

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

APROVECHAMIENTO DE UN SUBPRODUCTO DEL
PROCESAMIENTO DEL BANANO PARA LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) MEDIANTE FERMENTACIÓN
SUMERGIDA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado y
título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

MÓNICA ARIAS ROBLERO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

DEDICATORIA

A mis pequeñas Abigail y Olivia, que me motivan para ser mejor

A José, cuyo apoyo y amor hizo posible este proceso

AGRADECIMIENTOS

A la MSc. Carmela Velázquez, por su apoyo y guía académica

A Vanny Mora, por su amabilidad, su apoyo técnico y su gran involucramiento a lo largo de todo el proyecto

A la MSc. María de los Ángeles Mora y a la MSc. Alicia Hernández por sus valiosos aportes para el desarrollo de este trabajo

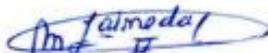
Al personal de los Laboratorios de Química del CITA - UCR y el CINA - UCR, cuya asesoría y soporte técnico fue esencial para conseguir los objetivos de esta Tesis

Al Dr. Fabrice Vaillant, por su guía en los aspectos estadísticos del trabajo

A Luis Alonso Porras, Iray Mata y José Pablo Quirós por su apoyo profesional para las actividades realizadas en CENIBiot

A Eduardo Thompson, Valeria Benavides, Henry Castro y Nathalie Guzmán por su valioso trabajo como parte de este proyecto

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría en Ciencia de Alimentos.



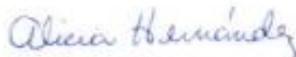
Dra. María Lourdes Pineda Castro, MSc.
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



MSc. Carmela Velázquez Carrillo
Directora de la Tesis



MSc. María de los Ángeles Mora López
Asesora



MSc. Alicia Hernández Peñaranda
Asesora



PhD. Jessie Usaga Barrientos
**Representante de la Directora del Programa de
Posgrado**



Mónica Arias Roblero
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Generalidades de los bioplásticos	5
2.2. Aprovechamiento biotecnológico de subproductos agroindustriales para la producción de PHAs	7
2.2.1. Idoneidad de los subproductos agroindustriales como sustratos de fermentación	7
2.2.2. Aprovechamiento de subproductos para la síntesis microbiana de PHAs	9
2.2.3. Potencial de los subproductos de banano como sustrato para la producción de PHAs	10
2.3. Polihidroxialcanoatos (PHAs): aspectos generales	13
2.3.1. Propiedades de los PHAs	13
2.3.2. Comercialización de los PHAs	15
2.3.3. Síntesis microbiana de los PHAs	16
2.4. Procesos fermentativos para la producción de PHAs	23
2.5. Extracción y cuantificación de PHB	25
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo General	29
3.1.1. Objetivos Específicos	29
4. METODOLOGÍA	30
4.1. Localización del proyecto	30
4.2. Subproducto de banano	30
4.3. Microorganismos	32
4.3.1. Cepas bacterianas	32
4.3.2. Conservación de microorganismos	33

4.4.	Definición del método de análisis para la cuantificación de polihidroxibutirato (PHB)	34
4.4.1.	Equipo y condiciones	34
4.4.2.	Preparación de curvas de calibración	35
4.4.3.	Determinación de límites de detección y cuantificación	36
4.4.4.	Determinación del porcentaje de recuperación del método	37
4.4.5.	Extracción de PHB a partir de caldos de fermentación	37
4.4.6.	Análisis de muestras	38
4.5.	Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas	38
4.6.	Diseño de un medio suplementado con subproducto de banano para la producción de biomasa de <i>Cupriavidus necator</i>	40
4.6.1.	Diseño Experimental	41
4.6.2.	Preparación de medios de cultivo y condiciones de crecimiento	42
4.7.	Implementación del proceso de producción de PHB en biorreactor	44
4.7.1.	Preparación del medio de cultivo	44
4.7.2.	Preparación y configuración del biorreactor	45
4.7.3.	Preparación y adición de inóculos	48
4.7.4.	Condiciones de crecimiento	49
4.7.5.	Extracción y procesamiento de muestras	49
4.7.6.	Determinación de biomasa mediante peso seco	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1.	Definición del método de análisis para detección y cuantificación de PHB	52
5.1.1.	Condiciones de análisis seleccionadas	52
5.1.2.	Curvas de calibración	56
5.1.3.	Límites de detección y cuantificación	57
5.1.4.	Porcentaje de recuperación	59
5.2.	Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas	59
5.3.	Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa bacteriana	62
5.4.	Implementación del proceso de fermentación en biorreactor	64
5.4.1.	Producción de biomasa durante la fase de crecimiento	66
5.4.2.	Producción de PHB	67
5.4.3.	Presencia de ácidos grasos en muestras de fermentación	79
6.	CONCLUSIONES	82

6.1.	Definición del método de análisis para la detección y cuantificación de polihidroxitirato (PHB) a partir de biomasa bacteriana	82
6.2.	Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas nativas, así como de una cepa control de <i>Cupriavidus necator</i>	83
6.3.	Diseño de un medio de cultivo suplementado con jugo de subproducto de banano para la producción de biomasa bacteriana productora de PHB.....	83
6.4.	Implementación de un proceso fermentativo en biorreactor de 7 L	84
7.	RECOMENDACIONES	86
8.	BIBLIOGRAFÍA	88
9.	ANEXOS	111
	Anexo 1.	111

RESUMEN

El polihidroxi butirato (PHB) corresponde al polihidroxi alcanoato (PHA) más común en la naturaleza. Es sintetizado por gran variedad de microorganismos a manera de reserva energética en condiciones de desbalance nutricional, en donde hay disponibilidad de carbono, pero limitación en otros nutrientes como nitrógeno, oxígeno y fósforo. Corresponde a un biopolímero con potencial para sustituir los plásticos derivados del petróleo, con la ventaja de ser completamente biodegradable, produciéndose CO_2 y agua en condiciones de degradación aerobia, o bien, metano en condiciones anaerobias. Con este trabajo se buscó definir un método analítico para la cuantificación de PHB de origen bacteriano, comparar la productividad de PHB de 11 cepas costarricenses con respecto a una cepa control de *Cupriavidus necator*, maximizar la concentración de biomasa productora de PHB mediante la optimización de los componentes del medio de cultivo e implementar un proceso de fermentación de tipo lote alimentado para la producción de PHB. Se desarrolló un proceso de extracción de PHB mediante metanólisis ácida, así como un método de análisis cromatográfico para la cuantificación del polímero. La evaluación de la productividad de PHB (g/L) de las distintas cepas se llevó a cabo mediante fermentación en dos etapas, empleando un medio mineral limitado en nitrógeno. Se optimizaron los niveles de jugo de subproducto de banano y NH_4Cl que permitieran maximizar la producción de biomasa de la cepa control. Para la implementación del proceso fermentativo de producción de PHB en biorreactor, se evaluaron suplementaciones de 30, 40 y 50 g/L de fructosa al final de la fase de crecimiento microbiano. En cuanto a la evaluación de la productividad de las cepas nativas, se obtuvo una productividad de 0,5 g/L de PHB para una cepa nativa de *C. necator* proveniente de suelos de una plantación bananera, en contraposición a la concentración de 2,8 g/L para la cepa control. Mediante el análisis de superficie de respuesta, se determinó que la máxima concentración de biomasa fue obtenida al emplear una concentración de 2 g/L de NH_4Cl como fuente de nitrógeno y un 5% de jugo derivado de un subproducto de banano (JSB) como fuente de carbono. A pesar de que para la mayoría de las pruebas de fermentación en biorreactor no se logró una producción detectable de PHB, para la fermentación suplementada con 50 g/L de fructosa se obtuvo una concentración de 1,29 g/L de PHB a las 96 horas de proceso. Gracias a su rica composición nutricional y a su contenido de azúcares fermentables, los subproductos del procesamiento del banano resultan promisorios como sustratos de fermentación para la producción de bioplásticos, sin embargo, es necesario profundizar en su estudio con el fin de desarrollar procesos de producción eficientes, tanto a escala piloto como industrial.

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is the most common naturally found polyhydroxyalcanoate (PHA). This polymer is usually synthesized and accumulated as an energy reservoir by a wide number of microorganisms under nutritional stress conditions, which usually involve carbon availability, but other nutrients (such nitrogen, oxygen, or phosphorus) deprivation. PHB constitutes an attractive potential substitute for petroleum-derived plastics since complete biodegradation of this polymer occurs in short periods of time. Under aerobic conditions, PHB is degraded into CO₂ and water, whereas methane is the main product of its anaerobic digestion. The objectives of this study were: to define an analytical method for bacterial PHB quantification, to compare PHB production of 11 autochthonous Costa Rican strains in relation to a *Cupriavidus necator* control strain, to maximize PHB-producing biomass concentration through culture medium component optimization and to implement a fed-batch fermentation process for PHB production. PHB extraction was achieved by acid methanolysis. A chromatographic method was developed for PHB quantification. PHB productivity (g/L) for the autochthonous strains was assessed through the application of a two-stage fermentation using a nitrogen-limited mineral medium. Banana by-product juice and NH₄Cl concentrations were optimized to maximize biomass production. For the implementation of PHB production in lab-scale bioreactors, at the end of the growth phase, carbon supplementation with 30, 40 and 50 g/L fructose was evaluated. Regarding strain productivity assessment, a PHB concentration of 0,5 g/L was obtained for a banana plantation soil-isolated autochthonous *C. necator* strain. PHB production of 2,8 g/L was determined for control strain. According to response surface analysis, maximum biomass density was observed for culture medium containing 2 g/L NH₄Cl as nitrogen source and 5% BBJ as carbon source. Although, for most fermentation assays, a detectable production of PHB was not observed, for a 50 g/L fructose-supplemented fermentation a 1,29 g/L PHB production was obtained at 96 h. Due to their nutritional composition and fermentable sugar content, banana processing by-products constitute suitable fermentation substrates for bioplastic production, nevertheless, plenty of research is still needed to design efficient pilot and industrial-scale production processes.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición nutricional de la pulpa de banano maduro	12
Cuadro 2. Ejemplos de microorganismos y sustratos agroindustriales reportados en la literatura para la producción de PHB	19
Cuadro 3. Ejemplos de condiciones de análisis para la cuantificación de PHB por Cromatografía de Gases, reportados en la literatura	28
Cuadro 4. Composición del jugo proveniente del subproducto de banano (JSB).....	32
Cuadro 5. Cepas bacterianas evaluadas en su capacidad de producción de PHB.....	33
Cuadro 6. Caldo de cultivo empleado para la evaluación de la producción de PHB por parte de las distintas cepas bacterianas.....	39
Cuadro 7. Diseño Experimental Central Compuesto Rotativo para la optimización de las concentraciones de JSB y Cloruro de amonio	42
Cuadro 8. Composición del medio de cultivo para el crecimiento de biomasa productora de PHB ajustado a pH 7,1 con NaOH 1M.....	42
Cuadro 9. Preparación de las distintas formulaciones de medios de cultivo para optimización de biomasa de <i>Cupriavidus necator</i>	43
Cuadro 10. Composición de sales para las fermentaciones en biorreactor	45
Cuadro 11. Condiciones de análisis para la cuantificación de PHB mediante Cromatografía de gases.....	52
Cuadro 12. Rampa de temperatura para el método de detección de PHB	52
Cuadro 13. Cálculo de los límites de detección y cuantificación para el método de análisis de PHB por CG-FID.....	57
Cuadro 14. Límites de detección y cuantificación para el método de cuantificación de PHB mediante CG-MS.	59
Cuadro 15. Promedios de áreas de pico y concentraciones de 3-MHB determinadas mediante CG con detección FID para cada una de las cepas bacterianas evaluadas .	60
Cuadro 16. Densidad Óptica a 425 nm para los cultivos de la cepa CN-2 crecidos en diferentes formulaciones del medio de cultivo para producción de biomasa.....	62
Cuadro 17. Resultados de las determinaciones de biomasa por peso seco al finalizar la primera etapa de las fermentaciones en biorreactor.....	66
Cuadro 18. Producción de PHB en el caldo de fermentación obtenida en distintos tiempos utilizando <i>C. necator</i> en un biorreactor con un volumen de 3L de medio de cultivo.....	68
Cuadro 19. Condiciones de crecimiento y productividades de PHB reportadas en la literatura para distintos procesos fermentativos con <i>C. necator</i>	70
Cuadro 20. Relaciones carbono/nitrógeno al inicio de la fase de producción de PHB .	76
Cuadro 21. Compuestos presentes en las muestras de fermentación en biorreactor, identificados mediante CG-MS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química general de los polihidroxicanoatos (PHAs)	13
Figura 2. Estructura química del polihidroxitirato (PHB).....	14
Figura 3. Ruta metabólica para la síntesis de PHB y P(HB-HV) en <i>C necator</i>	22
Figura 4. Proceso de fermentación, recuperación y purificación para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs)	23
Figura 5. Diagrama del procedimiento para la obtención del jugo de subproducto de banano (JSB)	31
Figura 6. Consola ez-Control (Applikon® Biotechnology) empleada para las fermentaciones con <i>C. necator</i>	46
Figura 7. Sistema de venteo acoplado en la salida del sistema de fermentación en biorreactor	47
Figura 8. Configuración general del biorreactor, conteniendo un volumen de 3 L.....	47
Figura 9. Diagrama de armado del del biorreactor	48
Figura 10. Sistema de toma de muestra acoplado al biorreactor	49
Figura 11. Procedimientos aplicados a las muestras de fermentación.....	50
Figura 12. Cromatograma para una disolución de 0,55 g/L del estándar Metil (R)-3 hidroxibutirato en cloroformo	53
Figura 13. Cromatograma para una disolución de 5,6 g/L de Ácido benzoico en cloroformo, posterior a la metanólisis	53
Figura 14. Cromatogramas correspondientes al JSB sometido a metanólisis.....	54
Figura 15. Cromatograma CG-FID para una muestra de fermentación en medio suplementado con JSB, realizando la extracción a partir de biomasa recuperada	55
Figura 16. Curva de calibración del Metil (R)-3 hidroxibutirato en cloroformo	56
Figura 17. Curva de calibración del Ácido Benzoico.....	57
Figura 18. Ajuste lineal de los promedios de concentraciones altas, medias y bajas de las curvas de calibración de 3-MHB	58
Figura 19. Morfología de la cepa CR-12 con acumulación de PHB	61
Figura 20. Gráfico de contorno: Efecto de las concentraciones de JSB y NH ₄ Cl en la concentración celular de <i>C. necator</i>	63
Figura 21. Comportamiento de la temperatura para las 3 repeticiones de la fermentación con 30 g/L de fructosa	65
Figura 22. Comportamiento del oxígeno disuelto para las 3 repeticiones de la fermentación con 30 g/L de fructosa	65
Figura 23. Comportamiento del oxígeno disuelto para los tres niveles de fructosa evaluados	71

Figura 24. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 30 g/L de fructosa a las 25 h de proceso	73
Figura 25. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 40 g/L de fructosa a las 25 h de proceso	74
Figura 26. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 50 g/L de fructosa a las 25 h de proceso	75
Figura 27. Cromatograma de las muestras de fermentación en biorreactor, mostrando los distintos compuestos identificados.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

3-HBCoA	β -hidroxibutiril coenzima A
3-MHB	Metil-3-hidroxibutirato
AB	Ácido benzoico
ANDEVA	Análisis de Varianza
ATC	Ácido tricarbóxico
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
CG	Cromatografía de gases
D.O	Densidad Óptica
Da	Dalton
DIA	Diseño Irrestricto al Azar
FID	Detector de ionización de flama
HV	Hidroxivalerato
JSB	Jugo de subproducto de banano
MS	Detección de masas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NC	No cuantificable
ND	No detectable
OD	Oxígeno disuelto
P (3HB-co HV)	Copolímero polihidroxibutirato - hidroxivalerato
PBS	Polibutileno succinato
PE	Polietileno
PhaPs	Proteínas fascinas
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato
PLA	Ácido poliláctico
PSB	Peso seco de biomasa
rcf	Fuerza centrífuga relativa
S/N	Relación Señal/Ruido
TGA	Analizador termogravimétrico
TSA	Agar Tripticasa Soya
TSB	Caldo Tripticasa Soya
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Mónica Arias Roblero, con cédula de identidad 205790452, en mi condición de autor del TFG titulado: “Aprovechamiento de un subproducto del procesamiento del banano para la producción de polihidroxibutirato (PHB) mediante fermentación sumergida”.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado.

SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. INTRODUCCIÓN

El uso masivo de plásticos sintéticos representa un serio problema ambiental. Estos materiales no son susceptibles a la degradación biológica y en muchas ocasiones se desechan inadecuadamente, acumulándose en los ecosistemas y rellenos sanitarios por períodos muy extensos (Castilho *et al.*, 2009).

Se estima que la cantidad de plástico que alcanza los océanos oscila entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas anuales y considerando la infraestructura disponible actualmente para el tratamiento de este tipo de desechos se prevé que dicho volumen aumente en un orden de magnitud para el año 2025 (Jambeck *et al.*, 2015).

Los plásticos son demandados por un creciente sector industrial, debido a su fuerza, alta durabilidad, bajo costo y resistencia a la degradación. Sin embargo, estas propiedades que otorgan valor en muchas aplicaciones provocan problemas ambientales y de salud, producto de la acumulación y disposición inadecuada de estos materiales. En ocasiones, los tratamientos diseñados para la destrucción o reutilización de los plásticos resultan costosos y consumen mucho tiempo. Incluso, algunos procesos comúnmente aplicados, como la incineración, pueden generar nuevas sustancias tóxicas, tales como el cianuro de hidrógeno y el cloruro de hidrógeno. Otras alternativas de tratamiento, como la fotodegradación, tienen aplicaciones limitadas (Khanna & Srivastava, 2005b; Muralisrinivasan Subramanian, 2016).

El reciclaje de plásticos contribuye a mitigar su impacto; sin embargo, se trata de un proceso poco atractivo comercialmente, que requiere la inversión de muchas horas de labor para categorizar adecuadamente cada tipo de material. Además, debido a sus características, algunos tipos de plásticos no pueden ser reciclados. Por otra parte, la limitación de las reservas petroleras y las preocupaciones por el impacto ambiental que

sus derivados generan, han motivado a los gobiernos, la industria y las comunidades a buscar alternativas para reemplazar esta materia prima por recursos renovables. Así, cada vez más países promueven políticas para reducir el consumo de plásticos sintéticos y sustituirlos por análogos biodegradables (Leong *et al.*, 2014).

Entre los plásticos biodegradables existentes, los polihidroxicanoatos (PHAs) se encuentran entre los más estudiados, ya que pueden ser totalmente degradados por la vía biológica, sin la generación colateral de compuestos tóxicos. Muchos microorganismos presentes en los suelos cuentan con sistemas enzimáticos capaces de romper los enlaces de estos polímeros (Saratale *et al.*, 2019), generando monómeros y oligómeros solubles en agua que luego son metabolizados en dióxido de carbono y agua (Chanprateep, 2010).

Los PHAs constituyen una familia de poliésteres con diversas estructuras sintetizados por bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Son los únicos bioplásticos cuya síntesis se lleva a cabo en su totalidad por la vía microbiana (G.-Q. Chen, 2010c). Debido a que los PHAs constituyen una reserva de carbono susceptible de ser metabolizada por una amplia gama de microorganismos, estos materiales pueden degradarse en todos los ambientes biológicamente activos, incluyendo suelos, cuerpos de agua, compost y aguas residuales (Somleva *et al.*, 2013).

Los PHAs presentan propiedades similares a las de los plásticos convencionales (Naranjo *et al.*, 2014), con la ventaja de que su degradación biológica puede lograrse en períodos menores a un año. Adicionalmente, su producción puede llevarse a cabo a partir de fuentes de energía renovables. Entre los productos que pueden elaborarse a partir de los PHAs pueden mencionarse: botellas, empaques para alimentos, películas a prueba de agua y materiales médicos como hilos de sutura, implantes y matrices para liberación controlada de medicamentos (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

El polihidroxibutirato (PHB) es el PHA más común y mejor caracterizado (Maity *et al.*, 2020). Es sintetizado por una gran variedad de bacterias, siendo *Cupriavidus necator* uno de los microorganismos productores más estudiados, dada su capacidad de acumular hasta un 80% de PHB, con respecto a su peso celular seco (Franz *et al.*, 2011).

Pese al incremento en la popularidad de los plásticos biodegradables, una de las mayores limitaciones para su producción es su elevado costo (T. Li *et al.*, 2017). Gran parte de dicho costo se deriva del medio de cultivo para la producción fermentativa. Por esto, es esencial la búsqueda de sustratos abundantes y económicos que puedan sustituir los medios químicamente definidos para la producción industrial del PHB (Keshavarz & Roy, 2010).

Debido a su composición nutricional y bajo costo, los subproductos agroindustriales son una opción atractiva para ser evaluados como materia prima para el diseño de medios de cultivo. La investigación previa ha demostrado la aplicación exitosa de estos subproductos como sustratos de fermentación para la producción de: ácidos orgánicos (Demichelis *et al.*, 2017), enzimas (Melnichuk *et al.*, 2020), biocombustibles (Boulal *et al.*, 2019) y compuestos funcionales como fibra dietética (de la Rosa *et al.*, 2019), antocianinas (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017) y carotenoides (Clementz *et al.*, 2019). Adicionalmente, el uso de subproductos como sustratos de fermentación ofrece una alternativa para su aprovechamiento.

En Costa Rica, la industrialización de productos agrícolas como café, banano y piña genera aproximadamente un 86% del total de desechos del sector industrial (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2018). El descarte inadecuado de los desechos agrícolas propicia su degradación anaeróbica y la emisión de metano, con el consecuente impacto de esta práctica en el cambio climático.

Numerosos sustratos provenientes de la actividad agroindustrial han sido estudiados para la producción fermentativa de PHB, entre ellos: melazas (Albuquerque *et al.*, 2010), suero lácteo (Povolo *et al.*, 2010), jarabe de maíz (Gouda *et al.*, 2001), residuos de vainas de guisantes (Patel *et al.*, 2012) y aceites vegetales (López-Cuellar *et al.*, 2011).

En el caso particular de nuestro país, los subproductos del procesamiento del banano, dado su alto contenido de carbono, son promisorios como sustratos de fermentación y se han valorado con éxito en la producción de ácido láctico necesario para la obtención de ácido poliláctico, un bioplástico de uso comercial (López *et al.*, 2008)

Este tipo de subproductos se caracteriza por su alto contenido de azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa, así como una gran variedad de minerales, vitaminas y aminoácidos (Chan-Blanco *et al.*, 2003; Guylène *et al.*, 2009). Dado que el banano presenta un contenido cercano a los 12 g de azúcares simples por cada 100 g de fruta (Cohen, 2011), su valorización se facilita pues, a diferencia de otros residuos ricos en almidones o celulosas, no es necesaria la implementación de tratamientos de hidrólisis química o enzimática destinados a liberar los azúcares requeridos por los microorganismos en el proceso de fermentación.

En este proyecto se evaluó una alternativa para la valorización de los residuos del procesamiento agroindustrial del banano, mediante su uso como materia prima para la producción de PHB en un proceso de fermentación. Los resultados del estudio apoyan la valorización del subproducto, así como la generación de una alternativa de plástico biodegradable y producido en forma íntegra por una cepa comercial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de los bioplásticos

Los bioplásticos comprenden una amplia familia de materiales con propiedades diversas. Para ser considerado como bioplástico, un material plástico debe cumplir con al menos una de las siguientes cualidades: a) ser elaborado a partir de biomasa, es decir, a partir de recursos renovables o b) ser biodegradable (EUBIO, 2019).

Los bioplásticos generados a partir de biomasa incluyen materiales cuya base de fabricación se compone de almidones (extraídos de fuentes como maíz, trigo, papa y yuca), proteínas, celulosas (obtenidas de pulpa de madera, algodón o cáñamo) o mezclas de estas materias primas con plásticos convencionales (G.-Q. Chen, 2010b; HGCA, 2009).

Se consideran polímeros biodegradables a aquellos plásticos que, gracias a su estructura química, pueden ser degradados naturalmente por acción microbiana, dando lugar a agua y dióxido de carbono en condiciones aerobias o a metano, si la degradación ocurre en anaerobiosis. El término biopolímero es más específico y se refiere a los polímeros biodegradables que son producidos exclusivamente a partir de fuentes renovables. Los biopolímeros, como los PHAs y el ácido poliláctico (PLA) pueden ser generados mediante polimerización de carbohidratos o bien, mediante procesos fermentativos (Rojas- Garbanzo *et al.*, 2018).

Entre otros ejemplos de polímeros biodegradables estudiados para distintas aplicaciones pueden citarse las poli(ϵ -caprolactonas) (PCL), poli(p-dioxanonas) (PPDO), almidones, celulosas, quitina y quitosano (Akaraonye *et al.*, 2010).

El ácido poliláctico (PLA) es uno de los bioplásticos más conocidos. Su desarrollo tecnológico se sitúa en una etapa avanzada en comparación con el de los PHAs y los procesos para su producción industrial se encuentran bien establecidos. El costo del PLA es ligeramente mayor, y, en algunos casos, comparable al de los plásticos convencionales. Pese a esto, presenta ciertas desventajas como la dificultad de la polimerización necesaria para la elaboración del material, su inestabilidad térmica y un rango limitado de aplicaciones dadas sus propiedades mecánicas (Chen, 2009). Por esto, se ha estimulado la investigación de otros bioplásticos, como los PHAs.

El PHB presenta limitaciones como plástico, debido a que constituye un material quebradizo y de alta dureza; sin embargo, las características mecánicas del polímero, tales como dureza, flexibilidad o elasticidad, pueden ser mejoradas mediante su combinación con otros monómeros de PHAs, con plásticos de distinta naturaleza, o con la incorporación de algunos aditivos (Somleva *et al.*, 2013).

A pesar de que los bioplásticos representan un 1% del total de 320 millones de toneladas de plástico producidas anualmente, su mercado presenta un crecimiento muy dinámico, producto de diversos factores, entre ellos: una mayor demanda de productos sostenibles por parte de los consumidores, las fluctuaciones en el precio del petróleo y una mayor concientización de la población sobre el cambio climático (European Bioplastics, 2019).

Es importante indicar que, a pesar de que muchos bioplásticos son biodegradables, estos deben desecharse correctamente al final de su vida útil, para maximizar sus beneficios ambientales. Existen métodos para disponer de estos materiales como: reciclaje, incineración para la recuperación de energía, compostaje y descarte en rellenos sanitarios. El compostaje industrial es el método predilecto para el descarte de los bioplásticos, pues, a diferencia de los procesos de domésticos, se logran

temperaturas lo suficientemente altas para la completa degradación del polímero (HGCA, 2009).

2.2. Aprovechamiento biotecnológico de subproductos agroindustriales para la producción de PHAs

2.2.1. *Idoneidad de los subproductos agroindustriales como sustratos de fermentación*

La actividad agroindustrial genera desechos con alto contenido de humedad y carga orgánica, lo que propicia su rápido deterioro, dificulta su manejo y acarrea problemas ambientales (Nayak & Bhushan, 2019). Para el caso de las frutas y vegetales tropicales, se estima que el porcentaje de material no aprovechado para el procesamiento oscila entre un 20 y un 60%, dependiendo del tipo de materia prima (Dávila-Aviña *et al.*, 2018)

Gracias al desarrollo en investigación, se ha evidenciado el potencial de estos residuos como fuentes de una variedad de productos de interés industrial. Las tecnologías actuales ofrecen alternativas para la recuperación sostenible y la reincorporación de ingredientes de alto valor agregado a las cadenas alimenticias. Por esto, el término “subproducto” ha sido acuñado y se utiliza cada vez con mayor frecuencia dentro de la comunidad científica en sustitución del término “residuo”, para enfatizar que estos constituyen en realidad sustratos valiosos para la recuperación de compuestos funcionales y la obtención de nuevos productos con alto valor de mercado (Galanakis, 2012).

El diseño de biorefinerías, entendidas como procesos de reciclaje de subproductos derivados de la industria para la generación de energía y otros productos como biomasa,

biofertilizantes y compuestos químicos de alto valor, gana cada vez más atractivo como una opción comercial sustentable. La producción de PHAs dentro de este esquema es una posibilidad viable (Nayak & Bhushan, 2009). Se reporta el uso de subproductos agroindustriales para la producción industrial de PHAs por parte de diversas compañías, por ejemplo: remolacha (Bio-On), caña de azúcar (Bio-Cycle) y maíz (Metabolix) (Tsang *et al.*, 2019).

Cerca de un 50% de los costos de producción de los PHAs dependen de las materias primas requeridas en el proceso de fermentación. La acumulación de estos polímeros ocurre en condiciones aerobias, lo cual conlleva pérdidas de carbono debido a la respiración celular. Por esto, menos de la mitad de la fuente de carbono es efectivamente utilizada para el crecimiento y la síntesis de PHAs. En estas condiciones, el uso de subproductos adecuados y abundantes regionalmente es una opción viable para el desarrollo de procesos económicamente atractivos (Koller *et al.*, 2010).

Pese a que los subproductos agroindustriales son materias primas promisorias para la producción de bioplásticos, estos requieren un tratamiento previo para mejorar sus cualidades biológicas y fisicoquímicas. Estos pretratamientos o procesos de conversión liberan monómeros en forma total o parcial a partir del subproducto específico (usualmente ricos en componentes lignocelulósicos), de modo que se incremente la accesibilidad de las proteínas y polisacáridos para procedimientos posteriores de fermentación (Tsang *et al.*, 2019). Ciertos materiales de descarte como melazas, jarabe de maceración de maíz, fibras de trigo y arroz y suero lácteo son algunos ejemplos de sustratos adecuados para la obtención de PHAs (Pakalapati *et al.*, 2018).

Dentro de las fuentes de carbono abundantes en los subproductos agroindustriales y que han sido estudiadas como precursoras de los PHAs se encuentran: azúcares simples (como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa), ácidos n-alcanoicos (entre ellos

ácido acético, ácido butírico, ácido valérico, ácido oleico y ácido propiónico) y alcoholes (metanol, etanol y glicerol) (Poli *et al.*, 2011; Santhanam & Sasidharan, 2010).

2.2.2. Aprovechamiento de subproductos para la síntesis microbiana de PHAs

Se han reportado experiencias de la conversión de efluentes residuales en ácidos orgánicos, que luego pueden ser utilizados como fuente de carbono para la producción de diversos compuestos con potencial económico, entre los cuales se encuentran los PHAs (Huschner *et al.*, 2015b). Para fermentaciones con un aislamiento de *Halomonas* sp. a partir de efluentes residuales del procesamiento de leguminosas y frutas, Elain *et al* (2016) reportaron productividades de PHAs de 1,6 g/L y 1,8 g/L, respectivamente.

Los subproductos del procesamiento de aceites vegetales son otro ejemplo de sustratos para la síntesis de PHAs, pues, debido a la variedad de triglicéridos que contienen, dan lugar a una mayor diversidad de polímeros que los azúcares simples. A partir de los subproductos del aceite de palma, por ejemplo, pueden producirse PHAs de cadena corta, media o mixtos. Entre los microorganismos estudiados como productores de PHAs en aceite de palma se encuentran *Erwinia* sp, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium* sp y *Cupriavidus necator* (Sudesh *et al.*, 2011). Yustinah *et al* (2019) reportaron contenidos de PHB de hasta 55% en base seca mediante fermentación con *Bacillus cereus*, utilizando un hidrolizado obtenido del fruto de la palma aceitera.

Los subproductos agroindustriales de frutas son también evaluados como posibles sustratos para la producción de PHAs. Sukruansuwan & Napathorn (2018) estudiaron la producción de PHB por parte de *Cupriavidus necator* a partir de subproductos derivados del procesamiento de la piña. Vega-Castro *et al* (2016) reportaron la producción de PHAs

con *Cupriavidus necator* a partir de cáscaras de piña hidrolizadas. Además, se ha logrado producir PHAs de cadena media a partir de hidrolizados de pulpas de diversas frutas como cerezas, albaricoques y uvas, obteniéndose las mejores productividades para estas últimas (21,2 g/L de pulpa) mediante fermentación con *Pseudomonas resinovorans* (Follonier *et al.*, 2014). Otros sustratos como bagazo de caña, cáscaras de naranja y cáscaras de banano han sido estudiados para la producción de PHAs empleando *Halomonas campisalis*. Aunque el microorganismo fue capaz de utilizar eficientemente todos los subproductos evaluados, la mejor productividad de los polímeros (47%) fue alcanzada al emplear el bagazo de caña (Kulkarni *et al.*, 2015).

2.2.3. Potencial de los subproductos de banano como sustrato para la producción de PHAs

El banano es uno de los principales productos agrícolas de Costa Rica, abarcando cerca del 10% del total de exportaciones del país (PROCOMER, 2016). La variedad Grand naine (*Musa acuminata*) es un cultivar del grupo Cavendish (AAA) y corresponde a la principal especie de banano producida en Costa Rica (Rojas- Garbanzo *et al.*, 2018).

Costa Rica se sitúa entre los tres primeros exportadores de esta fruta a nivel mundial. Cerca del 1% del territorio nacional se encuentra dedicado al cultivo de este producto, ubicándose la mayor extensión de plantaciones en la provincia de Limón (CORBANA, 2019).

Como consecuencia de los altos volúmenes de producción, existe un importante impacto ambiental producto de los desechos generados durante las diversas etapas de la cosecha y el procesamiento del banano (Steiner, 2006). Los subproductos del procesamiento de frutas se encuentran disponibles en grandes cantidades; sin embargo, generalmente no suelen ser empleados como materias primas en procesos industriales

pese a la amplia variedad de sustancias biológicamente activas que contienen (Guylène *et al.*, 2009).

El encontrar opciones para el aprovechamiento del banano de rechazo y de los subproductos del procesamiento industrial de la fruta fresca es una preocupación nacional (Rojas- Garbanzo *et al.*, 2018). Durante el año 2019 se exportaron 2 188 685 toneladas métricas de banano. Dicho volumen de exportaciones corresponde a cerca de un 85% de la producción total del país (CORBANA, 2019). A partir de este dato se estima que anualmente se generan aproximadamente 328 303 toneladas de banano de rechazo en las plantas empacadoras.

Cerca de un 70% del banano de rechazo es aprovechado por industrias alimentarias y convertido en jugos o puré, y el restante 30% se destina a consumo de fruta fresca en el mercado nacional, alimentación animal o se desecha de manera inadecuada (Steiner, 2006).

A partir del procesamiento del banano de rechazo de exportación se obtienen dos tipos de residuos: las cáscaras y el desecho de pulpa, que contiene la vena central y las semillas. Suponiendo un aprovechamiento de al menos el 50% del banano rechazado por parte de la agroindustria, el volumen de residuos generados mensualmente podría oscilar entre las 301 y las 559 toneladas (Rojas- Garbanzo *et al.*, 2018).

La pulpa de banano maduro constituye una materia prima atractiva como sustrato de fermentación microbiana por su alto contenido de azúcares disponibles como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y arabinosa (G. A. Pereira *et al.*, 2018) .

El Cuadro 1 muestra la composición de este producto.

Cuadro 1. Composición nutricional de la pulpa de banano maduro (*M. acuminata* Colla)

Componente	Contenido (en 100g de peso fresco)
Carbohidratos (g)	21 - 23
Azúcares totales (g)	12.23
Proteína (g)	1.1
Lípidos (g)	0.3
Minerales	
Sodio (mg)	1
Potasio (mg)	358-385
Calcio (mg)	5-8
Magnesio (mg)	27-30
Fósforo (mg)	22
Hierro (mg)	0.26-0.42
Cobre (mg)	0.11
Zinc (mg)	0.15-0.18
Manganeso (mg)	0.2
Vitaminas	
Vitamina E (mg)	0.1-0.2
Vitamina A (µg)	64
Vitamina C (mg)	8.7-11.7
Tiamina (mg)	0.03-0.04
Riboflavina (mg)	0.07
Niacina (mg)	0.61-0.66
Ácido Pantoténico (mg)	0.28
Vitamina B6 (mg)	0.36-0.47
Folatos (µg)	20-23
Biotina (µg)	2.6
Aminoácidos	
Isoleucina (mg)	34
Leucina (mg)	71
Lisina (mg)	50
Metionina (mg)	14
Cistina (mg)	20
Fenilalanina (mg)	41
Tirosina (mg)	26
Treonina (mg)	36
Triptófano (mg)	13
Valina (mg)	49
Arginina (mg)	57
Histidina (mg)	86
Alanina (mg)	43
Ácido aspártico (mg)	120
Ácido glutámico (mg)	115
Glicina (mg)	41
Prolina (mg)	43
Serina (mg)	49

Fuente: Guylène Aurore *et al* (2009) y Pareek (2016)

2.3. Polihidroxicanoatos (PHAs): aspectos generales

2.3.1. Propiedades de los PHAs

Los polihidroxicanoatos (PHAs) están conformados por monómeros de ácidos grasos hidroxilados, formando un poliéster lineal de masa molecular de entre 2×10^5 y 3×10^6 Da. Su peso molecular depende de factores del proceso de producción, como: microorganismo productor, composición del sustrato, estado del inóculo bacteriano, condiciones de cultivo y operaciones de extracción y purificación (Rai *et al.*, 2011).

Los PHAs cuentan con un grupo alquilo (R) enlazado al C-3, cuyo número de carbonos varía entre 1 y 14 (Figura 1). La longitud de este grupo da lugar a la clasificación de los PHAs en dos categorías: de cadena corta, con 5 carbonos o menos, y de cadena media, que contienen de 6 a 14 carbonos (Atlić *et al.*, 2011b; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

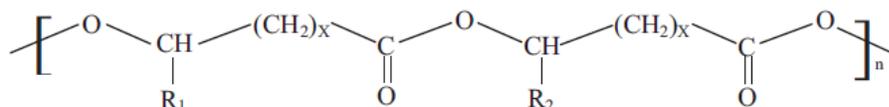


Figura 1. Estructura química general de los polihidroxicanoatos (PHAs)
R1 y R2: grupos alquilo. X: 1-4. n: 100-30000 Fuente: Leong *et al* (2014)

Las propiedades físicas de los PHAs como temperatura de transición vítrea, punto de fusión y cristalinidad están determinadas por la longitud de su cadena lateral y el tipo de grupo funcional que presenta. Dentro de la célula, los PHAs se encuentran en un estado fluido y amorfo; sin embargo, las operaciones de recuperación convierten el polímero a un estado cristalino (Akaraonye *et al.*, 2010).

Desde su descubrimiento en 1920, se han identificado más de 150 distintos monómeros que pueden incorporarse en un PHA. Las variaciones en la composición de los monómeros determinan las propiedades del material, originando polímeros aptos para diversas aplicaciones. Por esto, producto de investigación ha sido la identificación de sustratos de la PHA polimerasa y la caracterización de los bioplásticos producidos a partir de los mismos (Agnew & Pflieger, 2013).

Dentro de los PHAs de cadena corta, el polihidroxiбутirato (PHB), un homopolímero de ácido 3- hidroxibutírico (Figura 2), es uno de los bioplásticos más estudiados.

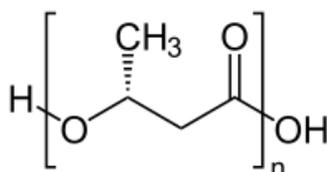


Figura 2. Estructura química del polihidroxiбутirato (PHB)

Las propiedades mecánicas del PHB son comparables a las de los plásticos convencionales, pudiendo ser extruido, moldeado en fibras o películas o combinado con otros polímeros. Posee, además, otras propiedades deseables como: alta resistencia a la humedad, pureza óptica y baja permeabilidad al oxígeno (Khanna & Srivastava, 2005a). El PHB presenta un punto de fusión cercano a los 180 °C y una temperatura de transición vítrea de 4°C. Constituye un polímero altamente cristalino (55-80%), dando lugar a materiales de alta fragilidad y rigidez. Estas propiedades pueden limitar sus aplicaciones, por lo cual es conveniente incorporar otros tipos de monómeros en la estructura del bioplástico. El hidroxivalerato (HV) resulta muy útil en este sentido, pues

permite mejorar las propiedades del material y ampliar el rango de temperaturas en las que éste puede ser procesado (Albuquerque *et al.*, 2011).

A diferencia de otros plásticos biodegradables, el PHB es completamente degradable por acción microbiana, produciéndose agua y dióxido de carbono en condiciones aerobias, o bien, metano mediante fermentación anaerobia. Las propiedades del polímero, así como las condiciones de humedad, temperatura y pH impactan la velocidad de degradación. En ambientes naturales, los microorganismos degradan el polímero por la acción de las PHA despolimerasas extracelulares (Akaraonye *et al.*, 2010).

2.3.2. Comercialización de los PHAs

Las primeras iniciativas de comercialización de los PHAs ocurrieron cerca de 1960 al desarrollarse un proceso de producción bacteriana de poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) por parte de WR Grace & Compañía; sin embargo, su aplicación fue limitada dada la baja eficiencia de producción y extracción del polímero. Posteriormente, la empresa Imperial Chemical Industries Ltd. comercializó el copolímero P(3HB-co-3HV) con el nombre comercial de Biopol™ para luego vender la tecnología a Monsanto y, más tarde, a Metabolix (Laycock *et al.*, 2013). A partir de ese momento, algunas compañías, como BASF (Alemania), ADM, P&G y Meredian (Estados Unidos) y Biocycles (Brasil) implementaron procesos productivos para estos bioplásticos y los comercializaron como materiales crudos o en forma de productos terminados (Chen, 2009).

Pese a estas iniciativas, el uso de productos de PHAs no se ha generalizado dado su elevado costo. Al ser un polímero intracelular, se requieren operaciones para la lisis celular y su extracción. Además, la selección de sustratos y las limitadas productividades logradas plantean un reto para el diseño de procesos rentables. Por esto, muchos

esfuerzos se dirigen a la aplicación de biología sintética a la síntesis de PHAs, a fin de identificar las vías metabólicas involucradas y trasladarlas a microorganismos más manejables que permitan obtener altas productividades y en los que las operaciones de purificación puedan simplificarse (Agnew & Pflieger, 2013).

A corto plazo, los usos más promisorios para los PHAs parecen encontrarse en la industria médica, farmacéutica y de biomateriales (Sirohi *et al.*, 2020) debido a que este sector industrial tiene la posibilidad de incorporar el alto costo del polímero en sus productos y a las atractivas características que presentan estos materiales en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad, pureza enantiomérica, insolubilidad en agua, baja toxicidad y facilidad de procesamiento (Leong *et al.*, 2014).

Se han desarrollado aplicaciones de los PHAs en nichos de mercado donde el consumidor está anuente a asumir un mayor costo por un producto biodegradable. Por ejemplo, la compañía Metabolix ha tenido éxito al incorporar su bioplástico Mirel™ en contenedores para jardinería, empaques y juguetes eco amigables, aun cuando el costo del material oscila entre \$2.25 y \$2.75 por libra, muy por encima del valor de \$0.75/lb de un análogo como el polipropileno (Agnew & Pflieger, 2013; Gholami *et al.*, 2016).

2.3.3. Síntesis microbiana de los PHAs

Los PHAs son sintetizados intracelularmente por numerosas bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas (Mostafa *et al.*, 2020; Pati *et al.*, 2020). La capacidad de almacenar este tipo de polímero confiere una ventaja ecológica, pues aumenta su probabilidad de supervivencia ante el estrés nutricional, térmico u osmótico (Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

La estructura, propiedades fisicoquímicas y composición de los monómeros de PHA varían de acuerdo con el microorganismo que lo produce. El polímero es almacenado en forma de cuerpos de inclusión lipídicos, con dimensiones entre los 0,2 y 0,5 μm (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Urtuvia *et al.*, 2014).

Se conocen al menos 75 géneros de bacterias productoras de PHB (Koller *et al.*, 2010), siendo *Cupriavidus necator* una de las especies más estudiadas (Cavalheiro *et al.*, 2009). Entre los microorganismos reportados como productores están: *Bacillus megaterium* (Gouda *et al.*, 2001; Kulpreecha *et al.*, 2009), *Bacillus cereus* (Valappil *et al.*, 2007), *Halomonas campisalis* (Kulkarni *et al.*, 2015), *Rhodobacter sphaeroides* (Sangkharak & Prasertsan, 2007), *Rhodopseudomonas palustris* y *Azohydromonas lata* (Ugwu *et al.*, 2011).

Los PHAs son acumulados intracelularmente a manera de reserva de energía (Cesário *et al.*, 2014; Pakalapati *et al.*, 2018). En la mayoría de los microorganismos, la acumulación es inducida cuando la célula experimenta condiciones de estrés debido a un desbalance nutricional (Amini *et al.*, 2020), típicamente un exceso de fuente de carbono acompañada de limitación en otros elementos como nitrógeno, magnesio, oxígeno, azufre o fósforo (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Getachew & Woldesenbet, 2016; Grousseau *et al.*, 2014c; Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004).

Sin embargo, ciertos grupos de microorganismos acumulan PHAs durante su fase de crecimiento exponencial, sin que dicha síntesis dependa de un desbalance nutricional. En este grupo pueden mencionarse: *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas* sp y algunas cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Khanna & Srivastava, 2005b; Koller *et al.*, 2010; Leong *et al.*, 2014). Por lo tanto, la estrategia de fermentación seleccionada para el proceso de producción de los PHAs debería considerar los requerimientos particulares del microorganismo a utilizar.

La bioprospección de microorganismos productores de PHB requiere el muestreo de diversos ambientes, como: suelos, aguas y lodos. El aislamiento se realiza incubando la muestra en un caldo rico en minerales y carbono, pero reducido en nitrógeno. El cultivo es inoculado en agar con una composición similar a la del caldo de enriquecimiento. (Alias & Tan, 2005). Preliminarmente, es posible diferenciar las cepas productoras de PHB adicionando al medio con agar algún colorante fluorescente adecuado para el polímero; por ejemplo, el Rojo Nilo en una concentración de 5 µg/mL. Las colonias productoras son visibles bajo luz ultravioleta. Estas colonias pueden recuperarse para estudiar su productividad cuantitativamente (Amirul *et al.*, 2008).

En el Cuadro 2 se resumen algunos de los microorganismos productores de PHB estudiados en diversas investigaciones, ejemplificando también cómo la síntesis de PHAs resulta factible a partir de sustratos agroindustriales variados.

Cuadro 2. Ejemplos de microorganismos y sustratos agroindustriales reportados en la literatura para la producción de PHB

Sustrato	Microorganismo	Productividad máxima PHB	Referencia
Algas marinas (<i>Sargassum</i> sp)	<i>Cupriavidus necator</i> (PTCC 1615)	74%	(Azizi <i>et al.</i> , 2017)
Trigo (paja)	<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	72%	(Cesário <i>et al.</i> , 2014)
Suero lácteo	<i>Escherichia coli</i> (modificada)	85%	(Pais <i>et al.</i> , 2009)
Melaza fermentada / Ácidos grasos volátiles	Cultivo mixto	56%	(Albuquerque <i>et al.</i> , 2011)
Hidrolizado de celulosa	<i>Escherichia coli</i> (modificada)	21%	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2011)
Hidrolizado de almidón de yuca	<i>Cupriavidus necator</i> (KKU38)	61%	(Poomipuk <i>et al.</i> , 2014)
Hidrolizado de aserrín	<i>Brevundimonas vesicularis</i> y <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	64 -72%	(Silva <i>et al.</i> , 2007)
Hidrolizado de bagazo de caña	<i>Cupriavidus necator</i> (<i>Ralstonia eutropha</i>)	57%	(Yu & Stahl, 2008)
Glicerol crudo	Cultivo mixto	67%	(Dobroth <i>et al.</i> , 2011)

El uso de cepas recombinantes de *E. coli* para la síntesis de PHAs es una línea de investigación importante, gracias a la experiencia acumulada para el cultivo de este microorganismo. Esta bacteria utiliza diversas fuentes de carbono, pudiendo sintetizar una gran variedad de PHAs a partir de las mismas. Además, es un microorganismo de rápido crecimiento y capaz de acumular concentraciones de los polímeros de hasta 80-90% en base seca. Otras ventajas del uso de *E. coli* son: la disponibilidad de procedimientos de recuperación y el hecho de que, contrario a lo que ocurre al emplear microorganismos que son productores naturales, no ocurre degradación del producto debido a la ausencia de despolimerasas intracelulares (Leong *et al.*, 2014).

Otro enfoque relacionado con la producción bacteriana de PHAs es el uso de cultivos microbianos mixtos y sistemas de fermentación abiertos. Este tipo de proceso es una alternativa para desarrollar tecnologías más económicas para la producción de PHAs con respecto a aquellas en las que se emplean cultivos puros (Gumel *et al.*, 2013).

2.3.3.1. Síntesis de PHB en *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator es una bacteria Gram negativa y aerobia estricta, conocida por su capacidad de sintetizar concentraciones de PHB de hasta un 80 -90% de su peso seco, empleando fuentes de carbono simples como glucosa, fructosa, alcoholes y ácidos orgánicos (Jung *et al.*, 2010). Posee cualidades no patogénicas, biocompatibles y tiene resistencia a ciertos compuestos tóxicos presentes en los subproductos agroindustriales. Además, *C. necator* es capaz de crecer y producir PHAs de manera autotrófica, utilizando CO₂, H₂ y O₂ como sustratos principales (Brigham *et al.*, 2012). Este microorganismo ha sido reclasificado en varias ocasiones, siendo anteriormente conocido como *Hydrogenomonas* sp, *Alcaligenes eutrophus* y *Ralstonia eutropha*. Más recientemente se ha encontrado en la literatura con la denominación *Wautersia eutropha* y, posteriormente, con la de *Cupriavidus necator* (Franz *et al.*, 2011).

La ruta biosintética del PHB involucra tres diferentes enzimas localizadas en el citosol de la célula, donde ocurre la acumulación de PHB. El acetyl-CoA es el primer sustrato del sistema enzimático. En *C. necator*, la enzima β-cetotiolasa, codificada por el gen *phbA*, condensa dos moléculas de acetyl-coA para formar acetoacil-coA. Una reductasa de acetoacil-co-A, dependiente de NADPH y codificada por el gen *phbB*, convierte este intermediario en 3-hidroxi-butiril-co-A. El paso final de la síntesis es una reacción de polimerización catalizada por la enzima PHB-sintasa, codificada por el gen *phbC*. La

PHB-sintasa de *C. necator* reacciona con un rango limitado de sustratos con cadenas de entre 3 y 5 carbonos, con preferencia por cadenas de 4 carbonos. Por esto, los PHAs obtenidos por esta vía contienen monómeros de cadena corta (Khanna & Srivastava, 2005a; Park *et al.*, 2011; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

En condiciones nutricionales balanceadas, el acetil-CoA es dirigido al ciclo del ácido tricarbóxico (ATC) y el CoA resultante actúa como inhibidor de la actividad de la β -cetotilasa, bloqueando la síntesis del PHB. Al ocurrir un desbalance nutricional, la concentración de NADPH aumenta, inhibiendo la actividad de las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, las cuales están involucradas en el ciclo del ATC. Producto de esto, el acetil-CoA no utilizado empieza a acumularse. La biosíntesis del PHB se dispara cuando los niveles de acetil-CoA aumentan hasta el punto en que se logra sobrepasar la inhibición de la β -cetotilasa (Poomipuk *et al.*, 2014).

La ruta biosintética del PHB es una ruta metabólica dedicada, es decir, que no es utilizada para la síntesis de otros metabolitos. Una excepción se da cuando hay presencia de propionato en el sustrato de fermentación, lo cual lleva a la producción de 3- hidroxivalerato. Existen numerosos microorganismos capaces de sintetizar un copolímero de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato (3HB-co-3HV), con propiedades mecánicas más versátiles y menos quebradizas que las del polímero de PHB (Agnew & Pflieger, 2013; Chanprateep, 2010). La ruta metabólica involucrada en la síntesis del polímero se ilustra en la Figura 3.

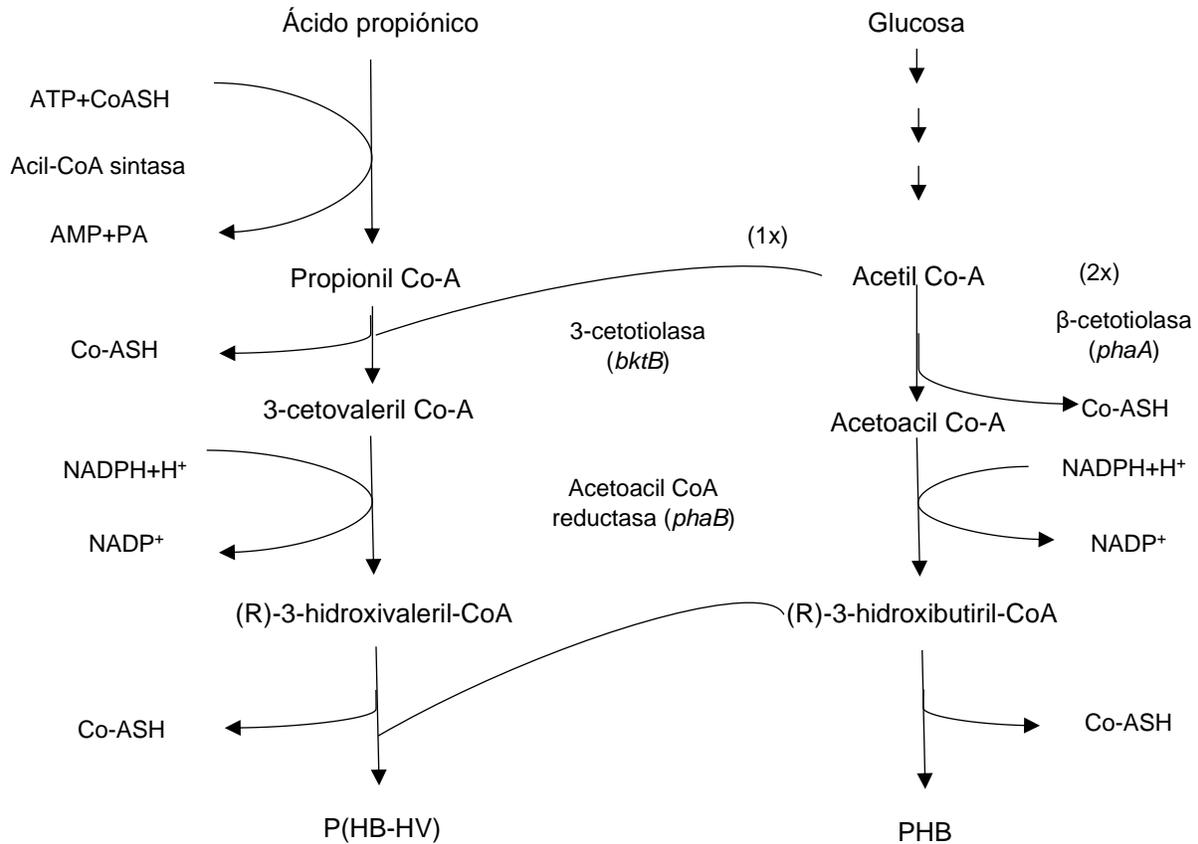


Figura 3. Ruta metabólica para la síntesis de PHB y P(HB-HV) en *Cupriavidus necator*
Fuente: Suriyamongkol *et al* (2007)

Además de las enzimas ya mencionadas, se ha encontrado que un grupo de proteínas fascinas (PhaPs) interviene en la organización de los gránulos de PHAs. Dichas proteínas se asocian con la superficie de los gránulos, siendo indispensables para su coalescencia y su estabilidad, así como para la síntesis de los polímeros (Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

C. necator suele acumular intracelularmente entre 8 y 13 gránulos de PHAs. Debido a su capacidad de refracción, los gránulos de PHAs pueden observarse en un microscopio con contraste de fases al realizar una tinción con Negro Sudán II. Además,

estas inclusiones muestran fluorescencia de color naranja al ser teñidos con Azul Nilo A y observados a una longitud de onda de excitación de 460 nm (Leong *et al.*, 2014).

2.4. Procesos fermentativos para la producción de PHAs

El desarrollo de una fermentación para la producción de PHAs incluye la selección de la cepa, el estudio de la fermentación a escala de laboratorio, la optimización del proceso en biorreactores a escala de laboratorio y piloto y, finalmente, el escalamiento industrial. La obtención de una buena productividad de PHAs depende de varios factores como: la densidad de biomasa, el precio y disponibilidad del sustrato y el costo y la conveniencia del método de extracción (Chen, 2009). La Figura 4 presenta un ejemplo de las operaciones comúnmente utilizadas en un proceso de producción de PHAs.

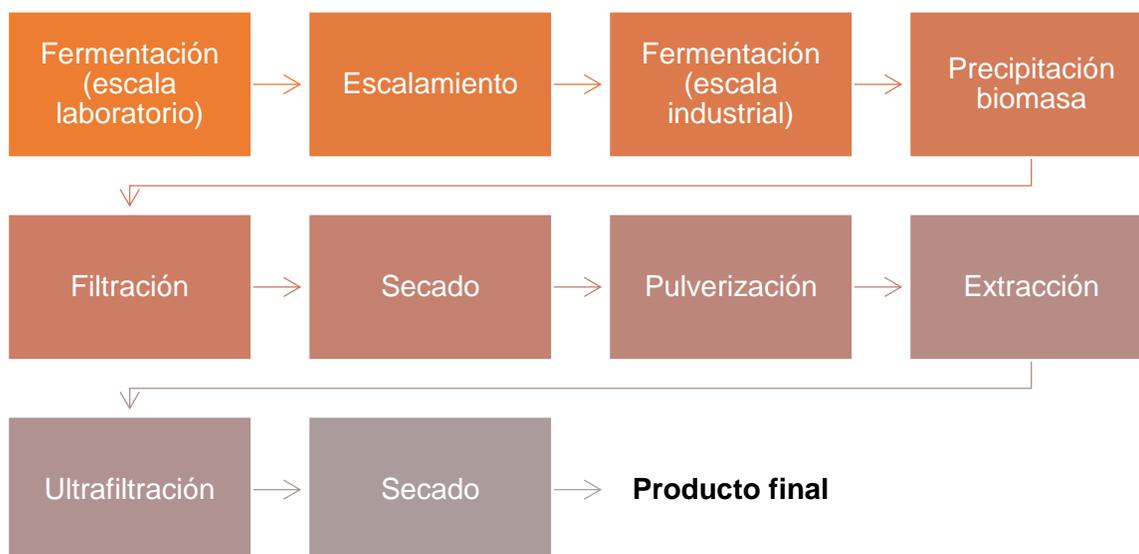


Figura 4. Proceso de fermentación, recuperación y purificación para la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs)
Fuente: G.-Q. Chen (2010)

Para la producción de PHAs con cultivos puros suelen utilizarse fermentaciones en lote con dos etapas. En la primera, el inóculo es introducido en un medio con una composición tal que promueva la obtención de una alta densidad celular. En la segunda etapa, un nutriente esencial (usualmente N, P u O₂) es limitado, generando condiciones de estrés e incentivando la síntesis del polímero (Keshavarz & Roy, 2010; Laycock *et al.*, 2013).

Varios autores han reportado mejoras en la producción de PHAs al usar fermentaciones de tipo lote alimentado, con respecto a otros sistemas (M. Li & Wilkins, 2020; Nygaard *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2017).

Huschner *et al* (2015) diseñaron un sistema de fermentación de tipo lote alimentado en tres etapas para *C. necator*, suministrando ácidos orgánicos derivados del procesamiento de aceite de palma como única fuente de carbono. La etapa de crecimiento de biomasa abarcó 16 h de cultivo y se empleó una relación C/N de 10. Posteriormente, la concentración de los ácidos orgánicos en la solución de alimentación fue modificada para obtener C/N de 90, la cual se mantuvo hasta las 36 h de fermentación, incentivándose en esta etapa una baja tasa de crecimiento de biomasa residual y una activación del metabolismo para mejorar la productividad de PHAs. Finalmente, durante la tercera etapa se suprimió el suministro de nitrógeno con el fin de detener el crecimiento celular y favorecer un aumento en la acumulación del polímero.

Mediante fermentación de tipo lote alimentado, Hafuka *et al* (2011) investigaron el efecto de distintos regímenes de alimentación en la acumulación de biomasa y la síntesis de PHB por parte de *C. necator* H16 (ATCC 17699) empleando como sustrato un filtrado proveniente de la fermentación de residuos de alimentos preparados. En el primer régimen, la totalidad del sustrato se adicionó al biorreactor al inicio de la

fermentación. Para el segundo régimen, la alimentación del sustrato se realizó por pulsos. Finalmente, en el tercer régimen, se empleó un sistema de alimentación continuo. La mayor producción de biomasa se obtuvo al alimentar el biorreactor en un único pulso. Sin embargo, las máximas concentraciones de PHB se lograron mediante los regímenes de alimentación en varios pulsos y continuo.

Mientras que al emplear procesos fermentativos por lote alimentado suele obtenerse un mayor rendimiento de biomasa y PHB, los procesos continuos pueden resultar ventajosos en algunas ocasiones debido a que los períodos operativos más extensos podrían contribuir a reducir los costos de producción (Franz *et al.*, 2011).

2.5. Extracción y cuantificación de PHB

La cromatografía de gases constituye el método de análisis instrumental por excelencia para la determinación de ácidos grasos. Este tipo de análisis no es aplicado directamente sobre dichos ácidos grasos, sino sobre sus ésteres, tales como metil, isopropil y butil ésteres, ya que de este modo se logra mejorar tanto la exactitud como la selectividad del análisis. Los metil ésteres constituyen el derivado lipídico más frecuentemente preparado a partir de muestras biológicas. Esto se debe a que se requieren temperaturas menores para su volatilización, lo cual contribuye a mejorar la forma del pico y la resolución entre señales (Carrapiso & García, 2000).

El detector de ionización de flama (FID) es frecuentemente utilizado para este tipo de análisis debido a que permite una cuantificación precisa de los derivados de los ácidos grasos, entre ellos, los metil ésteres. Durante la metilación, los lípidos O-acilo y N-acilo son transesterificados en presencia de un catalizador (usualmente ácido clorhídrico o sulfúrico) y un alcohol de cadena corta, por ejemplo, metanol, etanol o 2-

propanol. Los metil ésteres de los ácidos grasos pueden ser preparados ya sea a partir de lípidos aislados o directamente a partir de matrices como material vegetal, fluidos o células cultivadas, siendo posible de esta manera combinar el procedimiento de extracción y la transesterificación en un solo paso (Cruz-Hernández & Destailats, 2012).

La extracción de PHAs presentes en caldos de fermentación requiere la cosecha de la biomasa bacteriana mediante centrifugación. En ocasiones, dicha biomasa es desecada o liofilizada previo al procedimiento de extracción. El tratamiento de biomasa mediante metanólisis ácida para la extracción de PHB se encuentra reportado en la literatura (Albuquerque *et al.*, 2010; Dalal *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013).

La hidrólisis ácida permite la ruptura de los enlaces éster, tanto de la cubierta cristalina como del centro amorfo de los gránulos de PHB. Se considera que un tiempo de incubación de 4 h a 100°C resulta suficiente para la extracción del polímero a partir de muestras de biomasa, empleando una relación de alcohol y ácido de 3:1. Los tiempos de hidrólisis del polímero de PHB aumentan conforme disminuye la concentración de ácido (Werker *et al.*, 2008).

La ruptura celular, la hidrólisis del polímero y la síntesis de los metil ésteres a partir de los monómeros generados ocurre durante la metanólisis ácida. Experimentalmente, esta metodología implica la adición de una solución de ácido sulfúrico en metanol a las muestras de biomasa, en concentraciones que pueden variar entre 3% y 20% y su incubación en condiciones de agitación y alta temperatura. Las temperaturas reportadas para la metanólisis en la literatura varían entre 90°C y 100 °C, mientras que los tiempos de incubación oscilan entre las 2 y las 3,5 horas (Divyashree *et al.*, 2009; Dobroth *et al.*, 2011; Pieja *et al.*, 2011; Purama *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2012).

Después de la metanólisis, la extracción de los metil-ésteres se realiza adicionando un solvente, por lo general cloroformo, y agua. Después de la separación de las fases acuosa y orgánica, esta última es extraída para su análisis por CG (Werker *et al.*, 2008).

En el Cuadro 3 se resumen algunos estudios en los cuales la cromatografía de gases ha sido aplicada para la cuantificación de PHB y otros polihidroxicanoatos.

Es factible la utilización de estándares distintos a los detallados en el Cuadro 3 para la ejecución de este análisis, entre ellos: PHB (B.-Y. Chen *et al.*, 2012; Divyashree *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009), polihidroxitirato-co-hidroxivalerato P(HB-co-HV) (Albuquerque *et al.*, 2010; Divyashree *et al.*, 2009) y Ácido poli-3 hidroxibutírico (Liu *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Ejemplos de condiciones de análisis para la cuantificación de PHB por Cromatografía de Gases, reportados en la literatura

Columna	Condiciones	Estándar	Referencia
DB-WAXetr (30 m x 0,35 mm con grosor de 0.1 µm)	Gas: N ₂ , 3 mL/min T inyección y detección: 250 °C Programa T: 80°C por 4 min e incrementos de 8°C/min a 160 °C Detección FID	Metil (R)-3 hidroxi butirato	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
INNOWAX 19095N - 123	Gas: Helio 25 mL/min T inyección: 50 ° T detección: 250 °C Programa T: 90 °C por 0,1 min, incremento gradual a 150 °C (5 min) y 210°C (5 min) Detección FID	Propil ésteres PHAs	(Çiğgin <i>et al.</i> , 2009)
HP-Innowax (30 m x 0,25 mm, 0,5 mm grosor)	Gas Helio: 1,8 mL/min Programa T: 110 °C (5 min), incrementos de 3 °C/min hasta 130 °C e incrementos de 5°C/min a 250 °C Detección FID y MS	Ácidos 3-hidroxi alcanoicos (metilados)	(Davis <i>et al.</i> , 2013)
ZB1 Phenomenex (30 m x 0.25 mm)	Gas: Helio 1,2 mL/min Programa T: 40 °C (2 min), aumento de 5 °C/min hasta 200 °C Detección MS	No aplica	(Dobroth <i>et al.</i> , 2011)
HP-Innowax	Detección FID	PHB (propil ésteres)	(Moralejo-Gárate <i>et al.</i> , 2013)
BP21	Gas: N ₂ , 35,5 mL/min T inyección: 170 °C T detección: 190 °C T horno: 90 °C Detección FID	Metil ésteres del ácido 3-hidroxi butírico	(Kulkarni <i>et al.</i> , 2010)
HP-5	Detección FID	Sal de sodio del ácido DL-β-hidroxi butírico	(Pieja <i>et al.</i> , 2011)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la idoneidad de un subproducto del procesamiento del banano como suplemento nutricional en la implementación de un proceso fermentativo para la producción de polihidroxi butirato (PHB), empleando al menos una cepa de la bacteria *Cupriavidus necator*.

3.1.1. Objetivos Específicos

1. Definir un método de análisis para la detección y cuantificación de polihidroxi butirato (PHB) a partir de biomasa bacteriana.
2. Comparar la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas nativas, así como de una cepa control de *Cupriavidus necator* empleando un medio de cultivo químicamente definido, con el fin de seleccionar aquella cepa que presente el mejor rendimiento de PHB.
3. Diseñar un medio de cultivo para la producción de biomasa bacteriana productora de PHB, suplementando el mismo con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y con un subproducto del procesamiento de banano como fuente de carbono, con el fin de buscar una alternativa para el aprovechamiento de este residuo.
4. Implementar un proceso de fermentación para realizarse en un biorreactor de 5 litros, utilizando el medio de cultivo diseñado previamente y la cepa bacteriana que presente el mejor rendimiento de PHB.

4. METODOLOGÍA

4.1. Localización del proyecto

Las actividades correspondientes a los objetivos 1, 2 y 3 se realizaron en los laboratorios de Microbiología y de Química y en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. Las actividades del objetivo 4 se ejecutaron en las instalaciones del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot).

4.2. Subproducto de banano

El residuo que se evaluó en el proyecto fue suministrado por la empresa Mundimar, ubicada en Guápiles, Limón. Luego de las operaciones de pelado, molienda y filtrado del banano durante el proceso de producción de la pulpa, se obtuvo un subproducto que consistió en un puré con un alto contenido de semillas, retenido en el último tamiz del proceso agroindustrial. Para este proyecto, se trabajó con este último retenido del proceso (Thompson, 2015).

El residuo de puré de banano y sus semillas fue sometido a un tratamiento de maceración enzimático con el complejo Crystalzyme® PMLX (White Labs) con actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa y, posteriormente, a un prensado con una prensa neumática para obtener un jugo de banano a 20° Brix y pH 3,6, siguiendo el proceso desarrollado por Thompson (2015). El jugo del subproducto de banano (JSB) se utilizó como suplemento para el objetivo 3. Los detalles de rendimiento del jugo obtenido se muestran en la Figura 5.

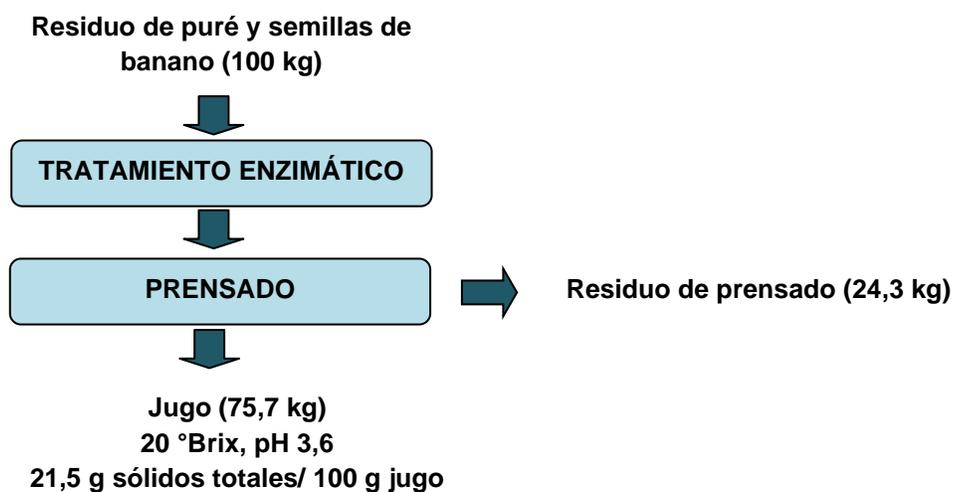


Figura 5. Diagrama del procedimiento para la obtención del jugo de subproducto de banano (JSB). Fuente: (Thompson, 2015)

La caracterización química del JSB, realizada por los Laboratorios de Química del CITA y el CINA, se detalla en el Cuadro 4. El jugo se empacó en bolsas y se conservó en congelación a -20°C para su uso posterior en el estudio.

Cuadro 4. Composición del jugo proveniente del subproducto de banano (JSB)

Componente	Concentración	Método de análisis	Laboratorio responsable
Sacarosa (g/ 100 g)	1,88 ± 0,04	HPLC, columna Zorbax Carbohydrate	CITA-UCR
Glucosa (g/ 100 g)	6,97 ± 0,45		CITA-UCR
Fructosa (g/ 100 g)	6,75 ± 0,43		CITA-UCR
Nitrógeno (g/ 100 g)	0,056 ± 0,001	920.152 AOAC 2012	CITA-UCR
Calcio (mg/ 100 g)	11,62 ± 0,39	985.35 AOAC 2012	CITA-UCR
Sodio (mg/ 100 g)	0,64 ± 0,04		CITA-UCR
Potasio (mg/ 100 g)	214,48 ± 6,3		CITA-UCR
Hierro (mg/ 100 g)	0,07 ± 0,002		CITA-UCR
Magnesio (mg/ kg)	305,76 ± 2,02	AOAC 975.03, AOAC 985.35	CINA-UCR
Fósforo (mg/ kg)	258,85 ± 20,95	AOAC 965.17, AOAC 986.24	CINA-UCR
Azufre (g/ 100 g)	1,38 ± 0,01	AOAC 924.06/924.27	CINA-UCR

4.3. Microorganismos

4.3.1. Cepas bacterianas

Como microorganismo de referencia para la producción de PHB se utilizó la cepa *Cupriavidus necator* (ATCC 17699). Las cepas bacterianas nativas evaluadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) a partir de su colección proveniente de diversas localidades costarricenses.

Las bacterias evaluadas se cultivaron inicialmente en agar M9 (Na₂HPO₄ 12,8 g/L; K₂HPO₄ 3 g/L; NaCl 0,5 g/L; NH₄Cl 1 g/L; Glucosa 20% 20 mL; MgSO₄ 1M 2 mL; CaCl₂ 1M 0,1 mL y tiamina 0,5% 0,1 mL). Para la evaluación presuntiva de su capacidad de síntesis de PHB, los aislamientos se sometieron a una tinción con azul de Nilo y se

observaron al microscopio de fluorescencia (Leong *et al.*, 2014; Ostle & Holt, 1982; Poomipuk *et al.*, 2014).

Las cepas que presentaron fluorescencia fueron identificadas mediante secuenciación de los genes ribosomales 16S. Las actividades anteriores fueron realizadas por personal del CIBCM. El Cuadro 5 muestra los códigos asignados a las cepas bacterianas evaluadas en su capacidad de producción de PHB en medio sintético.

Cuadro 5. Cepas bacterianas evaluadas en su capacidad de producción de PHB

Código Cepa	Procedencia	Características
CR-12	Suelos bananeros	Coco bacilos Gram -
M1-103B No. 14	Aguas Claras, Upala	Coco bacilos Gram -
M3-104 BB No. 6B	La Verbena, Upala	Bacilos Gram -
M5-103 NO.17	Guatuso	Bacilos Gram -
M2-103 NO.8	Aguas Claras, Upala	Coco bacilos Gram -
M4-103 NO.4	La Verbena, Upala	Bacilos Gram -
M5-104-A NO.9	Guatuso	Bacilos Gram -
52-102-C	Origen desconocido	Coco bacilos Gram -
52-102-A	Origen desconocido	Coco bacilos Gram -
M2-103-A	Aguas Claras, Upala	Coco bacilos Gram -
M4-103	La Verbena, Upala	Bacilos Gram -

4.3.2. Conservación de microorganismos

Tanto para su conservación como para contar con inóculos de trabajo, cada cepa se cultivó durante 24 h a 30 °C en 2 placas de Agar Tripticasa Soya (TSA). El crecimiento bacteriano se transfirió a un tubo con 40 mL de Caldo Tripticasa Soya (TSB) y se homogenizó con un agitador vortex, hasta lograr una concentración equivalente al estándar 4 de Mc Farland. La suspensión se distribuyó en porciones de 800 µL en crioviales con 200 µL de glicerol estéril (Tedeschi & De Paoli, 2011). Los crioviales se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.4. Definición del método de análisis para la cuantificación de polihidroxiбутirato (PHB)

Se utilizó cromatografía de gases (CG) como método para la detección y cuantificación de los metil-ésteres del ácido 3-hidroxiálcanoico (Cavalheiro *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2013; García *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2009).

4.4.1. Equipo y condiciones

Tanto para la implementación del método de cuantificación de PHB como para el análisis de muestras correspondientes al objetivo específico 2, se utilizó el cromatógrafo de gases GC-2014 (Shimadzu), con un detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés) (Albuquerque *et al.*, 2010; Grousseau *et al.*, 2014a; Moralejo-Gárate *et al.*, 2013). La captura de los datos se llevó a cabo empleando el software GC Solution (Shimadzu).

Para el análisis de las muestras de fermentación asociadas al objetivo específico 4, la lectura fue realizada en un cromatógrafo 7820A (Agilent Technologies), acoplado a un detector de masas 5977B MSD (Agilent Technologies).

Se empleó la columna HP-Innowax, con longitud de 30 m, diámetro interno de 0,25 mm y espesor de 0,25 μm (Ashby *et al.*, 1998; Çiğgin *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2013). Inicialmente, se tomó como base las condiciones de análisis propuestas por Davis *et al.* (2013): volumen de inyección: 2 μL , relación "Split": 20:1, gas acarreador: helio, flujo de gas: 8 mL/ min y temperatura del inyector y del detector: 250 °C. Se ejecutó un incremento de temperatura de la columna de 120 °C a 220 °C, con una velocidad de 3 °C/ min.

4.4.2. Preparación de curvas de calibración

Para la detección y cuantificación del PHB se utilizó como estándar el Metil (R)-3 hidroxibutirato (Sigma®), con una pureza del 99% (Cavalheiro *et al.*, 2009) y como estándar interno el ácido benzoico (Coats *et al.*, 2008) con una pureza de 99,9%.

a. Curva de calibración de Metil (R)-3 hidroxibutirato

Para cada una de las curvas de calibración, en un balón aforado se prepararon 25 mL de una disolución madre de metil-3-hidroxibutirato (M3-HB) con una concentración aproximada de 8000 mg/L, en cloroformo. A partir de esta disolución, se preparó la curva de calibración de entre 8 y 13 puntos, en un rango de concentraciones de 80 a 6000 mg/L, aproximadamente.

Se preparó un volumen de 1 mL de disolución para cada punto de la curva y se encapsuló cada vial rápidamente para evitar la volatilización del cloroformo, Los viales se conservaron a -20°C cuando no se analizaron inmediatamente.

b. Curva de calibración de ácido benzoico

Se preparó una curva de calibración del ácido benzoico (Azizi *et al.*, 2017; Coats *et al.*, 2008), incluyendo entre 8 y 13 disoluciones con concentraciones entre 80 y 6000 mg/ L, aproximadamente por triplicado. Para cada uno de estos puntos, se pesó la masa del estándar correspondiente y se disolvió en 6 mL de solución de Metanol: Ácido sulfúrico (85:15). Las disoluciones se colocaron en viales de espacio de cabeza y se sellaron con tapa metálica y septo.

Las disoluciones se sometieron a metanólisis ácida mediante el mismo procedimiento aplicado a las muestras de fermentación, detallado en el apartado 4.4.6. Las disoluciones se almacenaron a -20 °C hasta el momento del análisis.

4.4.3. Determinación de límites de detección y cuantificación

Para el análisis de CG con detección FID, los límites de detección y cuantificación para el 3-MHB se calcularon a partir de tres repeticiones de las curvas de calibración elaboradas. Para esto, se seleccionaron los niveles de concentración bajos (0,08 g/L), medios (2,1 g/L) y altos (5,3 g/L) de las curvas de calibración y se calculó la desviación estándar (s) en cada uno de estos niveles. Estos tres puntos se ajustaron mediante un modelo lineal, donde “ x ” corresponde a la concentración y “ y ” a la desviación estándar. Se buscó la recta de mejor ajuste y se empleó la misma para hacer una extrapolación de s para una concentración de cero o blanco (s_0). Este valor se multiplicó por 3 para obtener el límite de detección y por 10 para calcular el límite de cuantificación (Dejaegher *et al.*, 2012; Eurachem, 2014; Standards Council of Canada, 2003)

Para el análisis CG con detección de masas, los límites de detección y cuantificación se calcularon mediante la ejecución de una prueba de extinción (SAC-SINGLAS, 2012). Para esto, se preparó una disolución del estándar de Metil (R)-3 hidroxibutirato en cloroformo con una concentración de 0,098 g/L, correspondiente al punto más bajo de la curva de calibración realizada. Se realizaron diluciones de dicha disolución y se inyectaron en el cromatógrafo hasta obtener un pico con una altura apenas distinguible con respecto a la señal de ruido. Se calculó la relación señal ruido (S/N) empleando las alturas de los picos del estándar y del ruido. Como límite de detección se consideró la concentración correspondiente a la magnitud de la relación S/N multiplicada por 3. El límite de cuantificación se calculó a partir de un valor de 10 veces la relación S/N.

4.4.4. Determinación del porcentaje de recuperación del método

Se emplearon los resultados de la cuantificación de ácido benzoico mediante CG-FID para calcular el porcentaje de recuperación de la metodología de extracción de PHB mediante metanólisis ácida (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) & Organización Mundial de la Salud (OMS), 2017).

4.4.5. Extracción de PHB a partir de caldos de fermentación

Para evaluar la factibilidad de extraer PHB directamente a partir del caldo de fermentación (sin separación previa de la biomasa), varias muestras de 2 mL de caldo se sometieron al proceso de extracción por metanólisis. Se analizaron tres tipos de muestra: a) JSB puro; b) JSB con estándar de PHB (Sigma) añadido en una concentración de 5 g/L y c) cultivo de *C. necator* en medio suplementado con JSB.

Para las muestras de fermentación, se optó por aplicar el proceso de extracción de PHB a partir de biomasa recuperada. Para esto, se midieron 2 mL del caldo de cultivo y se centrifugó en porciones de 1 mL en tubos para microcentrífuga a 10600 rcf (fuerza centrífuga relativa, por sus siglas en inglés) durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se conservaron los botones celulares a -20°C. Se resuspendieron los botones de cada muestra en 2 mL de agua destilada y se transfirieron a viales de espacio de cabeza. En cada vial con muestra se adicionaron 4 mL de una solución de ácido benzoico 2,4 g/L en metanol: ácido sulfúrico; 85:15 (Dalal *et al.*, 2010). Se agregaron 2 mL adicionales de metanol: ácido sulfúrico a cada muestra. Los viales se sellaron con tapa metálica y septo y se colocaron en un baño termostático con agitación a 90 °C – 95 °C durante 3 h para el proceso de metanólisis (Cavalheiro *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2013; Dobroth *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012).

Los viales se enfriaron completamente en un baño con hielo, para luego introducir con jeringa en cada uno 1,5 mL de agua destilada y 3 mL de cloroformo. Se agitaron vigorosamente y se colocaron boca abajo hasta observar una separación de fases. Con la ayuda de una jeringa con aguja, se pinchó el vial y se extrajo la fase orgánica (inferior). Se desecó el extracto sobre sulfato de sodio anhidro en un tubo para microcentrífuga (Coats *et al.*, 2008) y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm . Se encapsuló el filtrado en viales para CG con insertos. Las muestras se conservaron a -20°C en posición vertical hasta el momento del análisis.

4.4.6. Análisis de muestras

Se realizó una inyección de tolueno para limpiar la columna antes de iniciar cada lote de análisis de muestras y como rutina de limpieza después de cada 5 inyecciones. Se llevó a cabo un ajuste de cero para lograr la estabilización de la línea base y se utilizó la función de inyección automática del equipo. Se corrieron las muestras de la curva de calibración durante 11 minutos dada la pureza de la disolución. Las muestras de fermentación se corrieron por 18,3 minutos para asegurar la salida de posibles residuos.

4.5. Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas

La producción de PHB, tanto para la cepa de referencia como para las cepas nativas, se evaluó en un medio químicamente definido basado en la composición propuesta por Khanna & Srivastava (2005b), con la modificación de que como fuente de nitrógeno se

empleó NH_4Cl a una concentración de 5 g/L. La composición de este caldo se detalla en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Caldo de cultivo empleado para la evaluación de la producción de PHB por parte de las distintas cepas bacterianas

Componente	Concentración
Fructosa	40 g/L
NH_4Cl	5 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
NaH_2PO_4	4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,51 g/L
CaCl_2	0,02 g/L
Solución trazas	1 mL/L
Composición sol trazas	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 13 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 6 mg/L, H_3BO_3 : 6 mg/L

Las fermentaciones se llevaron a cabo en dos etapas: la primera para la producción de biomasa en un caldo nutritivo, y la segunda para inducir la producción de PHB en un caldo rico en carbono y con cierta limitación de nitrógeno (Amirul *et al.*, 2008; El-Sayed *et al.*, 2009; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2015; Khanna & Srivastava, 2005b; Yang *et al.*, 2010).

Para la primera etapa de la fermentación, se inoculó 1 mL del cultivo previamente congelado en crioviales en 50 mL de Caldo Tripticasa Soya (TSB, por sus siglas en inglés). Se incubaron los cultivos durante 24 h a 30 °C y 150 rpm. Después de la incubación, se verificó la pureza de cada cultivo mediante tinción de Gram. Se realizó un recuento de células viables de acuerdo con los lineamientos proporcionados por FDA

(Maturin & Peeler, 2001) para determinar la concentración de biomasa al final de la primera etapa de fermentación.

El cultivo en TSB se transfirió asépticamente a tubos y se centrifugó a 3320 rcf durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y cada botón de biomasa se suspendió en 50 mL del medio de producción de PHB detallado en el Cuadro 6 y se transfirió a un matraz estéril. El cultivo se incubó nuevamente a 30 °C, con agitación a 150 rpm durante 48 h. Se centrifugaron porciones de 1 mL del caldo fermentado y los botones de biomasa se conservaron congelados a -20 °C hasta el momento de la extracción de PHB.

La fermentación para cada una de las cepas se efectuó por triplicado. Para el análisis de los resultados se aplicó un Diseño Irrestricto al Azar (DIA) donde los tratamientos corresponden a las distintas cepas evaluadas. El análisis de los resultados de producción de PHB determinada mediante CG se llevó a cabo mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) de un factor empleando Microsoft Excel.

4.6. Diseño de un medio suplementado con subproducto de banano para la producción de biomasa de *Cupriavidus necator*

Una vez definida la cepa con el mejor rendimiento de PHB, se diseñó un nuevo medio de cultivo suplementado con cloruro de amonio y el subproducto de banano, considerando la concentración de nitrógeno y azúcares para fomentar la multiplicación celular. Se utilizó el cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (Budde *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010) y el jugo de banano como fuente de carbono considerando que se ha reportado que *Cupriavidus necator* puede metabolizar la glucosa o la fructuosa para producir PHB (Cavalheiro *et al.*, 2013; El-Sayed *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011; Mozumder *et al.*, 2015; Volova & Kalacheva, 2005)

Dado que la realización de la fermentación en dos etapas a nivel de biorreactor de laboratorio, piloto e industrial resulta laboriosa y suelen presentarse problemas de contaminación debido a los procedimientos de recuperación de biomasa, se sustituyó este esquema por uno de fermentación tipo lote alimentado. Se procuró realizar ambas fases de fermentación en el mismo medio de cultivo, reemplazando las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de producción de biomasa por jugo de banano y cloruro de amonio, respectivamente. Debido a que una alta concentración de biomasa es indispensable para lograr adecuados rendimientos de PHB, se buscó optimizar las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno en términos de concentración celular.

4.6.1. Diseño Experimental

Para la optimización de las concentraciones de JSB y cloruro de amonio, se aplicó un diseño experimental Central Compuesto Rotativo con dos factores y dos niveles. Para ejecutar el mismo, se realizaron 4 repeticiones en los puntos centrales. Los factores y niveles evaluados se resumen en el Cuadro 7. La variable de respuesta consistió en la densidad óptica del cultivo, medida a 425 nm. El análisis de Superficie de Respuesta se realizó empleando el programa SAS JMP 8 (SAS Institute Inc.).

Cuadro 7. Diseño Experimental Central Compuesto Rotativo para la optimización de las concentraciones de JSB y Cloruro de amonio

Corrida	Puntos	% Jugo	NH ₄ Cl (g/L)
1	0	12,5	3,5
2	-+	5	5
3	A0	23	3,5
4	0a	12,5	1,4
5	--	5	2
6	a0	1,9	3,5
7	0A	12,5	5,6
8	+--	20	2
9	0	12,5	3,5
10	++	20	5
11	0	12,5	3,5
12	0	12,5	3,5

4.6.2. Preparación de medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Se prepararon 50 mL de cada una de las variantes del medio de cultivo (Cuadro 8) definidas según el diseño experimental (Cuadro 7) y se colocaron en matraces de 250 mL.

Cuadro 8. Composición del medio de cultivo para el crecimiento de biomasa productora de PHB ajustado a pH 7,1 con NaOH 1M

Componente	Concentración (g/L)
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Jugo de banano	50 a 200*
NH ₄ Cl	2 a 5 g

*5-20%

Para la elaboración de los medios de cultivo, se prepararon soluciones concentradas de NH_4Cl (100 g/L) y de las sales (10X). Para cada formulación, se mezclaron las correspondientes proporciones de JSB, solución de sales y agua, de acuerdo con lo detallado en el Cuadro 9. Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1M. Los medios y la solución de NH_4Cl fueron autoclavados por separado y la adición de esta solución se realizó de manera aséptica.

Cuadro 9. Preparación de las distintas formulaciones de medios de cultivo para optimización de biomasa de *Cupriavidus necator*

Punto	% JSB	NH_4Cl (g/L)	JSB (mL)	NH_4Cl 100 g/L (mL)	Sales 10X (mL)	Agua (mL)
0	12,5	3,5	6,25	1,75	5	37
-+	5	5	2,5	2,5	5	40
A0	23	3,5	11,5	1,75	5	31,75
0a	12,5	1,4	6,25	0,7	5	38,05
--	5	2	2,5	1	5	41,5
a0	1,9	3,5	0,95	1,75	5	42,3
0A	12,5	5,6	6,25	2,8	5	35,95
+--	20	2	10	1	5	34
0	12,5	3,5	6,25	1,75	5	37
++	20	5	10	2,5	5	32,5
0	12,5	3,5	6,25	1,75	5	37
0	12,5	3,5	6,25	1,75	5	37

Cada Erlenmeyer se inoculó con 1 mL de suspensión bacteriana criopreservada y se incubó a 30 °C y 150 rpm por 24 h. Se determinó la densidad óptica del cultivo a 425 nm. Para cada muestra, se utilizó como blanco la misma formulación del medio que estaba siendo evaluada.

4.7. Implementación del proceso de producción de PHB en biorreactor

A partir de la composición seleccionada de acuerdo con la optimización del medio de cultivo, se preparó un proceso en biorreactor con volumen de trabajo de 3 L. En pruebas preliminares se intentó realizar las fermentaciones en dos etapas, sin embargo, se presentaron dificultades para el drenado de los biorreactores, para la recuperación de la biomasa por centrifugación y para su re-inoculación dentro del biorreactor en condiciones asépticas. Debido a estos procedimientos, se presentó contaminación para las fermentaciones en dos etapas, por lo tanto, se definió un proceso en una sola etapa. Se ajustó el medio de cultivo para contar con las sales necesarias durante todo el proceso de fermentación y, una vez finalizada la etapa de producción de biomasa, se alimentó una solución de fructosa concentrada en un esquema de fermentación de tipo lote alimentado (fed-batch) con el fin de generar el desbalance C/N y estimular la síntesis del PHB. Se realizaron fermentaciones por triplicado, en las cuales se evaluaron 3 distintas concentraciones iniciales de fructosa para la fase de producción de PHB: 30, 40 y 50 g/L.

Se aplicó un Diseño Irrestricto al Azar y un análisis de varianza con el fin de comparar las concentraciones de fructosa y determinar cuál de ellas permitiría obtener una mayor productividad de PHB. El análisis estadístico se realizó empleando el programa JMP 8 (SAS Institute Inc.).

4.7.1. Preparación del medio de cultivo

Las sales necesarias para el volumen total de 3 L se autoclavaron dentro del biorreactor a 121 °C durante 65 minutos. El Cuadro 10 detalla la composición de sales empleada para las fermentaciones.

Cuadro 10. Composición de sales para las fermentaciones en biorreactor

Componente	Concentración (g/L)
NaCl	5
KH ₂ PO ₄	4
NH ₄ Cl	2
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	4.5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.51
CaCl ₂	0.02
Solución de trazas*	1

Composición de solución de trazas 10X (mL/L): ZnSO₄ 7H₂O: 130 mg/L, FeSO₄* 7 H₂O: 20 mg/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ * 4H₂O: 60 mg/L, H₃BO₃: 60 mg/L

Para cada biorreactor, se colocaron y esterilizaron 150 mL del JSB en una botella de adición. Para alimentar las fermentaciones, se utilizó una solución concentrada de fructosa (500 g/L). El volumen de fructosa requerido para el ajuste de cada concentración en un volumen de 3 L se depositó y esterilizó en una botella de adición. Tanto el JSB como las soluciones de fructosa fueron autoclavados a 121 °C durante 15 minutos empleando una autoclave marca Tuttnauer, modelo 3870 EHS.

4.7.2. Preparación y configuración del biorreactor

Las 3 fermentaciones para cada uno de los tratamientos se llevaron a cabo en 3 biorreactores de tanque agitado. Se emplearon biorreactores marca Applikon® Biotechnology con capacidad de 5 L. Los parámetros de la fermentación se monitorearon y controlaron mediante la consola ez-Control (Applikon® Biotechnology), ilustrada en la Figura 6. Se registraron los datos de pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD) con el software BioXpert ® XP (Applikon® Biotechnology).

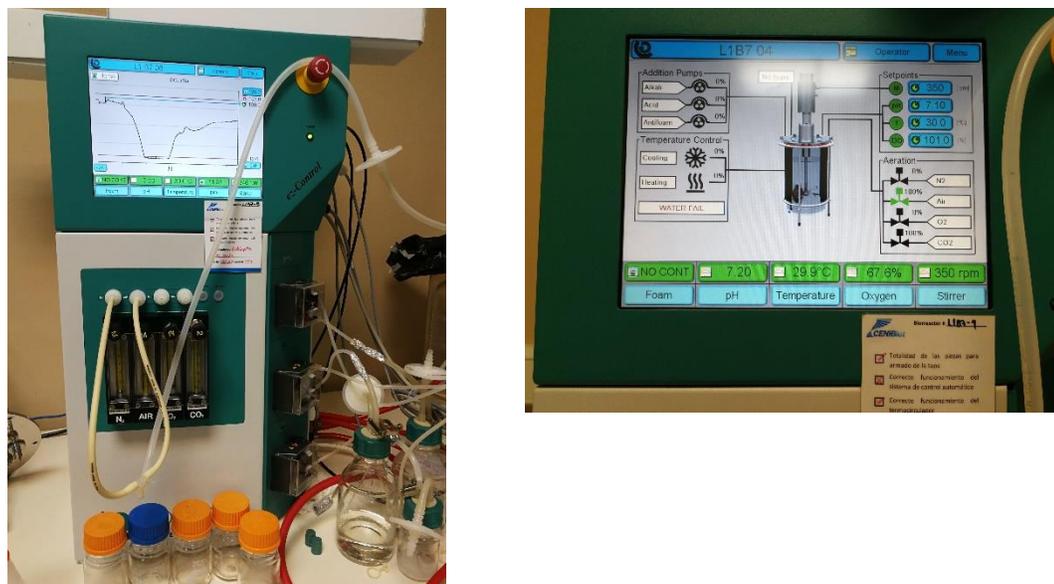


Figura 6. Consola ez-Control (Applikon® Biotechnology) empleada para las fermentaciones con *C. necator*

Para el control de pH se prepararon botellas de adición con 300 mL de solución de H_2SO_4 2 M y NaOH 2 M. Para el control de espuma se usó Antiespumante C (Sigma®). Las botellas de adición se autoclavaron a 121 °C por 15 minutos.

Se utilizaron sensores de pH y oxígeno disuelto AppliSens (Applikon® Biotechnology). Se realizó una calibración para los sensores de pH, empleando soluciones buffer con pH 4 y 7. Una vez establecidas las condiciones del proceso, se dejó estabilizar la lectura de OD y se tomó este valor como un 100% para calibrar el sensor de OD.

Para proveer agitación, se emplearon una propela marina y un impulsor axial, ambos con un diámetro externo de 45 mm. La propela marina se colocó en el extremo del eje de agitación y el impulsor axial se ajustó 3 cm por encima de la propela. Se preparó un sistema de venteo con una botella de polipropileno conectada al condensador del equipo, a manera de trampa de humedad para evitar la saturación del filtro de venteo (Figura 7).



Figura 7. Sistema de venteo acoplado en la salida del sistema de fermentación en biorreactor

Las Figuras 8 y 9 muestran la configuración empleada para cada biorreactor.



Figura 8. Configuración general del biorreactor, con un volumen de 3 L

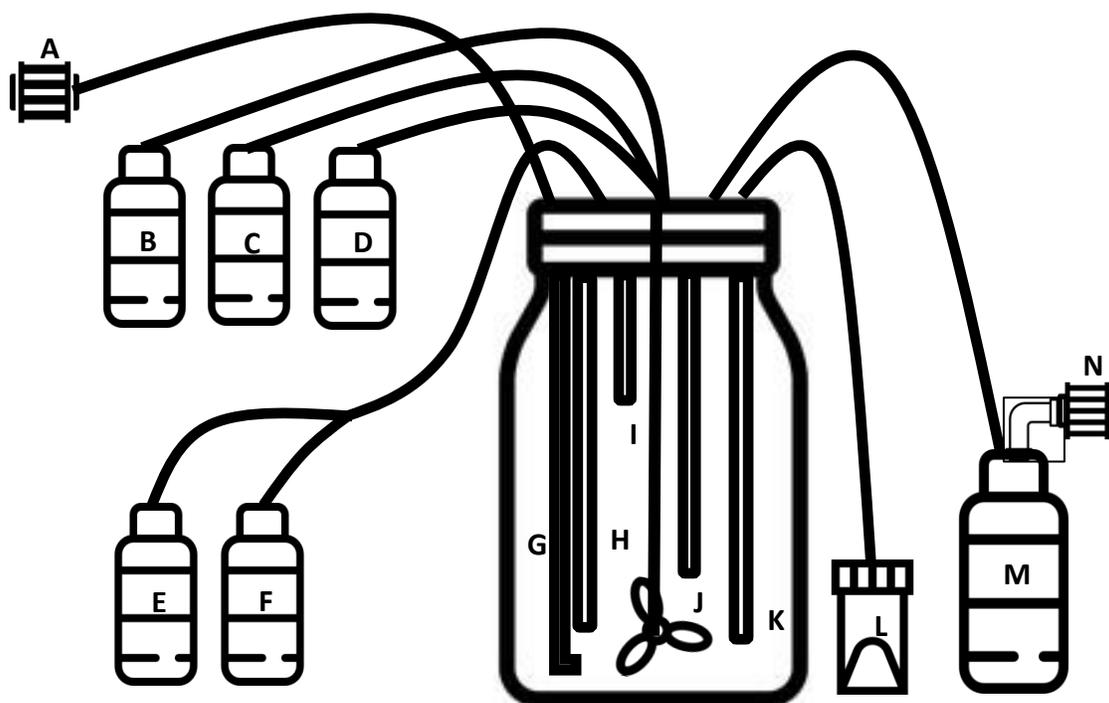


Figura 9. Diagrama de armado del del biorreactor. **A:** Filtro de entrada de aire, **B:** NaOH 2M, **C:** H₂SO₄ 2M, **D:** Antiespumante, **E:** JSB + inóculo, **F:** Solución de fructosa, **G:** Aireador, **H:** Sensor de OD, **I:** Sensor de espuma, **J:** Sensor de pH, **K:** Toma de muestra, **L:** Sistema de muestreo, **M:** Sistema de venteo, **N:** Filtro de salida

4.7.3. Preparación y adición de inóculos

Los inóculos se prepararon añadiendo el contenido de un criovial por cada 50 mL de medio de cultivo, para un volumen de inóculo de 300 mL. Los cultivos se crecieron en agitación a 175 rpm durante 24 h a 30 °C (Aramvash *et al.*, 2015).

El inóculo se transfirió a la botella con 150 mL de JSB estéril y esta se acopló al biorreactor. Mediante presión de aire estéril, el líquido se introdujo al equipo para iniciar la fermentación.

4.7.4. Condiciones de crecimiento

Las fermentaciones se llevaron a cabo con control de temperatura a 30 °C, pH de 7 ajustado con una solución de NaOH 2M y 100% de saturación de aire, a un flujo de 1 vvm (litros de gas por litro de medio de cultivo por minuto). Se corrió una primera etapa de crecimiento celular durante 24 horas con el medio de cultivo seleccionado de acuerdo con el objetivo específico 3 y con una velocidad de agitación de 350 rpm. Se inició la segunda etapa de producción del PHB con la adición de la solución concentrada de fructosa (500 g/L) y una velocidad de agitación de 500 rpm.

Para el ajuste de la concentración de fructosa, la botella de adición (con el volumen de solución estéril necesario para obtener la concentración a evaluar) se acopló asépticamente al puerto de adición del biorreactor. La solución se transfirió al biorreactor aplicando presión de aire a través del filtro de la botella.

4.7.5. Extracción y procesamiento de muestras

Se extrajeron 40 mL de muestra cada 24 h. La extracción aséptica se realizó mediante succión con una jeringa acoplada a la botella de muestreo (Figura 10)



Figura 10. Sistema de toma de muestra acoplado al biorreactor

Para cada muestra, se reservaron 20 mL, se colocaron en un tubo Falcon (Figura 11.A) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores determinaciones de biomasa y nitrógeno. Se realizó una tinción de Gram a cada muestra para verificar la pureza del cultivo (Beveridge, 2001) (Figura 11.C)



A



B



C

Figura 11. Procedimientos aplicados a las muestras de fermentación
A. Almacenamiento de muestra para determinación de biomasa y contenido de nitrógeno. **B.** Botones de biomasa obtenidos mediante centrifugación de 1 mL de muestra. **C.** Tinciones de Gram del caldo de cultivo.

Se centrifugaron 4 mL de cada muestra (en porciones de 1 mL) a 10600 rcf durante 10 min. Se transfirieron 2 mL del sobrenadante a un nuevo tubo y se conservó a -20 °C para la determinación de azúcares. Los botones de biomasa se almacenaron en congelación a -20 °C hasta el momento de la extracción de PHB (Figura 11.B).

4.7.6. Determinación de biomasa mediante peso seco

A las muestras extraídas a las 24 horas de cada fermentación en biorreactor se les determinó peso seco por duplicado empleando un analizador termogravimétrico TGA 701 (Leco).

Se colocó 0,2 mL de cada muestra en un crisol previamente desecado. Las muestras se secaron a 85°C hasta alcanzar peso constante. El peso seco de la biomasa fue calculado a partir de los resultados del porcentaje de humedad brindados por el equipo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Definición del método de análisis para detección y cuantificación de PHB

5.1.1. Condiciones de análisis seleccionadas

Los Cuadros 11 y 12 resumen las condiciones de corrida con las que se logró obtener picos con forma y resolución adecuadas para la cuantificación del PHB.

Cuadro 11. Condiciones de análisis para la cuantificación de PHB mediante Cromatografía de gases

Parámetro	Ajuste
Volumen de inyección	2 μ L
Modo de inyección	Split
Temperatura de inyección	250 $^{\circ}$ C
Gas acarreador	Helio
Presión	107,1 kPa
Flujo total	34 mL/min
Flujo de la columna	1 mL/min
Relación Split	30
Temperatura del detector	250 $^{\circ}$ C
Tiempo de corrida	18,3 min

Cuadro 12. Rampa de temperatura para el método de detección de PHB mediante CG

Velocidad ($^{\circ}$C/min)	Temperatura ($^{\circ}$C)	Tiempo de espera (min)
-	120	1
3	147	1
10	220	0

Tal y como se observa en las Figuras 12 y 13, se determinó un tiempo de retención de 2,58 minutos para el estándar de Metil (R)-3 hidroxibutirato, y de 3,55 minutos para el ácido benzoico.

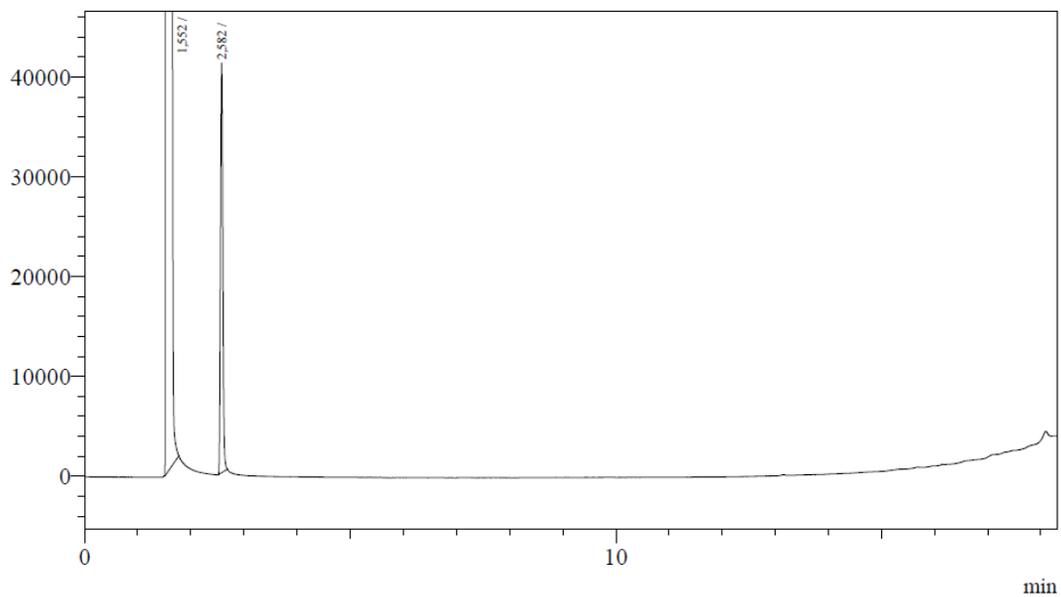


Figura 12. Cromatograma para una disolución de 0,55 g/L del estándar Metil (R)-3 hidroxibutirato en cloroformo

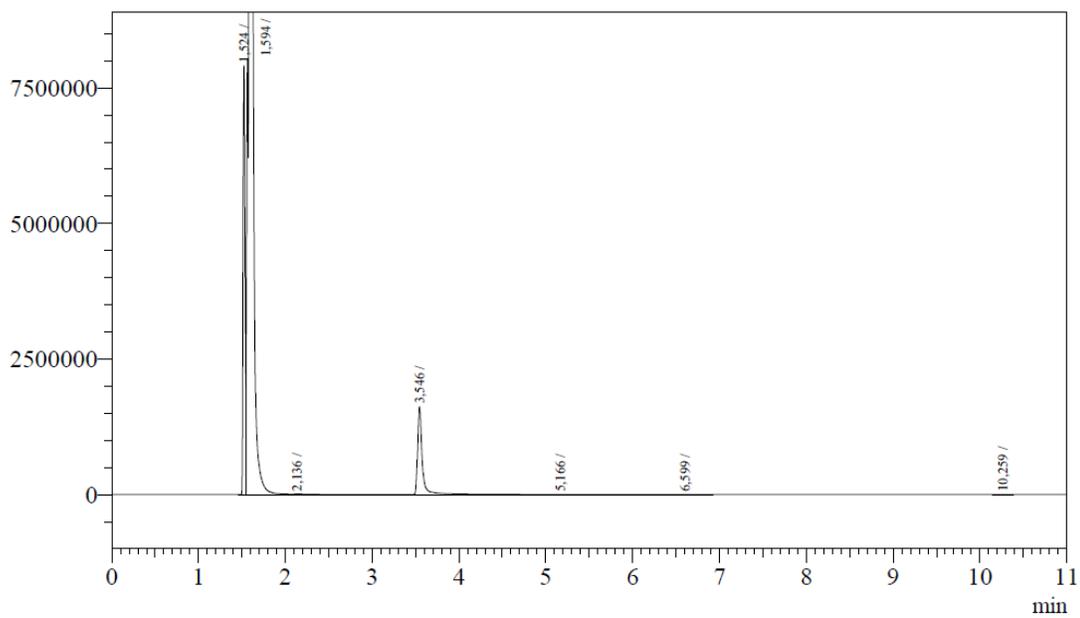
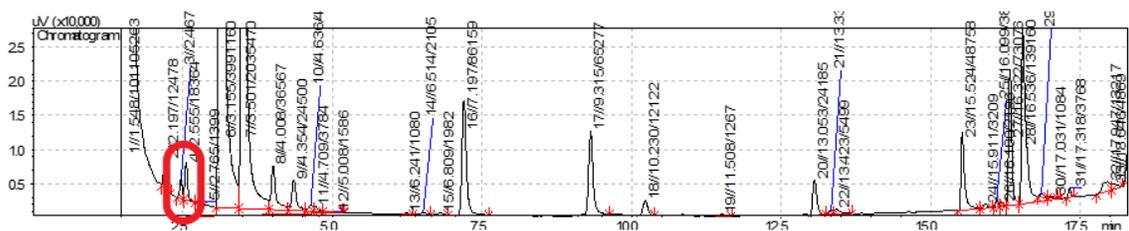
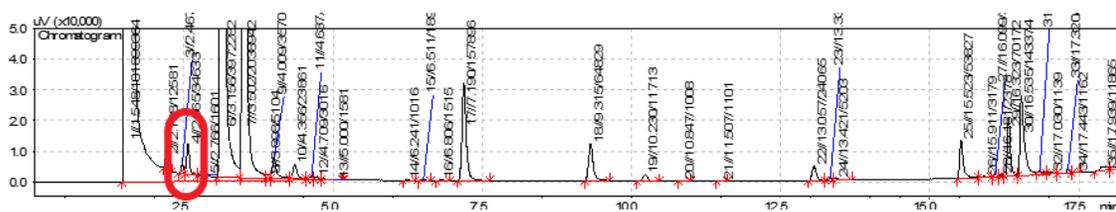


Figura 13. Cromatograma para una disolución de 5,6 g/L de Ácido benzoico en cloroformo, posterior a la metanólisis

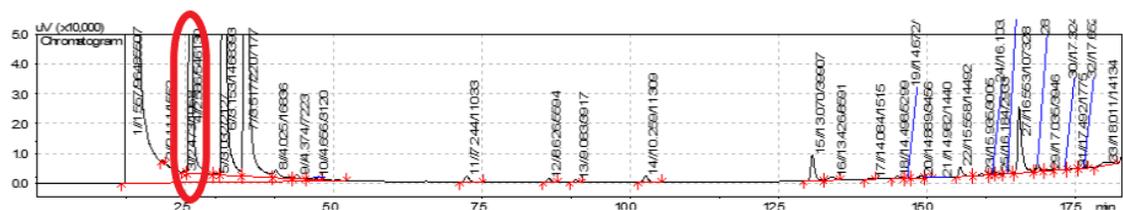
En la Figura 14 se presentan los cromatogramas obtenidos a partir de la extracción de muestras de jugo de subproducto de banano, la cual se realizó con el fin de determinar la presencia de interferencias en la matriz de trabajo.



A



B



C

Figura 14. Cromatogramas correspondientes al JSB sometido a metanólisis (señal del 3-MHB resaltada en rojo) A. JSB. B. JSB con adición de ácido poli (R)-3 hidroxibutírico (5 g/L). C. Cepa de control de *Cupriavidus necator* crecida en medio de cultivo suplementado con JSB

Como puede notarse en la Figura 14, el jugo del subproducto de banano (JSB) presenta gran cantidad de compuestos que son extraídos y detectados con el método cromatográfico empleado. En los cromatogramas del JSB (Figura 14.A) se observan picos cercanos a los tiempos de retención del PHB. Dichos picos representan interferencias para la cuantificación del PHB, pues imposibilitan distinguir los

compuestos propios del JSB del PHB añadido al medio (Figura 14.B) y de aquel sintetizado mediante fermentación por la cepa de referencia (Figura 14.C).

Debido a lo anterior, no es recomendable llevar a cabo la extracción de PHB en muestras de fermentación con medios suplementados con JSB directamente a partir de los caldos de cultivo. Para solventar este inconveniente, fue necesario separar la biomasa mediante centrifugación y realizar el proceso de extracción del PHB a partir de los botones bacterianos. Este procedimiento resultó factible gracias a que el polímero corresponde a un material de reserva que no es excretado por el microorganismo. En la Figura 15 se observa la ausencia de picos interferentes con el PHB al realizar la extracción del polímero a partir del botón de biomasa.

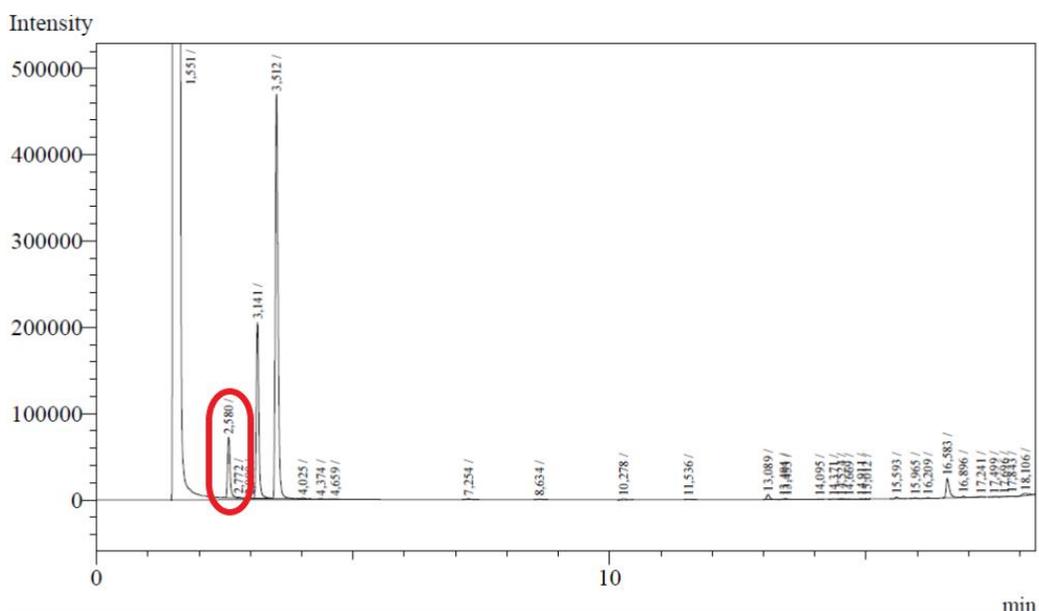


Figura 15. Cromatograma CG-FID para una muestra de fermentación en medio suplementado con JSB, realizando la extracción a partir de biomasa recuperada.

Como estándar para la cuantificación de PHB se seleccionó el Metil [®]-3 hidroxibutirato (Sigma[®]), con una pureza del 99% (Cavalheiro *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). El uso de este estándar facilitó la elaboración de las curvas

de calibración, pues al corresponder a la forma química resultante del proceso de metanólisis del PHB, no resulta necesario aplicar dicho tratamiento a las distintas disoluciones que componen la curva de calibración. Esto permite obtener curvas con mejor linealidad, pues se evitan posibles pérdidas producto de la manipulación de las muestras y de la reacción de metanólisis. Además, se minimiza el tiempo de elaboración de las curvas de calibración, pues su preparación requiere únicamente la elaboración de distintas disoluciones del estándar en cloroformo, a partir de una disolución madre.

5.1.2. Curvas de calibración

La Figura 16 muestran los resultados obtenidos para la elaboración de la curva de calibración de 3-MHB.

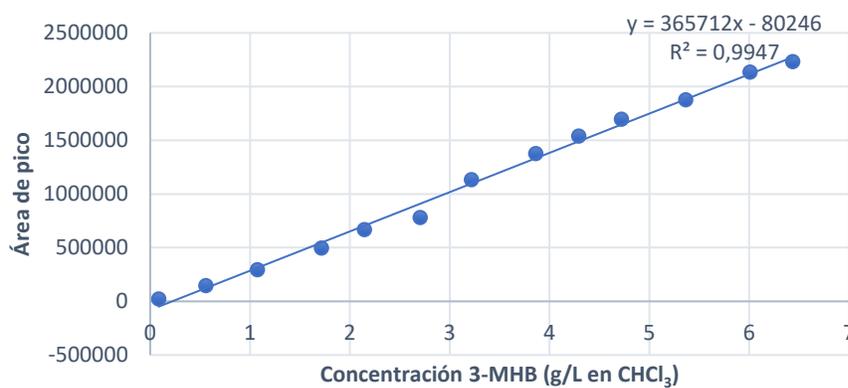


Figura 16. Curva de calibración del Metil @-3 hidroxibutirato en cloroformo

Como puede notarse en el gráfico anterior, se obtuvo un valor de R^2 de 0,99, el cual confirma que la curva obtenida posee un ajuste adecuado y permite una adecuada cuantificación del 3-MHB.

Para la curva de calibración de ácido benzoico (Figura 17), se obtuvo un R^2 de 0,98, el cual asegura un aceptable ajuste de la curva, así como su idoneidad para la

cuantificación de este analito, con base en el cual se llevó a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación del método.

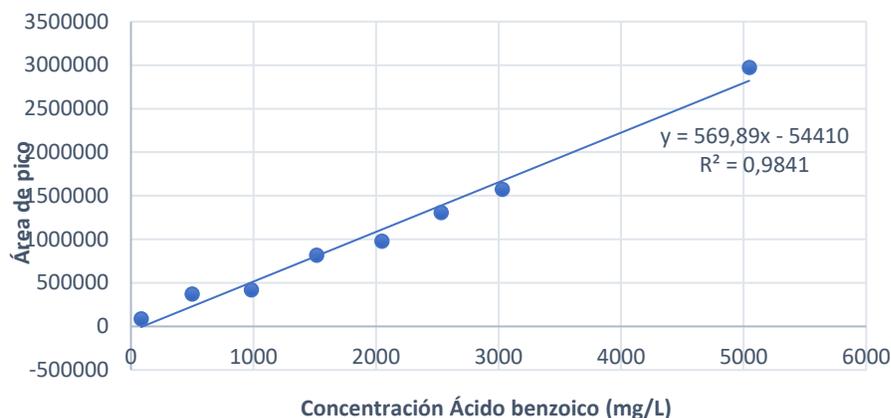


Figura 17. Curva de calibración del Ácido Benzoico

5.1.3. Límites de detección y cuantificación

a. Detección FID

El Cuadro 13 y la Figura 18 muestran los cálculos de los límites de detección y cuantificación para el análisis de CG con detección FID, a partir de tres curvas de calibración de 3-MHB.

Cuadro 13. Cálculo de los límites de detección y cuantificación para el método de análisis de PHB por CG-FID

Concentración (g/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D. Estándar (s)
Baja	0,0841	0,0858	0,0847	0,0849	0,0009
Media	2,1013	2,1548	2,1186	2,1249	0,0273
Alta	5,2532	5,3646	5,2965	5,3048	0,0561

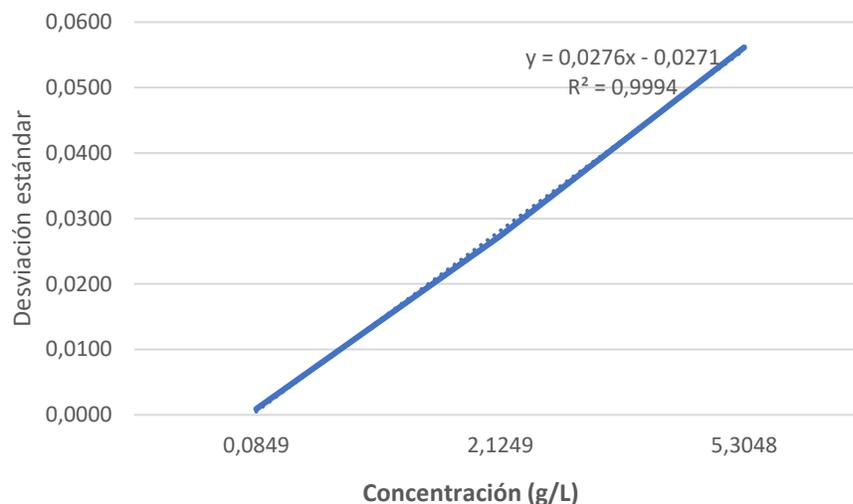


Figura 18. Ajuste lineal de los promedios de concentraciones altas, medias y bajas de las curvas de calibración de 3-MHB

Mediante extrapolación con base en la recta de mejor ajuste (Figura 18) se obtuvo un valor de s_0 de 0,0271. A partir de este dato, se calculó una concentración de 0,081 g/L como límite de detección y de 0,271 g/L como límite de cuantificación.

b. Detección MS

Para la realización de la prueba de extinción se empleó una disolución madre de 3-MHB en cloroformo con una concentración de 0,098 g/L. La mínima señal detectable fue obtenida al emplear una dilución 1/50, equivalente a una concentración de 0,00196 g/L.

El Cuadro 14 resume los resultados obtenidos para el cálculo de los límites de detección y cuantificación del método de CG-MS.

Cuadro 14. Límites de detección y cuantificación para el método de cuantificación de PHB mediante CG-MS.

	Dilución de prueba	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)
Altura señal	1687,58	5062,74	16875,8
Altura ruido	931,25	931,25	931,25
Señal/Ruido (S/N)	1,812	5,436	18,121
Concentración (g/L)	0,00196	0,00588	0,0196

5.1.4. Porcentaje de recuperación

A partir del promedio de 18 muestras analizadas mediante CG-FID, se obtuvo un porcentaje de recuperación de $94,41 \pm 4,47\%$.

5.2. Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas

En el Cuadro 15 se resumen los resultados de la evaluación de la productividad de PHB para las distintas cepas. Estos resultados corresponden al promedio de las tres repeticiones de cada fermentación. Los datos se obtuvieron a partir del muestreo de las 72 horas de cultivo, ya que en este momento fueron observadas las mayores áreas de pico.

Cuadro 15. Promedios de áreas de pico y concentraciones de 3-MHB determinadas mediante CG con detección FID para cada una de las cepas bacterianas evaluadas

Cepa	Área pico PHB	Concentración 3-MHB (g/L en CHCl ₃)	Concentración 3-MHB (g/L en caldo)
CN-2	607109,0	1,88 ± 0,01	2,82 ± 0,02
CR-12	40929,7	0,331 ± 0,003	0,497 ± 0,005
M1-103B No.14	3747,4	0,230 ± 0,001	NC*
M3-104 BB No.6B	7525,9	0,2400 ± 0,0005	NC*
M5-103 NO.17	8860,9	0,244 ± 0,002	NC*
M2-103 NO.8	3039,8	0,2277 ± 0,0008	NC*
M4-103 NO.4	3237,6	0,228 ± 0,001	NC*
M5-104-A NO.9	10833,1	0,2490 ± 0,0001	NC*
52-102-C	2777,3	0,227 ± 0,001	NC*
52-102-A	1440,7	0,2234 ± 0,0007	NC*
M2-103-A	1375,7	0,2232 ± 0,0003	NC*
M4-103	1366,7	0,2232 ± 0,0002	NC*

NC= No cuantificable

De acuerdo con los resultados anteriores, se obtuvieron bajas productividades de PHB para las cepas bacterianas nativas. Con excepción de la cepa de control y la cepa nativa CR-12 (ambas correspondientes al microorganismo *Cupriavidus necator*), no se lograron obtener concentraciones cuantificables de PHB para los cultivos en medio KS. Tomando en cuenta los límites de detección y cuantificación calculados en la sección 5.1.3, se observa que la señal obtenida mediante CG-FID para las cepas nativas es detectable mediante el método implementado; sin embargo, no sobrepasa el límite de cuantificación, por lo que dichos resultados no pueden ser reportados ni comparados entre sí. La ausencia del polímero en la mayoría de las cepas estudiadas podría relacionarse con la composición del medio de cultivo, pues al haber sido este estudiado para *C. necator* (Pereira *et al.*, 2021), podría carecer de los nutrientes necesarios para el metabolismo de otras cepas o, por el contrario, contener compuestos inhibitorios para estas. Por este motivo, se aplicó una prueba t-student para comparar los resultados obtenidos para la cepa CN-2 (control) y CR-12.

Tal y como era de esperarse, la mejor productividad de PHB se logró para la cepa de control CN-2 (2,82 g/ L de caldo de cultivo), mientras que con la cepa nativa CR-12 se obtuvo una producción de 0,5 g de PHB/ L de caldo de cultivo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas medias.

El valor obtenido es inferior a la productividad de 4,6 g/L de PHB reportada por (Nygaard et al., 2019) al cultivar la cepa ATCC 17967 de *Cupriavidus necator* durante 60 horas en un medio mineral con 20 g/L de fructosa y 1,5 g/L de sulfato de amonio y al valor de 7,2 a 7,7 g/L obtenido por Zhila *et al* (2015) al cultivar la cepa B-10646 de *Cupriavidus eutrophus* en un medio de composición similar a la empleada para el presente trabajo y aplicando de igual manera un proceso de fermentación en Erlenmeyer en dos etapas. Sin embargo, la producción de PHB obtenida fue superior al valor máximo de 1,62 g/L reportado por Sen *et al* (2019).

Con base en estos resultados, se optó por utilizar la cepa CN-2 en las etapas posteriores del trabajo. En la Figura 19 se ilustra la morfología observada al microscopio de *C. necator*.

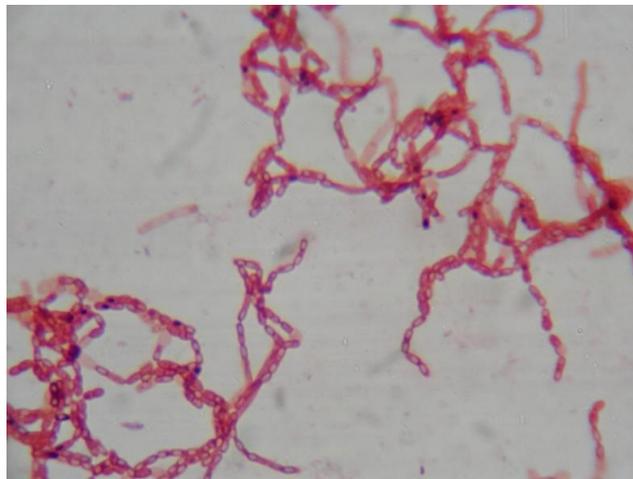


Figura 19. Morfología de la cepa CR-12 con acumulación de PHB (Objetivo 100X)

5.3. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa bacteriana

El Cuadro 16 resume los resultados de las determinaciones de biomasa mediante densidad óptica para las diferentes composiciones del medio de cultivo. En el Anexo 1 se detalla el análisis estadístico elaborado con JMP 8.

Cuadro 16. Densidad Óptica a 425 nm para los cultivos de la cepa CN-2 crecidos en diferentes formulaciones del medio de cultivo para producción de biomasa

Patrón	JSB (%)	NH ₄ Cl (g/L)	D. O 425 nm
+-	20	2	0,579
0	12,5	3,5	1,731
--	5	2	4,300
++	20	5	0,254
--	5	2	4,158
0	12,5	3,5	2,078
-+	5	5	3,515
0	12,5	3,5	1,896
+-	20	2	0,600
++	20	5	0,273
0	12,5	3,5	2,072
--	5	2	3,983
-+	5	5	3,568
++	20	5	0,304
+-	20	2	0,572
-+	5	5	3,403
0	12,5	3,5	2,135
0	12,5	3,5	2,195

De acuerdo con los resultados, tanto la concentración de JSB como la concentración de NH₄Cl presentan un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la concentración de células de *C. necator*, siendo aparentemente más determinante la influencia del primero. La interacción entre ambos componentes del medio de cultivo también es significativa.

Se observó que las concentraciones de biomasa (D.O) presentaron un comportamiento lineal, obteniéndose un valor de R² de 0,99. El modelo lineal generado

es adecuado para explicar el comportamiento de los datos ($p < 0,05$), pues dentro del espacio experimental evaluado, la concentración de biomasa se incrementa al disminuirse las concentraciones de NH_4Cl y JSB, tal como se muestra en la Figura 20.

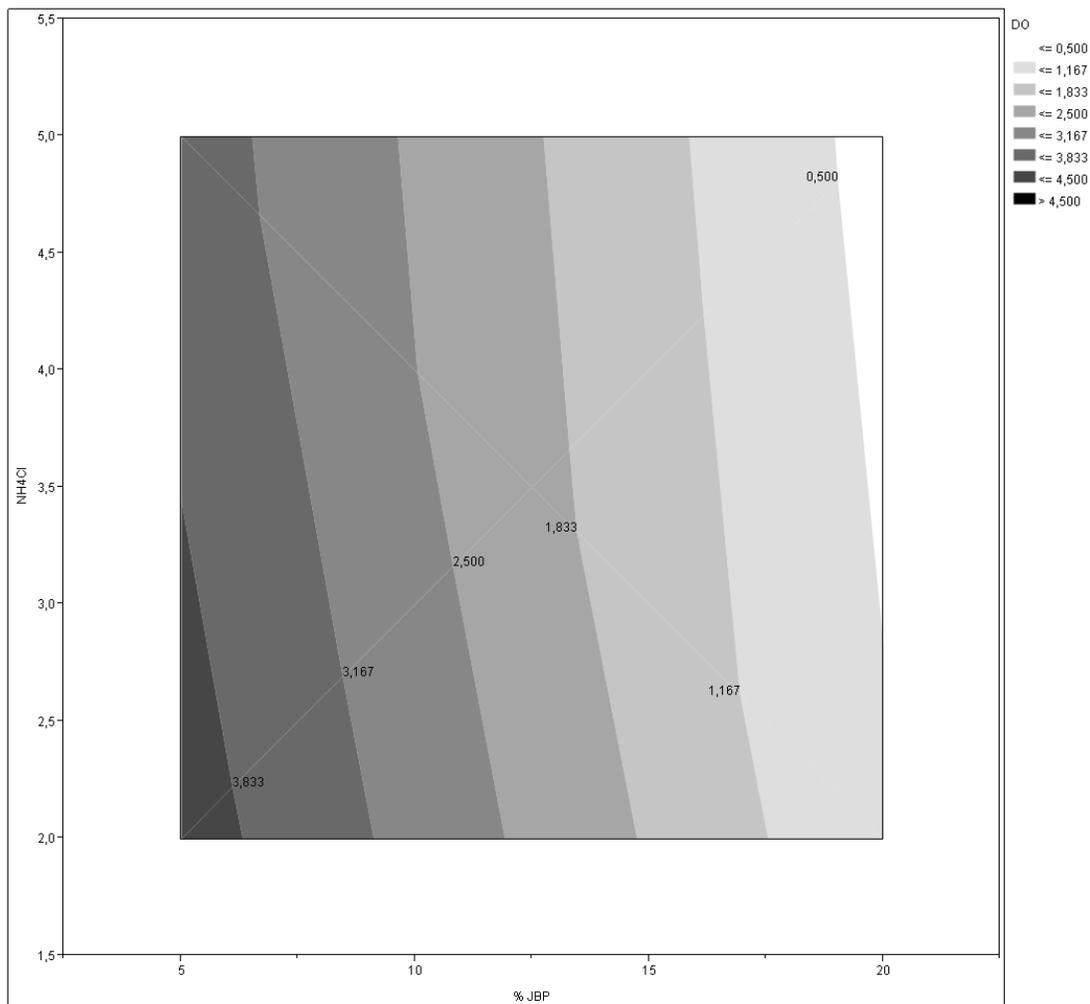


Figura 20. Gráfico de contorno: Efecto de las concentraciones de JSB y NH_4Cl en la concentración celular de *C. necator*

Con base en los resultados anteriores, se seleccionaron concentraciones de NH_4Cl y JSB de 2 g/L y 5%, respectivamente, para llevar a cabo las pruebas de fermentación subsiguientes. Estas concentraciones representan los niveles óptimos dentro del área experimental estudiada; sin embargo, es posible que puedan lograrse mejores productividades de biomasa al ampliar el espacio experimental, de manera que

se incluyan menores concentraciones de ambos nutrientes. De este modo, sería posible determinar hasta qué punto es posible obtener un aumento en la producción de biomasa al disminuir las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Para *C. necator* se ha reportado que la producción de biomasa se maximiza al emplear glucosa como sustrato de fermentación, aunque otros tipos de azúcares como fructosa y xilosa también generan buenos resultados (Poomipuk *et al.*, 2014). Dado que los azúcares constituyentes del JSB son casi en su totalidad fructosa y glucosa, es esperable que este sustrato contribuya a maximizar el crecimiento celular de *C. necator*.

Huschner *et al* (2015), reportaron que la máxima concentración de biomasa de la cepa ATCC 17699 de *C. necator* fue obtenida al aplicar una relación C/N (moles C/ moles N) de 10. Debido a la falta de información del estudio (dado que el número de repeticiones es escaso) se presume que relaciones C/N de 6 y de 8 arrojen resultados similares.

Para la composición seleccionada del medio de cultivo suplementado, al calcular la relación C/N con base en la concentración y la masa molar de la glucosa, fructosa y NH_4Cl , se obtuvo que dicha relación es de 5,3, algo menor al rango reportado por Huschner *et al* (2015), sin embargo, tal y como ya se ha mencionado, es posible que mediante una mayor disminución del contenido de la fuente de nitrógeno se consiga una concentración de biomasa mayor.

5.4. Implementación del proceso de fermentación en biorreactor

En general, el control automático de las condiciones de fermentación se dio según lo esperado. Sin embargo, durante la fermentación alimentada con 30 g/L de fructosa,

se originó un fallo en el control de temperatura de uno de los biorreactores, produciéndose una disminución de esta, según se observa en la Figura 21.

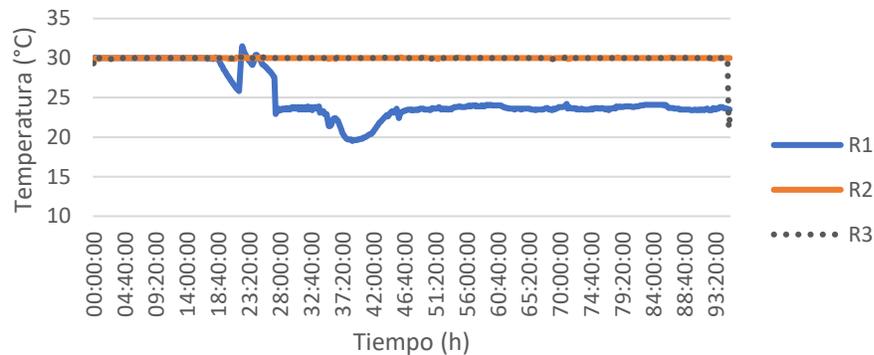


Figura 21. Comportamiento de la temperatura para las 3 repeticiones de la fermentación con 30 g/L de fructosa

Este hecho probablemente ocasionó una disminución, tanto del crecimiento como de la actividad microbiana en general, tal y como puede constatarse al observar la Figura 22, en donde se nota un menor consumo de oxígeno, o, en otras palabras, un incremento en la saturación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

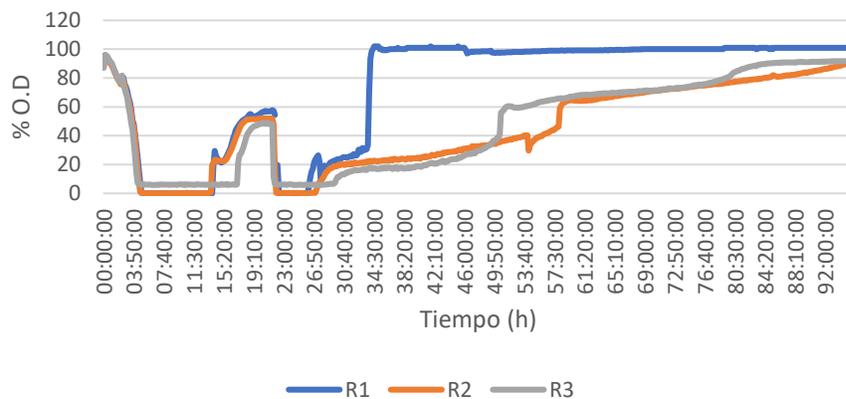


Figura 22. Comportamiento del oxígeno disuelto para las 3 repeticiones de la fermentación con 30 g/L de fructosa

5.4.1. Producción de biomasa durante la fase de crecimiento

El Cuadro 17 resume los resultados obtenidos a partir de la determinación de humedad realizada en el Analizador Termogravimétrico (TGA).

Cuadro 17. Resultados de las determinaciones de biomasa por peso seco al finalizar la primera etapa de las fermentaciones en biorreactor

Repetición	Masa inicial (g)*	Humedad (%)*	Masa seca (%)*	Peso seco (g/L)*
1	0,20	97,96	2,05	20,70
2	0,21	97,89	2,11	21,95
3	0,21	97,74	2,27	24,33
4	0,21	97,70	2,30	24,20
5	0,22	97,64	2,36	25,74
6	0,21	97,61	2,40	24,54
7	0,21	97,73	2,27	23,53
8	0,21	97,39	2,61	27,69
9	0,22	97,48	2,52	27,11
Promedio				24,42
D. Estándar				2,25

* Los datos corresponden al promedio de dos réplicas

Según Ienczak *et al* (2013), dado que los PHAs corresponden a polímeros intracelulares, para su producción eficiente es necesaria la obtención de cultivos con alta densidad celular, considerándose que dicha densidad, para este proceso específico, debe ser cercana a los 100 g/L de células totales en base seca. Pese a esto, para sistemas de fermentación de tipo lote alimentado, usualmente suelen obtenerse concentraciones de biomasa de alrededor de 50 g/L.

Para *C. necator*, se han reportado concentraciones de biomasa de hasta 208 g/L al emplear un sistema fed-batch y mediante el uso de glucosa pura (Shang *et al.*, 2003). Al emplear fuentes de carbono más complejas, por ejemplo glicerol crudo, la concentración de biomasa obtenida suele ser menor, habiéndose reportado concentraciones en base seca cercanas a los 27 g/L al final de la fase de crecimiento

exponencial (Cavalheiro *et al.*, 2012). Al utilizar aceite de soya como sustrato, se han alcanzado concentraciones máximas de biomasa de hasta 83 g/L para *C. necator* (da Cruz Pradella *et al.*, 2012).

Atlić *et al.* (2011) reportaron una concentración de biomasa de *C. necator* de 27 g/L después de 23 horas de cultivo en un sistema de fermentación en lote, empleando glucosa como fuente de carbono.

Como se puede notar a partir del Cuadro 17, al finalizar la fase de crecimiento exponencial se obtuvo una concentración de biomasa de *C. necator* de aproximadamente 24 g/L, resultado cercano a lo reportado por Atlić *et al.* (2011) y Cavalheiro *et al.* (2012). Sin embargo, es esencial mejorar la productividad de la biomasa durante las primeras 24 horas de proceso para potenciar la acumulación de PHB. Para esto, se podría intentar preparar un inóculo más concentrado, aumentar la proporción del inóculo añadido al biorreactor con respecto al volumen total de fermentación, o bien, ampliar el campo experimental propuesto inicialmente para la optimización del medio suplementado con JSB.

5.4.2. Producción de PHB

Para un organismo como *C. necator*, las condiciones óptimas para la producción de biomasa y para la síntesis del polímero difícilmente puedan ser logradas en un sistema de fermentación en una sola etapa, debido principalmente a que la acumulación de los PHAs no se encuentra asociada al crecimiento. Por esto, se recomienda la implementación de sistemas de dos o más etapas (Atlić *et al.*, 2011).

El Cuadro 18 resume los resultados de la producción de PHB para las distintas concentraciones de fructosa evaluadas.

Cuadro 18. Producción de PHB en el caldo de fermentación obtenida en distintos tiempos utilizando *C. necator* en un biorreactor con un volumen de 3L de medio de cultivo

Fructosa (g/L)	Tiempo (h)	PHB (g/L) en caldo*
30	24	ND
	48	ND
	72	ND
	96	ND
40	24	ND
	48	ND
	72	ND
	96	ND
50	24	ND
	48	0,0239 ± 0,0004
	72	0,0243 ± 0,0005
	96	1,2918 ± 2,1936

* Los resultados reportados corresponden al promedio de tres repeticiones

Para la repetición 2, correspondiente al tiempo de fermentación de 96 h, se obtuvo una producción de 3,84 g/L de PHB en caldo de cultivo, la cual es mucho mayor que la obtenida para las otras dos repeticiones. Esto produjo un valor alto en el cálculo de la desviación estándar. Es necesario realizar nuevas repeticiones de esta fermentación, con el fin de verificar la producción de PHB obtenida al emplear una concentración de 50 g/L de fructosa. No fue posible repetir los ensayos en el contexto de este trabajo, debido a limitaciones de acceso a los equipos e instalaciones necesarios.

Para este trabajo, la máxima producción de PHB fue de aproximadamente 1.3 g/L a las 96 h de proceso. Esta concentración es menor que la reportada por otros autores bajo condiciones similares de saturación de oxígeno (Atlić *et al.*, 2011; Cavalheiro *et al.*, 2009; Dalsasso, Pavan, Bordignon, Aragão, *et al.*, 2019; Grousseau *et al.*, 2014b; Huschner *et al.*, 2015; Passanha *et al.*, 2013), sin embargo, es cercana a la concentración de 3.3 g/L reportada por Li & Wilkins (2020) y de 1.98 g/L obtenida por

Amini *et al.* (2020) . Una posible explicación para estos resultados es el rápido consumo de fructosa en el medio de cultivo, que a su vez estimula la hidrólisis del polímero por parte del metabolismo bacteriano (Poomipuk *et al.*, 2014). Para el caso de fermentaciones de tipo lote alimentado, se ha reportado un incremento en la producción de PHB mediante el reemplazo de una sola suplementación con azúcar por una alimentación en varios pulsos, con el fin de mantener una concentración de azúcar relativamente constante durante la fermentación (Nygaard *et al.*, 2021).

5.4.2.1. Efecto del oxígeno disuelto en la acumulación de PHB

El oxígeno disuelto es un factor determinante tanto para el crecimiento celular de *C. necator* como para la acumulación de PHAs. La utilización del oxígeno tiene un rol importante en la generación de energía y en el metabolismo microbiano de oxidación-reducción, necesario para la formación de productos. Sin embargo, la productividad en condiciones aerobias resulta relativamente baja en comparación con la obtenida mediante procesos anaerobios, debido a limitaciones en la tasa de transferencia volumétrica de oxígeno y a que parte del sustrato es completamente oxidado para formar dióxido de carbono (Weusthuis *et al.*, 2011). El efecto de la concentración de oxígeno en la producción de PHAs ha sido estudiado por varios autores. El Cuadro 19 presenta una recopilación de diversos procesos fermentativos reportados en la literatura, incluyendo los niveles de oxígeno disuelto que fueron determinados como óptimos para cada uno de ellos.

Cuadro 19. Condiciones de crecimiento y productividades de PHB reportadas en la literatura para distintos procesos fermentativos con *C. necator*

Sustrato	Condiciones	Productividad (% PSB*)	Referencia
Glucosa	Sistema continuo en 5 biorreactores secuenciales. 30 °C, pH 6,8. OD ^{**} : 20-40%	77%	(Atlić <i>et al.</i> , 2011)
Glucosa	Lote alimentado, 34°C, pH 6,8. 20% OD ^{**}	76%	(Kim <i>et al.</i> , 1994)
Ácido propiónico o su combinación con ácido butírico	Lote alimentado, 30°C, pH 7. OD ^{**} superior a 20%	80-86% (HB y HV)	(Grousseau <i>et al.</i> , 2014c)
Glicerol de desecho	Lote alimentado, 34 °C, pH 6,8. OD ^{**} 15-20%	38%	(Cavalheiro <i>et al.</i> , 2009)
Efluente de procesamiento de aceite de palma (ácidos orgánicos)	Lote alimentado, 30 °C, pH 6,9. OD ^{**} de 40% para crecimiento y de 21-50% para acumulación	83%	(Huschner <i>et al.</i> , 2015)
Productos de biodigestor	Lote alimentado, 30 °C, pH 7. OD ^{**} 40%	78%	(Passanha <i>et al.</i> , 2013)
Aceite de maní	Lote alimentado, 30 °C, pH 7, Flujo aire:1 vvm	51%	(Pérez-Arauz <i>et al.</i> , 2019)
Mezcla de melazas y vinazas	Lote alimentado, 35 °C, OD ^{**} superior a 40%	58%	(Dalsasso, Pavan, Bordignon, de Aragão, <i>et al.</i> , 2019)

*PSB: Peso seco de biomasa

**OD: oxígeno disuelto

Cavalheiro *et al* (2009) obtuvieron un aumento tanto en la producción de biomasa de *C. necator* como en la concentración de PHB obtenida cuando se logró mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima de un 15% durante la fase de crecimiento exponencial del microorganismo, empleando un sistema de lote alimentado y un volumen de trabajo de 3 L. Para esto fue necesario el incremento de la aireación de 1 a 2 vvm

empleando un control de cascada. El flujo de gas estuvo compuesto por 2 L/min de aire combinado con 1L/min de oxígeno puro. Posteriormente, los mismos autores evaluaron más detalladamente el efecto de la concentración de OD en la producción de PHAs por parte de *C. necator*. Se determinó que tanto la concentración total de PHAs como la proporción en la cual los polímeros se acumularon intracelularmente aumentaron al incrementar la saturación de OD a 20% durante la fase de producción, esto en comparación con el mismo proceso ejecutado con una saturación de OD de 2% (Cavalheiro *et al.*, 2012). Como se nota en la Figura 23, durante este estudio no fue posible mantener la saturación de O.D por encima del nivel mínimo de 15% durante la totalidad de la etapa de crecimiento exponencial, observándose bajos niveles de oxígeno durante las primeras horas de fermentación.

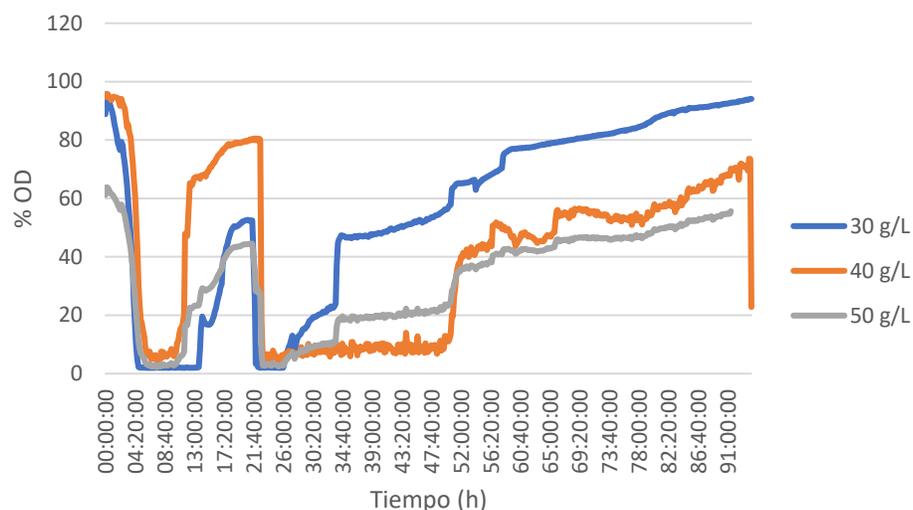


Figura 23. Comportamiento del oxígeno disuelto para los tres niveles de fructosa evaluados. Los datos para cada nivel corresponden al promedio de tres repeticiones

La baja saturación de oxígeno observada se debió a varias limitaciones encontradas durante la implementación de las fermentaciones. En primer lugar, es importante señalar que el flujo de aire no logró ser incrementado por encima de 1 vvm,

debido a la excesiva formación de espuma que en pruebas iniciales ocasionó el bloqueo de los filtros de venteo y la pérdida de volumen de cultivo. Además, no se contó con la disponibilidad de oxígeno puro para suplementar el cultivo e incrementar la concentración de este nutriente.

Adicionalmente, debido a la generación de espuma anteriormente mencionada, la agitación máxima que logró implementarse para la etapa de producción de PHB fue de 500 rpm, lo cual es probablemente insuficiente para alcanzar las saturaciones de oxígeno que han resultado exitosas en otros estudios (Cuadro 19).

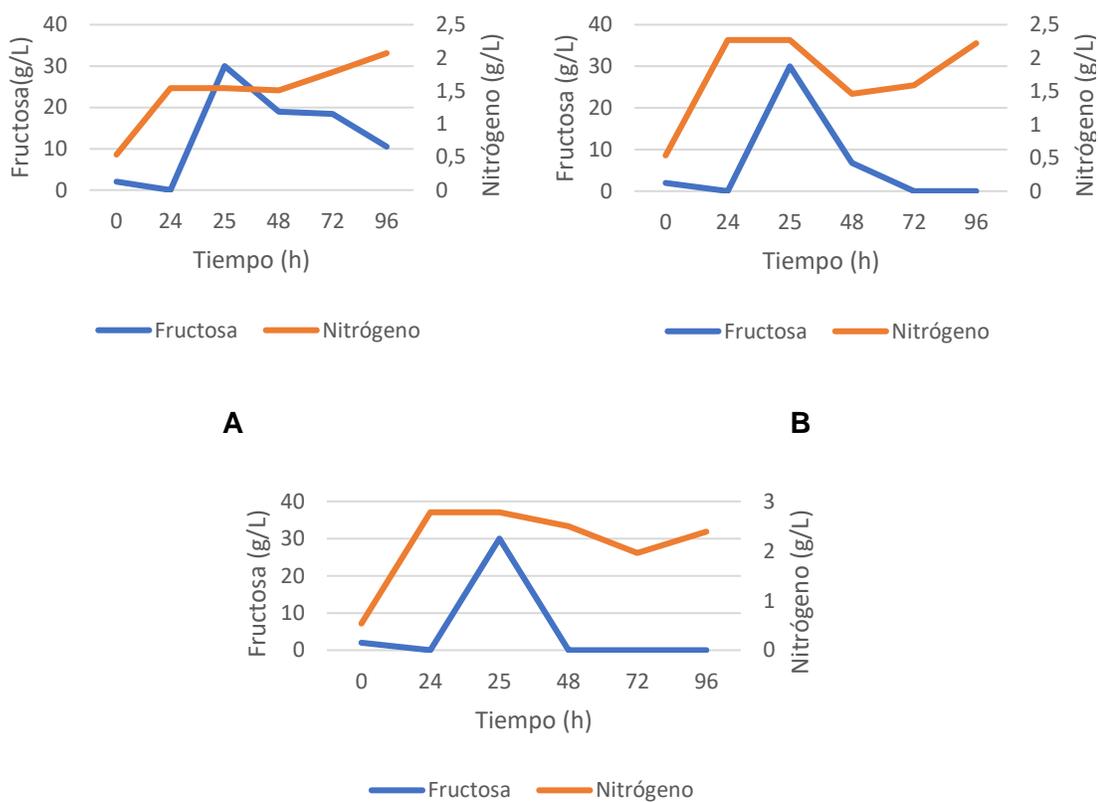
Para todas las fermentaciones, se observó un incremento en la saturación de oxígeno disuelto hacia la segunda mitad del proceso, alcanzándose los niveles de 20-40% reportados en la mayoría de los estudios consultados (Cuadro 19). Sin embargo, para este momento y, de acuerdo con el comportamiento más comúnmente observado para las distintas repeticiones, la fructosa en el medio de cultivo ya ha sido consumida completamente, por lo que en estas condiciones no es de esperar que se dé la acumulación del polímero, si no por el contrario, el consumo de esta reserva energética.

Cabe mencionar que para la repetición 2 de la fermentación suplementada con 50 g/L de fructosa se determinó un contenido de PHB de 3,84 g/L a las 96 horas de proceso. Aunque dicha producción de PHB no fue observada en las otras dos repeticiones de este tiempo de fermentación, es posible que la saturación de oxígeno disuelto contribuya a explicar la mejor producción del polímero para este ensayo en particular, pues esta se mantuvo mayor al 60% durante todo el proceso fermentativo, lo cual, con base en los reportes de la literatura, promovería una mejor acumulación de PHB.

5.4.2.2. Efecto del contenido de fructosa y nitrógeno en la síntesis de PHB

La fructosa ha sido reportada como la fuente de carbono más fácilmente utilizada por *C. necator*, obteniéndose, a partir de la misma, mayores productividades de PHB con respecto a la glucosa u otras fuentes más complejas como la melaza (Sharifzadeh *et al.*, 2011). Por este motivo, se optó por el uso de este azúcar como sustrato para la producción de PHB en el presente estudio.

Las Figuras 24, 25 y 26 muestran el consumo de la fructosa y el nitrógeno del medio de cultivo para las tres concentraciones de fuente de carbono evaluadas.



C

Figura 24. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 30 g/L de fructosa a las 25 h de proceso
A: Repetición 1, B: Repetición 2, C: Repetición 3

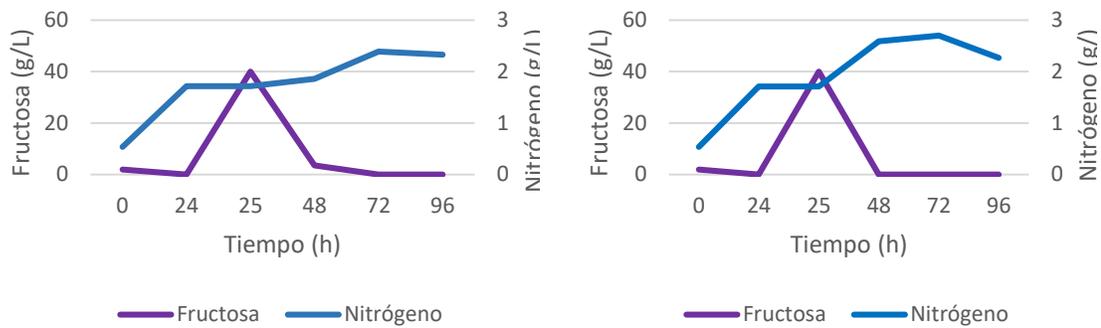
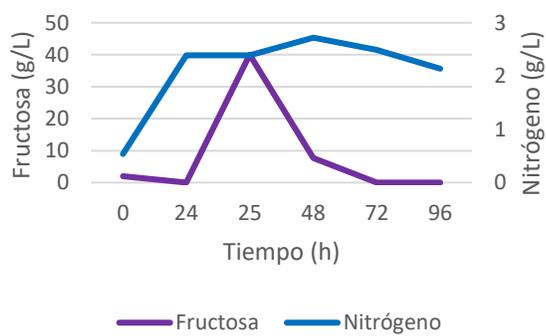
**A****B****C**

Figura 25. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 40 g/L de fructosa a las 25 h de proceso
 A: Repetición 1, B: Repetición 2, C: Repetición 3

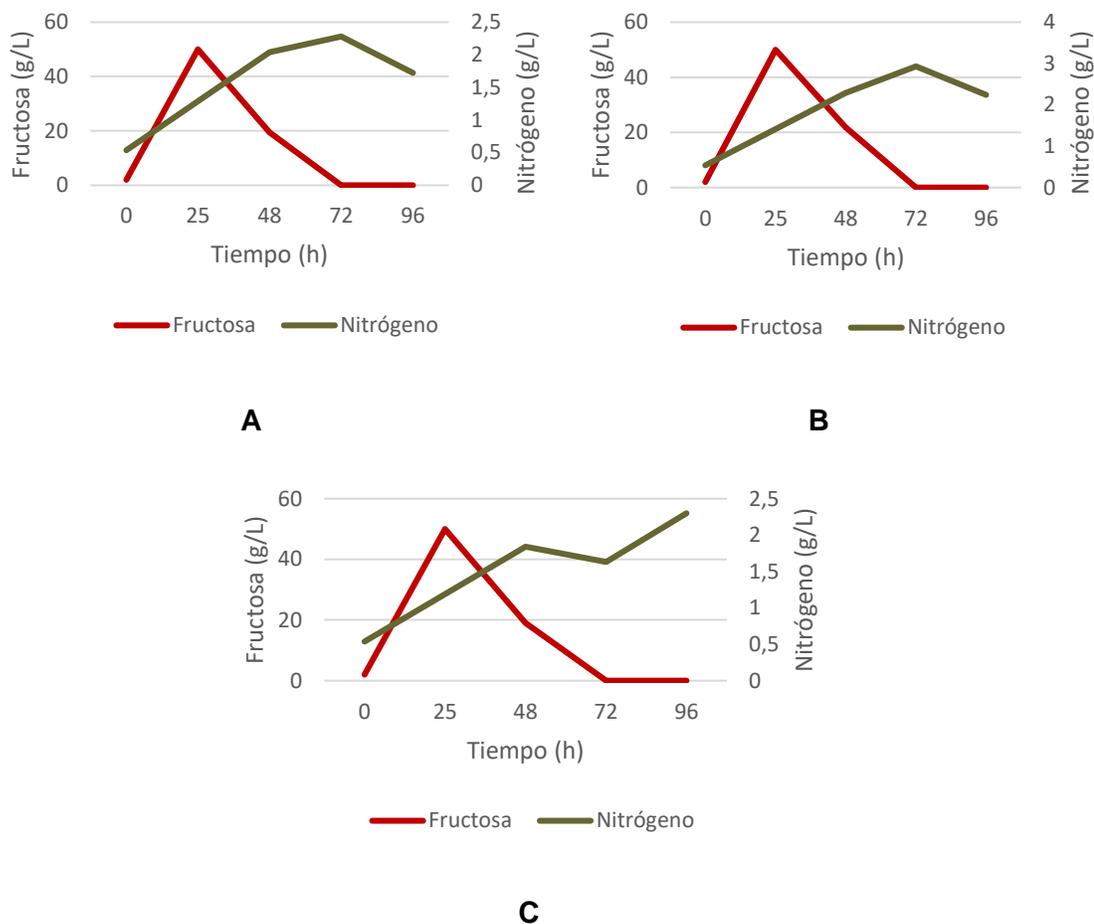


Figura 26. Comportamiento de la fructosa y el nitrógeno durante la fermentación suplementada con 50 g/L de fructosa a las 25 h de proceso
A: Repetición 1, B: Repetición 2, C: Repetición 3

Huschner *et al.* (2015) obtuvieron la máxima productividad de PHAs con la cepa ATCC 17699 de *C. necator* a las 48 h de cultivo, al emplear una relación C/N (moles C/ moles N) de 90 durante la fase de acumulación del polímero. Además, concentraciones importantes de PHAs (g PHA/ g de biomasa seca) fueron acumulados al utilizar otros valores de C/N; por ejemplo, para C/N: 50 se reportó una productividad de 76%, para C/N, 130, un 86%, para C/N: 290 un 78% y para C/N: 580 cerca de un 80%. En el Cuadro 20. se resumen los cálculos de las relaciones entre carbono y nitrógeno a las 25 horas de fermentación, tiempo estimado para el inicio de la fase de producción de PHB.

Cuadro 20. Relaciones carbono/nitrógeno al inicio de la fase de producción de PHB

Fructosa (g/L)	Carbono (moles)	Nitrógeno (moles)	Relación C/N
30	1,02	0,16	6,49
40	1,32	0,14	9,53

^a Moles teóricas de carbono calculadas a partir de la concentración de prueba de fructosa a las 25 horas de fermentación.

^b Moles calculadas a partir del promedio de los resultados de las determinaciones analíticas de nitrógeno a las 25 h de fermentación.

Nygaard *et al.* (2019) optimizaron la composición de un medio de cultivo para la producción de PHB empleando la cepa ATCC 17967 de *Cupriavidus necator*. La máxima producción del polímero fue obtenida al emplear una relación de 10 moles (C/N). Este nivel de fuente de nitrógeno permitió un adecuado balance entre el crecimiento de biomasa (6,5 g/L) y la producción de PHB (4,6 g/L), lo cual equivale a un rendimiento cercano al 70% en masa seca. Tal y como se observa en el Cuadro 20, para el inicio de la etapa de producción de PHB se obtuvieron relaciones C/N relativamente bajas en comparación con los resultados de Huschner *et al* (2015) y Nygaard *et al* (2019), independientemente de la concentración inicial de fructosa evaluada. Esto pudo deberse a que, contrario a lo esperado, no se observó una disminución en la concentración de nitrógeno al finalizar la fase de crecimiento del microorganismo; por el contrario, la misma parece mantenerse constante, e incluso, mostrar un ligero incremento conforme transcurrió el proceso de fermentación (Figuras 24, 25 y 26). Se esperaba que, al consumirse el nitrógeno y acercarse su concentración a 0, el rango de relaciones C/N para las distintas concentraciones de fructosa evaluadas se incrementara cerca de las 25 horas de proceso, pudiéndose lograr relaciones de entre 30 y 250, aproximadamente, dependiendo del grado de consumo de la fuente de nitrógeno. Sin embargo, dicho comportamiento no fue observado.

Es posible que el ligero aumento en la concentración de nitrógeno elemental determinado analíticamente pueda deberse tanto al consumo de este por parte del microorganismo, como a una degradación de la biomasa microbiana, ya que, aparte de la fuente de nitrógeno contenida en el medio de cultivo inicial, no hubo adición de compuestos nitrogenados en ningún otro punto del proceso fermentativo.

Jin Wang & Han-Qing Yu (2007) observaron una disminución en la concentración de biomasa residual de *C. necator* ATCC 17699 a partir del tiempo de fermentación en el que el nitrógeno se agota completamente, fenómeno que se atribuye a la autólisis celular. Además, como es esperable, se determinó que la concentración de PHB en el caldo de fermentación disminuyó tras el agotamiento de la fuente de carbono, debido al consumo del polímero como fuente de energía por parte del microorganismo. Para *C. necator* se ha observado que tanto la concentración como el contenido intracelular de PHAs disminuyen al darse el agotamiento del sustrato. Esto se atribuye a que dichos polímeros son utilizados por el microorganismo como fuente de energía (Poomipuk *et al.*, 2014).

La fuente de nitrógeno brinda precursores indispensables para la síntesis de aminoácidos, que a su vez son requeridos para la formación de biomasa bacteriana. Por lo tanto, una limitación de nitrógeno ocasiona, en primer lugar, un retraso en el crecimiento celular. Es importante considerar también que el acetil-co-A constituye un precursor necesario tanto para la producción de PHB como para la formación de biomasa. Debido a esto, ambos procesos compiten entre sí por la utilización del acetil-co-A (Park *et al.*, 2011).

Para la obtención de una alta productividad de PHAs mediante la aplicación de un sistema fed-batch, debe contarse con una estrategia adecuada de alimentación del sustrato durante la fase de producción, dado que, bajo condiciones de limitación de la

fuerza de carbono, ocurrirá la degradación del polímero por acción enzimática (Ienczak *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que niveles bajos de nitrógeno en la fase de producción de PHAs promueven un limitado crecimiento celular, a la vez que permiten obtener concentraciones óptimas de los polímeros. Esto se explica con base en la ruta metabólica de *C. necator* involucrada en la síntesis de PHAs. La coenzima NADPH se forma durante la asimilación de carbono mediante la ruta de Entner-Doudoroff. Sin embargo, en altas concentraciones, esta coenzima puede inhibir las enzimas involucradas en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), el cual es responsable de la síntesis de PHAs. Cuando se cuenta con un alto nivel de nitrógeno, NADPH se dirige hacia el crecimiento celular, mientras que, si su concentración es limitante, el NADPH es utilizado para la acumulación de estos polímeros. De esta manera, en condiciones de limitación de nitrógeno, disminuye la tasa de consumo del NADPH y este es acumulado, promoviendo la síntesis de PHAs (Dalsasso, Pavan, Bordignon, de Aragão, *et al.*, 2019).

Contrario a lo ocurrido para las concentraciones de 30 y 40 g/L de fructosa, para la fermentación suplementada con 50 g/L de dicho azúcar se obtuvieron valores detectables de PHB a las 96 horas (Cuadro 23), lo cual podría sugerir un efecto de una mayor relación C/N inicial para este tratamiento.

Con base en lo anterior, la ausencia de PHB en las muestras de los distintos tiempos de fermentación podría explicarse por la presencia de una relación C/N poco favorecedora para la síntesis de este polímero, dado que no se observó consumo de nitrógeno para ninguna de las pruebas realizadas.

5.4.3. Presencia de ácidos grasos en muestras de fermentación

Además de la señal correspondiente al Metil (S)-(+)-3-hidroxiбутirato (PHB), en las muestras de las fermentaciones en biorreactor se obtuvieron señales correspondientes a diversos ácidos grasos y ácidos carboxílicos, los cuales se encuentran detallados en el Cuadro 21 y la Figura 27.

Cuadro 21. Compuestos presentes en las muestras de fermentación en biorreactor, identificados mediante CG-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Metil (S)-(+)-3-hidroxiбутirato (PHB)	5,08
Metil éster del ácido levulínico	6,06
Dimetil éster del ácido succínico	6,25
Metil éster del ácido láurico	8,01
Metil éster del ácido mirístico	10,03
Ácido glutárico, 2-oxo-, dimetil éster	10,92

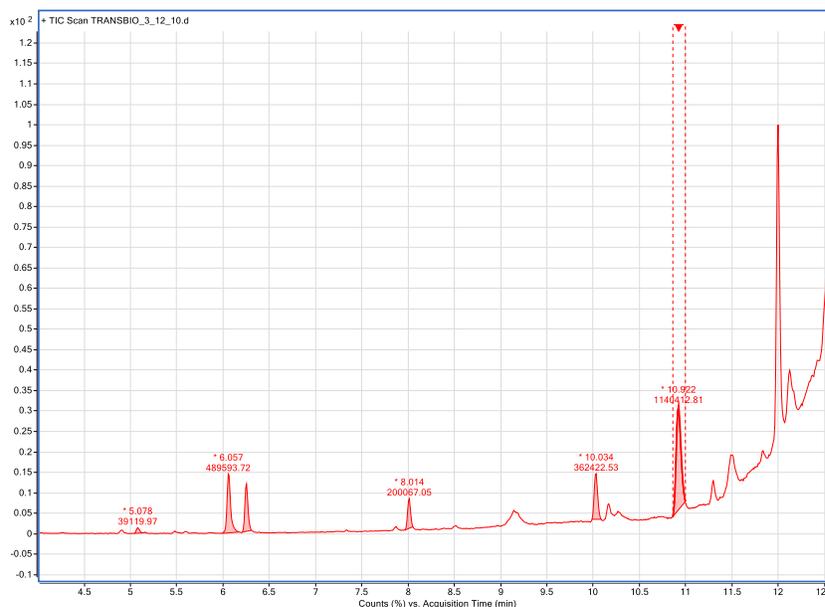


Figura 27. Cromatograma de las muestras de fermentación en biorreactor, mostrando los distintos compuestos identificados

Como se observa en la Figura 27, las áreas de pico para los ácidos identificados mediante CG-MS son mayores que el área del 3-MHB. Sin embargo, resulta necesario

realizar una cuantificación con un estándar adecuado con el fin de determinar si efectivamente la concentración de estos compuestos es significativa.

El ácido levulínico (AL), también conocido como ácido 4-cetovalérico, es un compuesto que puede derivarse a partir de carbohidratos simples, almidones y biomasa lignocelulósica. Se sabe que *C. necator* es capaz de incorporar monómeros de 3HB, 3HV y ácido 4-hidroxisovalérico (4HV) en los polímeros de PHA cuando cuenta con disponibilidad de ácido levulínico en bajas concentraciones (menores a 2 g/L), ya sea como única fuente de carbono, o bien, como co-sustrato. El AL constituye también una fuente de carbono adecuado para el crecimiento de *C. necator* (Jaremko & Yu, 2011).

Werker *et al* (2008) han reportado la detección de varias señales mediante CG-MS. Los autores consideran dichos compuestos se originan como productos del proceso de alcoholólisis (en el caso de este estudio, butanolólisis), o bien, corresponden a subproductos derivados tanto de la degradación de la biomasa celular como de algunos metabolitos microbianos. En dicha investigación, se identificó tentativamente mediante NIST la señal del ácido levulínico, el cual se deriva de los polisacáridos constituyentes de la biomasa bacteriana. Se detectó además una señal correspondiente al dibutil éster del ácido succínico, el cual es considerado un producto del metabolismo microbiano. De manera similar y según lo detallado en el Cuadro 21, ambos compuestos también fueron detectados para las fermentaciones con *C. necator*, en sus formas de metil éster y dimetil éster, respectivamente. Con base en lo anterior, es posible que la señal de ácido levulínico detectada en los distintos cromatogramas se derive ya sea del metabolismo microbiano a partir del azúcar simple empleado, o bien, de la degradación de la biomasa de *C. necator*.

Varios de los ácidos grasos detectados mediante el análisis de PHB por CG corresponden a constituyentes comunes de la biomasa bacteriana, por lo que su

presencia en los cromatogramas puede ser producto de la hidrólisis celular que se lleva a cabo mediante la extracción de las muestras mediante metanólisis ácida.

Finalmente, es importante notar que la biosíntesis de los PHAs y de los ácidos grasos comparten una única ruta metabólica, en donde tanto el acetil-CoA como el propionil-CoA constituyen intermediarios comunes. Así, ambas rutas compiten por precursores, principalmente si el cultivo bacteriano se lleva a cabo en condiciones de limitación nutricional. Los mecanismos que podrían explicar dicha competición no han sido aún dilucidados, por lo que se requiere mayor investigación que permita dirigir el proceso de síntesis hacia el componente deseado, obtener altas productividades de PHAs y controlar de manera más precisa la composición de estos polímeros (Magdouli *et al.*, 2015). En consecuencia, resulta también posible que los ácidos grasos detectados mediante CG-MS correspondan a productos de esta ruta metabólica, cuya síntesis se vio favorecida con respecto a la de los PHAs.

6. CONCLUSIONES

Seguidamente se resumen las principales conclusiones derivadas del presente trabajo, para cada uno de los objetivos específicos planteados.

6.1. Definición del método de análisis para la detección y cuantificación de polihidroxitirato (PHB) a partir de biomasa bacteriana

La aplicación de la metodología de metanólisis ácida para la extracción de PHB a partir de biomasa bacteriana permitió una recuperación del polímero cercana al 94%. A pesar de que mediante este protocolo resultó factible la recuperación de los PHAs directamente a partir del cultivo sin procesar, para los casos en que se utiliza el medio de cultivo suplementado con JSB resulta indispensable llevar a cabo una centrifugación del cultivo previo al proceso de extracción con el fin de eliminar el medio y realizar el procedimiento a partir de biomasa re-suspendida en agua. Esto debido a que se determinó la presencia de interferencias en el JSB que limitan la cuantificación del PHB mediante cromatografía de gases.

Mediante el método cromatográfico implementado se logró una adecuada separación y cuantificación del PHB proveniente de muestras biológicas. Para el método de CG con detección FID se determinaron límites de detección y cuantificación de 0,081 g/L y 0,271, respectivamente. En el caso del método de cuantificación por CG con detección MS-MS se calculó un límite de detección de 0,0059 g/L y un límite de cuantificación de 0,0196 g/L.

6.2. Comparación de la capacidad de producción de PHB de distintas cepas bacterianas nativas, así como de una cepa control de *Cupriavidus necator*

Con excepción de la cepa CR-12, correspondiente a *Cupriavidus necator*, no se obtuvo una producción de PHB cuantificable mediante CG-FID para las cepas aisladas cultivadas en el medio sintético KS.

La mejor producción de PHB en caldo sintético fue obtenida al emplear la cepa control de *C. necator* (ATCC 17699) y correspondió a una concentración de 2,82 g/L, la cual es significativamente mayor ($p \leq 0,05$) a la concentración de 0,49 g/L lograda para la cepa nativa CR-12.

Debido a la necesidad de contar con la mejor cepa productora de PHB para la posterior implementación del proceso fermentativo en biorreactor, la cepa de control fue seleccionada para la ejecución de las actividades correspondientes a los objetivos específicos 3 y 4 del presente proyecto, sin embargo, es importante resaltar que la cepa CR-12 resulta promisoría para la realización de nuevos estudios de fermentación, pues aún no se conoce su comportamiento en el medio de cultivo suplementado con JSB.

6.3. Diseño de un medio de cultivo suplementado con jugo de subproducto de banano para la producción de biomasa bacteriana productora de PHB

De acuerdo con lo inferido a partir del análisis de superficie de respuesta, tanto la concentración de JSB como la de NH_4Cl tienen un efecto significativo en la producción de biomasa de la cepa de control de *C. necator*, siendo mayor la influencia del JSB.

Se observó un comportamiento lineal de los datos, en donde la concentración de biomasa medida como densidad óptica a 425 nm aumenta al disminuir las

concentraciones de carbono (JSB) y nitrógeno (NH_4Cl). Las concentraciones óptimas que promueven la maximización de la concentración celular determinadas para ambos componentes fueron de 5% y 2 g/L, respectivamente.

Es importante mencionar que, dado que dichas concentraciones corresponden a los límites inferiores del diseño experimental utilizado, resulta importante ampliar el espacio experimental incluyendo menores niveles de ambos componentes, con el fin de determinar en qué medida se mantiene la tendencia lineal de los datos y si es posible obtener mayores densidades celulares de *C. necator* al emplear menores concentraciones de JSB y NH_4Cl .

6.4. Implementación de un proceso fermentativo en biorreactor de 7 L

Para las fermentaciones tipo lote alimentado suplementadas con 30 g/L y 40 g/L de fructosa como fuente de carbono no se obtuvieron concentraciones detectables de PHB para ninguno de los tiempos de muestreo. En el caso de la fermentación suplementada con 50 g/L de fructosa, para los tiempos de fermentación de 48, 72 y 96 horas, si bien para la mayoría de las pruebas no se obtuvieron concentraciones cuantificables de PHB, las mismas fueron detectables mediante CG-MS.

Debido a que no se observó una disminución de la concentración de nitrógeno para ninguna de las pruebas fermentativas, es probable que no se haya logrado inducir una limitación de dicho nutriente, la cual promovería la acumulación de PHB. Dada la permanencia de nitrógeno en el cultivo, las relaciones C/N obtenidas para los tres tratamientos con fructosa fueron demasiado bajas para inducir la síntesis de PHB. Sin embargo, la mayor relación C/N presente en la fermentación suplementada con 50 g/L probablemente permitió la obtención de niveles detectables de PHB.

Debido a limitaciones de acceso a los biorreactores e infraestructura necesarios, no fue posible realizar repeticiones adicionales para la fermentación con 50 g/L de fructosa, en la cual se obtuvo una producción de PHB de 3,84 g/L a las 96 horas de cultivo, pero concentraciones mucho menores para las otras dos repeticiones. Por tanto, el valor promedio de producción de PHB de 1,3 g/L no resulta concluyente y requiere ser verificado.

7. RECOMENDACIONES

- a. Profundizar en el estudio de la cepa CR-12 de *Cupriavidus necator* en medio suplementado con JSB, ya que dicho microorganismo únicamente fue evaluado en medio sintético. Resultaría interesante evaluar su desempeño con fuentes de carbono distintas a la fructosa, específicamente glucosa, pues de resultar viable llevar a cabo fermentaciones empleando este azúcar, el control del proceso sería más fácil y eficiente, ya que la determinación del nivel de fuente de carbono mediante el analizador bioquímico YSI, permitiría realizar ajustes de la concentración de este nutriente en tiempo real.
- b. Evaluar la factibilidad de realizar “screening” de los residuos de banano para buscar potenciales microorganismos acumuladores de PHAs, que, a su vez, tengan una buena adaptación a este tipo de material. Se debería poner especial atención a la búsqueda y/o evaluación de microorganismos con capacidad de acumulación de PHAs asociada al crecimiento, pues de este modo, se podrían diseñar procesos de fermentación más cortos y menos dependientes del estricto control de los niveles de nutrientes que se requiere al emplear microorganismos que por sus características metabólicas, demandan la implementación de fermentaciones en dos etapas.
- c. Para posteriores pruebas fermentativas, ya sea a nivel de erlenmeyer o biorreactor, resultaría útil probar el método espectrofotométrico propuesto por Porras et al (2018) con el fin de determinar si es posible llevar a cabo una cuantificación de PHAs en tiempo real durante el transcurso de las fermentaciones.
- d. Para la realización de fermentaciones en biorreactor, resultaría importante trabajar en la obtención de inóculos más concentrados, dado que, al tratarse el

PHB de un polímero acumulado intracelularmente, la obtención de altas productividades depende directamente de la consecución de altas densidades de biomasa.

- e. Debido a que, una vez que ocurre el agotamiento de la fuente de carbono, el PHB es metabolizado por *C. necator* como fuente de energía, sería importante llevar a cabo una mayor frecuencia de muestreos, con el fin de determinar de mejor manera los tiempos en que la producción del polímero alcanza su punto máximo antes de ser consumido.
- f. Es importante mejorar la cuantificación de la concentración de biomasa a lo largo de todo el proceso de fermentación, con el fin de determinar si los niveles de nitrógeno determinados analíticamente están relacionados con la autólisis celular. Es importante también la obtención de información correspondiente a la biomasa viable durante todo el proceso.
- g. En la medida de lo posible, se debe trabajar en el ajuste de parámetros de la fermentación en biorreactor tales como: velocidad de agitación, espacio de cabeza del cultivo, tipo y cantidad de agentes antiespumantes empleados y flujo de gases, todo esto con el propósito de mejorar la disponibilidad de oxígeno disuelto en el cultivo, de modo que logren alcanzarse niveles superiores al 15% de acuerdo con lo reportado más comúnmente en la literatura.
- h. Se recomienda repetir la fermentación en biorreactor con 50 g/L de fructosa, con el fin de verificar la producción de PHB obtenida.
- i. Es recomendable estudiar más a fondo la presencia de ácido succínico en las fermentaciones y cuantificar el mismo con un estándar adecuado, pues es un compuesto de interés para el desarrollo del biopolímero polibutileno succinato.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agnew, D. E., & Pflieger, B. F. (2013). Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. *Synthetic Biology*, 103, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.12.023>
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 732–743. <https://doi.org/10.1002/jctb.2392>
- Albuquerque, M. G. E., Concas, S., Bengtsson, S., & Reis, M. A. M. (2010). Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresource Technology*, 101(18), 7112–7122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.019>
- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>
- Alias, Z., & Tan, I. K. P. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 96(11), 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.012>
- Amini, M., Yousefi-Massumabad, H., Younesi, H., Abyar, H., & Bahramifar, N. (2020). Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 103588. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103588>

- Amirul, A. A., Yahya, A. R. M., Sudesh, K., Azizan, M. N. M., & Majid, M. I. A. (2008). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Exploring Horizons in Biotechnology: A Global Venture*, 99(11), 4903–4909. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.040>
- Aramvash, A., Akbari Shahabi, Z., Dashti Aghjeh, S., & Ghafari, M. D. (2015). Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), 2307–2316. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>
- Ashby, R. D., Cromwick, A.-M., & Foglia, T. A. (1998). Radiation crosslinking of a bacterial medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) elastomer from tallow. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(1), 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00034-8)
- Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., Chiellini, E., & Braunegg, G. (2011a). Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(2), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3260-0>
- Azizi, N., Najafpour, G., & Younesi, H. (2017). Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 1029–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.184>
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111–118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Boulal, A., Atabani, A. E., Mohammed, M. N., Khelafi, M., Uguz, G., Shobana, S., Bokhari, A., & Kumar, G. (2019). Integrated valorization of *Moringa oleifera* and waste

- Phoenix dactylifera* L. dates as potential feedstocks for biofuels production from Algerian Sahara: An experimental perspective. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101234. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101234>
- Brigham, C. J., Zhila, N., Shishatskaya, E., Volova, T., & Sinskey, A. J. (2012). Manipulation of *Ralstonia eutropha* Carbon Storage Pathways to Produce Useful Bio-Based Products. En *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways. Subcellular Biochemistry*. Springer Science+Business Media.
- Budde, C. F., Riedel, S. L., Hübner, F., Risch, S., Popović, M. K., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2011). Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1611–1619. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3102-0>
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*, 62, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016>
- Carrapiso, A. I., & García, C. (2000). Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and in situ Transesterification. *Lipids*, 35(11).
- Castilho, L. R., Mitchell, D. A., & Freire, D. M. G. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), 5996–6009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>
- Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., & Okon, Y. (2010). Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14, pp. 40–56). Springer Science+Business Media.

- Cavalheiro, J. M. B. T., Almeida, M. C. M. D. de, Fonseca, M. M. R. da, & Carvalho, C. C. R. de. (2013). Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Biotechnology*, *164*(2), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.009>
- Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C., & da Fonseca, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, *44*(5), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.008>
- Cavalheiro, J. M. B. T., Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M. D., Teresa Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., & da Fonseca, M. M. R. (2012). Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, *111*, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>
- Cesário, M. T., Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M. D., van Keulen, F., Ferreira, B. S., & da Fonseca, M. M. R. (2014). Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*, *31*(1), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.004>
- Chan-Blanco, Y., Bonilla-Leiva, A. R., & Velázquez, A. C. (2003). Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(2), 147–152. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1374-8>
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *110*(6), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Chen, B.-Y., Shiau, T.-J., Wei, Y.-H., & Chen, W.-M. (2012). Feasibility study on polyhydroxybutyrate production of dye-decolorizing bacteria using dye and

- amine-bearing cultures. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(2), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.09.001>
- Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38, 2434–2446.
- Chen, G.-Q. (2010a). Industrial Production of PHA. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14). Springer Science+Business Media.
- Chen, G.-Q. (2010b). Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14, pp. 2–11). Springer.
- Chen, G.-Q. (2010c). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. En A. Steinbüchel, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14, pp. 17–38). Springer.
- Çiğgin, A. S., Karahan, Ö., & Orhon, D. (2009). Effect of high nitrate concentration on PHB storage in sequencing batch reactor under anoxic conditions. *Bioresource Technology*, 100(3), 1376–1382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.036>
- Clementz, A., Torresi, P. A., Molli, J. S., Cardell, D., Mammarella, E., & Yori, J. C. (2019). Novel method for valorization of by-products from carrot discards. *LWT*, 100, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.085>
- Coats, E. R., Loge, F. J., Wolcott, M. P., Englund, K., & McDonald, A. G. (2008). Production of natural fiber reinforced thermoplastic composites through the use of polyhydroxybutyrate-rich biomass. *Bioresource Technology*, 99(7), 2680–2686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.065>
- Cohen, A. E. (2011). *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues*. Nova Science Publishers, Inc; eBook Academic Collection (EBSCOhost). <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=431068&lang=es&site=ehost-live&scope=site>

- CORBANA. (2019). *Estadísticas bananeras*. Corporación Bananera Nacional.
<http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>
- Cruz-Hernández, C., & Destailats, F. (2012). Analysis of Lipids by Gas Chromatography. En *Gas Chromatography: Vol. 1st ed.* Elsevier; e000xww.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=465005&site=ehost-live&scope=site>
- da Cruz Pradella, J. G., Ienczak, J. L., Delgado, C. R., & Taciro, M. K. (2012). Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Letters*, 34(6), 1003–1007. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0863-1>
- Dalal, J., Sarma, P. M., Lavania, M., Mandal, A. K., & Lal, B. (2010). Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA). *Pedobiologia*, 54(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2010.08.004>
- Dalsasso, R. R., Pavan, F. A., Bordignon, S. E., Aragão, G. M. F. de, & Poletto, P. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, 85(July), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>
- Dávila-Aviña, J. E., Zoellner, C., Solís-Soto, L., Rojas-Verde, G., & García-Amezquita, L. E. (2018). Economic and Environmental Benefits of Utilizing Plant Food By-products. En *Plant Food By-Products. Industrial Relevance for Food Additives and Nutraceuticals* (Primera, p. 382). Apple Academic Press.
- Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S., O'Donovan, A., Guzik, M., Shaikh, H., Duane, G., Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Padamatti, R. B., Casey, E., & O'Connor, K. E. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars

- and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150(Supplement C), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.001>
- de la Rosa, O., Flores-Gallegos, A. C., Muñiz-Marquez, D., Nobre, C., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.013>
- Dejaegher, B., Smeyers-Verbeke, J., & Vander Heyden, Y. (2012). Validation of Gas Chromatographic Methods. En *Gas Chromatography: Vol. 1st ed.* Elsevier; e000xww.
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=465005&site=ehost-live&scope=site>
- Demichelis, F., Pleissner, D., Fiore, S., Mariano, S., Navarro Gutiérrez, I. M., Schneider, R., & Venus, J. (2017). Investigation of food waste valorization through sequential lactic acid fermentative production and anaerobic digestion of fermentation residues. *Bioresource Technology*, 241, 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.174>
- Divyashree, M. S., Rastogi, N. K., & Shamala, T. R. (2009). A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *Special issue on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology: number 1*, 26(1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.04.004>
- Dobroth, Z. T., Hu, S., Coats, E. R., & McDonald, A. G. (2011). Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource Technology*, 102(3), 3352–3359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.053>
- Elain, A., Le Grand, A., Corre, Y.-M., Le Fellic, M., Hachet, N., Le Tilly, V., Loulergue, P., Audic, J.-L., & Bruzard, S. (2016). Valorisation of local agro-industrial processing

- waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products*, *80*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.052>
- El-Sayed, A., Azhar, H. M., Abdelhady, A., Abdel, H., & Khodair, T. (2009). Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies. *Journal of Applied Sciences Research*, *5*(5), 556–564.
- EUBIO. (2019). Bioplastics. *European Bioplastics e.V.* <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>
- Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.*
- European Bioplastics. (2019). *Frequently asked questions on bioplastics.* https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_FAQ_on_bioplastics.pdf
- Follonier, S., Goyder, M. S., Silvestri, A.-C., Crelier, S., Kalman, F., Riesen, R., & Zinn, M. (2014). Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Special Issue: Biodegradable biopolymers*, *71*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.061>
- Franz, A., Song, H.-S., Ramkrishna, D., & Kienle, A. (2011). Experimental and theoretical analysis of poly(β -hydroxybutyrate) formation and consumption in *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*, *55*(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.03.006>
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, *26*(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>

- García, I. L., López, J. A., Dorado, M. P., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Papanikolaou, S., Villar, M. A., & Koutinas, A. A. (2013). Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *130*, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.088>
- Garcia-Gonzalez, L., Mozumder, Md. S. I., Dubreuil, M., Volcke, E. I. P., & De Wever, H. (2015). Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. *Biomass valorization into fuels, energy, materials and chemicals (UBIOCHEM-IV)*, *257*, Part 2, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.025>
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, *9*, 1–9. a9h.
- Gholami, A., Mohkam, M., Rasoul-Amini, S., & Ghasemi, Y. (2016). Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges. *Minerva Biotechnologica*, *28*(1), 59–74.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, *156*(3), 201–207. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>
- Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M. G. E., Paul, E., & Uribe Larrea, J.-L. (2014). Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *148*, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.120>

- Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M. G. E., Paul, E., & Uribelarrea, J.-L. (2014c). Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *153*, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.072>
- Gumel, A. M., Chisti, Y., & Annuar, M. S. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, *21*, 580–605.
- Guyllène, A., Parfait, B., & Fährasmane, L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(2), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>
- Hafuka, A., Sakaida, K., Satoh, H., Takahashi, M., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2011). Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3551–3553. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.018>
- HGCA. (2009). *Industrial Uses for Crops: Bioplastics*.
- Huschner, F., Grousseau, E., Brigham, C. J., Plassmeier, J., Popovic, M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2015). Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochemistry*, *50*(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.004>
- Ienczak, J. L., Schmidell, W., & de Aragão, G. M. F. (2013). High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: A review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *40*(3), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1236-z>

- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jin Wang & Han-Qing Yu. (2007). Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. *Applied Microbiology & Biotechnology*, *75*(4), 871–878. a9h.
- Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*, *10*, 670–676.
- Jung, Y. K., Lee, S. Y., & Tam, T. T. (2010). Towards Systems Metabolic Engineering of PHA Producers. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14, pp. 64–79). Springer Science+Business Media.
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda. *Ecology and industrial microbiology • Special section: Systems biology*, *13*(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005a). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, *40*(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005b). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, *40*(6), 2173–2182. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, *43*, 892–898.

- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. En *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (Vol. 14, pp. 86–114). Springer Science+Business Media.
- Kulkarni, S. O., Kanekar, P. P., Jog, J. P., Sarnaik, S. S., & Nilegaonkar, S. S. (2015). Production of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 784–789. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.028>
- Kulkarni, S. O., Kanekar, P. P., Nilegaonkar, S. S., Sarnaik, S. S., & Jog, J. P. (2010). Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresource Technology*, 101(24), 9765–9771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.089>
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006>
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 38, 536–583.
- Leong, Y. K., Show, P. L., Ooi, C. W., Ling, T. C., & Lan, J. C.-W. (2014). Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 180, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.020>

- Li, M., & Wilkins, M. (2020). Fed-batch cultivation and adding supplements to increase yields of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* from corn stover alkaline pretreatment liquor. *Bioresource Technology*, 299, 122676. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122676>
- Li, T., Elhadi, D., & Chen, G.-Q. (2017). Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic Engineering*, 43, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.07.007>
- Liu, Z., Wang, Y., He, N., Huang, J., Zhu, K., Shao, W., Wang, H., Yuan, W., & Li, Q. (2011). Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.003>
- López, R., Velázquez, C., & Morales, I. (2008). Evaluación del fruto del banano (Musa AAA Cavendish) de rechazo de exportación como sustrato para la producción de L (+) ácido láctico utilizando *Lactobacillus casei rhamnosus*. *Alimentica*, 4(23).
- López-Cuellar, M. R., Alba-Flores, J., Rodríguez, J. N. G., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016>
- Magdoui, S., Brar, S. K., Blais, J. F., & Tyagi, R. D. (2015). How to direct the fatty acid biosynthesis towards polyhydroxyalkanoates production? *Biomass and Bioenergy*, 74, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.12.017>
- Maity, S., Das, S., Mohapatra, S., Tripathi, A. D., Akthar, J., Pati, S., Pattnaik, S., & Samantaray, D. P. (2020). Growth associated polyhydroxybutyrate production by the novel *Zobellellae tiwanensis* strain DD5 from banana peels under submerged fermentation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.004>

- Matsumoto, K., Morimoto, K., Gohda, A., Shimada, H., & Taguchi, S. (2011). Improved polyhydroxybutyrate (PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(4), 485–488. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.11.020>
- Maturin, L., & Peeler, J. T. (2001). Aerobic Plate Count. En *Bacteriological Analytical Manual* (8a ed.). U.S Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm#conventional>
- Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M.-R., & Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- Moralejo-Gárate, H., Kleerebezem, R., Mosquera-Corral, A., & van Loosdrecht, M. C. M. (2013). Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. *Water Research*, 47(3), 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.039>
- Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., Otaif, K. A., Alamri, S. A., Mostafa, M. S., & Sahlabji, T. (2020). Production and Characterization of Bioplastic by Polyhydroxybutyrate Accumulating *Erythrobacter aquimaris* Isolated from Mangrove Rhizosphere. *Molecules*, 25(1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010179>
- Mozumder, Md. S. I., Garcia-Gonzalez, L., De Wever, H., & Volcke, E. I. P. (2015). Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 191, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.110>

- Muralisrinivasan Subramanian, N. (2016). *Plastics Waste Management: Processing and Disposal*. Smithers Rapra; e000xww. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=1237412&site=ehost-live&scope=site>
- Naranjo, J. M., Cardona, C. A., & Higuera, J. C. (2014). Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery. *Waste Management*, 34(12), 2634–2640. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.007>
- Nayak, A., & Bhushan, B. (2019). An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *Journal of Environmental Management*, 233, 352–370. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.041>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., & Hermida, É. B. (2019). Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: Application of the response surface methodology. *Heliyon*, 5(3), e01374. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01374>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., Nosedá, D. G., Araoz, B., & Hermida, É. B. (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. *Heliyon*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05979>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), & Organización Mundial de la salud (OMS). (2017). *CODEX ALIMENTARIUS. Directrices sobre criterios de rendimiento para métodos de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. CXG 90-2017*. [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252F)

252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BGL%2B90-
2017%252FCXG_090s.pdf

- Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(1), 238–241.
- Pais, J., Farinha, I., Serafim, L. S., Prieto, M. A., Arévalo-Rodríguez, M., & Reis, M. A. M. (2009). Bioplastics production from cheese whey by recombinant *E. coli*. *Abstracts of the 14th European Congress on Biotechnology Barcelona, Spain 13–16 September, 2009*, 25, S220. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.181>
- Pakalapati, H., Chang, C.-K., Show, P. L., Arumugasamy, S. K., & Lan, J. C.-W. (2018). Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *126*(3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>
- Pareek, S. (2016). Chapter 3—Nutritional and Biochemical Composition of Banana (*Musa spp.*) Cultivars. En M. S. J. Simmonds & V. R. Preedy (Eds.), *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 49–81). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00003-9>
- Park, J. M., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2011). Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems Biology*, *5*, 101.
- Passanha, P., Esteves, S. R., Kedia, G., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2013). Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology*, *147*, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.050>
- Patel, S. K. S., Singh, M., Kumar, P., Purohit, H. J., & Kalia, V. C. (2012). Exploitation of defined bacterial cultures for production of hydrogen and polyhydroxybutyrate

- from pea-shells. *Biomass and Bioenergy*, 36(Supplement C), 218–225.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.10.027>
- Pati, S., Maity, S., Dash, A., Jema, S., Mohapatra, S., Das, S., & Samantaray, D. P. (2020). Biocompatible PHB Production from *Bacillus* Species Under Submerged and Solid-State Fermentation and Extraction Through Different Downstream Processing. *Current Microbiology*, 77(7), 1203–1209.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-01922-7>
- Pereira, G. A., Arruda, H. S., Molina, G., & Pastore, G. M. (2018). Extraction optimization and profile analysis of oligosaccharides in banana pulp and peel. *Journal of Food Processing & Preservation*, 42(1), n/a-1. a9h.
- Pereira, J. R., Araújo, D., Freitas, P., Marques, A. C., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C., Fortunato, E., Reis, M. A. M., & Freitas, F. (2021). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca*: Cultivation on fruit pulp waste and polymer characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.162>
- Pérez-Arauz, A. O., Aguilar-Rabiela, A. E., Vargas-Torres, A., Rodríguez-Hernández, A.-I., Chavarría-Hernández, N., Vergara-Porras, B., & López-Cuellar, M. R. (2019). Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 20, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>
- Pieja, A. J., Sundstrom, E. R., & Criddle, C. S. (2011). Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism in the Type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6012–6019.

- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., & Nicolaus, B. (2011). Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea*.
- Poomipuk, N., Reungsang, A., & Plangklang, P. (2014). Poly- β -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp. KKU38. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.002>
- Porras, M. A., Villar, M. A., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.008>
- Povolo, S., Toffano, P., Basaglia, M., & Casella, S. (2010). Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology*, 101(20), 7902–7907. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.029>
- PROCOMER. (2016). *Estadísticas de comercio exterior Costa Rica 2015* (p. 64). Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica. http://procomer.com/downloads/estudios/estudio_estadistico_2015/Anuario_Estadistico_2015.pdf
- Purama, R. K., Al-Sabahi, J. N., & Sudesh, K. (2018). Evaluation of date seed oil and date molasses as novel carbon sources for the production of poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyhexanoate) by *Cupriavidus necator* H16 Re 2058/pCB113. *Industrial Crops and Products*, 119, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.013>
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future.

- Materials Science and Engineering: R: Reports*, 72(3), 29–47.
<https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>
- Rojas- Garbanzo, C., Pérez-Carvajal, A. M., Cortés-Muñoz, M., Soto-Retana, M., Thompson-Vicente, E., Romero-Chacón, R., Vega-Baudrit, J. R., Sibaja-Ballester, M. del R., Jiménez-Bonilla, P., Murillo-Viera, E., Camacho-Elizondo, M., & Velázquez-Carrillo, C. (2018). *Bioplásticos y agroindustria: Alternativas para la valorización de subproductos agroindustriales* (Primera). EUNED.
- SAC-SINGLAS. (2012). *Guidance Notes C&B and ENV001: Method Validation for Chemical Testing*.
- Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22(3), 261–279.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.003>
- Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *International Symposium on Biological Polyesters 2006*, 132(3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.721>
- Santhanam, A., & Sasidharan, S. (2010). Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. And *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology*, 9(21), 3144–3150.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Cho, S. K., Kim, D. S., Ghodake, G. S., Kadam, A., Kumar, G., Bharagava, R. N., Banu, R., & Shin, H. S. (2019). Pretreatment of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) biomass feedstock for polyhydroxybutyrate (PHB) production and characterization. *Bioresource Technology*, 282, 75–80.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.083>

- Sen, K. Y., Hussin, M. H., & Baidurah, S. (2019). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>
- Shang, L., Jiang, M., & Chang, H. N. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 25(17), 1415–1419. <https://doi.org/10.1023/A:1025047410699>
- Sharifzadeh, M., Najafpour, G. D., Younesi, H., Tabandeh, F., Issazadeh, H., & Khodabandeh, M. (2011). GROWTH KINETIC PARAMETERS AND BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYBUTYRATE IN *Cupriavidus necator* DSMZ 545 ON SELECTED SUBSTRATES. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 17(1), 1–8. a9h.
- Silva, J. A., Tobella, L. M., Becerra, J., Godoy, F., & Martínez, M. A. (2007). Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(6), 542–546. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.542>
- Sirohi, R., Prakash Pandey, J., Kumar Gaur, V., Gnansounou, E., & Sindhu, R. (2020). Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology*, 311, 123536. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123536>
- Somleva, M. N., Peoples, O. P., & Snell, K. D. (2013). PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 233–252. a9h.
- Standards Council of Canada. (2003). *Guidelines for the accreditation of environmental testing laboratories CAN-P-1598*. The Standards Council of Canada.

<http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm343/alaee%20old%20pages/Chemistry%20Terms%20and%20Definitions.doc>

- Steiner, R. (2006). *Utilización energética de residuos orgánicos en la industria bananera, cafetalera y azucarera en Costa Rica. Considerando el Mecanismo de Desarrollo Limpio* [Trabajo de Tesis: Ingeniería Ambiental]. Fachhochschule Nordwestschweiz, Institut für Ecopreneurship.
- Sudesh, K., Bhubalan, K., Chuah, J.-A., Yik-Kang Kek, Kamilah, H., Sridewi, N., & Yan-Fen Lee. (2011). Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 89(5), 1373–1386. a9h.
- Sukruansuwan, V., & Napathorn, S. C. (2018). Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1207-8>
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—A review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>
- Tedeschi, R., & De Paoli, P. (2011). Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. En J. Dillner (Ed.), *Methods in Biobanking* (pp. 313–326). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-423-0_18
- Thompson, E. (2015, agosto 4). *Procesamiento del subproducto de banano empleado en el Proyecto TRANSBIO* [M. Arias (Entrevistador)].
- Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., Song, H., Kim, K.-H., Kwon, E. E., & Jeon, Y. J. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*, 127, 625–644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076>

- Ugwu, C. U., Tokiwa, Y., & Ichiba, T. (2011). Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by fermentation and bioconversion processes with *Azohydromonas lata*. *Bioresource Technology*, 102(12), 6766–6768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.073>
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., & Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *International Symposium on Biological Polyesters 2006*, 132(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.013>
- Vega-Castro, O., Contreras-Calderon, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Pérez, L., & Sobral, P. J. A. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 231, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018>
- Volova, T. G., & Kalacheva, G. S. (2005). The synthesis of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate copolymers by the bacterium *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*, 74(1), 54–59. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0028-5>
- Werker, A., Lind, P., Bengtsson, S., & Nordström, F. (2008). Chlorinated-solvent-free gas chromatographic analysis of biomass containing polyhydroxyalkanoates. *Water Research*, 42(10), 2517–2526. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.011>
- Weusthuis, R. A., Lamot, I., van der Oost, J., & Sanders, J. P. M. (2011). Microbial production of bulk chemicals: Development of anaerobic processes. *Trends in Biotechnology*, 29(4), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.007>

- Wu, S. C., Liou, S. Z., & Lee, C. M. (2012). Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5. *Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering*, 113(Supplement C), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.090>
- Xia, J., Li, R., He, A., Xu, J., Liu, X., Li, X., & Xu, J. (2017). Production of poly(β -l-malic acid) by *Aureobasidium pullulans* HA-4D under solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 244, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.148>
- Yang, Y. H., Brigham, C. J., Budde, C., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2037–2045.
- Yu, J., & Stahl, H. (2008). Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(17), 8042–8048. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.071>
- Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H., & Gozan, M. (2019). Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.057>
- Zhila, N., Kalacheva, G., & Volova, T. (2015). Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochemistry*, 50(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.018>

9. ANEXOS

Anexo 1.

Análisis de Superficie de Respuesta para el diseño del medio de cultivo suplementado con JSB

Cuadro 19. Resumen de Ajuste

R Cuadrado	0,992635
R Cuadrado Ajustado	0,991057
Cuadrado Medio del Error	0,136719
Media de Respuesta	2,089778
Observaciones	18

Cuadro 20. Análisis de Varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Modelo	3	35,271323	11,7571	628,9910
Error	14	0,261688	0,0187	Prob > F
Total	17	35,533011		<,0001*

Cuadro 21. Estimación de parámetros

Factor	Estimado	Error Est	t Ratio	t Ratio	Prob> t
% Jugo (5,20)	-1,695417	0,039467	-42,96		<,0001*
NH ₄ Cl (2,5)	-0,239583	0,039467	-6,07		<,0001*
% Jugo*NH ₄ Cl	0,08625	0,039467	2,19		0,0464*