2025, February). *Papayas (Fresh) in Colombia Trade | The Observatory of Economic Complexity*. <https://oec.world/en/profile/bilateral-product/papayas-fresh/reporter/col>
- Oria-Hernández, J., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., & Ramírez-Silva, L. (2005). Pyruvate Kinase Revisited. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37924–37929. <https://doi.org/10.1074/jbc.m508490200>
- Paduvari, R., & Somashekara, D. M. (2025). Advancements in genetic engineering for enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA) production: a comprehensive review of metabolic pathway

- manipulation and gene deletion strategies. *Bioengineered*, 16(1).
<https://doi.org/10.1080/21655979.2025.2458363>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Panda, A., Kurapati, S., Samantaray, J. C., Srinivasan, A., & Khalil, S. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(6), 770. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4365351/>
- Pandey, V. K., Shafi, Z., Tripathi, A., Singh, G., Singh, R., & Rustagi, S. (2024). Production of biodegradable food packaging from mango peel via enzymatic hydrolysis and polyhydroxyalkanoates synthesis: A review on microbial intervention. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, 100292.
<https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2024.100292>
- Payne, M. E., & Grayson, S. M. (2018). Characterization of Synthetic Polymers via Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2018(136), e57174. <https://doi.org/10.3791/57174>
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(3), 233–247.
<https://doi.org/10.1002/JCTB.1667>
- Plummer, D. T. . (1978). *An introduction to practical biochemistry* (Third). McGraw-Hill.
- 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. *Bioresource Technology*, 242, 304–310. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.117>
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment*, 702, 134455. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134455>
- Quintero-Silva, M. J., Suárez-Rodríguez, S. J., Gamboa-Suárez, M. A., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2024). Polyhydroxyalkanoates Production from Cacao Fruit Liquid Residues Using a Native *Bacillus megaterium* Strain: Preliminary Study. *Journal of Polymers and the Environment*, 32(3), 1289–1303. <https://doi.org/10.1007/S10924-023-03018-2>
- Rahmani Del Bakhshayesh, A., Akbarzadeh, A., Alihemmati, A., Tayefi Nasrabadi, H., Montaseri, A., Davaran, S., & Abedelahi, A. (2020). Preparation and characterization of novel anti-inflammatory biological agents based on piroxicam-loaded poly- ϵ -caprolactone nano-particles for sustained NSAID delivery. *Drug Delivery*, 27(1), 269–282. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1716881>
- Ramezani, M., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2015). Screening and comparative assay of polyhydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- β -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1. *Annals of Microbiology*, 65(1), 517–526. <https://doi.org/10.1007/S13213-014-0887-Y>
- Rao, A., Haque, S., El-Enshasy, H. A., Singh, V., & Mishra, B. N. (2019). RSM–GA Based Optimization of Bacterial PHA Production and In Silico Modulation of Citrate Synthase for Enhancing PHA Production. *Biomolecules*, 9(12), 872. <https://doi.org/10.3390/BIOM9120872>

- Rebocho, A. T., Pereira, J. R., Freitas, F., Neves, L. A., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C., & Reis, M. A. M. (2019). Production of Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* Grown in Apple Pulp Waste. *Applied Food Biotechnology*, 6(1), 71–82. <https://doi.org/10.22037/AFB.V6I1.21793>
- Rehman, A., & Aftab, M. N. (2016). *Production and characterization of a thermostable bioplastic (Poly-s-hydroxybutyrate) from bacillus cereus NRRL-b-3711*. <https://www.researchgate.net/publication/299387198>
- Reid, S. J., & Abratt, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: Genetic organisation and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 312–321. <https://doi.org/10.1007/S00253-004-1885-Y>
- RETEMA. (2024, February 29). *Obtención de textiles a partir de biopolímeros | RETEMA*. <https://www.retema.es/actualidad/obtencion-de-textiles-partir-de-biopolimeros>
- Rinanda, R., Sun, Y., Chang, K., Sulastri, R., Cui, X., Cheng, Z., Yan, B., & Chen, G. (2023). Plastic Waste Management: A Bibliometric Analysis (1992–2022). *Sustainability (Switzerland)*, 15(24). <https://doi.org/10.3390/su152416840>
- Saini, A., Panesar, P. S., & Bera, M. B. (2019). Valorization of fruits and vegetables waste through green extraction of bioactive compounds and their nanoemulsions-based delivery system. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40643-019-0261-9/TABLES/3>
- Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Kumar, P. S., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., & Thirumurugan, R. (2021). The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers 2021, Vol. 13, Page 3302*, 13(19), 3302. <https://doi.org/10.3390/POLYM13193302>
- Sánchez, N. (2018). *“Optimización de la cinética de secado en semillas de papaya”* [Ciudad Universitaria Rodrigo Facio]. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/server/api/core/bitstreams/a2c234c3-8cd8-44e9-85fd-f24e9939dcc8/content#:~:text=La%20cáscara%20generalmente%20es%20amarilla%20cuando%20el,esto%20varía%20dependiendo%20de%20una%20variedad%20%5B4%5D>
- Sánchez Safont, E. L. (2013). Desarrollo y caracterización de compuestos biodegradables basados en polihidroxialcanoatos y fibras lignocelulósicas para aplicaciones de un solo uso. In *UniversitaJAUMEI* (Issue Desarrollo y caracterización de compuestos biodegradables basados en polihidroxialcanoatos y fibras lignocelulósicas para aplicaciones de un solo uso). UniversitatJaumel.
- Santos, C. A., Lima, E. M. F., Franco, B. D. G. de M., & Pinto, U. M. (2021). Exploring Phenolic Compounds as Quorum Sensing Inhibitors in Foodborne Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 735931. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.735931/BIBTEX>
- Sanz Cervera, S. A. (2014). *Prácticas De Microbiología*. Universidad de La Rioja.
- Sauka H, D., & Benintende B, G. (2008). *Bacillus thuringiensis: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas* [Instituto de

- Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA)].
https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412008000200013
- Sawyer, S. F. (2009). Analysis of Variance: The Fundamental Concepts. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*, 17(2), 27E-38E. <https://doi.org/10.1179/JMT.2009.17.2.27E>
- Sheng H-W. (200 C.E.). Sodium, chloride and potassium. In M. Stipanuk (Ed.), *Biochemical and physiological aspects of human nutrition* (pp. 686–710). W.B. Saunders.
https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay?docid=alma999103273406676&context=L&vid=01NLM_INST:01NLM_INST&lang=en&search_scope=MyInstitution&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=LibraryCatalog&query=lds56,contains,Nutritional%20Physiological%20Phenomena%20--%20physiology,AND&mode=advanced&offset=10
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., & Neff, R. A. (2018). Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports*, 5(3), 375–386.
<https://doi.org/10.1007/S40572-018-0206-Z/TABLES/4>
- Song, H. M., Lim, S. H., Lee, E. S., Kim, D., Lee, S. Y., Jeong, K. J., & Park, S. J. (2025). Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates From Sucrose by Recombinant *Pseudomonas putida* KT2440. *ChemBioChem*, 26(8), e202401000. <https://doi.org/10.1002/CBIC.202401000>
- Statista. (2024, May). *Producción mundial de plástico*. https://www-statista-com.translate.goog/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/?__sso_cookie_checker=failed&_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
- Sudesh, K., & Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean - Soil, Air, Water*, 36(5–6), 433–442. <https://doi.org/10.1002/CLEN.200700183;CTYPE:STRING:JOURNAL>
- Sukan, A., Roy, I., Keshavarz, T., Sukan, A., Roy, I., & Keshavarz, T. (2014). Agro-Industrial Waste Materials as Substrates for the Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 5(4), 229–240. <https://doi.org/10.4236/JBNB.2014.54027>
- Sukruansuwan, V., & Napathorn, S. C. (2018). Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13068-018-1207-8/TABLES/4>
- Suneetha, J., Cs, P., & Suchiritha, D. (2017, June). *Nutritional properties of papaya peel*.
https://www.researchgate.net/publication/324202436_Nutritional_properties_of_papaya_peel
- SUWANNASING, W., IMAI, T., & KAEWKANNETRA, P. (2015). Potential Utilization of Pineapple Waste Streams for Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production via Batch Fermentation. *Journal of Water and Environment Technology*, 13(5), 335–347. <https://doi.org/10.2965/JWET.2015.335>
- Świątek, K., Gaag, S., Klier, A., Kruse, A., Sauer, J., & Steinbach, D. (2020). Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Sugars and Furfurals Formation. *Catalysts* 2020, Vol. 10, Page 437, 10(4), 437. <https://doi.org/10.3390/CATAL10040437>
- Szacherska, K., Moraczewski, K., Rytlewski, P., Czaplicki, S., Ciesielski, S., Oleskowicz-Popiel, P., & Mozejko-Ciesielska, J. (2022). Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain

- carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/S41598-022-11114-X>;SUBJMETA
- Talley, J. T., & Mohiuddin, S. S. (2023). Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556002/>
- Tan, C., Huang, M., McClements, D. J., Sun, B., & Wang, J. (2021). Yeast cell-derived delivery systems for bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 362–373.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.10.020>
- Tao, Q., Huang, H., Yang, M., Zou, Y., Harder, M. K., Yan, Q., Liang, B., Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., & Zhang, Y. (2024). Comparison of batch, fed-batch and continuous operation modes for scalable polyhydroxyalkanoate (PHA) production and carbon sequestration from phenol. *Journal of Water Process Engineering*, *60*, 105147. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2024.105147>
- Tikent, A., Laaraj, S., Bouddine, T., Chebaibi, M., Bouhrim, M., Elfazazi, K., Alqahtani, A. S., Noman, O. M., Hajji, L., Rhazi, L., Elamrani, A., & Addi, M. (2024). Antioxidant potential, antimicrobial activity, polyphenol profile analysis, and cytotoxicity against breast cancer cell lines of hydro-ethanolic extracts of leaves of (*Ficus carica* L.) from Eastern Morocco. *Frontiers in Chemistry*, *12*, 1505473. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2024.1505473>/BIBTEX
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2004). Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*, *26*(15), 1181–1189. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000036599.15302.E5/METRICS>
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudesh, K., & Vaithanomsat, P. (2021). Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-81386-2>
- Tridge. (2022, December 22). *Export market for Fresh Papaya in Colombia*.
https://www.tridge.com/tridge-eye/market-brief/EXPORT_MARKET/export-trend/MBF-8011d20f4b?date=2022-12-31
- Umesh, M., Priyanka, K., Thazeem, B., & Preethi, K. (2017). Production of Single Cell Protein and Polyhydroxyalkanoate from *Carica papaya* Waste. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *42*(6). <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2519-x>
- Valdez-Calderón, A., Barraza-Salas, M., Quezada-Cruz, M., Islas-Ponce, M. A., Angeles-Padilla, A. F., Carrillo-Ibarra, S., Rodríguez, M., Rojas-Avelizapa, N. G., Garrido-Hernández, A., & Rivas-Castillo, A. M. (2022). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain using low-cost media from fruit peel residues. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *12*(11), 4925–4938. <https://doi.org/10.1007/S13399-020-01147-5>/FIGURES/5
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2007.03335.X>

- Victoria, L., Gonzalez, P., Montenegro Gómez, S. P., Andrea, P., & Abad, G. (n.d.). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales Exploitation of agroindustrial waste in Colombia Exploração de resíduos agroindustriais na Colômbia*.
- Vilas-Franquesa, A., Frygas, C., Casertano, M., Montemurro, M., & Fogliano, V. (2024). Upcycling mango peels into a functional ingredient by combining fermentation and enzymatic-assisted extraction. *Food Chemistry*, 434. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.137515>
- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., & Majone, M. (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry*, 45(5), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.008>
- Vu, D. H., Wainaina, S., Taherzadeh, M. J., Åkesson, D., & Ferreira, J. A. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids. *Bioengineered*, 12(1), 2480–2498. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1935524>
- Walker, T. R., & Fequet, L. (2023). Current trends of unsustainable plastic production and micro(nano)plastic pollution. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 160, 116984. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.116984>
- Walterová, Z., & Horský, J. (2011). Quantification in MALDI-TOF mass spectrometry of modified polymers. *Analytica Chimica Acta*, 693(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2011.03.019>
- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M., & Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1–3), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00022-7)
- Yang, L., Pan, X., Zou, R., Zhang, Y., & Liu, H. (2025). Environmental and operational stresses in PHA Biosynthesis: Mechanisms, Challenges, and Sustainable Solutions. *Bioresource Technology*, 436, 133050. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2025.133050>
- Yasin, A. R., & Al-Mayaly, I. k. (2021). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresource Technology Reports*, 16, 100846. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100846>
- Yousuf, R., & Yousuf, R. G. (2017). *NOVEL POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION USING A WASTE DATE SEED FEEDSTOCK*. <https://www.researchgate.net/publication/337593093>

Apéndices

Apéndice. 1 Cáscaras de papaya provenientes de distintos lugares de recolección. Disposición para secado al sol.



Apéndice. 2 cáscaras de papaya seca, reducción de tamaño y pulverizado.



Apéndice. 3 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo DNS para la determinación de azúcares reductores totales en cáscara de papaya.

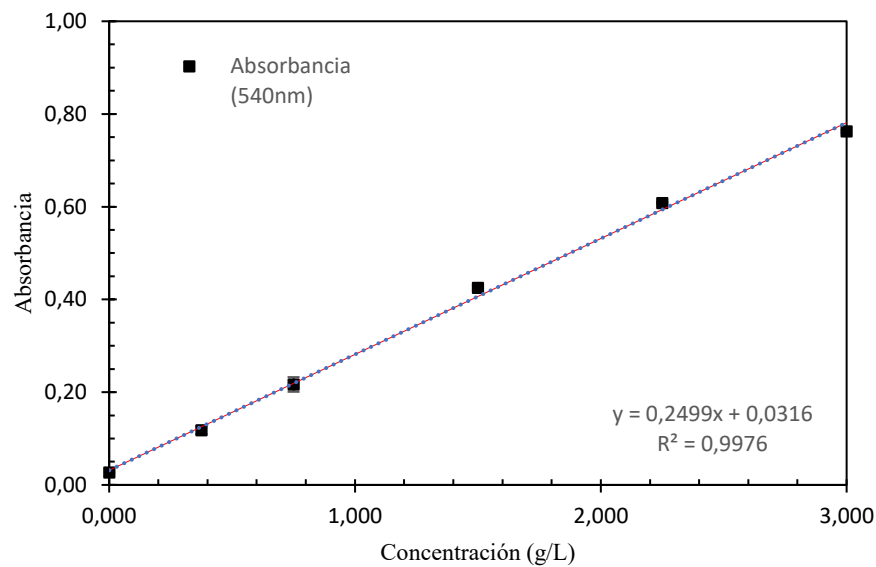
Patrón	Dextrosa (uL)	Agua Tipo 1 (uL)	Alícuota mezcla (Dextrosa + Agua Tipo 1) (uL)	Reactivo DNS (uL)
Blanco	0	1000	0	250
1	125	750	250	250
2	250	500	250	250
3	500	250	250	250
4	750	125	250	250

5	1000	0	250	250
---	------	---	-----	-----

Apéndice. 4 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración DNS.

Concentración (g/L)	Absorbancia (540nm) ($\langle x \rangle \pm CI (95\%)$)
0,000	0,027±0,002
0,375	0,117±0,007
0,750	0,216±0,015
1,500	0,425±0,004
2,250	0,608±0,002
3,000	0,762±0,002

Apéndice. 5 Curva de calibración DNS.



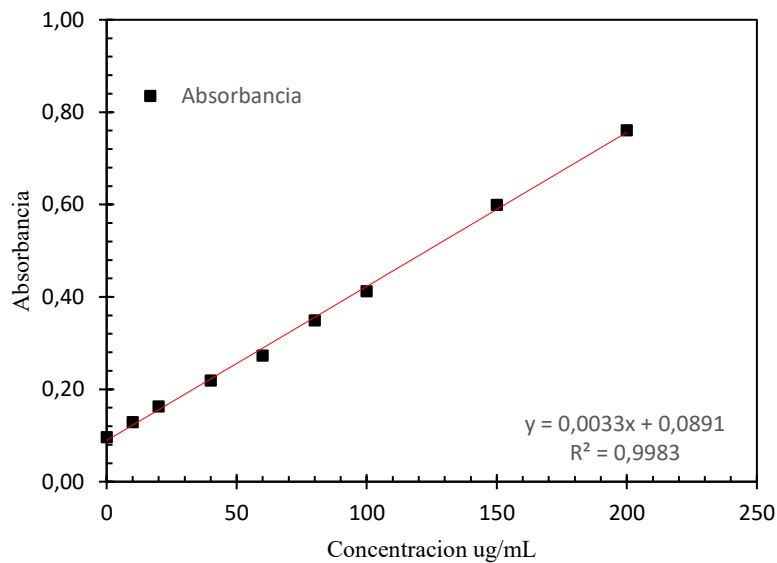
Apéndice. 6 Soluciones patrón para la determinación de la curva de calibración del ensayo Antrona para determinación de carbohidratos totales en cáscara de papaya.

Punto	Estándar (200 ppm)	Agua Tipo 1 (uL)	Reactivo Antrona (mL)
Blanco	0	1000	5
1	50	950	5

2	100	900	5
3	200	800	5
4	300	700	5
5	400	600	5
6	500	500	5
7	750	250	5
8	1000	0	5

Apéndice. 7 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Antrona.

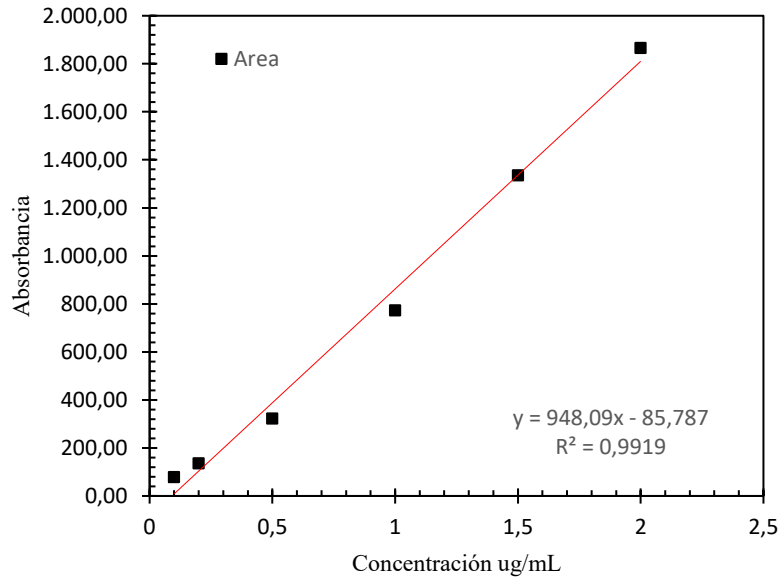
Concentración (g/L)	Absorbancia (620nm) ($\langle x \rangle \pm IC(95\%)$)
0	0,096±0,003
10	0,129±0,0036
20	0,163±0,0065
40	0,219±0,0034
60	0,273±0,0038
80	0,349±0,0069
100	0,412±0,0075
150	0,629±0,0246
200	0,761±0,0207

Apéndice. 8 Curva de calibración Antrona.**Apéndice. 9** Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración para el análisis UPLC de sacarosa.

Punto	Estándar (2 ug/mL)	Agua/ACN (50:50)
1	50	950
2	100	900
3	250	750
4	500	500
5	750	250
6	1000	0

Apéndice. 10 Áreas promedio de las señales cromatográficas obtenidas para las soluciones patrón de sacarosa para el análisis por UPLC.

Concentración (g/L)	Área ($\bar{x} \pm IC(95\%)$)
0,1	78,120±1,1683
0,2	135,597±4,4004
0,5	322,681±5,4567
1	772,849±10,4674
1,5	1335,038±23,4421
2	1865,855±14,5839

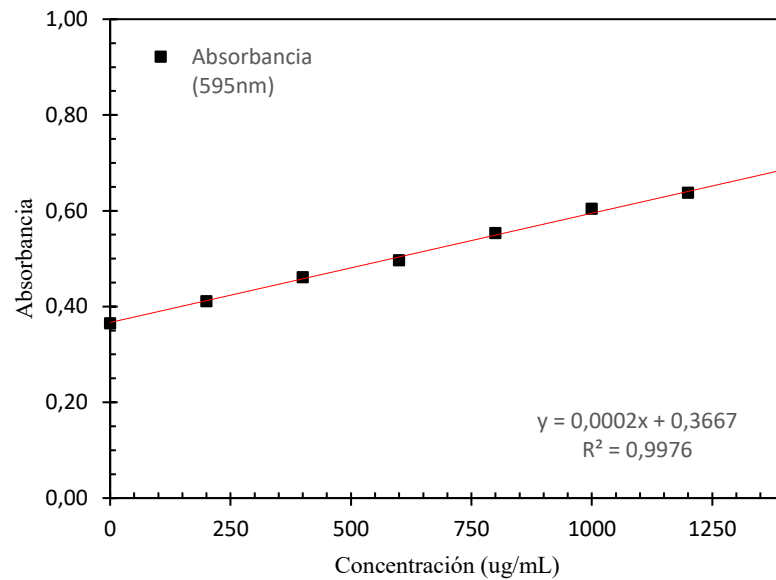
Apéndice. 11 Curva de calibración de sacarosa (UPLC)**Apéndice. 12** Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo Bradford para la determinación de proteínas en cáscara de papaya.

Patrón	Solución BSA (1400 ug/mL)	Solución Buffer fosfato (0,1M, pH 7) (uL)	Alícuota mezcla (Buffer fosfato + BSA) (uL)	Reactivo Bradford (uL)
Blanco	0	1400	0	2000
1	200	1200	40	2000
2	400	1000	40	2000
3	600	800	40	2000
4	800	600	40	2000
5	1000	400	40	2000
6	1200	200	40	2000
7	1400	0	40	2000

Apéndice. 13 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Bradford.

Concentración (ug/mL)	Absorbancia (595nm) ($\langle x \rangle \pm CI (95\%)$)
0	0,364±0,0004
200	0,411±0,0033
400	0,461±0,0038
600	0,496±0,0009
800	0,553±0,0038
1000	0,605±0,0025
1200	0,638±0,0022
1400	0,681±0,0028

Apéndice. 14 Curva de calibración Bradford.

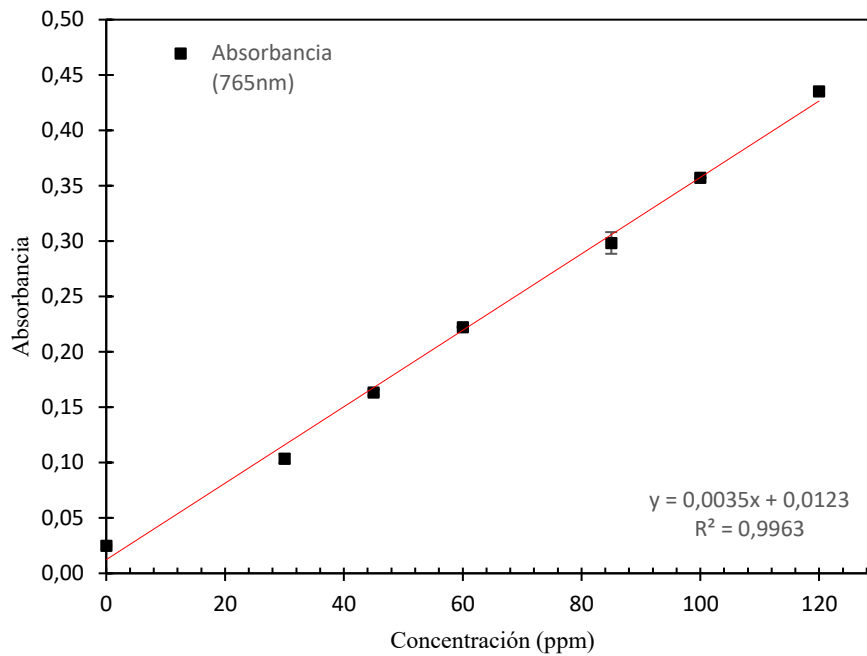


Apéndice. 15 Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del ensayo Folin-Ciocalteu para la determinación de proteínas en cáscara de papaya.

Patrón	Estándar Ácido Gálico (1000ppm) (uL)	Agua Tipo 1 (uL)	Solución Na ₂ CO ₃ (7,5% m/v)(uL)	Alícuota mezcla (Patrón AG+ Sln Na ₂ CO ₃)(uL)	Reactivo Folin-Ciocalteu 2M (1:10)(uL)
Blanco	0	1000	860	0	430
1	30	970	860	150	430
2	45	955	860	150	430
3	60	940	860	150	430
4	85	915	860	150	430
5	100	900	860	150	430
6	120	880	860	150	430

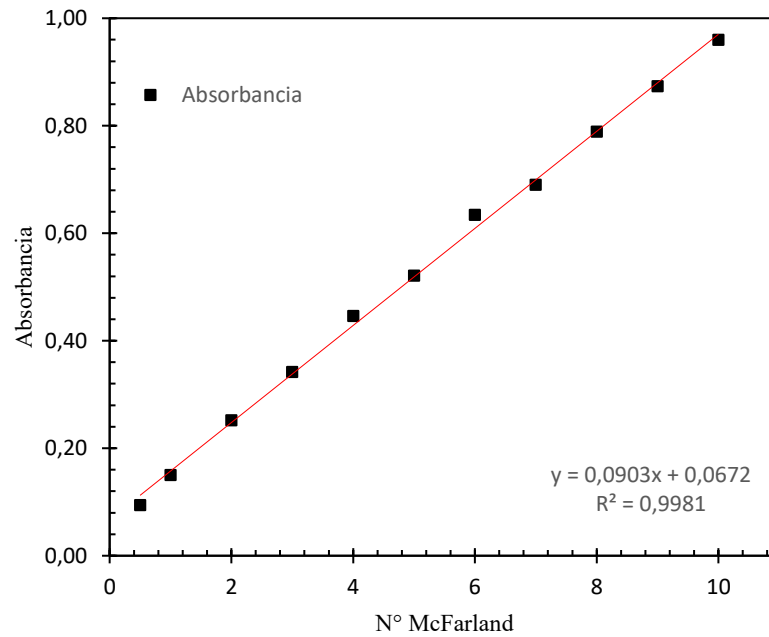
Apéndice. 16 Absorbancias de las soluciones patrón obtenidas para la construcción de la curva de calibración Folin-Ciocalteu.

Concentración (ppm)	Absorbancia (765nm) ($\langle x \rangle \pm CI$ (95%))
0	0,025±0,0009
30	0,103±0,0042
45	0,163±0,0024
60	0,222±0,0003
85	0,298±0,0097
100	0,357±0,0002
120	0,435±0,0026

Apéndice. 17 Curva de calibración Folin-Ciocalteu.**Apéndice. 18** Soluciones patrón y absorbancias para la preparación de la curva de calibración McFarland para la el ajuste de los inóculos.

N° McFarland	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC (x 10 ⁸ *mL ⁻¹)	Absorbancia (595 nm)
0,5	0,05	9,95	1,5	0,094
1	0,1	9,9	3	0,150
2	0,2	9,8	6	0,252
3	0,3	9,7	9	0,342
4	0,4	9,6	12	0,446
5	0,5	9,5	15	0,521
6	0,6	9,4	18	0,634
7	0,7	9,3	21	0,690
8	0,8	9,2	24	0,789
9	0,9	9,1	27	0,874
10	1	9	30	0,960

Apéndice. 19 Curva de calibración McFarland.



ANOVA extracción acuosa

Apéndice. 20 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para extractos acuosos.

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extracto acuoso (tiempo de exp)	4	82.6226	20.6557	3197	0.0001
Error	10	0.0646	0.0065		
Total	14	82.6872			

(B)

Tiempo de extracción	N	Media	Agrupación
120	3	11.80	A
60	3	11.15	B
30	3	10.98	B
15	3	8.64	C
0 (30°C)	3	5.42	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice. 21 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para extractos hidrolizados y extracto acuoso seleccionados.

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extracto Hidrolizado (%v/v)	3	0,04709	0,015697	8,15	0,008
Error	8	0,0154	0,001925		
Total	11	0,06249			

(B)

Extracto Hidrolizado %v/v	N	Media	Agrupación
3	3	12,08	A
2	3	11,55	B
1	3	11,07	C
0 (30 min EA)	3	10,98	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice. 22 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la concentración de Proteínas Solubles (g/L).

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extracto Hidrolizado (%v/v)	3	0,08381	0,027936	17,11	0,001
Error	8	0,01306	0,001632		
Total	11	0,09687			

(B)

Extracto Hidrolizado %v/v	N	Media	Agrupación
1	3	0,7590	A

0 (30 min EA)	3	0,6833	A	B	
2	3	0,6267		B	C
3	3	0,53			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA fenoles

Apéndice. 23 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la Concentración de Compuestos Fenólicos (ppm).

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extracto Hidrolizado (%v/v)	3	535607	178536	40179,51	0
Error	8	36	4		
Total	11	535642			

(B)

Extracto Hidrolizado %v/v	N	Media	Agrupación
3	3	549,99	A
2	3	520,07	B
1	3	501,24	C
0 (30 min EA)	3	37,52	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice. 24 (A) Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la Concentración de Compuestos Fenólicos (ppm) en los diferentes tratamientos con carbón activado.

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	7	896284	128041	25509,26	0
Error	16	80	5		
Total	23	896364			

(B)

Extracto Hidrolizado %v/v	N	Media	Agrupación
EH 3% NT	3	549.99	A
EH 2% NT	3	520.07	B
EH 1% NT	3	501.24	C
EH 3% TC	3	352.47	D
EH 2% TC	3	321.68	E
EH 1% TC	3	304.89	F
EA NT	3	37.52	G
EA TC	3	16.43	H

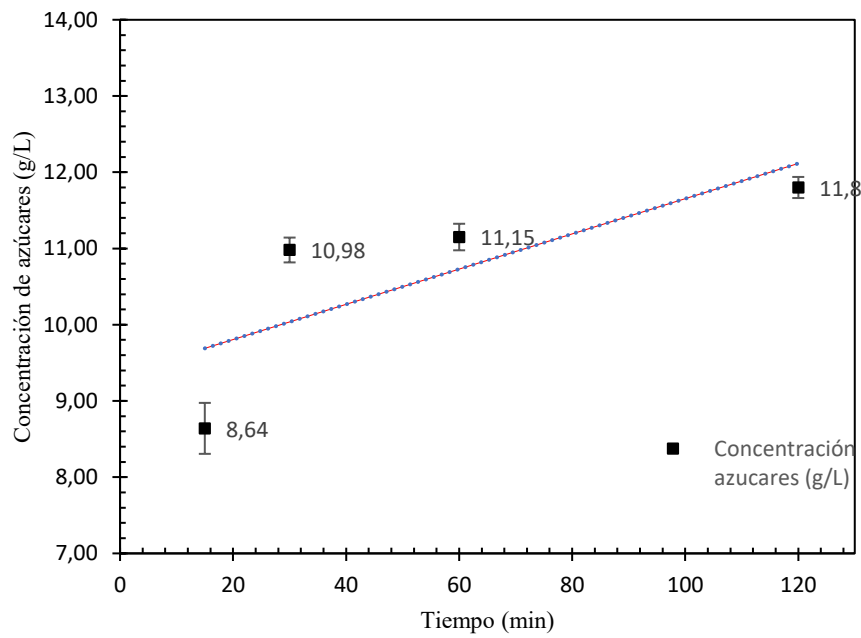
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice. 25 Diseño central compuesto (DCC) propuesto por el software Desing-Expert®.

Column 1	Column 2	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1
Std	Run	A: Temperatura	B: Concentración de Azúcares	C: pH	D: Relación de Inóculo	Q _p
		°C	g/L		%v/v	%
17	4	23,0	20,0	7,0	4,0	-
9	5	30,0	10,0	5,5	6,0	-
1	6	30,0	10,0	5,5	2,0	-
3	14	30,0	30,0	5,5	2,0	-
11	21	30,0	30,0	5,5	6,0	-
7	23	30,0	30,0	8,5	2,0	-
15	24	30,0	30,0	8,5	6,0	-
13	25	30,0	10,0	8,5	6,0	-
5	27	30,0	10,0	8,5	2,0	-
27	1	37,0	20,0	7,0	4,0	-
30	8	37,0	20,0	7,0	4,0	-
29	11	37,0	20,0	7,0	4,0	-
28	12	37,0	20,0	7,0	4,0	-
21	16	37,0	20,0	4,0	4,0	-
23	17	37,0	20,0	7,0	0,0	-
26	18	37,0	20,0	7,0	4,0	-
24	19	37,0	20,0	7,0	8,0	-
22	22	37,0	20,0	10,0	4,0	-
25	28	37,0	20,0	7,0	4,0	-
19	29	37,0	0,0	7,0	4,0	-
20	30	37,0	40,0	7,0	4,0	-

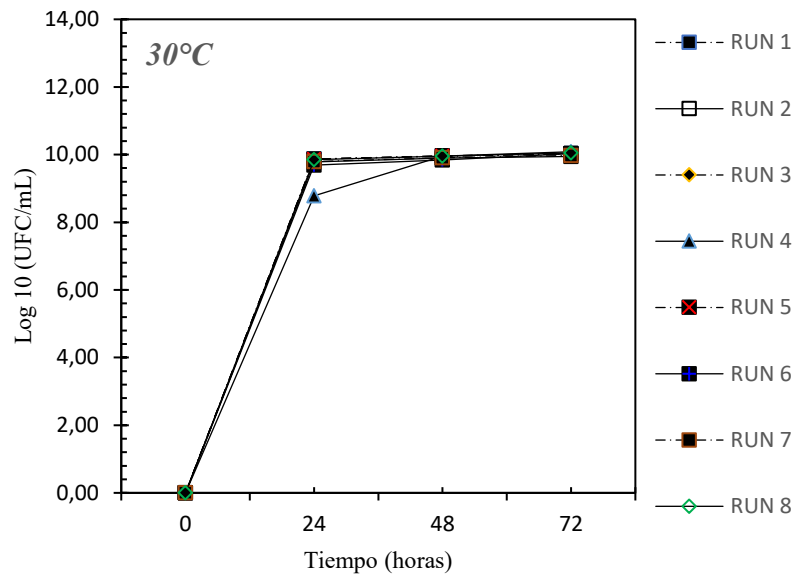
14	2	44,0	10,0	8,5	6,0	-
2	3	44,0	10,0	5,5	2,0	-
12	7	44,0	30,0	5,5	6,0	-
10	9	44,0	10,0	5,5	6,0	-
4	10	44,0	30,0	5,5	2,0	-
16	13	44,0	30,0	8,5	6,0	-
8	15	44,0	30,0	8,5	2,0	-
6	20	44,0	10,0	8,5	2,0	-
18	26	51,0	20,0	7,0	4,0	-

Apéndice. 26 Curva de extracción acuosa de azúcares en diferentes.

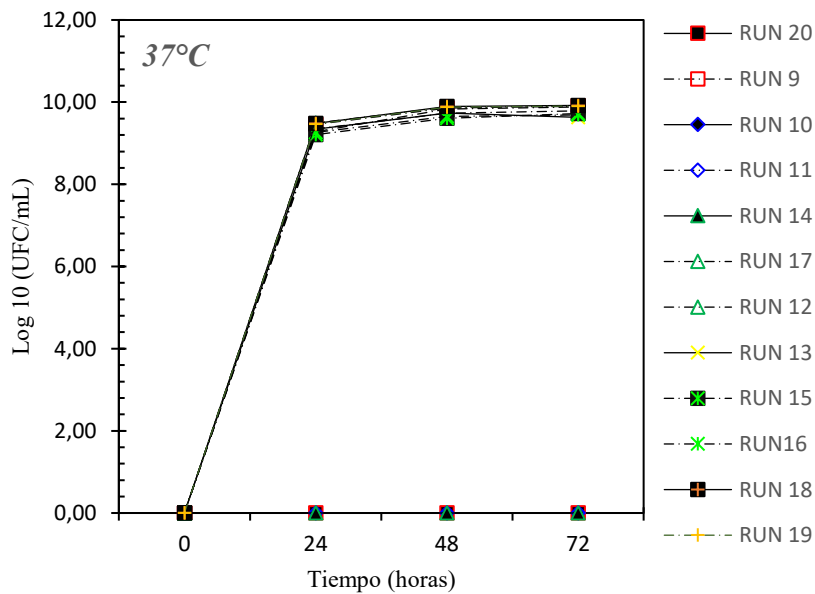


Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 1 (30°C).

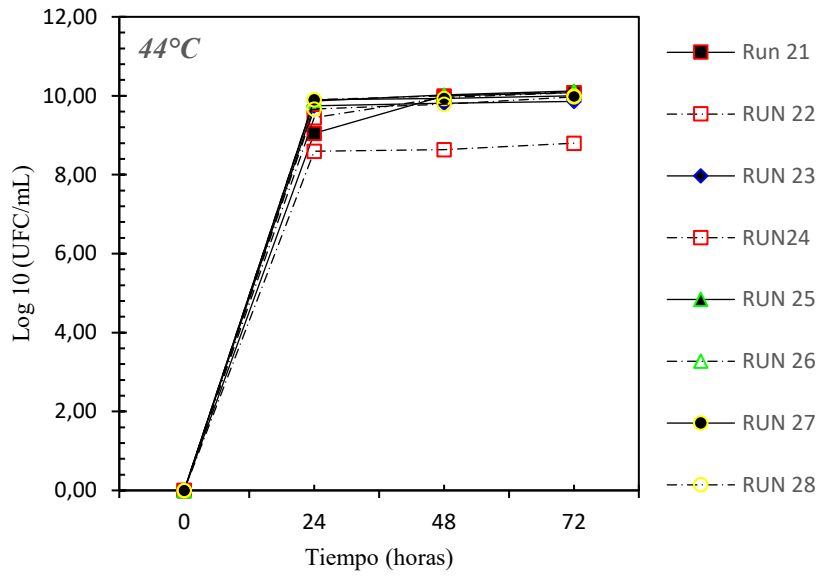
Apéndice. 27 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 1 (30°C).



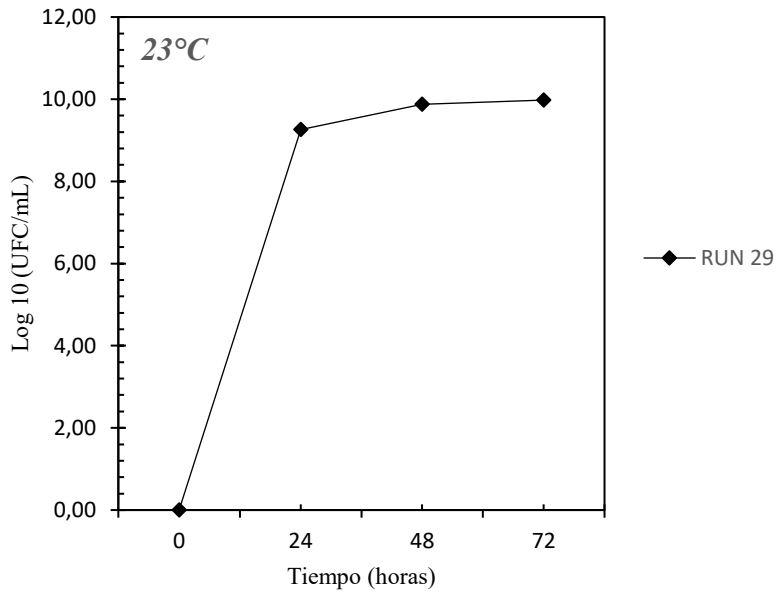
Apéndice. 28 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 2 (37°C).



Apéndice. 29 Curvas de crecimiento para los diferentes ensayos del Bloque 3 (44°C).



Apéndice. 30 Curva de crecimiento para el único ensayo del Bloque 4 (23°C).



Apéndice. 31 Efecto de la transformación logarítmica sobre las estadísticas de ajuste.

Fit Statistics (A)

Std. Dev.	0.0023	R²	0.9668	
Mean	0.0152	Adjusted R²	0.9359	
C.V. %	15.39	Predicted R²	0.3969	
		Adeq Precision	20.6710	

Fit Statistics (B)

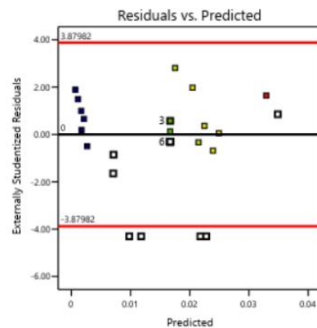
Std. Dev.	0.0245	R²	0.9978	
Mean	-1.94	Adjusted R²	0.9958	
C.V. %	1.26	Predicted R²	0.9902	
		Adeq Precision	71.1423	

Nota: (A) Ajuste para la respuesta sin transformar, (B) Ajuste para la respuesta transformada.

Apéndice. 32 Efecto de la transformación logarítmica sobre la homocedasticidad de la varianza de los residuos.

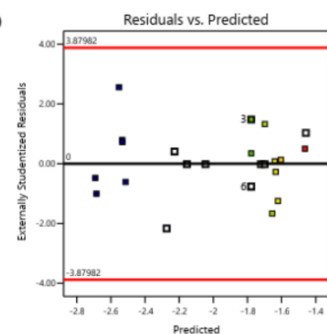
Response: Productividad volumétrica
 Productividad volumétrica :
 0.002  0.036

(A)



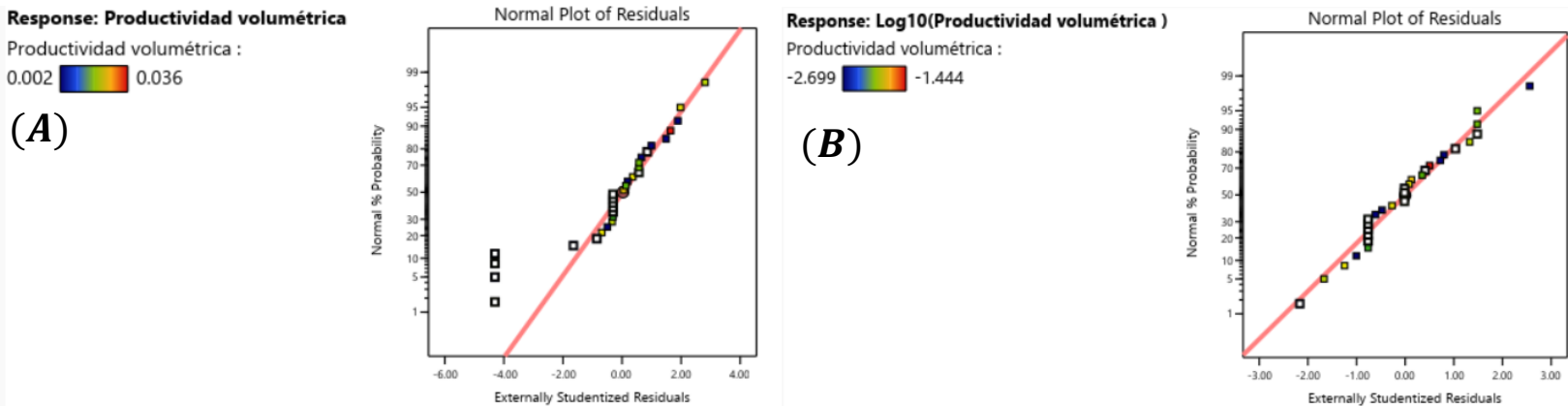
Response: Log10(Productividad volumétrica)
 Productividad volumétrica :
 2.699  -1.444

(B)



Nota: (A) Gráfico de probabilidad normal para los residuos de la respuesta sin transformar, donde se observa una clara desviación de la línea de normalidad teórica. (B) Gráfico de probabilidad normal para los residuos de la respuesta transformada, mostrando un correcto ajuste de los puntos a la línea, lo que valida el supuesto de normalidad.

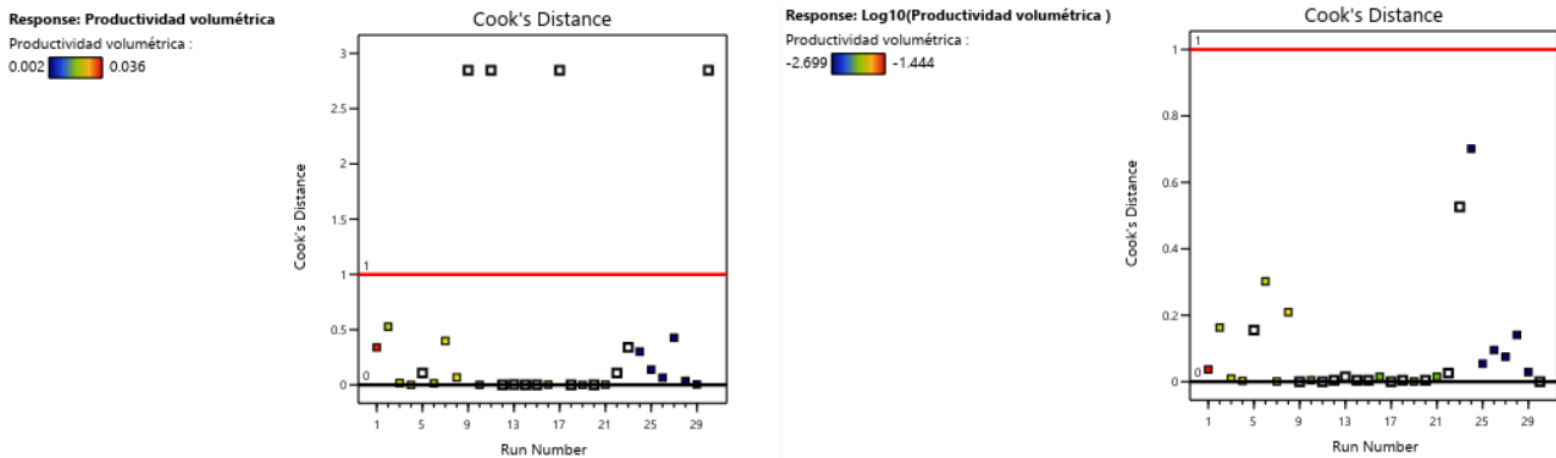
Apéndice. 33 Efecto de la transformación sobre la normalidad de los residuos transformación



sobre las respuestas predichas vs. respuestas actuales.

Nota: (A) Ajuste para la respuesta sin transformar, (B) Ajuste para la respuesta transformada

Apéndice. 34 Gráfico distancia de Cook para determinar valores atípicos.



Nota: (A) Ajuste para la respuesta sin transformar, (B) Ajuste para la respuesta transformada

Apéndice. 35 Resumen de ajustes para modelos: lineal, dos interacciones (2FI), cuadrático y cubico.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²
--------	--------------------	---------------------	-------------------------	--------------------------

Linear	< 0.0001	< 0.0001	0.7190	0.6402	
2FI	0.9852	< 0.0001	0.6476	0.3702	
Quadratic	< 0.0001	0.4549	0.9958	0.9902	Suggested
Cubic	0.3443	0.5838	0.9962		Aliased

Apéndice. 36 Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático ajustado a la Productividad Volumétrica de PHA.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4.15	14	0.2963	492.45	< 0.0001	significant
A-Temperatura	0.7709	1	0.7709	1281.05	< 0.0001	
B-Concentración de azúcares	0.0589	1	0.0589	97.94	< 0.0001	
C-pH	0.0578	1	0.0578	96.13	< 0.0001	
D-Concentración de inóculo	0.0012	1	0.0012	1.98	0.1794	
AB	0.0130	1	0.0130	21.53	0.0003	
AC	0.0133	1	0.0133	22.16	0.0003	
AD	0.0027	1	0.0027	4.44	0.0525	
BC	0.0163	1	0.0163	27.16	0.0001	
BD	0.0021	1	0.0021	3.45	0.0831	
CD	0.0001	1	0.0001	0.0981	0.7584	
A²	0.6261	1	0.6261	1040.38	< 0.0001	
B²	0.0103	1	0.0103	17.08	0.0009	
C²	0.0436	1	0.0436	72.39	< 0.0001	
D²	0.1262	1	0.1262	209.68	< 0.0001	
Residual	0.0090	15	0.0006			
Lack of Fit	0.0037	6	0.0006	1.05	0.4549	Not significant
Pure Error	0.0053	9	0.0006			
Cor Total	4.16	29				

Apéndice. 37 Análisis de Varianza y (B) Prueba de Tukey para la productividad volumétrica determinada en los ensayos de validación.

(A)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Ensayo de Optimización	1	0,001536	0,0015	3072	0,0001
Error	4	0,000002	0,0000		
Total	5	0,001538			

(B)

Optimización	N	Media	Agrupación
ROP	3	0,037	A
C	3	0,005	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice. 38 Parámetros experimentales de optimización según DCC-RSM.

Number	Temperatura	Concentración de azúcares	pH	Relación de Inóculo	Q _p	Desirability
#	°C	g/L		%		
1	31.35	10.10	5,6	3.99	0.0408	1.000 Selected

Apéndice. 39 Análisis confirmatorio mediante intervalo de predicción 95%.

Analysis	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
Productividad volumétrica	0.0408	0.0408		0,0023	3,00	N/A	0.0368	0.0371	0.0452

