

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

EVALUACIÓN DEL USO DE MUCILAGO DE CACAO (*Tehobroma Cacao*) COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL

Autor

Cornejo Lucero Osmar Josué

Director

Ing. Jimmy Núñez Pérez MSc.

Ibarra-Ecuador

2022



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

EVALUACIÓN DEL USO DE MUCILAGO DE CACAO (*Tehobroma Cacao*) COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se autoriza

su presentación como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA

Ing. Jimmy Nuñez, MSc.

DIRECTOR DE TESIS



FIRMA

Ing. José M. País Chanfrau PhD.

OPOSITOR



FIRMA

Ing. Rosario Espín MSc.

OPOSITOR



FIRMA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100420060-4		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Cornejo lucero Osmar Josué		
DIRECCIÓN:	Calle Manuel Díaz y José Posse Prado Urbanización el Valle-Otavalo		
EMAIL:	ojcornejol@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	06-2524978	CELULAR:	0978995762

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Evaluación del uso de mucilago de cacao (<i>Tehobroma cacao</i>) como sustrato para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs)
AUTOR:	Cornejo Lucero Osmar Josué
FECHA:	05/05/2021
PROGRAMA:	(X) PREGRADO () POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial
ASESOR/DIRECTOR:	Ing. Jimmy Núñez, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros. Ibarra, a los cuatro días del mes de mayo de 2022

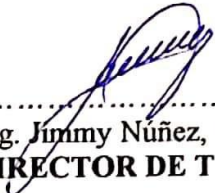
EL AUTOR:

(Firma).....

Cornejo Lucero Osmar Josué

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado por el Sr. Cornejo Lucero Osmar Josué, con cédula de ciudadanía 100420060-4, bajo mi supervisión.



.....
Ing. Jimmy Núñez, MSc.
DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

A mis padres y hermano quienes fueron mi apoyo durante todo este tiempo, y que a pesar de las dificultades siempre han sabido ayudarme con sus consejos y palabras de aliento, gracias a ustedes he logrado cumplir una de mis metas y siempre han sido y serán una fuente de inspiración para seguir adelante.

Osmar. C

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios por todas las veces que he podido ser testigo de su ayuda en mi vida y por qué siempre pude contar con su apoyo incondicional durante todo el proceso de formación académica, entregándole este triunfo para su honra y gloria.

Quiero agradecer a mis padres y hermano por todas las veces que supieron darme ánimos y ayuda oportuna, además de ser la base para que yo pueda culminar en este día con mis estudios universitarios.

De la misma manera estoy inmensamente agradecido por todo el conocimiento compartido por los docentes de la Carrera de Agroindustrias y de manera especial, quiero agradecer al Ing. Jimmy Núñez y a mis asesores Ing. Rosario Espín e Ing. José M. País Chanfrau PhD, quienes me han guiado con su paciencia, y su rectitud como docentes.

Y para culminar quiero agradecer a mis amigos que me ayudaron en innumerables ocasiones, muchas gracias.

Osmar. C

Contenido

INDICE DE TABLAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE ECACIONES	ii
Resumen	iii
Summary	iv
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4 HIPÓTESIS	3
1.4.1 HIPÓTESIS NULA (HO)	3
1.4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA (HA).....	3
CAPITULO II	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 EL CACAO	4
2.1.1 MUCILAGO DE CACAO.....	5
2.1.2 MICROORGANISMOS DEL MUCILAGO DE CACAO.....	6
2.2 BIOPOLÍMEROS	8
2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS PHAS.....	9
2.3.1 ESTRUCTURA	10
2.3.2 ANTECEDENTES.....	11
2.3.3 CLASIFICACIÓN	12

2.3.4	OBTENCIÓN Y BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) 13	
2.3.5	ORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAS	15
2.3.6	SUSTRATOS DE CARBONO UTILIZADOS	17
2.3.7	SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	19
2.3.8	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PHAS.....	20
2.3.9	MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN	21
2.4	MÉTODOS DE SIEMBRA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	22
2.4.1	SIEMBRA DE MICROORGANISMOS	23
2.4.2	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	23
2.4.3	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	23
CAPITULO III		27
MATERIALES Y MÉTODOS		27
3.1	CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	27
3.1.1	LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	27
3.2	MATERIALES Y EQUIPOS	27
3.2.1	MATERIA PRIMA E INSUMOS	27
3.3	MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO	28
3.4	MÉTODOS.....	28
3.4.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL MUCILAGO DE CACAO.....	28
3.4.2	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL MUCILAGO DE CACAO CON POTENCIAL PARA ACUMULACIÓN DE PHAS	30
3.5	EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA (TEMPERATURA, PH, Y CONCENTRACIÓN DE SULFATO DE	

AMONIO) PARA ALCANZAR LA MAXIMIZACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS.....	32
3.5.1 MÉTODO DEL EXPERIMENTO.....	33
3.5.2 FACTORES EN ESTUDIO.....	33
3.5.3 TRATAMIENTOS.....	33
3.6 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO	35
3.6.1 DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESO	37
CAPÍTULO IV	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL MUCILAGO DE CACAO.....	40
4.2 ASILAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL MUCILAGO DE CACAO CON POTENCIAL PARA ACUMULACIÓN DE PHAS41	
4.3 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA (TEMPERATURA, PH, Y CONCENTRACIÓN DE SULFATO DE AMONIO) PARA ALCANZAR LA MAXIMIZACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS.....	45
4.4 MAXIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS).....	47
CAPÍTULO V	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1 CONCLUSIONES.....	52
5.2 RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del cacao	4
Tabla 2 Composición química del mucilago de cacao.....	5
Tabla 3 Azúcares del mucilago de cacao	6
Tabla 4 Bacterias que acumulan PHAs en su entorno natural	15
Tabla 5 Sustratos de carbono más utilizados para la biosíntesis de PHA.....	17
Tabla 6 Términos para preparaciones teñidas	24
Tabla 7 Método general para tinción de Gram.....	25
Tabla 8 Características morfológicas	26
Tabla 9 Características Climatológicas.....	27
Tabla 10 Análisis físico-químicos del mucilago de cacao	28
Tabla 11 Preparación de muestras método de la glucosa oxidasa peroxidasa	30
Tabla 12 Factores en estudio.....	33
Tabla 13 Descripción de tratamientos.....	35
Tabla 14 Resultados de la caracterización del mucilago de cacao.....	40
Tabla 15 Análisis de Varianza para la producción de PHAs	47
Tabla 16 Condiciones de maximización sugeridas	49
Tabla 17 Resultados de la optimización de la producción de polihidroxialcanoatos	49
Tabla 18 Comparación de la producción de PHA con otros estudios similares	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de los biopolímeros.....	9
Figura 2 Gránulos de polihidroxicanoatos	10
Figura 3 Estructura general de los polihidroxicanoatos	11
Figura 4 Clasificación de PHAs según sus unidades monoméricas.....	12
Figura 5 Ruta de biosíntesis de P3HB	13
Figura 6 Ciclo de Krebs	14
Figura 7 Sistemas de cultivo	20
Figura 8 Representación gráfica de los tratamientos	34
Figura 9 Diagrama del manejo específico del experimento.....	36
Figura 10 Microorganismos identificados de residuos del cacao Tinción de Gram ..	42
Figura 11 Microorganismos identificados tinción con Sudan Negro.....	44
Figura 12 Espectro de barrido	45
Figura 13 Cinética de producción de polihidroxicanoatos.....	46
Figura 14 Superficie de respuesta estimada y gráfico de contorno.....	48

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (1) Método de la glucosa oxidasa peroxidasa	30
Ecuación (2) Ecuación de maximización.....	49

Resumen

El sector cacaotero ecuatoriano es uno de los más importantes exportadores de cacao existentes, que registra altos volúmenes de producción, sin embargo, en esta industria solo se aprovecha aproximadamente el 10% del total del fruto, que es la semilla y el restante, como el mucilago de cacao se desecha directamente sobre los suelos de las cacaoteras y este en especial es un residuo que posee componentes de alto valor para su aprovechamiento. Por otro parte, estudios demuestran que existe gran interés por utilizar subproductos de la agroindustria como sustratos para la producción de plásticos biodegradables no contaminantes y de bajo costo, como los polihidroxicanoatos (PHAs), por tal motivo el objetivo de la presente investigación es evaluar el uso de este residuo de la industria del cacao como sustrato para la obtención de este biopolímero mediante fermentación sumergida y las mejores condiciones que permitan optimizar el bioproceso. Para el desarrollo de la investigación se aislaron bacterias productoras de PHAs de la cascara del cacao y con el fin de encontrar las mejores condiciones del proceso se controlaron los parámetros de temperatura (25 °C– 40 °C), pH (6.5 – 8.5) y concentración de fuente de nitrógeno (NH₄)₂SO₄ (0.0 g/l – 1.2 g/l), para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico *Design Expert 13*. Teniendo como resultado que las condiciones que permiten maximizar la acumulación del polímero intracelular con el microorganismo *Bacillus* Gram negativo se dan a los 40 °C con un pH controlado de 7.3 y ausencia de concentración de fuente de nitrógeno. Concluyendo que la concentración del polímero obtenida se acerca a valores reportados en la bibliografía, además de que permite validar el modelo de optimización sugerido en el programa estadístico, y se demostró que el mucilago de cacao tiene gran potencial para ser usado como sustrato en los procesos de obtención de polihidroxicanoatos.

Summary

The Ecuadorian cocoa sector is one of the most important exporters of cocoa, with high production volumes; however, in this industry only approximately 10% of the total fruit is used, which is the seed, and the rest, such as cocoa mucilage, is discarded directly on the cocoa farm soils, and this is a waste that has components of high value for its use. On the other hand, studies show that there is great interest in using agroindustrial by-products as substrates for the production of non-polluting and low-cost biodegradable plastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). For this reason, the objective of this research is to evaluate the use of this residue from the cocoa industry as a substrate to obtain this biopolymer by submerged fermentation and the best conditions to optimize the bioprocess. For the development of the research, PHAs producing bacteria were isolated from cocoa husk and in order to find the best process conditions, the parameters of temperature (25 °C- 40 °C), pH (6.5 - 8.5) and concentration of nitrogen source $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.0 g/l - 1.2 g/l), for the analysis of the results the statistical program Design Expert 13 was used. Having as a result that the conditions that allow maximizing the accumulation of the intracellular polymer with the microorganism *Bacillus* Gram negative occur at 40 °C with a controlled pH of 7.3 and absence of nitrogen source concentration. Concluding that the concentration of the polymer obtained is close to values reported in the literature, in addition to allowing validation of the optimization model suggested in the statistical program, and it was demonstrated that cocoa mucilage has great potential to be used as a substrate in the processes of obtaining polyhydroxyalkanoates.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

El incremento constante por el consumo de alimentos procesados a lo largo del tiempo ha sido realmente significativo, ya que esto ha llevado a que la agroindustria genere métodos cada vez más complejos y diversos para la obtención de nuevos productos alimenticios, aumentando a su vez la cantidad de residuos, provocando en la mayoría de los casos problemas relacionados directamente con la gestión ambiental, debido, principalmente al desconocimiento de alternativas tecnológicas que permitan aprovechar los residuos de una manera efectiva.

Entre los sectores Agroindustriales con gran importancia por la cantidad de materia prima que utilizan, está el sector cacaotero, cuyo fin es el de producir y comercializar granos o pasta cacao y en algunos casos llevar a cabo toda la cadena productiva hasta llegar a la comercialización de chocolate y sus derivados. Este sector resulta ser uno más dentro la lista de aquellos con poco índice de innovación en cuanto a la reutilización de residuos, tales como la cascara del fruto y el mucilago o pulpa, siendo este último el de mayor interés por sus componentes.

El mucilago de cacao se presenta como exudado durante la fermentación de las semillas del fruto, llegándose a obtener cerca de 70 litros de mucilago por cada tonelada de cacao, el cual es desechado directamente sobre los suelos de las cacaoteras lo que puede llegar a causar problemas de contaminación de agua, aire, degradación de suelos y generación de fuentes de contaminación biológica, y esto se vuelve un problema al conocer que solo se aprovecha aproximadamente el 10% del fruto que es la semilla y “a nivel mundial se exporta 3.3 millones de toneladas de cacao en grano”(Durango et al., 2019), lo que resulta en una gran fuente de residuo y contaminación si no es tratado adecuadamente.

El sector cacaotero ecuatoriano, a pesar de ser uno de los más importantes exportadores de cacao para los países asiáticos, europeos y de norte América, no ha sabido aprovechar en su totalidad este residuo, las cantidades alcanzadas de producción nacional son considerablemente altas por lo que la obtención de mucilago residual también lo es, un ejemplo de esto es la producción nacional de cacao reportada para el

año 2020 que fue de 360.000 Tm, y en base a esto se conoce que durante ese periodo se obtuvieron aproximadamente 25.200 m³ de mucilago exudado, que aún los programas destinados a su reutilización y aprovechamiento no han sido suficientes (ANECACAO, 2020).

1.2 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha buscado reemplazar a los plásticos derivados del petróleo y en contraste, producir bioplásticos a partir de fuentes renovables como los polihidroxicanoatos (PHAs), sin embargo su producción actual resulta ser costosa llegando a alcanzar hasta el 50% del costo de producción en base a la materia prima utilizada destinada a ser la fuente de carbono, por tal motivo, existe gran interés por parte de los productores en utilizar subproductos de la agroindustria como sustratos para la producción de plásticos biodegradables no contaminantes y de bajo costo, frente a los problemas derivados con la acumulación excesiva de residuos plásticos, por lo que es de mucha importancia realizar estudios que permitan aplicar nuevas alternativas de aprovechamiento para distintos tipos de residuos agroindustriales y generar nuevos subproductos.

En el presente trabajo se evaluó el uso de mucilago de cacao como sustrato para el crecimiento bacteriano donde se obtuvo polihidroxicanoatos mediante fermentación sumergida.

Los microorganismos seleccionados para tal fin fueron las bacterias nativas del fruto de cacao, previamente identificadas y mediante el control de las condiciones en el proceso de fermentación, se aprovecha el mucilago como fuente de carbono dentro de la biosíntesis de PHAs para reducir las cantidades del residuo desechado, empleándolo en la obtención de materia prima para la producción de plástico biodegradable y aportar así en la disminución del impacto ambiental.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de mucilago de cacao, como fuente de carbono para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs).

1.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el sustrato de mucilago de cacao.
- Aislar cepas de bacterias productoras de PHAs del mucilago de cacao.
- Establecer las condiciones de fermentación sumergida (temperatura, pH, y concentración de nitrógeno) para alcanzar la maximización de biosíntesis de polihidroxicanoatos.

1.4 HIPÓTESIS

1.4.1 HIPÓTESIS NULA (H₀)

No se puede obtener polihidroxicanoatos (PHAs) del mucilago de cacao bajo condiciones controladas de temperatura, pH y concentración de nitrógeno.

1.4.2 Hipótesis alternativa (H_a)

Se puede obtener polihidroxicanoatos (PHAs) del mucilago de cacao bajo condiciones controladas de temperatura, pH y concentración de nitrógeno.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 EL CACAO

El cacao es un árbol nativo del trópico americano, especialmente de Mesoamérica de pequeña talla, perennifolio que en cultivos controlados tiene una altura promedio de 4 a 7 m, en estado silvestre puede llegar a medir hasta 20 m de altura. El cacao está clasificado en el género *Theobroma*, en la familia *Malvaceae* con 22 especies identificadas, ubicadas principalmente en Sudamérica y partes de Centroamérica (Ogata, 2007).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del cacao

Reino	Vegetal
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnolipsida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Familia	<i>Malvaceae</i>
Subfamilia	<i>Byttnerioideae</i>
Tribu	<i>Theobromeae</i>
Genero	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao L</i>

Fuente: (Arvelo et al, 2017)

El sistema tradicional de clasificación indica que existen tres principales tipos de cultivares, a partir de las cuales se desprenden la variedades, híbridos y clones, actualmente denominados como criollos, forasteros y trinitarios.

De acuerdo al estudio realizado por (Arvelo, González, Maroto, Delgado y Montoya, 2017) basado en lo descrito por la Organización Internacional del Cacao, se sabe que las tipologías de las variedades anteriormente mencionadas son:

- **Forastero:** Originarios de la cuenca amazónica, producidos en los cuatro continentes cacaoteros (América, África, Asia y Oceanía), el fruto es ovalado y corto, de superficie lisa y corteza gruesa con granos pequeños y aplanados.

- **Criollo:** Originarios del norte de Suramérica y Centro de América (Venezuela, Papa Nueva Guinea, Las Antillas del Caribe, Sri Lanka, Timor Oriental y Java), el fruto posee un sabor suave y aromático, este es alargado de punta pronunciada, doblada y aguda, sus granos son grandes y gruesos, obteniéndose de estos chocolates de gran calidad.
- **Trinitario:** Son generados a partir de la hibridación de las variedades criollo y forastero, originarios de Trinidad y Tobago, cuya extensión abarca Venezuela, Ecuador, México, Centro América, Camerún, Samoa, Sri Lanka, Java y Papa Nueva Guinea. La planta es robusta con frutos verdes o pigmentados, sus granos bien procesados son reconocidos por su gran calidad.

En la producción actual del cacao fino de aroma, el Ecuador participa con el 50% de la oferta mundial con la variedades de cacao Nacional y CCN-51, convirtiéndose en un productor reconocido a nivel internacional, en el año 2011 el país llegó a exportar una cifra récord de 164.705 toneladas por lo que la producción de cacao en el país es altamente sostenible y rentable.

2.1.1 Mucilago de cacao

Corresponde ser la parte fibrosa que recubre a las semillas o almendras del fruto de cacao, en términos comunes se la conoce como pulpa de cacao. El mucilago contiene carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa), ácido cítrico y pectinas, esta última provocando que tenga una apariencia viscosa (El Salous et al., 2019), lo que hace que al momento de ser extraída y separada de las semillas se presente comúnmente como una sustancia turbia.

Tabla 2

Composición química del mucilago de cacao

Componente	Base húmeda (% m/m)
Agua	79.2 – 84.2
Proteína	0.09 – 0.11
Azúcares	12.50 – 15.9
Pectinas	0.9 – 1.19
Ácido cítrico	0.77 – 1.52
Cenizas	0.40 – 0.50

Fuente: (Ortiz y Álvarez, 2015)

El mucilago forma parte de la producción de alcohol y ácido acético durante la fermentación de las almendras, sin embargo, el 100% de está, no es utilizada ya que alrededor del 5 al 7% drena como exudado, generándose cerca de 70 litros de desperdicio por cada tonelada de material mucilaginoso (Vera et al, 2014), siendo este rico en azúcares.

Tabla 3

Azúcares del mucilago de cacao

Parámetros	Variedad Nacional (% m/v)	Variedad CCN-51 (% m/v)
Azúcares totales	11.70	13.10
Azúcares reductores	11.36	7.42
Fructosa	4.45	2.62
Glucosa	6.91	4.81
Sacarosa	0.34	5.67
Lactosa	0.00	0.00

Fuente: (Zambrano, 2020)

2.1.2 Microorganismos del mucilago de cacao

El mucilago del fruto del cacao es un medio estéril, debido a la hermeticidad del mismo fruto, la pulpa es rica en glucosa, fructosa y sacarosa con un contenido total de 10–15% y un pH inicial relativamente bajo (pH 3.3 – 4.0) (Nielsen et al., 2007), presenta ser un medio con baja concentración de oxígeno lo que hace difícil el desarrollo de microorganismos. Sin embargo durante el proceso de apertura de las vainas es donde se inoculan una amplia variedad de microorganismos, procedentes de las manos de los trabajadores, contenedores para el transporte, cuchillos, superficies de vainas, entre otros (Nielsen et al., 2005).

La mayor concentración de microorganismos se da durante la fermentación real de la pulpa, el proceso requiere de una acción secuencial compleja de diferentes microorganismos, siendo las que predominan en el medio, diversas levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y finalmente *Bacillus spp*, desarrollándose en sucesión (Nielsen, 2005), el proceso fermentativo está dividido en tres fases en la cuales cada una de ellas favorece la aparición de uno de los tipos de microorganismos.

- **Primera fase fermentativa**

Se da la aparición pronta de levaduras al contacto con el medio externo, y su desarrollo se ve favorecido debido a que la pulpa fresca presenta un alto contenido de azúcar, bajo pH y limitada disponibilidad de oxígeno. La actividad principal de las levaduras es la conversión de glucosa, fructosa y sacarosa a etanol (Nielsen, 2005), pudiéndose identificar en esta primera fase entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen gradualmente hasta que solo prevalece la especie *Hanseniaspora guilliermondii*, que es la levadura predominante durante las primeras 24 horas (Wacher, 2011). El grupo de especies de levaduras más frecuentemente aisladas e identificadas son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia manshurica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala* y *Kluyveromyces marxianus* (Salazar y Rojas, 2017).

El metabolismo de las levaduras conduce al rápido consumo de los azúcares simples produciendo una fermentación alcohólica moderadamente exotérmica con una reacción de 93.3 kJ por molécula de glucosa consumida, conduciendo a un aumento moderado en la temperatura de la masa que va desde 35 a 40 ° C (Lagunes et al., 2007), las levaduras además provoca el agotamiento rápido del oxígeno y también promueven en una etapa seguida una segunda aeración, por lo que su actividad metabólica es clave para el desarrollo de los siguientes tipos de bacterias ligados al proceso fermentativo del mucilago.

- **Segunda fase fermentativa**

Aquí se desarrollan las bacterias ácido lácticas, su aparición es secuencial a las levaduras, esto es debido a la capacidad que poseen las levaduras de consumir rápidamente el oxígeno disponible en la masa de mucilago, logrando crear las condiciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de bacterias ácido lácticas, cuya función principal es la de fermentar los carbohidratos residuales y continuar con el consumo de ácido cítrico (Salazar y Rojas, 2017), contribuyendo a la disminución de la acidez del medio.

Durante la fermentación del mucilago las bacterias ácido lácticas que se han logrado identificar son principalmente del tipo *Lactobacillus* encontrándose entre ellas a *L. collonides*, *L. fermentum*, *L. mali* y *L. Plantarum* (El Salous, 2019), siendo las del tipo

fermentum y Plantarum las que mejor se han logrado adaptar al sustrato por lo que son las predominantes.

- **Tercera fase fermentativa**

Se da la proliferación de bacterias ácido acéticas, como resultado de la degradación del mucílago debido a la descomposición de los polisacáridos de las células del tejido mucilaginoso por la acción pectinolítica de las levaduras, permitiendo una segunda aireación del medio (Lagunes et al., 2007), y la disminución de las condiciones ácidas por el consumo del ácido cítrico producido por levaduras, favoreciendo al desarrollo de bacterias ácido acéticas (El Salous, 2019), conformándose así la tercera fase de la fermentación del mucílago que promueve la oxidación del etanol.

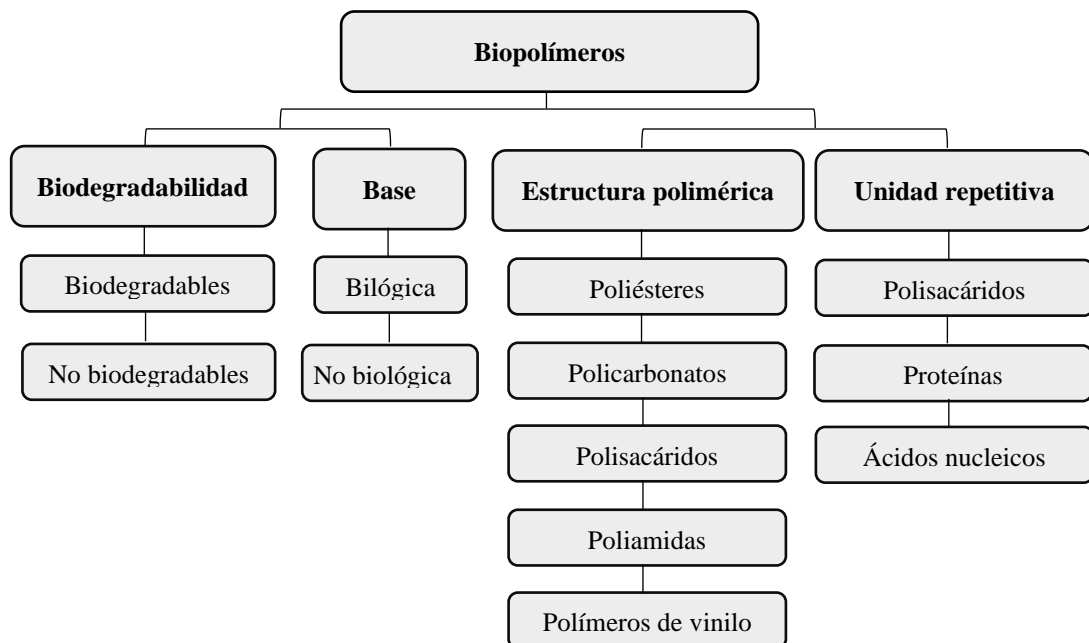
La oxidación del etanol a ácido acético es una reacción altamente exotérmica, produciendo cerca de 496 kJ por molécula de etanol convertido en ácido acético, que eleva la temperatura a 50 °C (Lagunes, 2007), estas reacciones en conjunto explican los incrementos de temperatura de la masa de mucílago durante la fermentación.

2.2 BIOPOLÍMEROS

Los biopolímeros tienen una marcada importancia dentro de los avances para el cuidado del medio ambiente ya que muchos de ellos constituyen ser un material altamente aprovechable dentro de la industria del plástico, y en particular son una interesante alternativa debido a que son producidas en su gran mayoría exclusivamente por sistemas biológicos, de modo que los biopolímeros son macromoléculas que se sintetizan en animales, plantas e incluso en una gran variedad de microorganismos, como ejemplo de esto tenemos al colágeno en animales o la quitina en plantas, además de los de origen microbiano como el ácido poliláctico y los polihidroxicanoatos que han demostrado tener una amplia gama de aplicaciones, al mismo tiempo este grupo de macromoléculas pueden ser sintetizados químicamente siempre y cuando sus unidades poliméricas cumplan con el requerimiento de derivar de sistemas biológicos, como los aminoácidos o azúcares (Tharanathan, 2003).

Figura 1

Clasificación de los biopolímeros



Fuente: (Molina y Flórez, 2020)

2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS PHAs

Son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que comprenden a una clase bastante compleja de biopolioxoesteres, sintetizados por la mayoría de géneros de eubacterias y miembros de la familia Halobacteriaceae de archaea (Rehm y Bernd, 2003), además de un cierto grupo de microalgas.

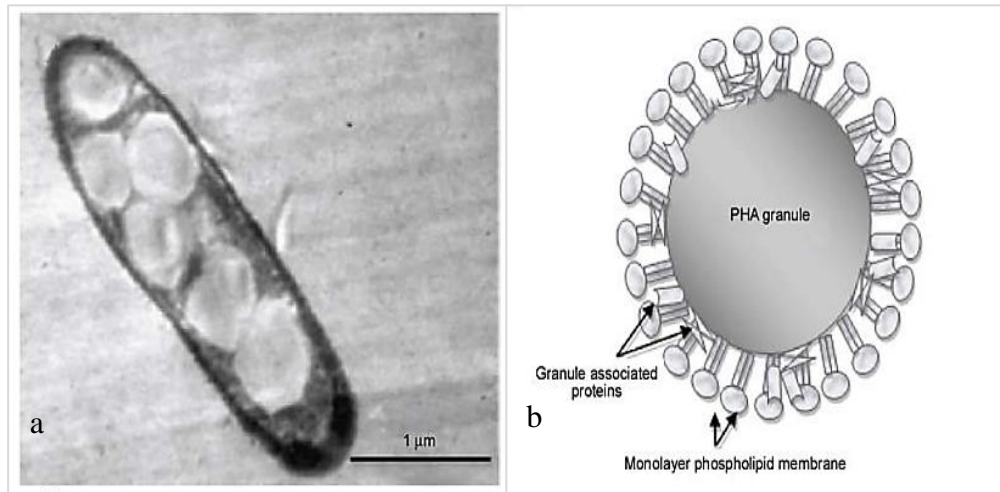
El PHAs se sintetiza mediante la polimerización enzimática intracelular, acumulándose como material de reserva, en forma de gránulos en el citoplasma microbiano (figura 2), y una vez extraídos y purificados presentan propiedades físicas similares a los plásticos derivados del petróleo (González et al, 2013).

Actualmente los PHAs son potenciales sustitutos de los polímeros de origen petroquímico, su producción es atractiva para las industrias por que la mayor ventaja que presentan tener estos compuestos es que sus propiedades son similares a los plásticos convencionales, además de poseer una completa biodegradabilidad, también se los prefiere porque el sustrato utilizado para su producción no es de origen petroquímico, si no que en su gran mayoría los sustratos utilizados comprenden

desechos agroindustriales, que constituyen ser materiales de bajo costo (Lemos y Córdoba , 2015).

Figura 2

Gránulos de polihidroxicanoatos



Nota. La figura (a) y (b) muestran gránulos acumulados en el citoplasma celular y la representación del granulo de PHA, respectivamente. Fuente: (Kunasundari, 2011).

Los polihidroxicanoatos son formados y acumulados frente a un déficit de elementos como nitrógeno fosforo, magnesio u otros, y abundancia en el medio de una fuente de carbono, de modo que el proceso de producción resulta ser un método de supervivencia para la bacterias productoras y degradadoras de PHAs, los gránulos poseen un tamaño que oscila entre los 0.2 y 0.5 μm, y se encuentran entre 8 a 10 gránulos por célula, con un peso molecular de 2×10^5 a 3×10^6 Da (Yadira y Ria, 2010).

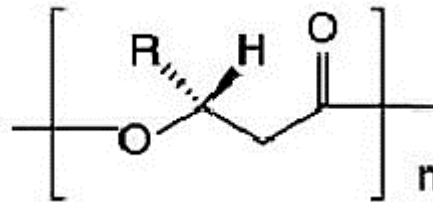
2.3.1 Estructura

Los PHA contiene la unidad monomérica (R) -3HA, estos se encuentran en la posición R debido a la estereoespecificidad de la enzima polimerizaste, la estructura general de estos compuestos se muestra en la figura 4, como ejemplo de su composición se tiene que, si el grupo R es CH₃, el polímero resultante se llama polihidroxitirato o ácido

polihidroxibutírico y, si R es igual C₃H₇, el polímero se llama polihidroxicanoato y así sucesivamente (Raza, Abid y Banat, 2018).

Figura 3

Estructura general de los polihidroxicanoatos



Fuente: (Andler y Díaz, 2013)

2.3.2 Antecedentes

Los polihidroxicanoatos fueron descubiertos por primera vez en 1926 como componente de la bacteria *Bacillus megaterium* (Ojumu, 2014), Maurice Lemoigne del Instituto Pasteur, observó inclusiones granulosas en el líquido citoplásmico, que poseían un carácter de insolubilidad frente al éter, como es característico de los lípidos, mediante microscopia y una serie de análisis químicos, llegó a la conclusión de que se trataba de un poliéster, cuya fórmula molecular era (C₄H₆O₂)_n en su forma pura (González et al., 2013), sin embargo en el año de 1901 se menciona en la literatura microbiológica por primera vez a uno de los polímeros más comunes de la familia de los polihidroxicanoatos, el poli(β-hidroxibuti-rato) (PHB). Por medio de los trabajos realizados por Lemoigne se logró conocer por primera vez la composición de los PHAs, el proceso de obtención realizado por las células, la determinación del peso molecular y su temperatura de fusión, sus aportes fueron de gran importancia obteniéndose modelos de cuantificación del polímero y los primeros estudios de la variedad de bacterias capaces de producirlo (Kunasundari, 2011).

Varios estudios se susitaron a partir de los de Lemoigne y sus colaboradores, a pesar de esto el descubrimiento de este tipo de nuevos polímeros paso inadvertido por mucho tiempo para la comunidad científica, hasta finales de la década de los 50 en donde la importancia de su producción comenzó a generar interés, cuando varios laboratorios del Reino Unido y los Estados Unidos confirmaron la naturaleza de este

polímero, iniciando en primera instancia la producción de PHB por Baptist y Werber para su posible evaluación comercial, sus innovaciones permitieron fabricar un laminado plástico a partir del producto de fermentación (García, 2014).

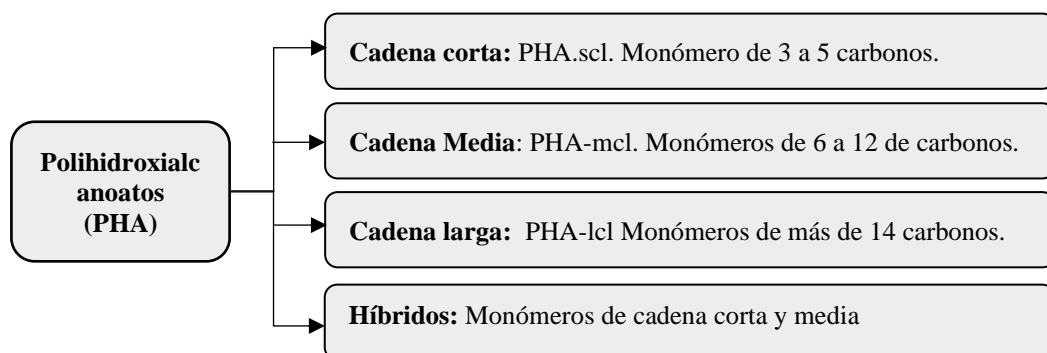
2.3.3 Clasificación

Se han identificado más de 150 diferentes tipos de ácidos hidroxialcanoicos constituyentes de PHAs (Zhang et al, 2006), de acuerdo a los estudios realizados se ha demostrado que existen tres tipos de clases distintas de polihidroxialcanoatos, clasificados en base a la naturaleza de sus unidades monoméricas, que según la longitud de la cadena de carbono, se pueden identificar tres grupos principales: PHAs de cadena corta, media e híbridos (Carrasco et al., 2004), además existen PHAs de cadena larga, sin embargo estos son poco comunes y poco estudiados.

Entre los principales PHA de cadena corta se tiene al poli (3-hidroxi butirato), P (3HB) y al poli (4-hidroxi butirato), P (4HB), mientras que para los representantes de los PHA de cadena media se encuentran al poli(3-hidroxi hexanoato), P(3HHx) y poli (3-hidroxi octanoato) , P (3HO) (Rai et al, 2011), en términos de propiedades físicas se sabe que los mcl-PHA tiene valores de Tm que van desde 40 a 60 °C y un tg de entre 50 y 25 °C por lo que son considerados como constituyentes de los polímeros termo elastómeros y gomas, mientras que los scl-PHA cuentan con un Tm de 180 °C y un Tg de 4 °C, de modo que son altamente cristalinos y resistentes, teniendo propiedades cercanas a la de los plásticos convencionales (Suriyamongkol et al., 2007).

Figura 4

Clasificación de PHAs según sus unidades monoméricas



Fuente: (González et al., 2013; Kunasundari, 2011).

2.3.4 Obtención y biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHAs)

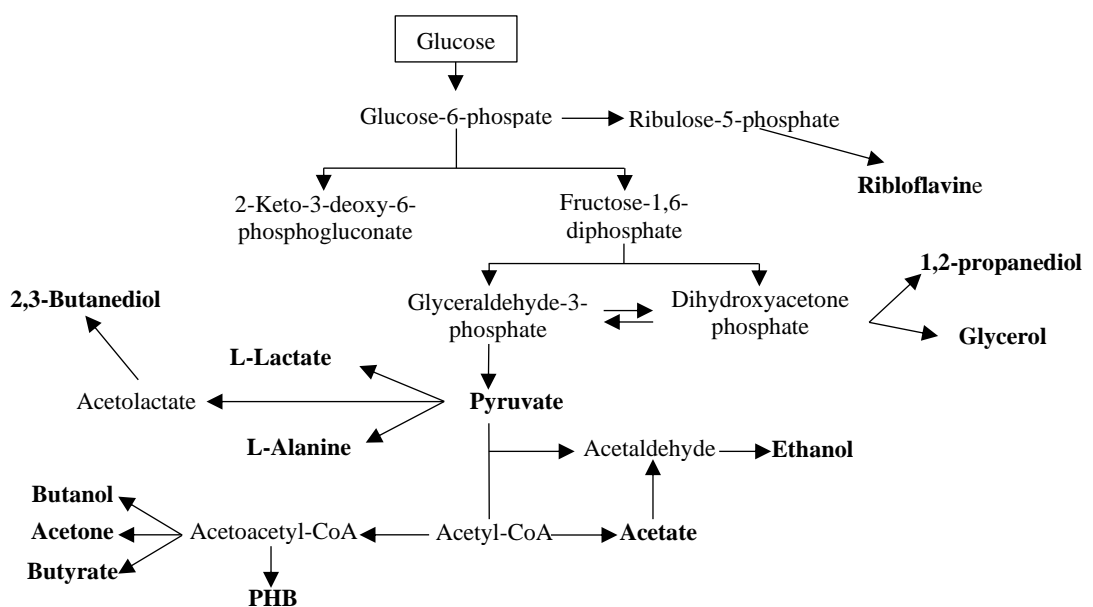
Los PHAs son sintetizados como resultado de la acción enzimática intracelular de algunas bacterias, inducida bajo una serie de condiciones desfavorables para su desarrollo en el medio y un exceso de fuente carbono (Lemos y Córdoba, 2015), los organismos capaces de sintetizarlo también tienen la capacidad de degradarlo, por lo que este actúa como compuesto de almacén que puede ser ocupado cuando las células bacterianas se encuentran en condiciones de estrés.

Para su producción se han utilizado en su gran mayoría aislamientos naturales y bacterias recombinantes que son capaces de utilizar varias fuentes de carbono, sin embargo, su capacidad para despolimerizar y degradar los PHAs, hacen que la recuperación del mismo sea complicada (Chee et al, 2010).

Los polihidroxicanoatos en un principio resultan ser unidades monoméricas que por acción enzimática dan lugar a la formación del poliéster final, el PHA más estudiado es el P3HB de modo que la ruta biosintética de este a partir de carbohidratos ha sido descrita a detalle.

Figura 5

Ruta de biosíntesis de P3HB



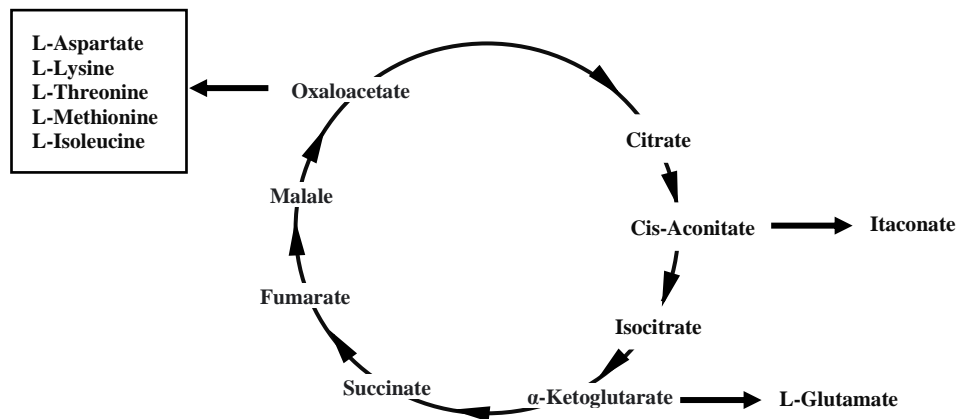
Fuente: (Scheper, Nielsen, Schügerl, Tsao, y Zhong, 2004)

Las enzimas encargadas de la polimerización de los monómeros de ácido PHA son las polimerasas o PHA sintetasa que actúan sobre los (R)-HA-CoA solubles para sintetizar el polímero insoluble, con la liberación de una molécula de CoA (coenzima) (Fernández, 2012).

Existen tres principales sustratos de los cuales las bacterias productoras se valen para la síntesis de PHAs, siendo estos la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos individualmente, que por medio del catabolismo pasan a ser acetil coenzima o ACETIL-CoA, que como propósito original tiene el de ceder la energía almacenada en las moléculas para que la célula bacteriana pueda utilizarla, mediante el conocido ciclo de Krebs. Por lo tanto, en un medio donde prevalezca la glucosa, esta representaría ser una fuente neta de carbono por lo que la célula la aprovecharía convirtiéndola por medio del glucolisis a piruvatos mediante la acción de la enzima piruvato deshidrogenasa, que luego pasarán a conformar la Acetil-CoA para que de este modo se puedan liberar CO₂ y electrones para la producción de ATP (González et al., 2013).

Figura 6

Ciclo de Krebs



Fuente: (Scheper et al., 2004)

Sin embargo, las células identificadas como productoras de PHAs, utilizan el ACETIL-CoA como precursor del Ácido polihidroxicanoico con el mismo fin, de utilizar su energía contenida, solo que, en este caso, polimerizan los monómeros para generar una fuente de reserva de carbono y energía, frente a un estímulo que en muchos de los casos resulta ser la deficiencia de uno o varios componentes biogénicos del medio (Scheper et al., 2004).

Las limitaciones que provocan el estrés y la consecuente acumulación intracelular de los polihidroxicanoatos resultan ser determinadas por el tipo de medio de desarrollo y el microorganismo implicado, como por ejemplo en la síntesis de P3HB realizado por la bacteria *A. beijerinckii*, el estímulo del medio en el cual la bacteria acumula P3HB es en condiciones de limitación de oxígeno a partir de glucosa (Rehm y Bernd, 2003), por lo tanto la clave de la regulación de la producción de PHAs está determinada por el destino de la ACETIL-CoA, ya que puede ser oxidada vía el ciclo Krebs o puede servir como sustrato para la síntesis de PHAs.

2.3.5 Organismos productores de PHAs

La producción de PHAs está influenciada por la deficiencia de uno o varios elementos biogénicos que promueven la biosíntesis intracelular, a partir de esto se ha llegado a identificarse hasta 90 géneros de especies microbianas que acumulan estos poliésteres (Sasidharan y Bhat, 2014), y a partir de los estudios de Maurice Lemoigne se han reportado más de 300 bacterias capaces de acumular PHAs en su entorno natural. En la tabla 4 se muestran algunos de las principales bacterias acumuladoras de PHAs:

Tabla 4

Bacterias que acumulan PHAs en su entorno natural

Género	Especie	
<i>Bacillos</i>	<i>B. megaterio</i>	<i>Bacillos sp.</i>
	<i>B. megaterio</i> ATCC6748	<i>Bacillos sp. CFR 256</i>
	<i>Bacillos sp. CFR 256</i>	<i>B. cereus M5</i>
	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. firmus NII 0830</i>
	<i>B. sphaericus</i>	<i>Bacillos sp. PSI</i>
	<i>B. sphaericus</i> NCIM 5149	
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. casei</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp. USM</i>	
	<i>B. cepacia</i> IPT 048	
	<i>B. sacchari</i> IPT 101	
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> Ba21S strain	
	<i>S. thermophilus</i> ; <i>S. durans</i>	
<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas sp. KM-1 strain</i>	
	<i>Haloferax mediterranei</i>	

	<i>Halomonas hydrothermalis</i>	
	<i>H. volcanii</i>	
<i>Methylobacterium</i>	<i>Protomonas extorquens</i> sp. strain K	
	<i>M. extorquens</i>	
	<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	
<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	
<i>Chromobacterium</i>	<i>C. violaceum</i>	
<i>Pseudoaltermonas</i>	<i>Pseudoaltermonas</i> sp. SM9913	
<i>Zobellella</i>	<i>Z. denitrificans</i> MW1	
<i>Delftia</i>	<i>D. acidovorans</i> DS-1	
<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas</i> sp. EB172	
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. fredii</i>	
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	
<i>Azospirillum</i>	<i>A. brasilense</i> Sp7	
<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i> DDSS-69	
<i>Rhodobacter</i>	<i>R. sphaeroides</i> ES 16	
	<i>R. sphaeroides</i>	
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>R. palustris</i> SP5212	
	<i>R. palustris</i> KU003	
<i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> sp.	
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> 12BI	
<i>Thermus</i>	<i>T. thermophilus</i> HB8	
<i>Paracoccus</i>	<i>P. seriniphilus</i> E71	
	<i>Paracoccus</i> sp. strain E33	
<i>Azoarcus</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	
<i>Amaricoccus</i>	<i>Amaricoccus</i> sp.	
<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp.	
<i>Thauera</i>	<i>Thauera</i> sp.	
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>P. hydrogenovora</i>
	<i>P. aeruginosa</i> IFO3924	<i>P. putida</i> KT2442
	<i>P. guezenei</i> .biovar. Tikehau	<i>Pseudomonas</i> .sp. LDC-5
<i>Vibrio</i>	<i>V. natrie</i> gens	<i>Vibrio</i> sp. strain BM-1
	<i>V. harveyi</i> .	<i>Vibrio</i> sp. strain MK4
	<i>V. neries</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. chroococcum</i> H23
	<i>A. vinelandii</i> UWD	<i>A. chroococcum</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>A. latus</i>	
	<i>A. latus</i> .ATCC.29712	
	<i>Alcaligenes latus</i> DSM 1124	
<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	<i>Cupriavidus</i> .sp. K KU38
	<i>Cupriavidus</i> .sp. USMAA2-4	<i>C. necator</i> DSM 545
	<i>C. taiwanensis</i>	

Fuente: (Sasidharan y Bhat, 2014)

El grupo de bacterias existentes capaces de acumular PHAs intracelular incluyen especies del tipo Gram positivas siendo este el grupo más grande y Gram negativas, de las cuales destacan *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*, además de incluir una cepa de *Escherichia coli* recombinante que contiene el operón de la biosíntesis de PHAs de *C. necator* (Sánchez, Marín, Mora y Yepes, 2012).

2.3.6 Sustratos de carbono utilizados

Los microorganismos capaces de acumular PHAs intracelular pueden utilizar diversas fuentes de carbono que van desde costosos y complejos efluentes residuales (Panchal, 2016), a sustratos orgánicos como carbohidratos (glucosa, sacarosa), aceites, alcoholes, ácidos orgánicos e hidrocarburos, (Segura et al, 2007), entre las más importantes fuentes de carbono que se han utilizado y estudiado se tienen a los aceites y restos vegetales, preferidos principalmente por la reducción de costos de sustrato y el ahorro del costo de la eliminación de los mismos.

El uso de residuos vegetales utilizados como sustratos azucareros resultan ser una buena opción al momento de elegir una fuente de carbono para la biosíntesis de PHA, en base a estudios previos realizados, se ha obtenido que, mediante el uso de melaza de caña de azúcar, un representante claro de sustrato azucarero, los valores de concentración de PHA obtenidos fueron de $(1.69 \pm 0.02 \text{ g/l})$ a las 36 h de fermentación (Salazar et al., 2014).

En la tabla 5 se muestran algunos de los sustratos utilizados para la producción de PHA y el rendimiento obtenido:

Tabla 5

Sustratos de carbono más utilizados para la biosíntesis de PHA

Microorganismo empleado	Tipo de PHA	Sustrato	Contenido de PHA (%)
<i>Alcaligenes latus</i> <i>DSM 1124</i>	P(3HB)	Residuos de soya, residuos de malta	33.71
<i>Bacillus megaterium</i>	P(3HB)	Melaza de remolacha, jarabe de dátiles	~50 22 - 70

<i>Burkholderia sp. USM (JCM 15050)</i>	P(3HB) MCL- PHA	Derivados del aceite de palma, ácidos grasos, Glicerol	79 - 88
<i>Comamonas testosteroni</i>		Aceite de ricino, aceite de coco, aceite de mostaza, aceite de semilla de algodón, aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo	
<i>Cupriavidus necátor</i>	P(3HB)	Hidrolizados de bagazo	54
<i>Cupriavidus necator HI6</i>	P(3HB- co3HV)	Aceite de almendra de palma crudo, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de almendra de palma, cocinar aceite, oleína de palma, aceite de palma crudo, coco aceite + propionato de sodio	65 - 90
<i>Cupriavidus necator DSM 545</i>	P(3HB)	Residuos de glicerol	50
<i>Recombinant Cupriavidus necátor</i>	P(3HB- co3HHx)	Aceite de almendra de palma, oleína de palma, palma cruda aceite, aceite ácido de palma	40 - 90
<i>Recombinant Escherichia coli</i>	P (3HB- co3HHx- co-3HO	Aceite de soja	6
<i>Pseudomonas aeruginosa IFO3924</i>	mcl PHA	Aceite de palma	39
<i>Pseudomonas aeruginosa NCIB 40045</i>	mcl PHA	Residuos de aceite para freír	29
<i>Pseudomonas guezennei biovar. tikehau</i>	mcl PHA	Aceite de coprah	63
<i>Thermus thermophilus HB8</i>	P(3HV- co3HHp- co- 3HNco- 3HU)	Suero	36

Fuente: (Chee et al., 2010)

La producción de PHAs con azúcares ha sido un proceso que se ha optimizado para lograr obtener los máximos rendimientos posibles, los sustratos azucareros están representados por aquellos en las que su composición predomina algún tipo de azúcar principalmente la glucosa y sacarosa por lo que el rendimiento obtenido después de la fermentación estará determinado por el tipo de azúcar presente, al momento de utilizar sustratos de glucosa se ha logrado determinar que los máximos valores que se pueden obtener son aproximadamente de 0.3 a 0.4 g de P(3HB) por gramo de glucosa, siendo este el valor más alto (Panchal, 2016).

En sustratos de sacarosa provenientes principalmente de materias primas como la remolacha o la caña azucarera, los valores comúnmente obtenidos son de 0.4 gPHA/g de sacarosa con un 63% de peso seco de las células (Jiang et al., 2016).

2.3.7 Sistemas de producción

Dado los estudios de producción de PHAs se conoce que la naturaleza de los mismos depende del sustrato utilizado y el microorganismo seleccionado, de las más de 300 especies de bacterias identificadas solo algunas de ellas almacenan cantidades significativas de PHAs, como se conoce para que se dé la producción de este biopolímero es necesario la limitación un nutriente esencial (Verlinden et al., 2007) siendo el agotamiento de este el que desencadena el cambio metabólico hacia la biosíntesis.

Los sistemas de cultivo propuestos para maximizar y optimizar la producción de los PHAs incluyen los conocidos cultivos continuos y cultivos por lotes alimentados, además de que la producción a gran escala del biopolímero depende directamente de estos sistemas (Koller y Braunegg, 2015).

- **Cultivos por lotes**

Este tipo de sistema es de simple operación, consta de una sola alimentación sin agregados posteriores hasta culminar con el proceso fermentativo. El sistema es considerado como uno de baja productividad ya que la concentración máxima permitida de fuente de nitrógeno y de carbono está restringida por las precondiciones fisiológicas de la cepa (Koller, 2018), admitiendo concentración de fuentes de nitrógeno de 2 – 3 g/l, fuentes de carbono de 10 – 30 g/l y para sustratos relacionados

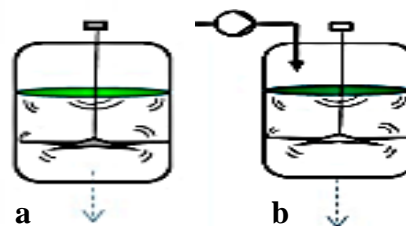
con ácidos grasos concentraciones menores a 1 g, caso contrario pueden llegar a actuar como inhibidores si se sobrepasan dichos rangos (Bona et al., 2008).

- **Cultivos por lotes alimentados**

En este al igual que los sistemas continuos el sustrato se agrega en intervalos cuando su concentración cae por debajo de un valor crítico sin eliminar el fluido de cultivo, presentándose al inicio de la fermentación en altas concentraciones los azúcares e inhibidores (Tahezadeh y Karimi, 2011), de modo que este sistema presenta tener mayores ventajas para la producción de PHAs.

Figura 7

Sistemas de cultivo



Nota. La figura (a) muestra el sistema de cultivo por lotes y (b) muestra el sistema de cultivo alimentado. Fuente: (Koller, 2018)

2.3.8 Detección y cuantificación de PHAs

Entre las principales técnicas de detección de gránulos intracelulares de PHA se tienen a las técnicas que emplean colorantes lipofílicos como el negro Sudán B, azul del Nilo A y Rojo del Nilo (Romo, Grosso, Solano, y Castaño, 2007), estos colorantes muestran una alta sensibilidad por lo gránulos intracelulares de modo que mediante microscopía se puede observar las coloraciones que permiten en primera instancia confirmar o no la presencia de polihidroxialcanoatos.

La cuantificación del contenido de PHA celular se determina generalmente mediante extracción con disolventes apropiados con el fin de separar el polímero de los restos celulares siendo este un método directo de cuantificación (Porrás, Villar, y Cubitto, 2018), además es posible realizar métodos indirectos como el ensayo del ácido crotónico, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida y espectroscopía

infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Mutiara et al., 2014). Estos métodos resultan ser apropiados para la cuantificación, sin embargo, son laboriosos y costos de modo que una alternativa para la cuantificación de polihidroxialcanoatos es la desarrollada por (Porrás et al., 2018), esta técnica permite conocer de manera rápida la presencia y el contenido del polímero intracelular, haciendo uso del colorante de tinción tradicional Sudan Negro mediante un análisis de barrido por espectrofotometría a longitudes de onda de 550 a 800 nm.

2.3.9 Métodos de separación y purificación

Durante la síntesis de polihidroxialcanoatos es importante determinar el tiempo en el cual su producción es máxima y el método de extracción a emplear, ya que de esto dependerá en gran medida el rendimiento final (Koller, Salerno, Muhr, Reiterer, y Braunegg, 2013). Los gránulos se encuentran en interior de la célula y se deben emplear métodos que permitan en lo posible extraerlo completamente, sin embargo, desde sus inicios los métodos para recuperar el biopolímero son complejos y costosos.

- **Extracción por solventes**

Corresponde a uno de los principales métodos de extracción caracterizados por su simplicidad y fácil aplicación, el método consta de tres fases, donde inicialmente se rompe la pared celular para que los gránulos de PHAs estén disponibles mediante un pretratamiento, luego se solubiliza el polímero en disolventes adecuados si se requiere de alta pureza del mismo, utilizándose cloroformo, 1-2 dicloroetano, acetona o carbonato, por último, viene la separación de los polímeros de los restos celulares que comúnmente se lo realiza por centrifugación obteniéndose dos partes perfectamente identificables (Raza, Abid y Banat, 2018).

- **Método de flotación**

Su principio básico corresponde a una extracción por solventes, sin embargo, este permite tener aun mayor pureza llegando a alcanzar hasta el 98% de pureza con una eficiencia de recuperación del 85%, el método consiste en mezclar a las células con cloroformo a 30 °C durante 72 h y un reposo de 24 h hasta obtener la auto flotación de los desechos a temperatura ambiente (Raza, Abid y Banat, 2018).

- **Tratamiento con agentes surfactantes**

Este método permite la disponibilidad del granulo de PHA, y ha sido ampliamente utilizado para su extracción y purificación, a bajas concentraciones estas moléculas se insertan en la bicapa lipídica de la membrana celular, y mientras esta concentración asciende se produce la ruptura de la membrana celular, han sido utilizados para este propósito dodecil sulfato de sodio y el Triton X-100 (Ortega et al., 2014).

- **Método de digestión**

Es una alternativa a los métodos que emplean solvente como principio de aplicación, este método implica la digestión química o enzimática de la biomasa que tiene como beneficio el de no afectar durante el proceso a los gránulos de PHAs obtenidos, en el método químico, típicamente se aplican una mezcla de hipoclorito de sodio y tensoactivos para facilitar la recuperación de PHAs de la célula, sin embargo solo utilizar el hipoclorito de sodio puede conducir a la degradación del polímero hasta un 50%. En la digestión enzimática se realizan muchos pasos que consisten en tratamiento térmico, hidrólisis enzimática y lavado con surfactante, siendo más específico y efectivo (Raza, 2018).

2.4 MÉTODOS DE SIEMBRA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

En la naturaleza existen cientos de microorganismos que habitan una amplia variedad de medios, sin embargo, la mayoría de estos no se encuentran aislados, si no que integran poblaciones mixtas conformadas por varios tipos de células que impiden su correcto estudio individual, por lo que es necesario separarlos para poder trabajar con especies aisladas, haciéndolo posible mediante la aplicación de diferentes tipos de métodos de siembra, aislamiento e identificación de microorganismos cuyo objetivo principal es lograr obtener cepas axénicas o puras que faciliten la caracterización de los mismos.

Un cultivo puro procede de un solo tipo de célula, su crecimiento se origina en un medio solido que permitirá obtener una masa de células fácilmente visible recibiendo el nombre de colonia.

2.4.1 Siembra de microorganismos

La siembra o inoculación corresponde a la fase en donde se toma la muestra que contiene generalmente colonias mixtas de microorganismos y se la introduce artificialmente en un medio adecuado para iniciar con el cultivo microbiano a condiciones estrictamente controladas (Garibaldi et al, 2009).

Las siembras se la pueden realizar en medios líquidos, semisólidos y sólidos haciendo uso de azas, hilo, hisopos o pipetas estériles dependiendo del estado en el cual se encuentra la muestra a extraer y el medio en que se realizara la siembra, las principales técnicas de siembra empleadas son el método de siembra por inmersión, método de siembra por estría en placa y método de vertido y extensión en placa.

2.4.2 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento consiste en separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea, empleando diferentes estrategias de aislamiento e identificación de microorganismos, como las separaciones físicas mediante diluciones seriadas o siembra en medios de cultivos selectivos y diferenciales (Buritaca et al, 2017) , lo que se trata en cada uno de las estrategias es aprovechar las características de los mismo microorganismos como sus requerimientos nutricionales, sin embargo se opta comúnmente por implementar los dos métodos en simultaneo durante el aislamiento. Dentro de los métodos de siembra utilizados para el aislamiento, se pueden encontrar a la siembra por agotamiento y al aislamiento en placa mediante diluciones sucesivas, el primero consiste en un agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido con el que se consigue disminuir un elevado número de microorganismos contenidos inicialmente, mientras que el segundo método consiste en realizar diluciones seriadas de la muestra en condiciones estériles con el objetivo de sembrar cantidades conocidas de las mismas en una serie de placas Petri (Cervera, 2011).

2.4.3 Identificación de microorganismos

La identificación se realiza para determinar específicamente el tipo de microorganismo que se ha logrado aislar, comúnmente se utilizan métodos de identificación fenotípicos y genotípicos, esto en base a la dificultad de identificación que presente el

microorganismo en cuestión, sin embargo, se prefieren los métodos fenotípicos principalmente por su menor costo de inversión.

La identificación fenotípica se basa principalmente en la determinación de características observables a nivel macro y microscópico como la morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas, que permitan realizar comparaciones entre bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo (Bou et al, 2011).

- **Características microscópicas**

Son principalmente la identificación de estructuras celulares y tamaños mediante tinciones, siendo las más comunes las de azul de metileno y las de gram, sin embargo, las tinciones de gram son la primera y única herramienta que sirve para realizar un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias (Bou et al., 2011).

Los términos comúnmente utilizados para realizar la lectura por tinción se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Términos para preparaciones teñidas

Indicador	Detalle	Indicador	Detalle
Tinción	<ul style="list-style-type: none"> • Uniforme • Irregular • Unipolar • Bipolar, etc. 	Bordes laterales	<ul style="list-style-type: none"> • Abultados • Paralelos • Cóncavos • Irregulares
Forma	<ul style="list-style-type: none"> • Cocos (esféricas u ovaladas) • Bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) • Espirilos (espiral) • Cocobacilos • Filamentosos • Bacilos curvos, etc. 		
Extremos	<ul style="list-style-type: none"> • Redondeados • Puntigudos 	Disposición	<ul style="list-style-type: none"> • Parejas • Cadenas • Tétradas • Racimos, etc.
Capsula	<ul style="list-style-type: none"> • Presente o ausente 	Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Cortos • Medios • Largos

Endosporas	<ul style="list-style-type: none"> • Ovalases • Esféricas • Terminales • subterminales 	Formas irregulares	<ul style="list-style-type: none"> • Variación en forma y tamaño • Ramificados • Fusimorfes, etc.
------------	--	--------------------	--

Fuente: (Bou, Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2011)

Las tinciones de gram están basados en las características de la pared celular y en la presencia de una capa de peptidoglicano en la célula, la tinción de gram más utilizada es la que implica como colorante primario el colorante cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano, siendo así que la identificación se realiza fundamentándose en que las bacterias Gram positivas retienen con mayor fuerza el complejo al contener una gran cantidad de peptidoglicano y ausencia de una membrana celular externa, ,mientras que las Gram negativas no pueden retener el complejo por tener menos cantidad de peptidoglicano, presentándose en estas como una capa fina además de poseer una membrana celular externa (López et al., 2014).

Tabla 7

Método general para tinción de Gram

Solución	Tiempo de aplicación	Gram positivas	Gram negativas
Colorante: cristal violeta	30 s	Violeta	Violeta
Mordiente: Lugol	1 min	Violeta	Violeta
Decolorante: alcohol acetona	10-15 min	Violeta	Incolora
Colorante de contraste: safranina	1 min	Violeta	Rosada

Fuente: (Kaur y Embi, 2009)

- **Características macroscópicas**

Se basa principalmente en la identificación de las características morfológicas de las colonias, la identificación se realiza para colonias de una única especie, desarrolladas en medios específicos, de las cuales se determinan su tamaño, forma, consistencia y en algunos de los casos también su color (Bou et al., 2011).

Las características morfológicas de las colonias se obtienen después de un tiempo de incubación que generalmente es de 24 horas para la mayoría de los microorganismos, realizándose la identificación del tamaño y forma de las colonias finalizando el

periodo. La mayoría de las colonias varían desde los 0.5 mm a más grandes como las de enterobacterias

Tabla 8

Características morfológicas

Indicador	Detalle		Ejemplo m/o
Forma	<ul style="list-style-type: none"> • Circular • Puntiforme • Irregular 	<ul style="list-style-type: none"> • Filamentosa • Rizoide • Espigar 	Staphylococcus Bacillus
Borde	<ul style="list-style-type: none"> • Entero-liso • Ondulados • Sierra • Dentados 	<ul style="list-style-type: none"> • Lobular • Filamentoso • Rizado 	Característico de los bacilos largos como Bacillus anthracis (Yersinia pestis) Proteus vulgaris o Escherichia coli)
Superficie	<ul style="list-style-type: none"> • Plana • Elevada • Convexa 	<ul style="list-style-type: none"> • Pulvinado • Umbonado • Umbilicoide 	
Color	<ul style="list-style-type: none"> • Verde • Amarillo • Grisáceo 		(P. aeruginosa) (S. aureus) (N. meningitidis)
Comportamiento a la luz	<ul style="list-style-type: none"> • Brillante • Opaca 		(Streptococcus) (Staphylococcus)
Consistencia	<ul style="list-style-type: none"> • Mucoide(M): aspecto acuoso propio de bacterias encapsuladas o que forman cubiertas polisacáridos. 		Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae,
	<ul style="list-style-type: none"> • Liso(S): aspecto homogéneo, textura uniforme, característico de m/o salvajes recientemente aislados de su habitat natural. • Rugoso(R): aspecto granuloso, en general son cepas mutantes que carecen de proteínas o polisacáridos de superficie. 		Enterobacterias no virulentas

Fuente: (Kaur y Embi, 2009);(Duarte, 2000)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1 Localización del experimento

El desarrollo de la presente investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de análisis fisicoquímico y microbiológico de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la ciudadela universitaria Av. 17 de Julio 5-21 y Gral. José María Córdova, Ibarra, Imbabura, CP 100105, Ecuador.

Tabla 9

Características Climatológicas

Altitud	2256 m.s.n.m
Temperatura	21 °C
Humedad relativa promedio	73%
Latitud	0.20 Norte

Fuente: (INAMHI, 2021)

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 Materia prima e insumos

- Residuo agroindustrial (mucilago de cacao)
- Agar y caldo nutritivos
- Agua destilada
- Glucosa (grado analítico)
- NaOH concentrado
- Hipoclorito de sodio (5%)
- Solución DNS
- Reactivo GOD-Pad
- Colorantes para tinción de Gram
- Colorante para tinción con Sudan Negro, xilol y safranina.
- Cloroformo

- Agua oxigenada

3.3 Materiales y equipos de laboratorio

- **Materiales**

Autoclave, incubadora, centrifuga, microscopio, pH-metro, termómetro, balanza, analítica, espectrofotómetro UV-Vis, biorreactor de fermentación por lotes.

- **Equipos**

Material de vidrio de laboratorio, cuchillo, lienzo tamiz, algodón estéril, papel Kraft, papel filtro, papel aluminio.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL MUCILAGO DE CACAO

Para la determinación de las características físico químicas del mucilago de cacao y conocer los compuestos aprovechables en la investigación que este subproducto de la industria cacaotera ofrece, se llevaron a cabo los análisis de determinación de contenido de cenizas, pH, azúcares reductores y contenido de glucosa libre.

Tabla 10

Análisis físico-químicos del mucilago de cacao

Análisis físico químico	Método de ensayo
Cenizas	AOAC (Baker y Flatman, 2007)
pH	981.12 AOAC (2006) (Dolores, 2009)
Azúcares reductores	Método DNS (Carrera et al., 2006)
Glucosa libre	Método GOD-Pad (Bohórquez, 2016)

Fundamentos de los métodos usados

- **Cenizas**

El contenido de cenizas presentes en la muestra de mucilago se determinó siguiendo el método AOAC procedimiento general utilizado por (Baker y Flatman, 2007), para lo cual es necesario pesar una muestra de 5 a 10 g de mucilago en un crisol previamente tarado para proceder a introducirlos en la mufla y someter la muestra a carbonización a una temperatura de 550 °C por un periodo de 12 - 18 h, pasado el tiempo indicado

se esperará a que la temperatura disminuya a los 250 °C o más bajo para retirar la muestra de la mufla y transferirla rápidamente a un desecador con plato de porcelana y desecante donde se dejará enfriar para su posterior pesaje.

- **pH**

La determinación de pH se realizó mediante el método 981.12 AOAC (2005) descrito en el trabajo de (Dolores, 2009), este método consiste en medir el potencial eléctrico creado en una membrana de electrodo de vidrio, que es función de la actividad de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana, para ello es necesario el uso de un medidor automático de pH con patrones primarios de pH.

Para este trabajo se utilizó un medidor de pH modelo (Milwaukee pH55), se inicia por calibrar el equipo con soluciones tampón pH 7.00 y pH 4.01, seguido se mide 25 ml de muestra filtrada y homogenizada para posteriormente introducir el medidor de pH y realizar las lecturas.

- **Azúcares reductores**

Para la determinación de azúcares reductores se desarrolló el método descrito por (Carrera, Díaz y Bello, 2006) el cual consiste en la determinación de azúcares mediante el método de DNS, para ello fue necesario realizar previamente una curva de calibración para validar el método, el gráfico obtenido permite establecer una relación entre la concentración del azúcar presente y la absorbancia proporcional a esta concentración.

Para el método se toman 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del ácido dinitrosalicílico (DNS) y se depositan en tubos de ensayo de 10 ml, que seguido se colocan en baño maría por 5 min, se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente, se agita evitando que la solución llegue a los bordes de la tapa y se procede a realizar las lecturas a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Carrera, 2006).

Para los cálculos de la concentración de azúcares reductores se emplea la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, considerándose además el factor de dilución realizado en la muestra, utilizándose en esta investigación un factor de 500.

- **Glucosa libre**

Se determinó mediante el método de la glucosa oxidasa peroxidasa GOD-PAD desarrollado por (Bohórquez, 2016), cuyo principio está basado en que el peróxido de

hidrogeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y fenol, bajo acción catalizadora de la peroxidasa, a través de una reacción oxidativa de acoplamiento, formando una antipirilquimonomina roja cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra (BIOLABO, 2019).

Para preparar la muestra se usa la siguiente dosificación:

Tabla 11

Preparación de muestras método de la glucosa oxidasa peroxidasa

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón (s)	-	20 µL	-
Muestra	-	-	20 µL
Reactivo (A)	2 ml	2 ml	2 ml

Posterior a la preparación de la muestra se debe agitar bien e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para seguido realizar las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 500nm frente a un blanco, para los cálculos de la glucosa se empleó la siguiente ecuación:

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} * C \text{ patrón} = C \text{ muestra} \quad (1)$$

Donde:

A muestra: absorbancia de la muestra.

A patrón: absorbancia del patrón

C patrón: concentración del patrón en mg/Dl

C muestra: concentración de la muestra

3.4.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL MUCILAGO DE CACAO CON POTENCIAL PARA ACUMULACIÓN DE PHAS

Los microorganismos fueron aislados de subproductos de la industria cacaotera resultante de la obtención de semillas de cacao para la producción de chocolate y derivados, con el fin de obtener cepas de microorganismos que sean posibles candidatos para la producción PHAs.

- **Toma y preparación de muestras**

El muestreo se realizó para mazorcas de cacao pertenecientes a fincas de la parroquia de Lita-Imbabura, considerando como residuo a procesar tanto al mucilago de cacao como la cascara del mismo, para el mucilago de cacao se siguió el procedimiento desarrollado por (Vallejo et al., 2018) por lo que previo a la toma de la muestra las mazorcas de cacao se lavaron con agua clorada (100 ppm de cloro) y se enjuagaron con agua potable, se trocearon los frutos realizando un corte transversal y se separó manualmente la cáscara de las almendras, para la extracción del exudado se utilizó un lienzo de tela de algodón con el cual se logró obtener 1 litro de mucilago suficiente para tratamiento en laboratorio, tomando en cuenta que si los análisis no se realizan inmediatamente las muestras deberán ser conservadas y almacenadas a $(4 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$ para evitar proliferación microbiana por un tiempo no mayor a las 24 h.

En cuanto a la cascara del fruto se omitió el proceso de lavado y solo se limitó a separar la pulpa que contiene el cacao con el fin de conservar las características que este posee de manera natural

Las muestras recolectadas se dividieron en 5 y se dejaron fermentar durante 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente para luego de cada periodo tomar 10 ml de mucilago fermentado y realizar diluciones seriadas con agua destilada estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-6} .

- **Recuperación e identificación de microorganismos**

Para la recuperación de los microorganismos se utilizó agar nutritivo, reportado por (Buritaca et al., 2017) como un medio útil para el aislamiento de microorganismos de diferentes medios en el cual se pueden desarrollar la mayoría de bacterias y hongos existentes por lo que es apropiado para este trabajo, la recuperación de se realizó tanto para el mucilago exudado como para la cascara del fruto, ambos considerados como residuo del cacao.

La recuperación para el mucilago de cacao se realizó tomando como base el proceso descrito por (Bastidas, 2011), se tomaron 0.1 ml de la dilución 10^{-3} y 10^{-6} de las muestras correspondientes a cada uno de las horas de muestreo y se adicionó en cada una de las cajas Petri, se realizó el procedimiento por duplicado, la muestra se distribuyó por toda la extensión del medio en la caja con un asa bacteriológica y luego se incubo por un periodo de 24 a 48 h a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

En cuanto a la cascara de cacao se realizó raspados en la superficie para luego inocular sobre una caja Petri con agar nutritivo mediante un agotamiento por estría y a continuación incubar a 30 °C por 24 horas, replicando las condiciones de incubación ya descritas, pasado los periodos de incubación en los dos tipos de recuperaciones, tomando como referencia el trabajo de (Buritaca et al., 2017) por lo que se realizó la identificación microscópica de las colonias desarrolladas empleando en cada uno de los casos tinción de Gram como determinación fenotípica inicial.

- **Identificación y aislamiento de microorganismos productores de PHA**

De las colonias obtenidas durante la recuperación de microorganismos se seleccionaron colonias representativas que fueron inoculadas en 5 ml de caldo nutritivo modificado con una concentración de 10 g/l de glucosa, provocando que esta sea la concentración excedente de fuente de carbono, a una temperatura de 30 °C con agitación constante durante 24 h, según lo descrito por (Lemos y Córdoba, 2015).

Posteriormente se procedió a realizar tinciones con Sudan Negro B en base al estudio realizado por (Guzmán et al, 2017) para identificar gránulos de PHA en el interior de la célula, dando como positivo cuando exista la presencia de gránulos negros o grisáceos en el interior de las células vegetativas rosadas.

- **Confirmación de la presencia de polihidroxicanoatos en células aisladas**

Para la confirmación de la presencia de PHA intracelular se emplea el método espectrofotométrico del Sudan Negro desarrollado por (Porras, Villar, y Cubitto, 2017) que consiste en determinar la absorbancia mediante un barrido en un espectrofotómetro UV-vis a longitudes de onda de 550 a 800 nm, como resultado los espectros de células que contiene polímero generan un valor de absorbancia máximo alrededor de 660 y 680 nm.

3.5 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA (TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE SULFATO DE AMONIO) PARA ALCANZAR LA MAXIMIZACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Para el desarrollo del objetivo descrito se optó por utilizar el paquete estadístico, Design Expert en su versión 13 para desarrollar el diseño del experimento, y analizarlos datos y visualizar resultados de manera gráfica para cada experimento.

3.5.1 Método del experimento

Para la presente investigación se empleó el Método de Superficie de Respuesta (MRS) con optimización mediante un Diseño Central Compuesto (DCC) para la evaluación de tres factores en estudio, A, B y C estableciendo un rango de mínimos y máximos determinado para cada factor.

El tipo del método de superficie de respuesta seleccionado (DCC), es comúnmente aplicado para la optimización de un proceso que se ajusta a superficies de respuesta de segundo orden, para lo cual se realizaron 20 experimentos con seis repeticiones al punto central y una repetición para todos los puntos axiales, lográndose encontrar la configuración adecuada de los experimentos con la ayuda del paquete estadístico Design Expert 13, con el fin de lograr la maximización de la concentración de PHAs.

3.5.2 Factores en estudio

Los factores en estudio y los valores asignados por el programa estadístico Design Expert 13 para evaluar y maximizar la concentración de polihidroxialcanoatos se muestran en la tabla 12:

Tabla 12

Factores en estudio

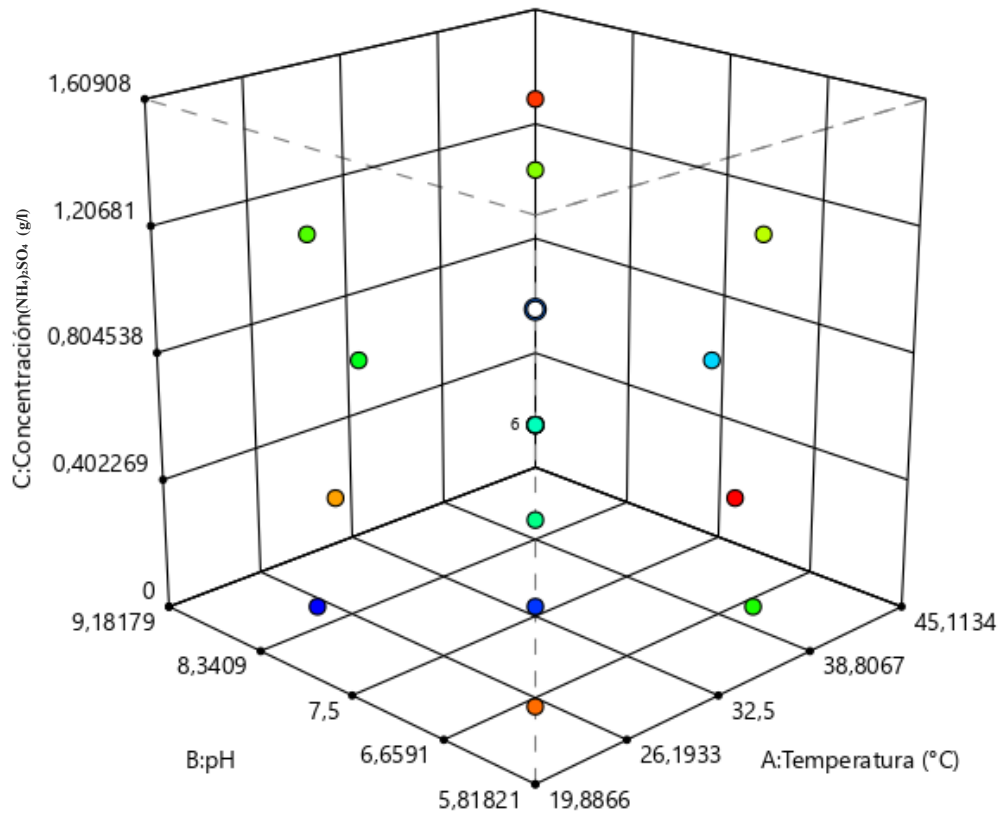
Factores	Mínimo	Máximo	Unidad
Factor A: Temperatura	25.0	40.0	°C
Factor B: pH	6.5	8.5	-
Factor C: Concentración de Sulfato de amonio	0.0	1.2	g/l

3.5.3 Tratamientos

Representación gráfica de los tratamientos proporcionado por el Software estadístico Design-Expert 13, figura 8.

Figura 8

Representación gráfica de los tratamientos



En la tabla 13 se muestran los tratamientos realizados para la maximización de la producción de PHAs

Tabla 13*Descripción de tratamientos*

T	Factor A Temperatura °C	Factor B pH	Factor C (NH ₄) ₂ SO ₄
1	25.0	6.5	0.0
2	40.0	6.5	0.0
3	25.0	8.5	0.0
4	40.0	8.5	0.0
5	25.0	6.5	1.2
6	40.0	6.5	1.2
7	25.0	8.5	1.2
8	40.0	8.5	1.2
9	19.9	7.5	0.6
10	45.0	7.5	0.6
11	32.5	5.8	0.6
12	32.5	9.2	0.6
13	32.5	7.5	0.0
14	32.5	7.5	1.6
15	32.5	7.5	0.6
16	32.5	7.5	0.6
17	32.5	7.5	0.6
18	32.5	7.5	0.6
19	32.5	7.5	0.6
20	32.5	7.5	0.6

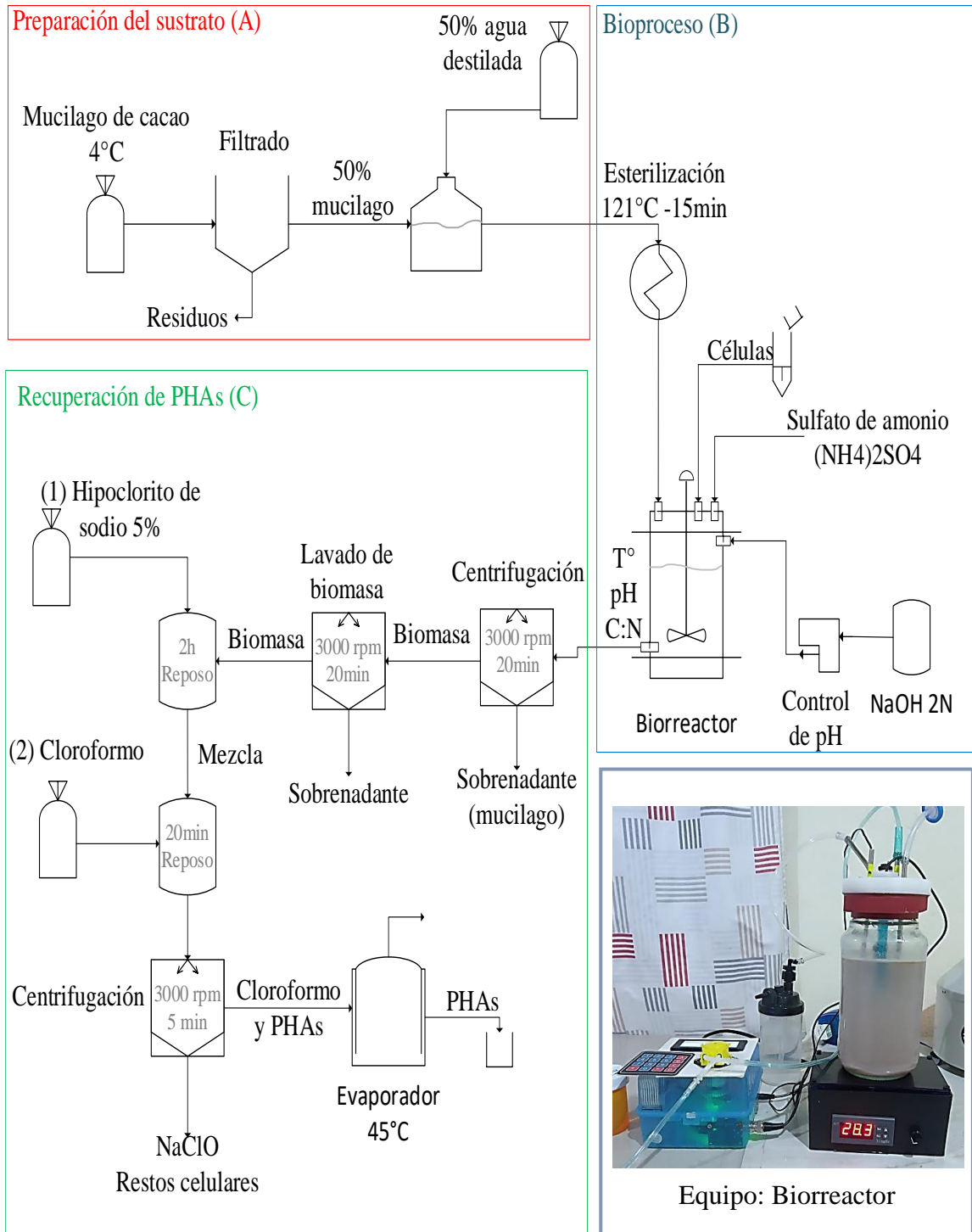
Para los tratamientos propuestos se evaluó la cantidad final obtenida de PHAs expresada en g/l con la finalidad de encontrar un modelo que maximice el proceso.

3.6 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

El proceso de obtención de polihidroxialcanoatos fue separado en tres etapas (figura 9), que contemplan: etapa de preparación del sustrato (A), bioproceso (B) y recuperación de PHAs (C), a continuación, se explica cada una de las etapas desarrolladas.

Figura 9

Diagrama del manejo específico del experimento



3.6.1 Descripción del diagrama de proceso

- **Preparación del sustrato**

Esta etapa del proceso inicia con la filtración del exudado del mucilago de cacao, para esto fue necesario emplear un lienzo de algodón de dimensiones de (10 x 10) cm, un embudo de vidrio y un contenedor final para el mucilago filtrado, esto se realizó con el fin de eliminar partículas grandes de fibra del mucilago que puedan interferir con el proceso.

La solución preparada tiene una composición de 50% mucilago de cacao y 50% de una mezcla de agua destilada y NaOH 2N, esta preparación se determinó realizarla así con el fin de facilitar el acondicionamiento del sustrato y cumplir con los parámetros de desarrollo sugeridos para fermentaciones en cultivos por lotes, descrito por (Bona et al., 2008), quien indica que en este tipo de cultivos la concentración de fuentes de carbono por glucosa no debe superar los 30 g/l, de modo que al realizar la dilución del mucilago, la concentración final que se obtiene es de 24.84 ± 1.03 g/l lo que permite un buen desarrollo de los microorganismos durante la fermentación.

- **Esterilización**

Siguiendo el método convencional el sustrato es sometido a esterilización por calor húmedo en una autoclave utilizando frascos apropiados, las condiciones de esterilización fueron: temperatura de 121 °C y un tiempo de 15 min.

- **Banco de células de trabajo**

Consiste en preparar una serie de viales que contengan una cantidad conocida de células que puedan ser utilizadas durante cada uno de los tratamientos contemplados en el diseño experimental, desarrollándose dos etapas para la obtención del banco de células, modificando la metodología descrita en el trabajo de (Acosta, 2019), aumentado la concentración de glicerol en el crioprotector.

La primera etapa trata de acumular la mayor cantidad de biomasa disponible de modo que se inoculó en caldo nutritivo, una pequeña cantidad de una de las cepas seleccionadas durante el aislamiento y se la deja en incubación a 40 °C por un periodo de 12 h, pasado este tiempo se centrifuga el cultivo obtenido a 4000 rpm por 20 min para luego eliminar el sobrenadante y conservar la biomasa acumulada.

La segunda fase consiste en adicionar 20 ml de caldo nutritivo recién preparado al precipitado de células resultante de la centrifugación, para luego homogenizar y dividir el cultivo en 20 viales de congelación con la adición de 1ml de crioprotector (glicerol al 80%) y almacenar a una temperatura de -4 °C, el aumento en la concentración del glicerol es debido a que la viabilidad de las bacterias empleadas en este estudio es nula al 30% de glicerol ya que el proceso de congelación se realizó a una velocidad menor por el uso de un congelador convencional.

- **Bioproceso**

Esta fase se desarrolla en un biorreactor de tipo tanque agitado modo discontinuo con capacidad de 1.14 litros ocupando el 80% de su capacidad para el proceso fermentativo, el biorreactor consta de un controlador automático de pH y temperatura que permite la continuidad de las condiciones fijadas durante el tiempo de producción de PHAs, además de un motor para agitación magnética.

El bioproceso consistió en la inoculación de uno de los viales por cada uno de los tratamientos, estos contienen a las células de trabajo con una concentración inicial de 10.4 mg/ml, previo a la inoculación el sustrato fue modificado para que cumpla con las condiciones iniciales del tratamiento dispuesto por el diseño experimental de superficie de respuesta, agregándose una cantidad determinada de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y un volumen de NaOH 2N considerado dentro de la dilución inicial para ajustar el pH del medio y luego seguir a su esterilización.

Con el sustrato ya esterilizado y con las condiciones establecidas, inicia el proceso de crecimiento celular y consecuente producción de polihidroxialcanoatos, los periodos de muestreo realizados fueron uno cada cuatro horas contando con 50 ml por muestra para determinar el contenido de polímero producido hasta las 36 horas.

- **Recuperación del polímero**

Para lograr determinar la cantidad producida de polihidroxialcanoatos (PHAs) durante el bioproceso se empleó el método descrito por (Raza, Abid y Banat, 2018) el cual consta de tres fases, a partir de la muestra extraída se procede a centrifugarla a 3000 rpm por 30 min para obtener un sedimento que comprende a las células con gránulos intracelulares de polihidroxialcanoatos y seguido realizar tres lavados del sedimento con agua destilada, es aquí cuando inicia la primera fase del pretratamiento del sedimento, con el uso de hipoclorito de sodio al 5%, reportado en el trabajo de

(Guzmán et al., 2017), se induce a la ruptura de la pared celular para que los gránulos de PHAs se encuentren disponibles, esta primera fase tiene un tiempo de duración de dos horas

La segunda fase consiste en solubilizar el polímero en cloroformo de modo que se adiciona 1ml de solvente en el tubo que contiene las células y el hipoclorito de sodio, se mezclan con la ayuda de una micropipeta y se deja en reposo durante 20 minutos, Pasado ese tiempo se centrifuga la mezcla a 3000 rpm durante 5 minutos y es aquí cuando se da la separación de los polímeros de los restos celulares obteniéndose dos partes perfectamente identificables.

En la última fase se separa el cloroformo con el uso de una micropipeta y se deposita en viales previamente pesados para iniciar la evaporación del solvente por medio de un evaporador a 45 °C y finalmente registrar el peso obtenido de polímero recuperado (anexo3).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL MUCILAGO DE CACAO

El mucilago de cacao fue sometido a un proceso de caracterización previo a ser utilizado dentro del bioproceso, esto se realizó para tener un punto de partida de la composición del mucilago, los valores promedios obtenidos se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

Resultados de la caracterización del mucilago de cacao

Análisis físico químico	Resultados obtenidos		Unidades
Cenizas	0.39	± 0.02	% (m/v)
pH	3.70	± 0.05	-
A. reductores	12.20	± 0.72	% (m/v)
Glucosa libre	4.97	± 0.21	% (m/v)

Nota. $\bar{x} \pm$ desviación estándar

- **Cenizas**

La cantidad de cenizas presentes en el mucilago de cacao es de $0.39 \pm 0.02\%$, lo que se acerca a lo reportado por (Ortiz y Álvarez, 2015) quienes determinaron que el contenido promedio de cenizas en el mucilago de cacao oscila entre 0.40 – 0.50%, esta diferencia de 0.01% obtenida en la determinación puede deberse a la calidad de suelo del cual proviene el fruto, conocer la cantidad de cenizas permite saber de manera preliminar el contenido de posibles fuentes de nitrógeno ya que según (Márquez, 2014) los minerales constituyentes de las cenizas se presentan en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos y cloruros, lo que puede ser aprovechado por los microorganismos durante el bioproceso.

- **pH**

El valor obtenido de 3.70 ± 0.05 , se encuentra entre los valores reportados como comunes para el mucilago de cacao descritos por (Wacher, 2011) quien afirma que el mucilago tiene un pH que va desde 3.30 a 4.00, el pH es un factor importante que influye sobre el crecimiento de los microorganismos, según (Cervantes et al., 2017) el

rango óptimo de pH para el crecimiento de bacterias va de 6.0 hasta 8.5 y sólo pocas prefieren los límites muy básico o muy ácidos, si se quisiera modificar el pH se añadiría una base como NaOH, NH₃ etc., para alcanzar valores de pH que favorezca el crecimiento de bacterias según lo reportado, esto no cambiaría en gran medida la composición del mismo.

- **Azúcares reductores**

La cantidad de azúcares reductores presentes en el sustrato fue de $12.20 \pm 0.72\%$, reportes de (Zambrano, 2020) afirman que la cantidad de azúcares reductores presentes en el mucilago de cacao podría estar de 12.50 a 15.90% de modo que el sustrato posee valores cercanos para su uso como fuente de carbono dentro del bioproceso.

- **Glucosa libre**

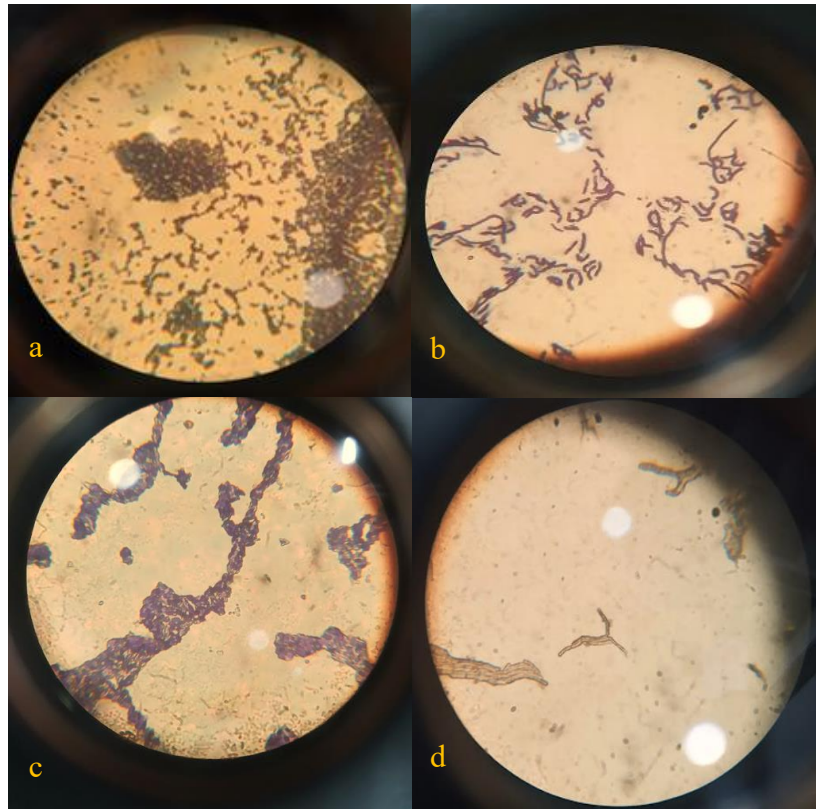
El mucilago de cacao cuenta con una concentración de $4.97 \pm 0.21\%$ de glucosa coincidiendo con el estudio realizado por (Zambrano, 2020) donde determinó que la concentración de glucosa en el fruto de cacao se encuentra entre 4.81% y 6.91%, esta cantidad resulta ser beneficiosa, ya que su concentración hace posible que el sustrato sea empleado en varios tipos de bioprocesos al ser la glucosa una de las principales fuentes de carbono del cual varios tipos de microorganismos se valen para su desarrollo, sin embargo la cantidad determinada resulta ser alta para el proceso propuesto ya que excede los límites mencionados por (Bona et al., 2008) de la concentración de fuente de carbono por glucosa para la fermentación en cultivos por lotes, por lo que se sugiere diluir hasta valores inferiores al 3%.

4.2 ASILAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL MUCILAGO DE CACAO CON POTENCIAL PARA ACUMULACIÓN DE PHAS

Se lograron identificar cuatro tipos de microorganismos en el estudio, tres presentes en el mucilago y uno en la cascara de cacao, la identificación para cada tipo de microorganismo se realizó por microscopia, utilizando método de tinción de Gram y tinción con Sudan Negro para la determinación de polímeros intracelulares, en la figura 10 se muestran los campos ópticos con cada tipo de célula identificada.

Figura 10

Microorganismos identificados de residuos del cacao Tinción de Gram



Nota. (a) Cocos ovalados gram positivos, (b) Bacilos en bastones curvos gram positivos, (c) Cocos esféricos gram positivos, (d) bacilos cilíndricos gram negativos.

Los tipos de microorganismo identificados en el mucilago de cacao se dieron durante las 24 y 48 horas de fermentación a temperatura ambiente, donde según (Wacher, 2011) en las primeras 24 horas prevalecen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, siendo la levadura de mayor presencia durante este periodo la perteneciente a la especie *Hanseniaspora guilliermondii* cuya morfología y características coinciden con la del microorganismo asilado, correspondiente a la visualización de la figura 10 (a), al ser cocos esféricos y positivos a la tinción de Gram, este microorganismos se caracteriza por crecer sin problema en medios con alta concentración de glucosa de modo que su presencia es abundante durante la primera fase fermentativa.

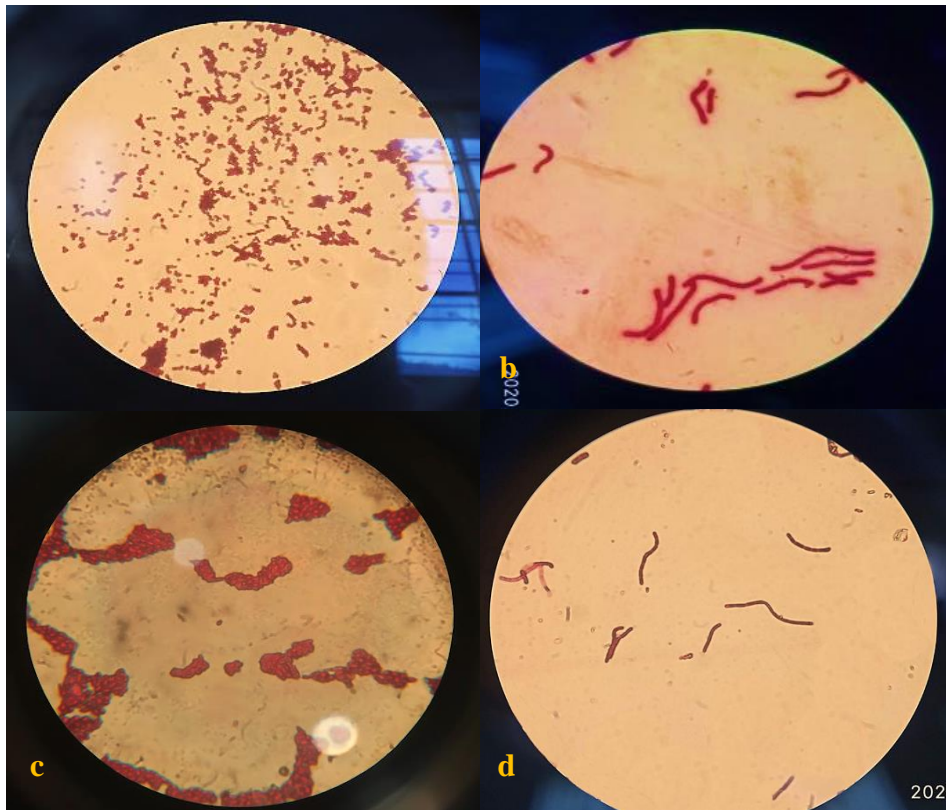
El segundo microorganismo (figura 10b) debido a su morfología y características pertenece a la especie *Lactobacillus*, al ser bacilos curvos y gram positivos, estos se desarrollan secuencialmente casi después de las levaduras ya que su desarrollo promueve a la modificación del medio como lo describe (Salazar y Rojas, 2017), las levaduras tienen la capacidad de consumir rápidamente el oxígeno disponible en la masa de mucilago, logrando crear las condiciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de bacterias ácido lácticas.

Por último, el microorganismo recuperado de la figura 10 (c) corresponde pertenecer al tipo de bacterias ácido acéticas, esto debido a la secuencia de fermentación que sigue el mucilago de cacao, comúnmente a las 48 horas se cumple la tercera fase de fermentación y se da la aparición de este tipo de microorganismos, esto debido a la degradación del mucilago producto de la descomposición de los polisacáridos del tejido mucilaginoso por acción pectinolítica de las levaduras, permitiendo una segunda aireación del medio (Lagunes et al., 2007) y en conjunto con la disminución de las condiciones acidas por el consumo del ácido cítrico, favorece al desarrollo de bacterias ácido acéticas, procediéndose la oxidación del etanol a ácido acético (El Salous, 2019)

En cuanto al microorganismo de la figura 10 (d) se conoce que en base a su morfología pertenece al género *Bacillus* dominios bacteria según (Vos et al., 2011), el microorganismo es aislado de la superficie de la cascara de cacao, dando como negativo a la tinción de Gram, este posee características de crecimiento diferentes ya que se desarrolla a temperaturas de 45 °C y su crecimiento es mejor a un pH neutro. Una vez identificado la presencia de estos microorganismos en los residuos de cacao se procedió a la identificación de los posibles candidatos productores de PHAs para este sustrato, utilizando la tinción con Sudan Negro según el método empleando por (Guzmán et al, 2017), mostrándose los resultados en la figura 11.

Figura 11

Microorganismos identificados tinción con Sudan Negro



Nota. (a) Cocos ovalados sin coloración interna, (b) Bacilos en bastones curvos sin coloración interna, (c) Cocos esféricos sin coloración interna, (d) bacilos cilíndricos con coloración interna.

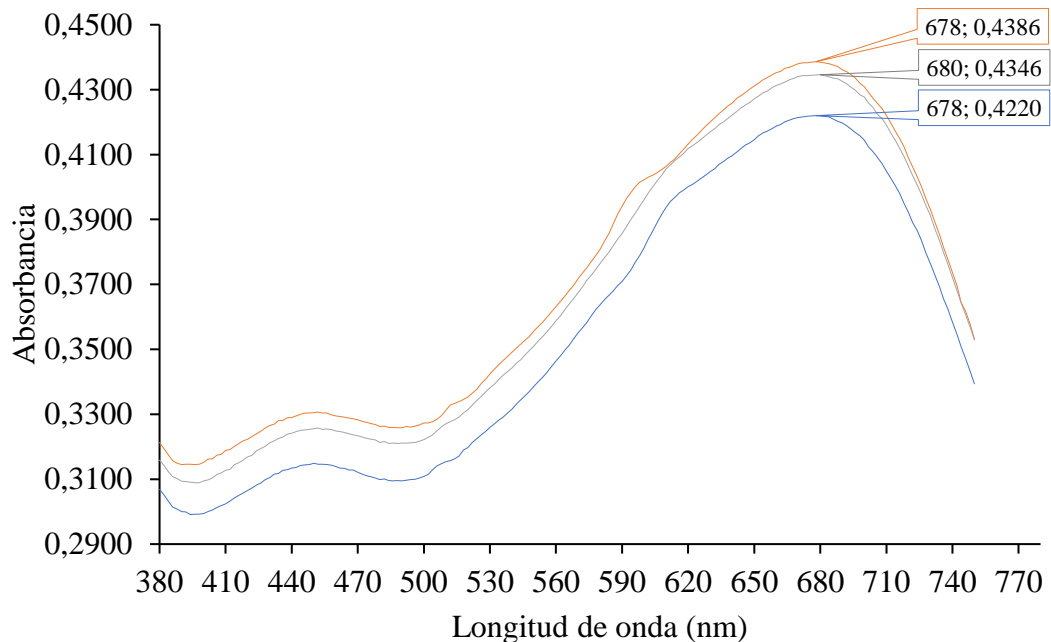
Del total de microorganismos aislados solo uno logró tener la capacidad de acumular polihidroxicanoatos de manera natural (figura 11d), presentando coloración interna grisácea-oscuro a manera de granos fácilmente identificables, siendo este el candidato para ser utilizado en el bioproceso.

- **Confirmación de la presencia de PHAs intracelular del microorganismo aislado**

Para validar la presencia de gránulos intracelulares se empleó el método desarrollado por espectrofotometría (Porras, Villar, y Cubitto, 2018), (figura 12).

Figura 12

Espectro de barrido



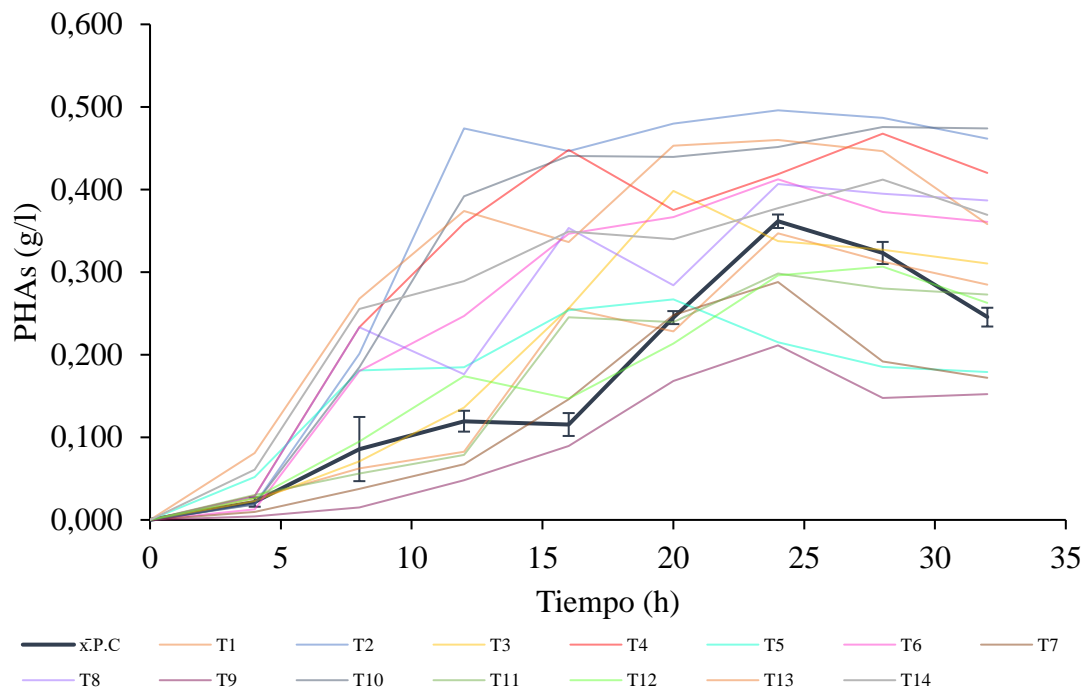
Se realizó el análisis de barrido en el espectro visible trabajando en el rango de los 380 a 750 nm, donde se logró evidenciar que existen picos máximos de absorbancia en las regiones de 670 y 680 nm (figura 12b), coincidiendo con lo descrito en las investigaciones de (Porrás, Villar, y Cubitto, 2018), para la determinación de polihidroxicanoatos intracelulares, de modo que la cepa identificada y aislada de la cascara del fruto es apta para su uso dentro de la evaluación de la producción de PHA en mucilago de cacao.

4.3 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA (TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE SULFATO DE AMONIO) PARA ALCANZAR LA MAXIMIZACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Una vez seleccionada la cepa productora se inició con el bioproceso utilizando como sustrato el mucilago cacao donde se evaluaron los parámetros descritos en la metodología. En la figura 13 se muestra el comportamiento general del proceso con la representación gráfica de la media de los puntos centrales.

Figura 13

Cinética de producción de polihidroxicanoatos



Nota. La gráfica muestra la desviación estándar de la media de los 6 puntos centrales del diseño (\bar{x} P.C), y el comportamiento de los tratamientos 1 al 14.

Existe una leve reducción de la concentración de polihidroxicanoatos entre la hora 10 y 15 de fermentación, esto puede deberse a que el microorganismo no está adaptado al medio de modo que en ese periodo consume la reserva de fuente de carbono producida que es el polímero como respuesta a su adaptación, corrigiéndose el comportamiento en las horas posteriores, dándose que la fase exponencial para la acumulación del polímero se encuentra entre las 20 y 25 horas.

- **Análisis de varianza**

Se obtuvieron los valores de producción de PHAs y se realizaron los análisis estadísticos para determinar las mejores combinaciones entre tratamientos, se puede evidenciar en el anexo 1 que los datos provienen de una distribución normal.

En la tabla 15 se encuentran los resultados del análisis de varianza en el que se determina la existencia de diferencias significativas entre los factores. Mediante los valores-P se ha comprobado la significancia estadística de cada uno, así como sus interacciones.

Tabla 15*Análisis de Varianza para la producción de PHAs*

FV	SC	GL	MC	F-valor	p-valor	Significancia
Modelo	0.1012	9	0.0112	50.63	< 0.0001	Significante
A-	0.0632	1	0.0632	284.44	< 0.0001	
Temperatura	0.0002	1	0.0002	0.9666	0.3487	
B-pH	0.0208	1	0.0208	93.53	< 0.0001	
C-Conct N	0.0014	1	0.0014	6.21	0.0319	
AB	0.0065	1	0.0065	29.34	0.0003	
B ²	0.0187	1	0.0187	84.42	< 0.0001	
C ²						
Residuo	0.0022	10	0.0002			
Falta de ajuste	0.0017	5	0.0003	3.25	0.1111	No significativa
Error puro	0.0005	5	0.0001			
Total	0.1034	19				

Mediante el análisis ANOVA se logró determinar que el valor obtenido de 50.63 para el F-modelo es significativo, y el resultado del coeficiente de determinación ajustado $R^2 = 0.9592$ permite saber que el modelo estadístico sugerido para este trabajo es útil en la búsqueda del punto óptimo para la producción del polímero, ya que según (Gutiérrez, 2016) si el modelo no presenta un coeficiente de determinación mínimo de 0.70, no es recomendable el uso del mismo para la predicción de variables resultado.

El análisis p-valor permitió conocer la significancia de las variables dependientes sobre el procesos productivo, por lo que se determinó que únicamente los factores A (Temperatura), C (Concentración de Sulfato de amonio) y la interacción AB así como los cuadrados B², C² resultan ser términos de modelo significativo que influyen en la producción de PHAs, esto debido a que los valores resultantes no son mayores a 0.1000, sin embargo el factor B correspondiente al pH no es significativo y en el rango establecido no influye dentro de la producción final.

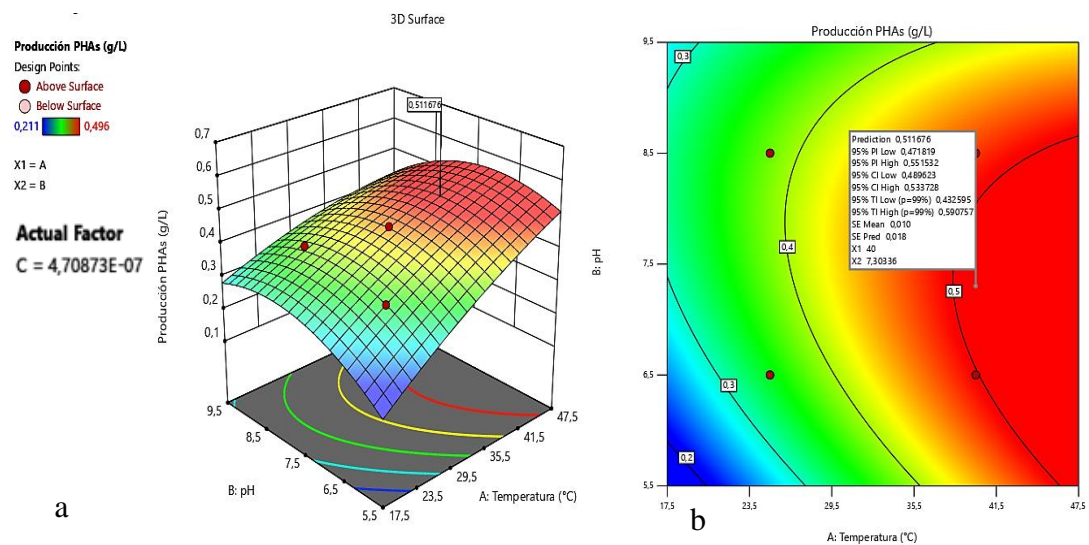
4.4 MAXIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Teniendo en cuenta los valores reportados anteriormente, se procedió a la optimización por métodos numéricos para obtener los máximos en la producción del polímero.

En la figura 14 se muestran los gráficos que reflejan el área explorada, donde la interacción entre los factores en estudio (Temperatura, pH, Concentración de Sulfato de amonio) definen el punto óptimo en función de la variable respuesta (Concentración de PHAs).

Figura 14

Superficie de respuesta estimada y gráfico de contorno



En la figura 14 (a) y (b) se muestra la optimización del diseño, la zona roja representa los puntos óptimos de las mejores combinaciones de temperatura (A), pH (B) y un factor de Concentración de Sulfato de amonio (C) igual a 4.7×10^{-7} (el cual se podría asumir como valor 0) que permiten maximizar a la variable respuesta, de modo que cualquier punto dentro la zona de color rojo especificada da resultados máximos de acumulación del polímero.

En el estudio realizado por (González et al., 2013) para la determinación de síntesis y biodegradación de los polihidroxicanoatos, se afirma que la biosíntesis del polímero siempre involucra un factor de limitación de crecimiento como nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno o magnesio, de modo que la ausencia de concentración de nitrógeno dentro de los valores evaluados para la optimización es coherente ya que el mucilago presenta minerales de manera natural, entre ellos sulfatos que pueden estar actuando como fuentes de nitrógeno suficientes para el desarrollo inicial de los microorganismos por lo que el mucilago contaría con las condiciones adecuadas para la producción de

PHA al presentar limitación de una fuente de nitrógeno y un suministró en exceso de una fuente de carbono.

La ecuación 2 describe el comportamiento de los datos para la maximización de la variable respuesta concentración de polihidroxicanoatos.

$$\text{CPHA} = 0.365509 + 0.0680007 * A + 0.00396403 * B - 0.0441526 * C - 0.013125 * AB - 0.021172 * B^2 + 0.0455046 * C^2 \quad (2)$$

CPHA = Concentración de polihidroxicanoatos

- **Validación de las condiciones establecida para la optimización**

Mediante el análisis de los resultados con el uso del paquete estadístico Design expert 13 y la exploración del área de superficie respuesta se encontraron 81 soluciones de optimización correspondientes a las combinación de los factores en la zona roja de la figura 14 (a) y (b), sin embargo solo una fue seleccionada para maximizar la concentración del polímero mostrándose las condiciones de optimización en la tabla 16 , para la validación del punto óptimo se realizaron tres réplicas del experimento a las condiciones sugeridas.

Tabla 16

Condiciones de maximización sugeridas

Numero	Temperatura (°C)	pH	Concentración de (NH ₄) ₂ SO ₄	Concentración de PHAs	
1	40.00	7.3	0	0.512	Seleccionado

Los resultados obtenidos para la validación del punto óptimo después de la experimentación se muestran en la tabla 17 verificándose que se cumple con los valores planteados en el modelo al encontrarse la producción dentro del rango establecido.

Tabla 17

Resultados de la optimización de la producción de polihidroxicanoatos

Análisis	Media predicha	Desv. Est.	95%IP Bajo	Media Real	95%IP Alto
Concentración de PHAs	0.512	0.015	0.482	0.488 ± 0.017	0.541

El valor obtenido se encontró dentro del rango de valores sugeridos por el programa, demostrándose la validación de la optimización de la variable respuesta. La producción final obtenida del punto óptimo fueron favorables ya que reflejan la efectividad del microorganismo según lo descrito por (Guzmán et al., 2017) conociéndose que los microorganismos que presenten una producción mayor a 0.300 g/l de polihidroxicanoatos tiene potencial para su aplicación industrial.

En la tabla 18 se muestra la comparación de este estudio con investigaciones similares de PHA utilizando diferentes especies de microorganismos con diferentes sustratos.

Tabla 18

Comparación de la producción de PHA con otros estudios similares

Sustrato	Microorganismo	Tiempo	PHA (g/l)	P. volumétrica (mg/l.h)	Fuente
Harina de yuca	<i>Ralstonia eutropha</i>	20.0	0.620	31.00	(Rojas, Hoyos, Mosquera y Silvio, 2016)
Glucosa	<i>Bacillus cereus EGU3</i>	20.0	0.500	25.00	(Porwal et al., 2008)
Almidón de papa	<i>Halófilos</i>	20.0	0.019	0.095	(Guzmán et al., 2017)
Mucilago de cacao	<i>Bacillus sp. (Gram negativo)</i>	25.5	0.488	19.10	Este estudio

Para los resultados obtenidos en la tabla 18 la producción más alta de PHA es de 0.620 g/l con una productividad volumétrica de 31.00 mg/l.h, seguido se encuentra la producción alcanzada en este estudio, con una concentración de 0.488 g/l y una productividad volumétrica de 19.10 mg/l.h, la diferencia que existe al comparar la producción puede ser debido al microorganismo utilizado. Actualmente se han reportado más de 300 bacterias capaces de acumular PHAs en su entorno natural, cada una con diferente capacidad de acumulación intracelular (Sasidharan y Bhat, 2014), de modo que la productividad obtenida durante el bioproceso está estrechamente relacionada con la capacidad de acumular grandes cantidades del polímero de las especies empleadas, además del sustrato utilizado.

La acumulación de polímero intracelular obtenida en el estudio de (Rojas, Hoyos, Mosquera y Silvio, 2016) destacada por ser la mayor concentración alcanzada en esta comparación, se debe principalmente a que el sustrato utilizado según los autores tuvo un pretratamiento de hidrólisis enzimática para la disponibilidad de glucosa en el medio, alcanzando un equivalente de dextrosa del 79%, que facilita la asimilación pronta de la fuente de carbono disponible, y que en conjunto con el microorganismo utilizado *Ralstonia eutropha*, garantiza que la acumulación de polihidroxialcanoatos sea alta, ya que este microorganismo en específico es una de las bacterias más utilizadas en la producción de PHA, debido a que es capaz de almacenar hasta un 96% de este material en peso seco, y desarrollarse con fuentes de carbono como fructosa y glucosa (Betancur y Agudelo, 2011).

De la misma manera los resultados obtenidos por (Porwal et al., 2008) se ven influenciados por el microorganismo utilizado, ya que el microorganismo *Bacillus cereus EGU3* se encuentra entre las 100 cepas de alta producción de PHB alcanzando un capacidad de acumulación de hasta el 66% en peso seco.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio superan a la concentración alcanzada de PHA en el trabajo de (Guzmán et al., 2017) en el cual se utilizaron aislados de microorganismos halófilos que llegaron a alcanzar una concentración máxima de 0.019 g/l de PHA, usando almidón de papa como fuente de carbono, y es aquí donde se puede evidenciar que el tratamiento del sustrato también influencia en la concentración alcanzada por el microorganismo, ya que en este mismo estudio se obtuvo una concentración de 0.678 g/l al utilizar glucosa pura como fuente de carbono, existiendo una marcada diferencia entre los dos tipos de sustrato empleados.

Por tal motivo se puede determinar que el uso de mucilago de cacao como sustrato es viable ya que presenta características que permiten el crecimiento de microorganismos aptos para la acumulación de PHA intracelular, siempre y cuando el microorganismo tenga un buen desarrollo en medios con glucosa, obteniendo resultados cercanos a los reportados con el uso de microorganismos de alta acumulación en la industria.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El mucilago utilizado califica como un sustrato para ser empleado en bioprocesos, y su bajo valor de pH no altera notablemente la concentración de la fuente de carbono predominante.
- Se logró aislar un microorganismo gram negativo productor de polihidroxicanoatos (PHAs) presente en los residuos del cacao, que supera el mínimo sugerido de 0.300 g/l para ser considerado en producciones industriales
- Las mayores concentraciones de PHAs durante el bioproceso aplicado se lograron en ausencia de fuente de nitrógeno, temperaturas altas y pH cercano al neutro.
- Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró por experimentación que la concentración de polihidroxicanoatos está influenciada por los parámetros de temperatura, pH y concentración de nitrógeno.

5.2 Recomendaciones

- Establecer un proceso de clarificación del mucilago que permita conservar la concentración de glucosa disponible para reducir la dificultad en la recuperación del polímero.
- Establecer métodos de recolección y almacenamiento en campo del mucilago de cacao para su uso dentro de bioprocesos.
- Caracterizar el microorganismo aislado de la cascara del fruto de cacao.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, O. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. *UDES*. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/3756>
- Andler, R., y Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. *Ingengerare* 27, 29–36. <https://es.scribd.com/document/263471353/Andler-diaz-29-36>
- ANECACAO (2020).Asociación Nacional de Exportadores de cacao Ecuador. <http://www.anecacao.com/index.php/es/revista.html>.
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., y Montoya, P. (2017). Manual del cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*. ISBN: 978-92-9248-732-4
- Baker, K., & Flatman, S. (2007). Food Analysis Fourth Edition. *In Medicines from Animal Cell Culture*. <https://doi.org/10.1002/9780470723791.ch23>
- Bastidas, I. (2011). Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (Pulpa) provenientes del beneficio del café. Universidad Católica de Manizales, 1–68.
- Betancur, M. y Agudelo, L.M. (2011). Producción de biopolímeros (polihidroxialcanoatos - PHAs) a partir de una cepa comercial empleando sustratos no convencionales. Tesis de Maestría. Universidad de Antioquia, 103.
- BIOLABO. (2019). Manual glucosa GOD-PAP. *Labtest*, 1-6. https://labtest.com.br/wpcontent/uploads/2016/09/Ref_134_EdiFevereiro2012_Ref050914_Esp.pdf
- Bohórquez, D. (2016). Evaluación de la producción de galacto- oligosacáridos (GOS) utilizando una β - galactosidasa a partir de la lactosa del lactosuero. Universidad de Sucre. <http://repositorio.unisucre.edu.co/handle/001/581>

- Bona, R., Koller, M., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C. y Braunegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4854–4863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.049>
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29. 601-608 <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Buritaca, H., Mejía, M., y Álvarez, M. (2017). Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y Aire). *Mente Joven*, 6, 09-20. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3666
- Carrasco, F., Majone, M., Dionisi, D., Petrangeti, M., Carucci, G., y Beccari, M. (2004). Los polihidroxialcanoatos: Plásticos biodegradables producidos por microorganismos. *Universidad de Aberdeen*, 36(414), 244-251. <https://abdn.pure.elsevier.com/en/publications/los-polihidroxialcanoatos-plasticos-biodegradables-producidos-por>
- Carrera, B., Díaz, M., Bello, D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, (2),45-50. ISSN: 0138-6204. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
- Cervantes, J., Orihuela, R., y Rutiaga, J. (2017). Acerca del Desarrollo y Control de Microorganismos en la Fabricación de Papel. *Conciencia Tecnológica*, (54), 54-58. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/944/94454631001/html/index.html>
- Cervera, S. (2011). Prácticas de microbiología. Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja. ISBN:84-604-4493-7
- Chee, J., Yoga, S., Lau, N., Ling, S., Abed, R. y Sudesh, K. (2010). Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA). *Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* ,1395–1404.<https://www.researchgate.net/publication/216173367Bacterially>

[produced polyhydroxyalkanoate PHA Converting renewable resources into bioplastic](#)

- Dolores, A. (2009). Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (Brassica rapa L). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2599/9788498872613_content.pdf?sequence=1
- Duarte, B. (2000). Estudio y descripción de las bacterias y hongos comunes de estudio en el laboratorio y muestras de origen ambiental. Universidad del Cauca, (1). <https://wiac.info/docview>
- Durango, W., Caicedo, M., Vera, D., Sotomayor, I., Saini, E. y Chavávez, E. (2019). La cadena de valor del CACAO en América Latina y El Caribe. *Fontagro*. https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe_CACAO_linea_bas_e.pdf
- El Salous, A., Angulo, G. A., y Solís, F. L. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Espirales Revista Multidisciplinaria de investigación*, 3(28), 1. <https://doi.org/10.31876/er.v3i28.572>
- Fernández, I., (2012). Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. ISBN: 978-84-693-1123-3
- García, J. (2014). PHB despolimerasas de *Streptomyces exfoliatus* y *Streptomyces ascomycinicus*. Caracterización de enzimas con potencial aplicación biotecnológica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/28881/1/T35793.pdf>
- González, Y., Meza, J., González, O. y Córdova, J. (2013). 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

- Garibaldi, P., Santambrosio, E., y Ortega, M. (2009). Siembra y recuento de microorganismos. Universidad Tecnológica Nacional, 1–8.
- Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2016). Análisis y diseño de experimentos. *McGraw-Hill Interamericana*, 2(46). ISBN:10 : 970-10-6526-3
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., y Casos, I. (2017). Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- INAMHI. (2021). Condiciones actuales del tiempo. Red de Estaciones Automáticas Hidrometeorológicas. <http://186.42.174.236/InamhiEmas/#>
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V. y Radecka, I. (2016). Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Kaur, R., y Embi, M. A. (2009). Self-directedness through asynchronous online interactions: A Malaysian experience. *European Journal of Social Sciences*, 9(1), 48-60.
- Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Koller, M., y Braunegg, G. (2015). Potential and prospects of continuous polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 2(2), 94–121. <https://doi.org/10.3390/bioengineering2020094>
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., y Braunegg, G. (2013). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers and Plastics From Renewable Resources Polihidroksialkanoati. *Materials and Technology*, 47(1), 5–12. https://www.researchgate.net/publication/235282879_Polyhydroxyalkanoates_Biodegradable_Polymeric_Materials_from_Renewable_Resources

- Kunasundari, B. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Lagunes, G. S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., y Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lemos, A. y Córdoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1), 83–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.23850/22565035.139>
- López, E., Hernández. M., Colín. C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Literatura biomédica, Mediagraphic*, 3(1), 10-18. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48632>
- Márquez, M. B. (2014). Cenizas Y Grasas, teoría del muestreo. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, 1-165.
- Molina, A. y Flórez, C. (2020). Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación. *CIBAS*, 1-9. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19521.17767/1>
- Mutiara, I., Razaad, N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., y Wang, J. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., y Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271–284. <https://doi.org/10.1002/yea.1207>
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., y Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168–186.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

- Ogata, N. (2007). El cacao. *CONAVIO. Biodiversitas*, (72), 1–5. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/01/biodiv72art1.pdf>
- Ojumu, T. (2014). Production of Polyhydroxyalkanoates , a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* , 3(1), 18-24. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2004>
- Ortega, G. M. y García, A. B. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. *ICIDCA : Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 48(1), 7–15. ISSN: 0138-6204. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223131337002>
- Ortiz, L. K., y Álvarez, L. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma Cacao L*) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural* 19(1), 65–84. <https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5>
- Panchal, B. (2016). Production of Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mendocina* using vegetable oils and their characterisation. University of Westminster.1-158. <http://westminsterresearch.wmin.ac.uk/>
- Porras, M. A., Villar, M. A., y Cubitto, M. A. (2017). Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. *Journal of Biotechnology*, 255, 28–32. ISSN 0168-1656. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.012>
- Porras, M. A., Villar, M. A., y Cubitto, M. A. (2018). Improved intracellular PHA determinations with novel spectrophotometric quantification methodologies based on Sudan black dye. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 1-11. ISSN 0167-7012. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.008>
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., ... Sharma, R. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99,

5444-5451. ISSN 0960-8524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.011>

Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., y Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates , promising new biomedical materials for the future. *Materials Science & Engineering R*, 72(3), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>

Raza, A., Abid, S. y Banat, I. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International biodeterioration & biodegradation*, 126, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

Rehm, H., y Bernd, A. (2003). Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15–33. <https://doi.org/10.1042/BJ20031254>

Rojas, F., Hoyos, C., José, L., Mosquera, S. y Silvio, A. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 19-26. ISSN 1692-3561

Romo, D. M. R., Grosso, M. V., Solano, N. C. M., y Castaño, D. M. (2007). A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 348–357. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-13>

Salazar, L.G, Rojas, R, H. J. (2017). Aislamiento e identificación de microorganismos presentes durante el proceso de fermentación de *Theobroma cacao* L., variedad “Chuncho” del Cuzco. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 1-93.

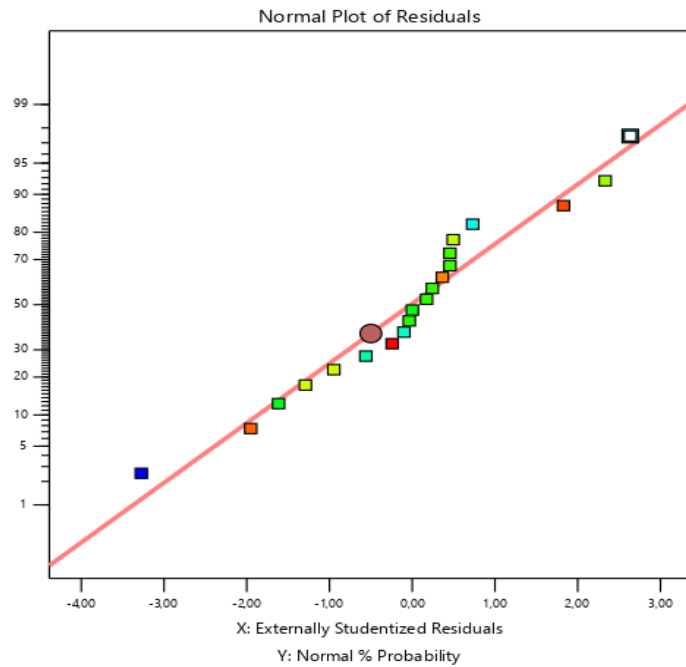
Salazar, A., Yepes, M., Correa, G., & Mora, A. (2014). Producción de polihidroxialcanoatos a partir de sustratos azucarados inexplorados. *DYNA*, 81(185), 73–77. <https://doi.org/10.15446/dyna.v81n185.36844>

Sánchez, M. S. A., Marín, M. M. A., Mora, M. A. L., y Yepes, P. M. (2012). Identificación de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de*

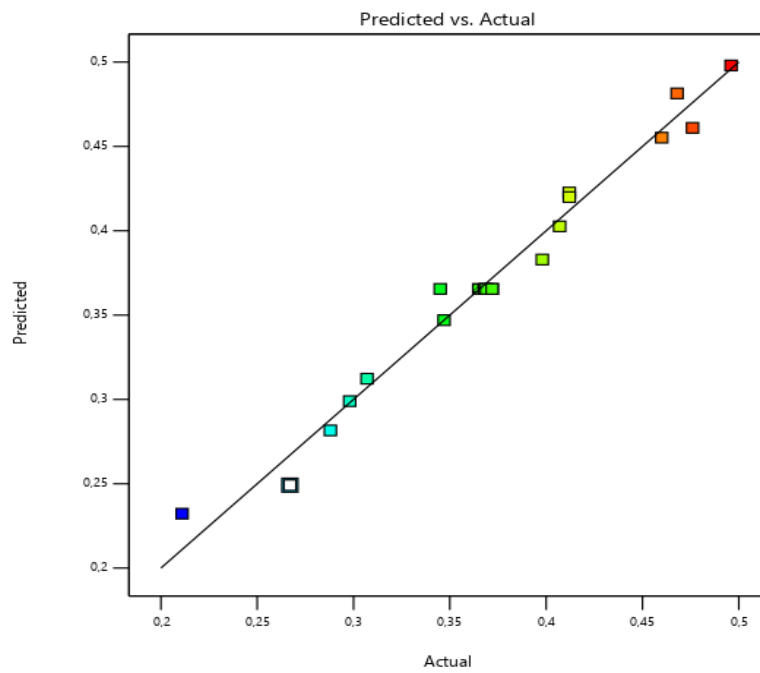
- Biotecnología*, 14(2), 89–100. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a10.pdf>
- Sasidharan, R. S., y Bhat, S. G. (2014). Bacterial Polyhydroxyalkanoates production and its Applications. *Microbial Bioproducts*, 70-96. http://www.researchgate.net/publication/283568901_Bacterial_Polyhydroxyalkanoates_production_and_its_Applications
- Scheper, S. E. T., Nielsen, B. M. J., Schügerl, H. S. K., Tsao, U., y Zhong, C. W. J. (2004). *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg*. ISSN: 0724-6145
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 361–372. https://www.researchgate.net/publication/242144167_Contaminacion_ambiental_y_bacterias_productoras_de_plasticos_biodegradables
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>
- Taherzadeh, M. J. y Karimi, K. (2011). Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. *Biofuels, Academic Press*, 287-311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00012-7>
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Vallejo, C., Vera, J., Quintana, J., Verdezoto, D., Cajas, L., & Mendoza, T. (2018). Bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) de dos variedades. *Revista de Investigación Talentos V*, 1(1), 59–68. <https://talentos.ueb.edu.ec/index.php/talentos/article/download/31/41/>
- Vera, J. Vallejo, C. Parraga, D. Marcías, J. Ramos, R. y Morales, W. (2014). Propiedades físicoquímicas y sensoriales de las almendras de quince clones de

- cacao Nacional (L.) en el Ecuador. *Revista Ciencia y tecnología*, 7(2), 21-34.
- 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>
- Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. y Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Wacher, M. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*, 12(4), ISSN: 1067-6079. <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/index.html>
- Yadira, J., y Ria, S. (2010). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y praxis investigativa*, 5(2), 79-84. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3702404.pdf>
- Zambrano, W. A. A. (2020). Caracterización física – química del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao L.*) con énfasis en los azúcares que lo componen. Universidad Agraria del Ecuador. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ALAVA_ZAMBRANO_WISTON_ADRIAN.pdf
- Zhang, B., Carlson, R., y Srienc, F. (2006). Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 536–543. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.536-543.2006>

Anexo 1 Normalidad para la producción de PHAs



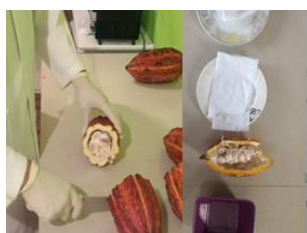
Anexo 2 Normalidad de las cantidades predichas y las reales



Anexo 3 Polímero recuperado



Anexo 4 Proceso de obtención de Polihidroxicanoatos



Fotografía 1
Extracción de mucilago de cacao



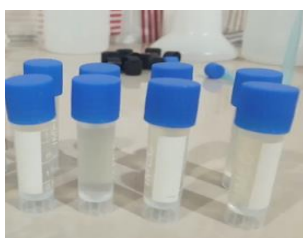
Fotografía 2 Filtrado



Fotografía 3
Acondicionamiento del sustrato



Fotografía 4
Esterilización del sustrato



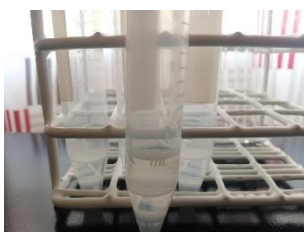
Fotografía 5
Banco de células



Fotografía 6
Bioproceso (Biorreactor)



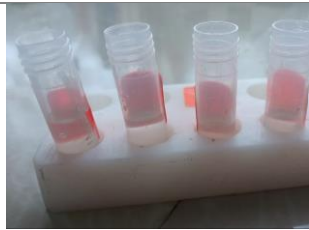
Fotografía 7
Centrifugación y lavado de biomasa



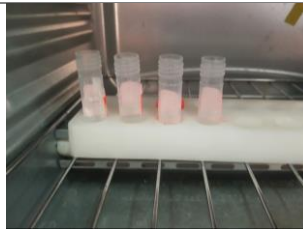
Fotografía 8
Pretratamiento con hipoclorito de sodio 5%



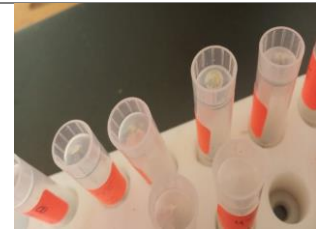
Fotografía 9
solubilización de PHA en cloroformo



Fotografía 10
Separación de
cloroformo con PHAs



Fotografía 11
Evaporación de
cloroformo



Fotografía 12
PHA recuperado adherido
a viales de 2ml
