



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

OBTENCIÓN DEL POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DE LA
CÁSCARA DE PIÑA USANDO LA BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: SAMANTHA NICOLE CÁRDENAS PEÑA

NATHALY JOHANNA CASTILLO BERNAL

TUTOR: ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Samantha Nicole Cárdenas Peña con documento de identificación N° 0106272172 y Nathaly Johanna Castillo Bernal con documento de identificación N° 0106041585; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 31 de julio del 2023

Atentamente,



Samantha Nicole Cárdenas Peña

0106272172



Nathaly Johanna Castillo Bernal

0106041585

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotras, Samantha Nicole Cárdenas Peña con documento de identificación N° 0106272172 y Nathaly Johanna Castillo Bernal con documento de identificación N° 0106041585, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del Trabajo experimental: "Obtención del polihidroxitirato (PHB) a partir de la cáscara de piña usando la bacteria *Bacillus subtilis*", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 31 de julio del 2023

Atentamente,



Samantha Nicole Cárdenas Peña

0106272172



Nathaly Johanna Castillo Bernal

0106041585

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Braulio Amaya Pinos con documento de identificación N° 0103444923, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OBTENCIÓN DEL POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DE LA CÁSCARA DE PIÑA USANDO LA BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*, realizado por Samantha Nicole Cárdenas Peña con documento de identificación N° 0106272172 y por Nathaly Johanna Castillo Bernal con documento de identificación N° 0106041585, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 31 de julio del 2023

Atentamente,



Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD.

0103444923

DEDICATORIA

A mis amadísimos padres, Mario y Narcisa, por su amor incondicional, su apoyo y esfuerzo sobrehumano, por su paciencia y sabias palabras que reconfortan.

A mis queridísimos hermanos Christian y Vanessa, por su apoyo y acompañamiento, por creer en mis capacidades e impulsarme a lograrlo.

A mis perritas Suca, Juguetona y Breka por su amor desinteresado, por su acompañamiento y cariño incondicional, por enseñarme la responsabilidad que conlleva su crianza.

A mis seres queridos abuelita Inés, tío José, tía Ruth, tía Beatriz por su apoyo y palabras de sabiduría, por guiar mi camino y formarme como una persona empática y respetuosa a lo largo de mi vida.

A mi querida hermanita y abuelitos que se encuentran en el cielo por su protección incondicional.

Samantha Nicole Cárdenas Peña

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios en primer lugar, por guiar mi camino, darme fuerzas y sabiduría en los momentos difíciles que he atravesado a lo largo de mi vida y carrera universitaria

Agradezco a mis padres amados Narcisa y Mario por su infinito amor, apoyo, por sus largos días de sacrificio para ayudarme a cumplir una meta más en mi vida.

A mi persona por no rendirse a pesar de las adversidades. Por mi dedicación y responsabilidad, por ser constante e invertir en mi educación y formación espiritual a lo largo de mi carrera universitaria

A Nathaly Castillo por su apoyo desde el inicio en el desarrollo de este trabajo investigativo.

Al Ing. Jorge Amaya Ph.D por su guía y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo investigativo.

Samantha Nicole Cárdenas Peña

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiarme y darme sabiduría a lo largo de mi carrera universitaria.

Agradezco a mis padres, hermanos y abuelitos por todo el apoyo que me han dado en mi formación humana y educativa.

A mis profesores que me han dado las mejores enseñanzas tanto académicas como personales motivando a seguir hasta el final.

Al Ing. Jorge Amaya PhD por su guía y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo investigativo.

Nathaly Castillo Bernal

Índice de Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Capítulo I. Introducción	3
1.1. Problema.....	4
1.2. Delimitación de estudio	4
1.3. Pregunta de investigación	5
1.4. Justificación	5
1.5. Objetivos	6
1.5.1. General	6
1.5.2. Específicos.....	6
1.6. Hipótesis	6
Capítulo II. Fundamentación teórica	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Generalidades de la piña	9
2.3. Aprovechamiento de residuos de la piña	9
2.4. Composición de material lignocelulósico.....	9
2.4.1. Celulosa	10
2.4.2. Hemicelulosa.....	10
2.4.3. Lignina.....	11
2.5. Pretratamientos del material lignocelulósico	11
2.6. Metabolismo de xilosa en microorganismos.....	12
2.7. Microorganismos productores de PHA.....	13
2.8. Criterios influyentes en la fermentación	13
2.9. Polihidroxicanoatos (PHAs)	13
2.10. Clasificación de las unidades monoméricas de los PHAs	14
2.11. Ruta metabólica de los PHAs.....	15
2.12. Polihidroxibutirato (PHB).....	17
2.13. <i>Bacillus subtilis</i> como productora de PHB	18
2.14. Síntesis de PHB.....	18
2.15. Propiedades del PHB frente a polímeros sintéticos.....	20
2.16. Costo de producción de PHB	21
Capítulo III. Materiales y Métodos	22
3.1. Diseño	22
3.1.2. Diseño experimental	22
3.1.2.1. Tratamiento de Hidrolisis	22
3.1.2.2. Tratamiento de fermentación	24

3.2. Población y muestra	24
3.3. Variables.....	24
3.3.1. Variable Independiente.....	24
3.3.2. Variable Dependiente	24
3.4. Recogida de datos	25
3.5. Protocolos Experimentales	25
3.5.1. Análisis proximal químico.....	25
3.5.1.1. Humedad.....	26
3.5.1.2. Cenizas totales.....	26
3.5.1.3. Grasas totales	27
3.5.2. Acondicionamiento del sustrato	28
3.5.3. Cuantificación azúcares reductores	30
3.5.4. Activación del microorganismo.....	31
3.5.5. Ambientación del microorganismo	32
3.5.6. Producción fermentativa del PHB.....	33
3.5.7. Extracción y purificación del PHB.....	34
3.5.8. Rendimiento del PHB a partir del sustrato.....	34
3.5.9. Caracterización del PHB en el FT-IR	34
3.6. Análisis estadístico	35
Capítulo IV. Resultados y discusión	36
4.1. Análisis proximal químico	36
4.1.1. Análisis químico de humedad.....	36
4.2. Cuantificación de azucares reductores	38
4.2.1. Análisis estadístico de azucares reductores: Glucosa	40
4.2.2. Análisis estadístico de azúcares reductores: Fructosa	42
4.3. Rendimiento del PHB a partir del sustrato.....	45
4.4. Análisis estadístico del producto obtenido (PHB).....	47
4.5. Caracterización del PHB en polvo por el FT-IR.....	50
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	56
5.1. Conclusiones	56
5.2. Recomendaciones	57
Bibliografía	58
Anexos	67

Resumen

La obtención de polímeros biodegradables a base de residuos agroindustriales nace como solución a la problemática medioambiental que conlleva el uso desmesurado del plástico convencional y la mala práctica de manejo de los mismos. Así mismo, con el fin de dar un valor agregado a los residuos agroindustriales se propone que los mismos actúen como fuente de carbono en el proceso fermentativo de obtención del biopolímero. En este sentido la presente investigación encaminó su desarrollo a la obtención de polihidroxitirato PHB utilizando en su proceso fermentativo *Bacillus subtilis* y cáscara de piña en donde se evaluó la influencia de los parámetros como pH, temperatura y medio de fermentación. Así tras un análisis estadístico de superficie de respuesta el proceso de tratamiento aplicado a la matriz lignocelulósica de la cáscara de piña indicó que las mejores condiciones aplicadas en el proceso de hidrólisis fueron H₂SO₄ al 5%, temperatura constante (autoclave) de 118 °C con un tiempo de 30 minutos, seguido se analizó la influencia de los parámetros en el proceso fermentativo, siendo finalmente los mejores tratamientos T6, T7 y T8 lo cual se corroboró mediante análisis estadístico por prueba de DSH - Tukey.

Palabras Clave: PHB, *Bacillus subtilis*, cáscara de piña, biopolímeros.

Abstract

The production of biodegradable polymers from agro-industrial wastes is a solution to the environmental problems caused by the excessive use of conventional plastics and the poor management of these wastes. Likewise, in order to give an added value to agro-industrial wastes, it is proposed that they act as a source of carbon in the fermentation process of obtaining the biopolymer. In this sense, the present research was aimed at obtaining PHB polyhydroxy butyrate using *Bacillus subtilis* and pineapple peel in its fermentation process, where the influence of parameters such as pH, temperature and fermentation medium was evaluated. Thus, after a statistical analysis of response surface, the treatment process applied to the lignocellulosic matrix of pineapple peel indicated that the best conditions applied in the hydrolysis process were 5% H₂SO₄, constant temperature (autoclave) of 118 °C with a time of 30 minutes, followed by an analysis of the influence of the parameters in the fermentation process, being finally the best treatments T6, T7 and T8, which was corroborated by statistical analysis by DSH - Tukey test.

Key Words: PHB, *Bacillus subtilis*, pineapple peel, biopolymers

Capítulo I. Introducción

La biotecnología es una rama interdisciplinaria que mediante procesos tecnológicos emplea organismos vivos o productos de los mismos para el beneficio humano y su entorno, su finalidad es la de resolver problemas o desarrollar productos (Thieman & Palladino, 2010). Uno de los procesos biotecnológicos más utilizados industrialmente es la fermentación microbológica, que constituye el eje principal en la obtención de polímeros biodegradables como Polihidroxialcanoatos (PHAs).

Los PHAs como indica Rodríguez, S (2021) son polímeros provenientes de ácidos hidroxialcanoicos, producto intracelular granulado de la síntesis de azúcares en un ambiente de estrés, acumulado y reservado como fuente de carbono y energía por microorganismos. Entre los PHAs se destaca el polihidroxibutirato (PHB), considerado un poliéster alifático cuyo rendimiento se ve maximizado en contacto con procariotas. Normalmente los microorganismos producen PHB al encontrarse con un exceso de carbono o limitaciones nutricionales como son nitrógeno, fósforo y oxígeno.

El polihidroxibutirato (PHB) caracterizado por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, cristalinidad regular y moderada resistencia mecánica se posiciona como una alternativa prometedora frente a los plásticos convencionales (Arrieta, 2014). Sin embargo, una limitante para su aplicación extendida es el costo de producción que se encuentra entre 5 a 19 veces mayor que la obtención de polímeros convencionales. (Raza, et. al. 2018). Por esta razón, Yang et. al. (2018) resalta la importancia de estudiar nuevas fuentes de carbono como la biomasa lignocelulósica, debido a que estas pueden llegar a reducir hasta un 50% del costo de producción; pues, al utilizar biomasa lignocelulósica también se modifica parámetros de fermentación, extracción y purificación (Govil, 2022). Además, varios estudios demuestran que la utilización de material lignocelulósico obtiene rendimientos significativos de biopolímeros.

1.1. Problema

El plástico es un polímero sintético proveniente de combustibles fósiles, es de un solo uso y sus tiempos de degradación son prolongados. Sus múltiples aplicaciones han provocado un incremento en su consumo a nivel mundial a más de 350 millones de toneladas, acarreado consigo graves consecuencias medioambientales y un conflicto a solucionar en la gestión de sus residuos (OCDE, 2022).

A nivel local el problema con el consumo de plástico se mantiene. De acuerdo a Solíz (2021) Ecuador es el tercer país Latinoamericano que importa más material plástico, debido en parte a las escasas políticas públicas para controlar su ingreso, comercialización y distribución, a esto se suma, la alta demanda y la insuficiente concientización de los consumidores. Por lo tanto, es indispensable tratar a los plásticos de un solo uso como un problema grave en la actualidad.

En este contexto, es de suma importancia el estudio de nuevas técnicas o medios alternativos para generar biopolímeros, teniendo en consideración las ventajas medioambientales y económicas que conlleva esta alternativa como solución al uso del plástico. Por esta razón, el presente estudio investiga el uso de residuos agroindustriales como la cáscara de piña como fuente de carbono que en contacto con la bacteria *Bacillus subtilis* pueda almacenar de manera intracelular polihidroxibutirato (PHB). Además de permitir establecer aquellas condiciones idóneas e influyentes en la producción del biopolímero.

De esta manera, se pretende aportar información e incentivar el desarrollo de nuevas investigaciones, basadas en el potencial aprovechamiento de los residuos agroindustriales de alta disponibilidad en el país, buscando proponer un cambio en la matriz del plan de manejo de residuos en el contexto ecuatoriano.

1.2. Delimitación de estudio

El presente estudio limitó la recolección de cáscaras de piña residuales en la juguería “Hawaii” ubicada en la parroquia Yanuncay, Cuenca-Ecuador. En este contexto es importante

indicar que el estudio tiene como sustrato la cáscara de piña de las variedades Milagreña y Hawaiana.

1.3. Pregunta de investigación

¿Cómo influye el control de distintos parámetros en el proceso de producción fermentativa de PHB usando la bacteria *Bacillus subtilis* y como fuente de carbono la cáscara de piña?

1.4. Justificación

Al ser los plásticos provenientes de material fósil, una fuente no renovable y encontrarse en grandes cantidades por su uso desmesurado y difícil degradabilidad, son actualmente uno de los problemas medioambientales en busca de soluciones ecoamigables y socioeconómicas responsables. Aunque actualmente se practica la incineración, reciclaje, reutilización y la fotodegradación como alternativas que aminoren el problema, existen ciertas desventajas en el proceso que no permiten catalogarlas como soluciones efectivas. Por ejemplo, el desprendimiento de HCl y HCN durante el proceso de incineración causa potenciales daños en la salud humana. Por consiguiente, nace la propuesta de obtener biopolímeros también conocidos por su nombre genérico, polihidroxialcanoatos (PHAs), entre ellos el polihidroxibutirato (PHB). Este biopolímero presenta características como biocompatibilidad, biodegradabilidad, regular cristalinidad entre otras propiedades mecánicas semejantes a los polímeros tradicionales, que lo han convertido en un sustituto promisorio del polietileno (PE), polipropileno (PP), polietileno de alta densidad (HDPE) y el polietileno de baja densidad (LDPE).

Como ya se mencionó con anterioridad, dentro del costo de obtención del PHB la fuente de carbono representa entre el 30-50% del total, razón por la cual investigaciones preliminares centran su interés en la biomasa lignocelulósica. La presente investigación plantea la utilización de cáscara de piña como fuente de carbono, siendo esta una fruta que

se da bien en el entorno ecuatoriano; del mismo modo, en busca de un mejor rendimiento se plantea el estudio y control de parámetros como temperatura, pH, cantidad de inóculo y tiempo de fermentación.

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Evaluar la capacidad de producción de un biopolímero clase PHB por la cepa *Bacillus subtilis* utilizando como sustrato cáscara de piña.

1.5.2. Específicos

- Desarrollar el método más adecuado de producción de PHB por *Bacillus subtilis* controlando los parámetros de fermentación para optimizar su rendimiento.
- Analizar el biopolímero obtenido, mediante la técnica FT-IR para verificar que el mismo sea de clase PHB.
- Cuantificar el rendimiento sustrato/producto mediante la evaluación de parámetros fisicoquímicos que nos permitan conocer las mejores condiciones del proceso de obtención.

1.6. Hipótesis

¿Es posible obtener un biopolímero de clase PHB usando la bacteria *Bacillus subtilis* y como fuente de carbono la cáscara de piña, bajo el control de ciertos parámetros fisicoquímicos influyentes en el proceso de fermentación?

Capítulo II. Fundamentación teórica

2.1. Antecedentes

Sustratos como alcoholes, ácidos orgánicos, carbohidratos, hidrocarburos, aceites y diversas fuentes más de carbono, esencialmente azúcares sintetizados de fuentes lignocelulósicas naturales como indica Zárate (2020) permiten a la cepa bacteriana almacenar cantidades de PHB, que pueden llegar a corresponder hasta el 90% en biomasa. Así mismo menciona la relación dependiente entre la especie bacteriana utilizada y la cantidad de biopolímero producido.

Según Zárate (2020), dentro del estudio de cepas productoras de PHAs se encuentran *Alcaligenes sp.*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas sp* y *Azotobacter vinelandii*. Así mismo, estudios afines como el de Rodríguez (2022) nos demuestra que el campo de bacterias productores es aún más amplio, incluyendo a *Rhodococcus gordionae* (R.g) y *Jeotgalibacillus Soli* (J.s). El estudio de Facundo, L et al., (2022) utilizó las cepas *Jeotgalibacillus Soli* (J.s); *E indicum* (E.i); *Rhodococcus gordionae* (R.g); *M.h hydrocarbonoxydans* (M.h), para ser inoculadas en medio MMA, medio M1 y medio M6, siendo la diferencia entre ellos ciertos nutrientes de la composición. Con una alícuota por cada cepa las condiciones de inoculación para MMA fueron 120 rpm, 37° C por 24h; para M6 fueron 400 rpm, 30° C, 72h y M1 120 rpm, 37°C por 96 horas. Los resultados mostraron mayor crecimiento bacteriano en presencia de glucosa baja en diferencia a sacarosa y concentraciones altas de glucosa. Así mismo se reportó que tres de las cuatro cepas J.s, R.g y M.h resultaron productoras de PHB, en los medios MMA, M1 y M6 para J.s, R.g y solo M1 para M.h.

Por otra parte, las investigaciones de Lee et. al. (2021) centran su interés en las especies de *Bacillus* ya que están convirtiéndose en productoras potenciales de PHB debido a que pueden producir homopolímeros y copolímeros sin ninguna ingeniería genética, crecen rápidamente y poseen enzimas hidrolíticas que pueden utilizar diversas fuentes de carbono como residuos agroindustriales. Lee et. al (2021) agrega que la xilosa fue la mejor fuente de

carbono para la producción de PHB para *Bacillus* sp. Siendo el medio más óptimo SM01 (1% de xilosa, 2% de NaCl y 0,5% de extracto de levadura) con la mayor producción de PHB.

Con el fin de estudiar la influencia de los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de obtención de PHB por *Bacillus subtilis* el estudio de Hassan et. al. (2019) aísla esta cepa del campo de *Jatropha* usando distintos residuos agrícolas e industriales como salvado de maíz, trigo y arroz, residuos lácteos y melaza de caña de azúcar. Siendo la mejor fuente de carbono el residuo de salvado de arroz para obtener PHB con 30,4% del peso de la celda seca (DCW). Variables como pH, temporal de incubación y volumen de inóculo fueron condiciones realmente influyentes en la producción de PHB; usando condiciones optimizadas, se logró un aumento de seis veces en el contenido de PHB. Los PHB obtenidos a partir de glucosa y salvado de arroz se caracterizaron utilizando Análisis H NMR, FT-IR, TGA y DSC.

En el estudio de Penkhrue et. al. (2020) “Método de superficie de respuesta para la acumulación de bioplásticos de polihidroxibutirato (PHB) en *Bacillus drentensis* BP17 usando cáscara de piña” se aisló la bacteria BP17 del suelo compostado donde se realizaron estudios comparativos de optimización para obtener una mayor acumulación de PHB siendo uno de los resultados más bajos 0.17g/L el cual no tuvo modificación de variables influyentes, a comparación del tratamiento donde los parámetros más óptimos fueron 11,5% (v/v) de cáscara de piña, pH 6, inóculo 10% (v/v), temperatura de 28°C y temporal fermentativo 36 horas; dando como resultado 5.55 g/L de polihidroxibutirato.

En esta revisión exhaustiva sobre bacterias capaces de obtener de polihidroxibutirato (PHB), se ha puesto énfasis en explicar el papel innovador que cumple el género *Bacillus*, siendo evidente el buen rendimiento en presencia de fuentes de carbono originarias de residuos agroindustriales. Sin embargo, específicamente los estudios que analizan la obtención de PHB mediante la fermentación de *Bacillus subtilis* y cáscara de piña son escasos, por lo que, se requiere mayor investigación referente al tema.

2.2. Generalidades de la piña

La piña (*Ananas comosus*) está constituida nutricionalmente por un 90% de agua y 8-10% de monosacáridos que se encuentran en forma de sacarosa, glucosa y fructosa; su contenido de grasas y proteínas es muy baja por lo que es una buena fuente de fibra, principalmente la cascara contiene un gran porcentaje de esta y un 12% de carbohidratos no estructurales (Decheco, 2018).

Los residuos de la piña como la cáscara y la corona de hojas tienen un gran valor por su contenido químico de celulosa, lignina y hemicelulosa que son esenciales para la elaboración de productos de valor agregado (Morales, 2021).

2.3. Aprovechamiento de residuos de la piña

A partir de los residuos que ofrece la piña se pueden adquirir varios productos como el bioetanol, aprovechando el material celulósico que posee, también se puede utilizar las fibras de la corona de piña como reforzador de resinas de poliéster mejorando la resistencia a la ruptura por tensión (Decheco, 2018).

Ramírez et al. (2011) señala que la cáscara de piña es potencial para la obtención de xilosa que puede convertirse en xilitol, que puede ser un reemplazo de la sacarosa siendo un edulcorante con muchas ventajas para personas diabéticas, con osteoporosis y previene la otitis.

2.4. Composición de material lignocelulósico

Los materiales lignocelulósicos se localizan en las paredes de la biomasa vegetal que constan de polisacáridos, compuestos fenólicos y minoritarios como lípidos, proteínas, entre otros (Ramírez & Reyes, 2017). Actualmente, estos polisacáridos son estudiados por sus compuestos de celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa está constituida por azúcares que se obtienen principalmente por hidrólisis ácida. La lignina es un polímero

aromático que forma parte del tejido vegetal (Ramírez, et al., 2011); esta conformación permite la obtención de productos sustentables y no contaminantes para el medio ambiente.

Kumar & Sharma (2017) describen el material lignocelulósico como un conjunto natural de polímeros recalcitrantes que obligatoriamente debe someterse a un pretratamiento, ya sea de tipo físico y/o químico con la finalidad de convertir polisacáridos en azúcares fermentables.

2.4.1. Celulosa

Sharma et. al. (2019) describe la formación de celulosa por la unión de celobiosa (unidad de repetición) y unidades β -D-glucopiranosas por enlaces β (1,4) glucosídicos, compuestas por 500-1400 unidades de D-glucosa para formar microfibrillas y estas a su vez fibrillas de celulosa. Yoo et. al. (2017) mencionan la relación directa entre el contenido de celulosa y la liberación de glucosa, donde el número de unidades de glucosa en el polímero lo convierte en recalcitrante.

2.4.2. Hemicelulosa

En el estudio de Chandel et. al. (2018) se describe a la hemicelulosa como un biopolímero heterogéneo, compuesto por subunidades de monosacáridos capaces de formar mananos, glucomananos, xilanos y xiloglucanos, que representan el 20 al 35% del peso-biomasa. La cadena principal de la hemicelulosa es el xilano, el cual es fácilmente hidrolizable; sin embargo, la composición de las cadenas depende de cada especie vegetal y del método de extracción que se aplique. (Decheco, 2018)

Isikgor & Becer (2015) mencionan que la hemicelulosa es amorfa y de resistencia física leve, fácilmente hidrolizable en presencia de bases o ácidos diluidos. Del mismo modo, Santos et al. (2018) coincide en que la hemicelulosa es como una barrera física, limitante de la actividad enzimática; recomienda un pretratamiento con ácido diluido capaz de destruir la

hemicelulosa y así aumentar la conversión de celulosa mejorando accesibilidad de las enzimas.

2.4.3. Lignina

En la investigación de Ragauskas et. al. (2014) se define a la lignina, como un heteropolímero amorfo que tiene como unidad estructural a los fenilpropanoides; segundo componente polimérico más abundante en la biomasa lignocelulósica, llegando a representar el 15-40% del peso seco. Dado que es capaz de unir la hemicelulosa a la celulosa, se la cataloga como responsable de hidrofobicidad y rigidez estructural, siendo así la lignina una limitante en la conversión de la celulosa.

2.5. Pretratamientos del material lignocelulósico

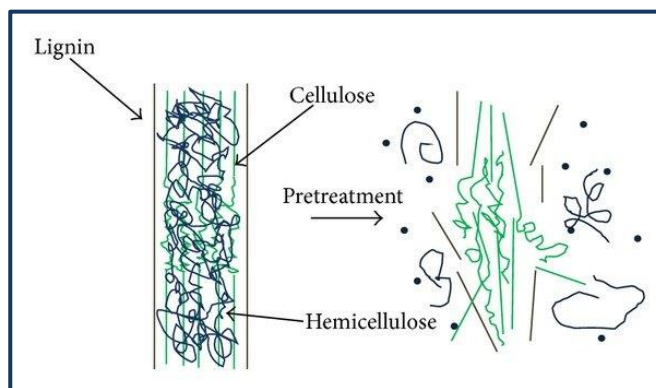
A través del tiempo las técnicas de hidrólisis han ido mejorando para obtener un mayor rendimiento de azúcares fermentables mediante el uso de celulasas; por esa razón, Decheco (2018) hace mención a los pretratamientos esenciales del material lignocelulósico (Figura.1) siendo:

- a) Pretratamiento físico: reducción de tamaño del material para poder aumentar el área de superficie de hidrólisis.
- b) Pretratamiento de auto-hidrólisis: Se lo realiza a altas presiones y temperaturas en donde la hemicelulosa y lignina empiezan a solubilizarse.
- c) Pretratamiento químico: Se emplean ácidos o bases dependiendo el material lignocelulósico a tratar para que la celulosa quede expuesta.
- d) Pretratamiento oxidativo: Se agregan agentes oxidantes al material como el ácido acético, peróxido de hidrógeno u ozono los cuales afectan a las matrices de lignina y hemicelulosa.

- e) Pretratamiento biológico: Se utilizan organismo como hongos, bacterias o partes de un organismo como las enzimas capaces de solubilizar la lignina y dejar la celulosa expuesta para su posterior hidrólisis.

Figura. 1

Efecto de pretratamiento en la matriz lignocelulósica



Nota. Recuperado de “Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process” (p. 18), por H. Lee et al., 2014, The Scientific World Journal, vol. 2014, Article ID 631013.

2.6. Metabolismo de xilosa en microorganismos

Los materiales lignocelulósicos pueden ser ricos en azúcares que componen la hemicelulosa (xilosa, arabinosa y glucosa) pero principalmente D-xilosa. Malan (2015) recalca la importancia de comprender las rutas metabólicas de xilosa, como difieren y son eficientemente utilizadas según el microorganismo. En este contexto, Stephens et. al. (2007) describe dos rutas para la degradación de la D-xilosa; una de ellas es la ruta de la xilosa isomerasa utilizada por *E. coli*, *Lactobacillus* y ciertas especies de *Bacillus*. Jeffries (2006), indica que en esta ruta se transforma directamente D-Xilosa en D-xulosa y posteriormente es fosforilada, requisito necesario al momento de entrar en la vía de pentosas fosfato.

Malan (2015) en su estudio, usa hemicelulosa hidrolizada, residuo rico en xilosa, como sustrato de la bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Z69. Obtuvo dos mutantes en las cuales

se modificaron las rutas oxo-reductivas del catabolismo de la xilosa como única fuente carbonatada para optimizar el porcentaje de producción de PHB.

2.7. Microorganismos productores de PHA

Ranganathan, et. al. (2020) y Obruca et. al. (2018) explican la obtención de los ésteres poliméricos de la familia de los PHAs (P3HB, PHBHHX, PHBO, P(3HB-co-3HV)) con las cepas *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *E. coli* recombinante, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhizobium* y *Rhodobacter*.

A nivel industrial la obtención de PHB ocurre por fermentación bacteriana. Dentro del grupo de microorganismos productores se encuentran *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter beijerinckia*, *Pseudomonas Oleovorans*, *Rhizobium sp.* y *Bacillus sp.* (Bababniyi, B & Adelaja, O. 2020).

2.8. Criterios influyentes en la fermentación

La capacidad de biosíntesis de PHAs mejora sustancialmente la supervivencia de las bacterias bajo numerosos factores de estrés como el choque térmico, la radiación UV, el pH ácido y la presión osmótica. (Obruca et al., 2018)

2.9. Polihidroxicanoatos (PHAS)

Existen diferentes tipos de plásticos biodegradables, como el ácido poliláctico (PLA), el poli (succinato de butileno-co-butilenadipato) (PBSA), la policaprolactona (PCL) y los polihidroxicanoatos (PHA) (Adnan et. al. 2022).

Según Lanotti et. al. (2018) los polihidroxicanoatos (PHAs) junto con el ácido poliláctico (PLA) conforman el grupo de plásticos de base biológica o biodegradables a base de polímeros; los PHAs pertenecen a una gran familia de polímeros termoplásticos. Silverio (2021) describe su origen microbiano al ser polímeros sintetizados y

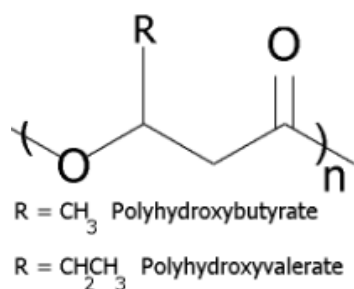
almacenados en forma de gránulos de manera intracelular que luego actúa como fuente de energía y de carbono.

2.10. Clasificación de las unidades monoméricas de los PHAs

Estructuralmente los polihidroxicanoatos, pueden variar con el cambio de R que representa el grupo funcional según el tipo de polihidroxicanoato (PHA) (Figura 2) y cuando el número de unidades repetitivas de la cadena polimérica (n) ocupa valores superiores a cero, proporcionando así, el número de repeticiones. (McAdam. et. al., 2020).

Figura 2

Estructura química típica de las moléculas de polihidroxicanoato (PHAs)



Nota. Imagen recuperada de McAdam, B et. al, (2020).

Tabla 1.

Estructura química de los polihidroxicanoatos (PHAs)

	R- Hidrógeno	Poli (3 -hidroxipropinato)
n=1	Metil	Poli (3 -hidroxibutirato)
	Etil	Poli (3 -hidroxivalerato)
	Propil	Poli (3 -hidroxihexanoato)
	Pentil	Poli (3 -hidroxioctanoato)
	Nonil	Poli (3 -hidroxidecano)
n=2	Hidrogeno	Poli (4- hidroxiburato)
n=3	hidrogeno	Poli (5 -hidroxivalerato)

Nota. Recuperado de McAdam, B et. al, (2020).

Dos Santos et. al. (2017) detalla la clasificación de las unidades monoméricas de los PHAs correspondiente a los átomos de carbono totales. Por un lado, están aquellos que

poseen 3-5 carbonos como el 3-hidroxi butirato (P3HB), 4-hidroxi butirato (P4HB) o 3-hidroxi valerato (P3HV), denominados PHAs de cadena corta (PHAsCL) con propiedades termoplásticas similares a las del propileno. En este grupo el más destacado es PHB al tener un grupo metilo en su estructura.

Por otro lado, están aquellos que poseen 6-14 átomos de carbono conocidos como PHAs de cadena media (PHAsMCL), como unidades monoméricas a las que pertenecen 3-hidroxi hexanoato (HHx), 3-hidroxi decanoato (HD), o incluso unidades de comonomero de cadena más larga. Al presentar una longitud de cadena más extensa poseen mayor flexibilidad asemejándose al látex, menor cristalinidad, baja temperatura de transición vítrea y una masa molecular inferior en comparación a las propiedades de PHAsCL. La cristalinidad, punto de fusión, condiciones de cultivo, bacteria a emplear y la composición química de PHAs obtenido puede determinarse mediante el tamaño monomérico lateral de la cadena.

2.11. Ruta metabólica de los PHAs

Vrom et al. (citado por McAdam et. al., 2020) describe tres principales rutas para obtención de PHB:

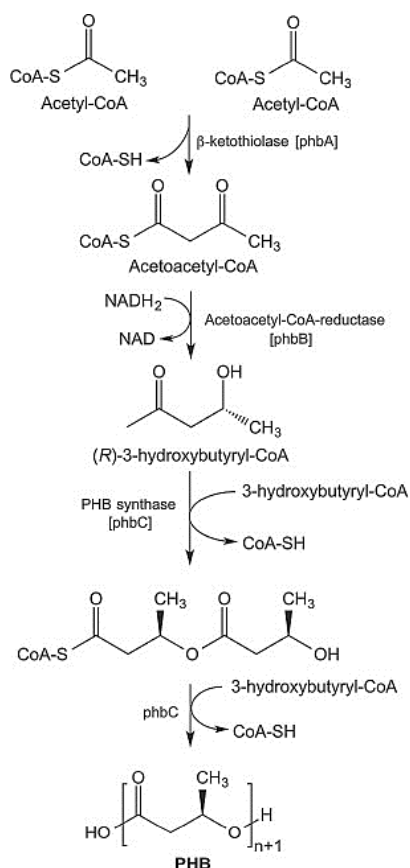
- 1ra ruta: Corresponde a la apertura del anillo (ROP) de β -butirolactona (BL).
- 2da ruta: Utiliza como vehículo las células de plantas transgénicas para la biosíntesis de PHAs aprovechando la alta disponibilidad de Acetil.CoA presente. Kosseva & Rusbandi (2018) afirman que la modificación de *Linum usitatissimum* L. (Lino) produjo aumento en rendimiento de aproximadamente el 20% frente a cultivos de control, y por ende, mayor acumulación de biomasa.
- 3era ruta: Corresponde a la fermentación bacteriana, como explica Dobrogojski et. al. (2018) la obtención de PHB tiene como molécula precursora al acetil-CoA y se desarrolla en tres etapas con la intervención de β -cetotilasa

simbolizada como phaA o phbB, acetoacetyl-CoA reductasa como phaA o phbB y PHB sintasa como phaC o phbC.

El proceso indicado por Kosseva & Rusbandi (2018) inicia con la glicolisis de una azúcar u otro reactivo formando moléculas de Acetil-CoA, que por intervención de la enzima β -cetotiolasa (phaA) se condensan en acetoacetyl-CoA, posteriormente en (R)-3-hidroxiacetil-CoA, para llegar así a la etapa final donde acetoacetyl-CoA reductasa (phbB) interviene en la formación NADPH para la obtención del monómero (R)-3-hidroxiacetil-CoA que posteriormente será polimerizado por PHB sintasa (phbC) obteniendo así finalmente Poli(3-hidroxiacetilato).

Figura 3

Primera vía biosintética para producir PHB a partir de acetil-CoA



Nota. Recuperado de “Tendencias en la biofabricación de polihidroxicanoatos, con especial atención al procesamiento posterior” Kosseva, M., & Rusbandi, E. (2018).

2.12. Polihidroxi butirato (PHB)

El polihidroxi butirato (PHB) es considerado uno de los PHAs más comunes por su estructura lineal sencilla. Grigore et. al. (2019) señala la importancia del grupo metilo (CH₃) y el grupo de enlace éster (-COOR) presentes en la estructura del PHB como grupos funcionales responsables de las características termoplásticas, hidrófobas, de alta cristalinidad y quebradizas de los materiales. El PHB posee un peso molecular (Mw) de 1×10⁴-3×10⁶ Da, polidispersidad cercana a 2, temperatura de transición vítrea 180 °C y densidades del PHB cristalino y amorfo, 1,26 y 1,18 g (cm³)-1, respectivamente; estas propiedades descritas por Penkhrue et. al. (2020) posicionan al PHB como una alternativa promisorio frente a otros plásticos al poseer de manera cuantitativa un rango de valores similares a los polímeros sintéticos.

Tabla 2.

Resumen de las propiedades mecánicas del P3(HB) y de los polímeros de base petroquímica (PP, PET, PE) y de base biológica (PLA).

Propiedad Mecánica	P3HB	PP	PET	LDPE	HDPE	PLLA	PDLLA
Módulo de tracción (GPa)	3 -3.5	1.95	9.35	0.26-0.5	0.5-1.1	2.7-4.14	1-3.45
Resistencia a la tracción (MPa)	20-40	31-45	62	30	30-40	15.5-150	27.6-50
Alargamiento a la rotura (%)	5-10	50-145	230	200-600	500-700	20-30	1.5-20
Grado de cristalinidad (%)	50-60	42,6-58,1	7.97	25-50	60-80	13.94	3.5
Temperatura de fusión (°C)	165-175	160-169,1	260	115	135	170-200	Amorfo

Nota. Recuperado de McAdam, B et. al, (2020).

En cuanto a métodos de análisis de ciertas propiedades como la temperatura de fusión (T_m), temp. de transición vítrea (T_g), temp. de degradación (T_d) y grado de cristalinidad autores como McAdam et. al. (2020) señalan oportuno la utilización del método DSC calorimetría diferencial de barrido y/o XRD difracción de rayos X. En cuanto al método FT-IR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, es muy utilizada para el conocimiento de la estructura molecular, la determinación del nivel de purificación de las muestras y últimamente también es utilizado para la investigación de cristalización de los materiales de PHA (Romano et. al. 2018).

2.13. *Bacillus subtilis* como productora de PHB

La cepa *Bacillus sp.* es descrita por Hassan et. al. (2019) como la primera cepa productora de PHB, siendo un microorganismo gram positivo aislado principalmente del suelo e intestino de ciertos animales.

Rodríguez et. al. (2013) centra sus investigaciones en el género *Bacillus* e indica que es una cepa que obtiene altos rendimientos de PHB. Así mismo, Thirumala et. al. (2010) añade que son pocos los factores que necesita esta cepa en el proceso fermentativo. Rodríguez et. al. (2013) señala que especies como *Bacillus sp.* IPCB-403 y *Bacillus megaterium* S29 bajo condiciones óptimas pueden llegar a almacenar hasta el 70% en PHB por peso seco celular. Por su parte, Bomrungnok et. al. (2019) describe el uso de almidón residual para la obtención directa de PHB con *Bacillus aryabhatai* T34-N4 y *Bacillus cereus* obteniendo para esta última cepa el 48% del contenido de PHB.

2.14. Síntesis de PHB

Las condiciones desfavorables, como se menciona con anterioridad, pueden ser nutrientes limitantes (N, O_2 , S, P, etc) y/o excedencia de C, permiten la acumulación intracelular de PHB en una gran variedad de cepas bacterianas tanto gram negativas, como

gram positivas reportándose hasta la fecha más de 75 géneros diferentes, en arqueas y en pocas eucariotas como hongos y levaduras. (Thapa et. al., 2019)

Sudesh (citado por McAdam et. al., 2020) explica que, según el microorganismo utilizado y el enfoque de obtención del material, se puede obtener PHB isotáctico o PHB sindiotáctico. El PHB isotáctico es propio de un proceso bacteriano y existe poca o nula estereoregularidad en configuración R, siendo responsable la estereoespecificidad de la enzima PHA sintasa. Por otra parte, mediante la síntesis química se puede conseguir PHB sindiotáctico.

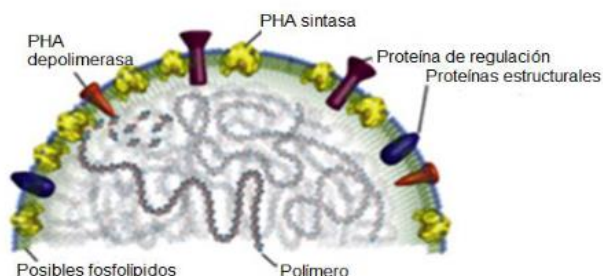
Sudesh (citado por Martínez, 2018) explica que un gránulo de PHA estructuralmente está integrado por proteínas responsables de la síntesis entre ellas:

- PHA de polimerasa codificada intracelularmente por el gen phaZ. Calero (2017) explica que esta enzima es la responsable de volver reversible el proceso en donde Acetil-CoA produce energía al reintegrarse al ciclo tricarboxílico (ATC), después de haber sufrido inhibición por la restricción de nutrientes y/o la fuente superabundante de carbono.
- Fasinas, proteínas responsables de la creación y consolidación de las inclusiones de PHAs.
- Gen phaC que sintetiza la enzima PHA sintasa codificada.

PHA sintasa es la enzima responsable de la polimerización y es capaz de identificar el tipo de PHA sintetizado. Se clasifica en 4 tipos de acuerdo a la estructura primaria y a la especificidad del sustrato (Martínez, 2018).

Figura 4

Representación gráfica de la estructura de los granos de PHA



Nota. Recuperado de Martínez, C (2018).

- 1er: *Ralstonia Eutropha* DSM 541 pertenece a todas las enzimas encargadas de polimerizar monómeros de cadena corta (PHAscl).
- 2da: Enzimas con actividad para monómeros de cadena larga (PHAmcl), grupo donde pertenecen dos sintasas de *Pseudomonas sp.*
- 3er: En la mayoría de los casos son enzimas que polimerizan monómeros de cadena corta. Clasificado en subunidades C y E de 40 kDa y 40 kD respectivamente; corresponde a *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa Pfennigii* y *Synechocystis sp.* PCC 6803.
- 4to: Clase compuesta por unidades catalíticas PhaC y PhaR de 40 kDa y 20kDa respectivamente. Son enzimas que polimerizan a monómeros de cadena corta. Destaca en este grupo el género *Bacillus*.

2.15. Propiedades del PHB frente a polímeros sintéticos

Permeabilidad de la barrera: En comparación con el polietileno (PE) y propileno (PP) la permeabilidad de la barrera del P3HB es superior. Así mismo, en comparación con el polipropileno es más rígido y menos flexible. (Yousuf & Winterburn, 2016)

Capacidad degradativa: La capacidad de degradación total, descrita por Adnan et.al. (2022) ocurre en un periodo de tiempo prudente cuando el PHB tiene contacto con el entorno biológico (suelo, agua, compostaje aerobio y anaerobio) o en instalaciones de tratamiento biológico.

Lamberti et al. (2020) establece que tan solo en un periodo de 90 días y un rango de temperatura de 50 a 60 °C son suficientes para la descomposición completa del PHB. Del mismo modo, Jogi & Bhat (2020) estudiaron la tasa de degradación en ambientes marinos, comprobando así que el PHB en el periodo de un año puede degradarse hasta un 80% en ambientes acuáticos a temperatura ambiente. En comparación a la degradación de otro biopolímero como el ácido poliláctico (PLA) que representa apenas el 8% en las mismas condiciones.

Las características estructurales ya mencionadas y las propiedades fisicoquímicas como son la biodegradabilidad, resistencia a la exposición de rayos UV, su baja actividad con el agua, alta elasticidad, según expone Saratale et al., (2020) podría convertir a los biopolímeros en un sustituto promisorio del plástico y a las actuales aplicaciones que conlleva el uso del mismo.

2.16. Costo de producción de PHB

Conociendo las numerosas ventajas que presenta el PHB, los investigadores centran su interés en reducir los costes de producción. Así lo indican Bababniyi & Adelaja (2020) quienes proponen el uso de material agroindustrial, aislando microorganismos productores de PHB a partir de materias primas baratas.

En este contexto, sabiendo que el coste de producción es uno de los limitantes para la producción y comercialización extensiva de PHB. Yang et. al. (2018) resalta la importancia de estudiar nuevas fuentes de carbono como la biomasa lignocelulósica debido a que estas pueden llegar a reducir hasta un 50% del costo de producción,

dado que al utilizarla también se modifica parámetros de fermentación, extracción y purificación.

Capítulo III. Materiales y Métodos

3.1. Diseño

El diseño que se usó para esta investigación es de carácter experimental, ya que se busca demostrar la producción de PHB que tiene la bacteria *Bacillus subtilis* usando como fuente de carbono la xilosa, obtenida de la cáscara de piña, mediante la variación de sus parámetros de fermentación.

- Experimental puro

Se deben controlar todos los factores críticos que pueden generar cambios en el proceso.

- Validez interna: Garantiza que los efectos o resultados son producto del tratamiento fermentativo en el biorreactor y no de factores que deben ser controlados.
- Validez externa: Generaliza los resultados a otros estudios y otras condiciones de parámetros en la fermentación microbiana.

3.1.2. Diseño experimental

3.1.2.1. Tratamiento de Hidrolisis

Para comprobar el mejor tratamiento con ácido sulfúrico diluido se generaron los factores propuestos mediante el software estadístico Statgraphics Centurion versión XVIII (Tabla 3) usando el modelo de superficie de respuesta con un diseño se ha creado un diseño compuesto central: 2^3 +estrella el cual estudiará los efectos de 3 factores en 16 corridas. Un solo bloque será el diseño a ejecutar. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado (Tabla 4) con el fin de evitar el efecto de variables ocultas.

Tabla 3.

Distribución de factores mediante modelo de superficie de respuesta.

FACTORES	BAJO	ALTO
Concentración	4	6
Tiempo	10	83
Temperatura	98	121

Tabla 4.

Variables aleatorias según los factores establecidos por Statgraphics

C. H₂SO₄ (%)	Tiempo (min)	Temperatura °C
6	15	121
5	30	118
6	83	98
4	20	115
4	10	121
6	30	121
5	80	100
6	20	115
5	25	121
4	83	98
6	25	115
5	28	120
5	15	121
4	15	121
5	80	98
5	60	105

3.1.2.2. Tratamiento de fermentación

Para establecer el efecto de producción de PHB con los distintos tratamientos (Tabla 5) en su rendimiento óptimo se propuso una estructura de una vía con un diseño completamente al azar (DCA) y una secuencialidad en registro transversal, donde los tratamientos se sometieron a pruebas destructivas.

Tabla 5.

Tratamientos modelados por la combinación de: pH, temperatura y medio para la producción fermentativa de PHB

Tratamiento	pH	Temperatura	Medio
T1	6.20	37 °C	M3
T2	6.20	37 °C	M2
T3	6.20	37 °C	M1
T4	5.67	35.8 °C	M1
T5	5.67	35.8 °C	M2
T6	7.77	36.7 °C	M3
T7	7.77	36.7 °C	M2
T8	7.77	36.7 °C	M1

Nota. M: hace referencia al tipo de medio que se utilizó para la fermentación. Medios descritos en el apartado 3.5.5. en la Figura 17.

3.2. Población y muestra

En la presente investigación se estudiará una población finita y accesible que es el caso de los residuos de la piña (cáscara) que se van adquirir en la juguería “Hawaii” de la ciudad de Cuenca, los cuales mediante un muestreo al azar simple van a servir como única fuente de carbono para *Bacillus subtilis* en la producción de PHB.

3.3. Variables

3.3.1. Variable Independiente

Parámetros fisicoquímicos: Temperatura, pH, medio de fermentación

3.3.2. Variable Dependiente

Bacteria *Bacillus subtilis* productora de PHB.

3.4. Recogida de datos

Se utilizó la técnica de observación cuantitativa, en la cual los resultados que se obtienen se basan en métodos de análisis estadísticos y numéricos. Se observaron los datos relacionados con un valor numérico como el peso, el volumen, la escala de temperatura y concentración de azúcares los cuales se adquieren en el proceso de producción de PHB.

- Instrumentos de observación libre: libreta de notas, cámara fotográfica y FT-IR.
- Instrumentos de observación estructurada: escala de estimación que mide cómo se manifiesta la producción de PHB al variar las condiciones fisicoquímicas del biorreactor.

3.5. Protocolos Experimentales

3.5.1. Análisis proximal químico

Para los distintos análisis se utilizó la materia orgánica en seco (Figura 5) para facilitar los análisis ya que las cáscaras de piña tienen un alto contenido hídrico, estos procedimientos se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de los resultados.

Figura 5

Cáscaras de piña secas



Nota. Cáscaras de piña secadas en estufa a 60 °C por 48 horas.

3.5.1.1. Humedad

Para determinar el porcentaje de humedad presente en las cáscaras de piña se utilizó el analizador de humedad Mettler Toledo HB con lámpara de halógeno (Figura 6), donde se pesó 4 g de muestra.

Figura 6

Analizador de Humedad con lámpara halógeno

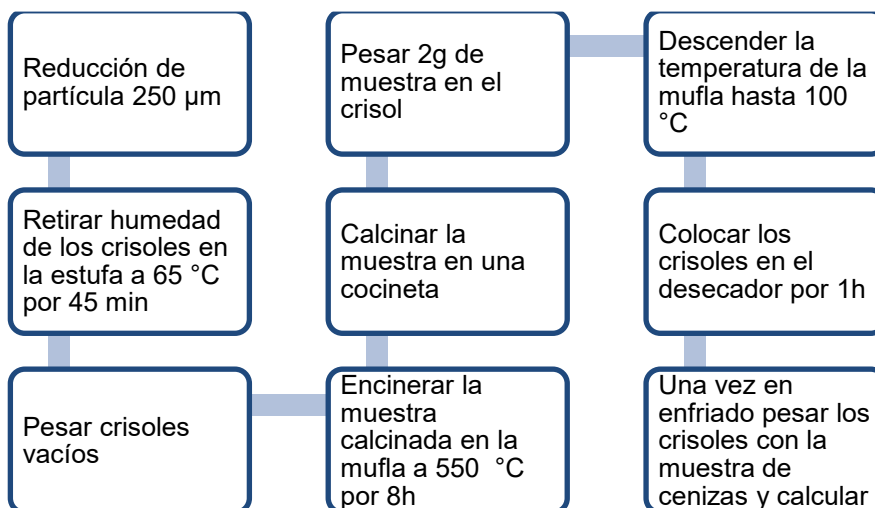


3.5.1.2. Cenizas totales

Para esta prueba se utilizó el protocolo de análisis 923.03 de la AOAC (1990) con ciertas modificaciones, las cuales se especifican en la Figura 7.

Figura 7

Esquema del proceso de análisis de cenizas



Para el cálculo se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas}(\%) = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100 \quad [1]$$

P_0 = Peso de crisol vacío

P_1 = Peso de crisol con la muestra

P_2 = Peso de crisol con las cenizas

3.5.1.3. Grasas totales

Se determinó las grasas totales presentes en la cáscara de piña mediante extracto etéreo 920.39C descrito por la AOAC (1990) donde se realizaron modificaciones para la cual se pesó un vaso de precipitación de 50 ml vacío y se agregó 1 g de la muestra previamente pulverizada añadiendo 10 ml de H₂SO₄ 50%, seguido de esto se colocó en baño maría con agitación constante hasta que se observó una disolución y calcinación total provocando una digestión química de moléculas que no sean grasas, una vez llegado a ese punto se dejó enfriar la muestra y se colocó un doble de volumen de éter de petróleo en un embudo de decantación con una agitación vigorosa hasta disolver la grasa de muestra, teniendo cuidado con la liberación de los gases producidos por la reacción, finalmente se dejó en reposo por 2 horas donde se recogió la fase etérea en el vaso de precipitación previamente pesado, donde se evaporó en baño maría el éter de petróleo dejando las grasas presentes en el residuo de la muestra. (Figura 8).

Figura 8

Proceso de extracto etéreo



Nota. A. Se observa la formación de las dos fases. B. Se observa la obtención final de la grasa presente en la cáscara de piña.

Aplicamos la siguiente fórmula obteniendo los porcentajes de grasas presentes en la cáscara de piña.

$$\%grasas = \frac{\text{peso final} - \text{recipiente vacío}}{\text{g muestra}} \times 100 \quad [2]$$

3.5.2. Acondicionamiento del sustrato

Para el pretratamiento de la materia prima o sustrato (cáscaras de piña) se tomó la metodología sugerida por Ramírez (2012), en su trabajo “Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*)” el cual se le modificó con las sugerencias de Decheco (2018) en su investigación “Obtención de jarabes glucosados a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) mediante hidrólisis enzimática de celulasas” para asegurar que no exista cualquier formación de inhibidores durante el proceso (Figura 9).

Debido a que en el hidrolizado se obtuvo un pH bastante ácido se preparó una solución buffer con compuestos que no alteran las azúcares obtenidas, se hizo una solución ácido cítrico/acetato/carbonato. Para los reactivos puros de ácido cítrico y acetato de sodio se realizó una primera solución de 2.10 g y 2.94 g en 100 ml respectivamente. La segunda

solución se mezcló 7.2 ml de $C_6H_8O_7$ y 42.8 ml de CH_3COONa aforando a 100 ml para adquirir un pH de 6.2. Finalmente, para reforzar la solución buffer se agregó carbonato de calcio con una concentración 1N evitando que al agregar la muestra de sustrato hidrolizado interfiera en el pH del buffer. Una vez preparado el buffer se procedió a preparar tres pH diferentes cambiando las disoluciones respectivamente para la fermentación.

Figura 9

Tratamientos del material vegetal para la obtención de la fuente de carbono (xilosa) a utilizar

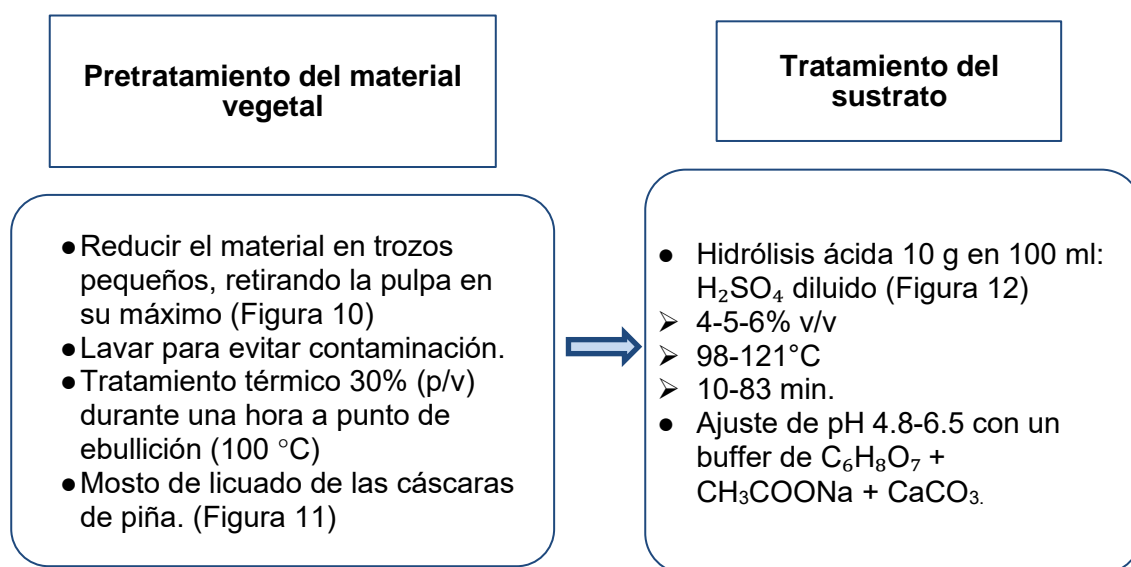


Figura 10

Cáscara de piña en tamaño reducido



Figura 11

Mosto de la cáscara de piña

**Figura 12**

Tratamiento de hidrólisis ácida diluida (4%-5%-6%).

**3.5.3. Cuantificación azúcares reductores**

Para la cuantificación de azúcares reductores presentes en la hidrólisis de la cáscara de piña se aplicó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico mencionado por Burgos (2020) con adaptaciones en las diluciones preparadas para de la curva de calibración.

Partiendo de 50mg de glucosa y 50mg de fructosa como soluciones estándar, se prepararon sus respectivas diluciones a concentraciones de 5000 ppm, 500ppm, 50ppm y 5ppm aforadas en 25 ml como se muestra en el esquema de la **Figura 13**. Tomando 1ml de

solución patrón y llevándolo a un tubo de ensayo se añadió 1mL de reactivo DNS. Posteriormente se analizó la presencia de glucosa y fructosa de las muestras hidrolizadas en el espectrofotómetro UV-Vis equipo Jasco V-630. (Figura 14).

Figura 13

Esquema de la curva de calibración con adaptaciones

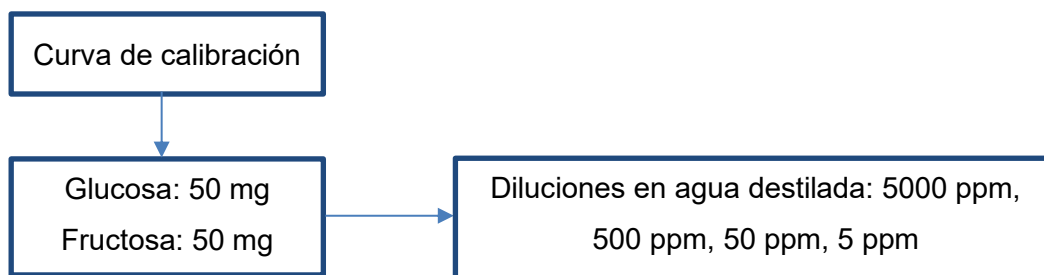
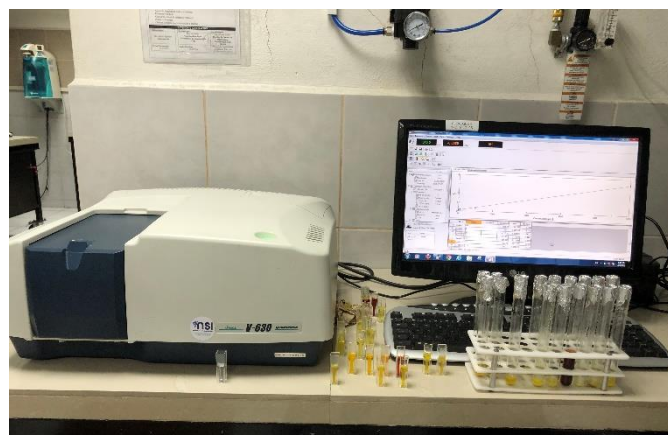


Figura 14

Análisis de hidrolizados de cáscara de piña en UV-VIS



3.5.4. Activación del microorganismo

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC (6633) disponible en el banco de microorganismos de microbiología perteneciente a los laboratorios de Ciencias de la Vida (Universidad Politécnica Salesiana-Cuenca). Se hizo una siembra en Agar Nutritivo semisólido y líquido por 48 horas en condiciones normales de incubación (37 °C en estufa) para obtener la mayor cantidad de células viables para la fermentación (Figura 15).

Figura 15

Activación del microorganismo



Nota. La imagen de la izquierda muestra la preparación de agar nutritivo semi sólido. La imagen de la derecha muestra la preparación de agar nutritivo líquido.

3.5.5. Ambientación del microorganismo

Se debe desarrollar una adaptación de la nueva fuente de carbono del microorganismo que en este caso será la xilosa obtenida de la cáscara de piña, para esto se hizo mezclas iniciales del nuevo sustrato con Agar nutritivo y evaluando la tolerancia del microorganismo hasta reemplazar en su mayoría la fuente de carbono tradicional por la nueva (Figura 16) cada ambientación se realizó a nivel de matraz en shaker con agitación orbital(Thermo Scientific MaxQ 4000 ®) (Figura 17) a un pH de 6.2 con temperatura de 36.7 °C a 115 rpm en un período de 96 horas.

Figura 16

*Ambientación de *Bacillus subtilis* ATCC (6633) al hidrolizado de cáscara de piña*

M1: Agar nutritivo (75 ml) + Sustrato (25 ml)

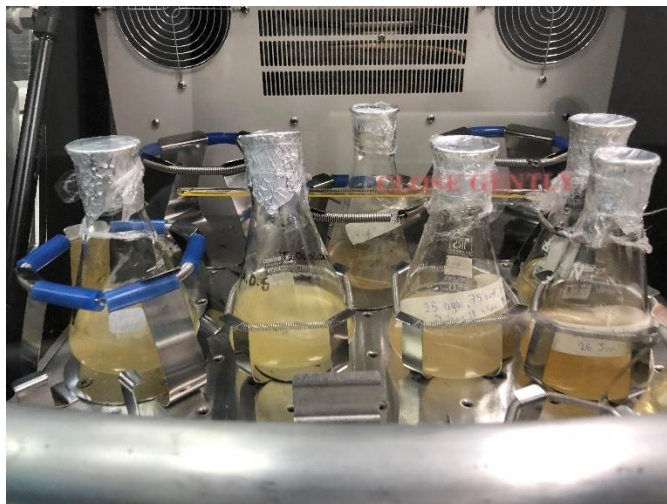
M2: Agar nutritivo (50 ml) + Sustrato (50 ml)

M3: Agar nutritivo (25 ml) + Sustrato (75 ml)

Nota. Las notaciones M1, M2 y M3 hacen referencia a los medios compuestos por agar nutritivo y sustrato.

Figura 17

Ambientación en Shaker con agitación orbital



3.5.6. Producción fermentativa del PHB

Para la producción fermentativa se utilizó la metodología propuesta por Yüksekdağ (2004) en su investigación “Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*”, donde se modificó las condiciones de operación para la fermentación (Tabla 6) realizándose 8 tratamientos previamente descritos en el apartado 3.1.2.2. (Tabla 5), los cuales se hicieron por triplicado para evaluar la capacidad de producción de *Bacillus subtilis*.

Tabla 6.

Parámetros de fermentación

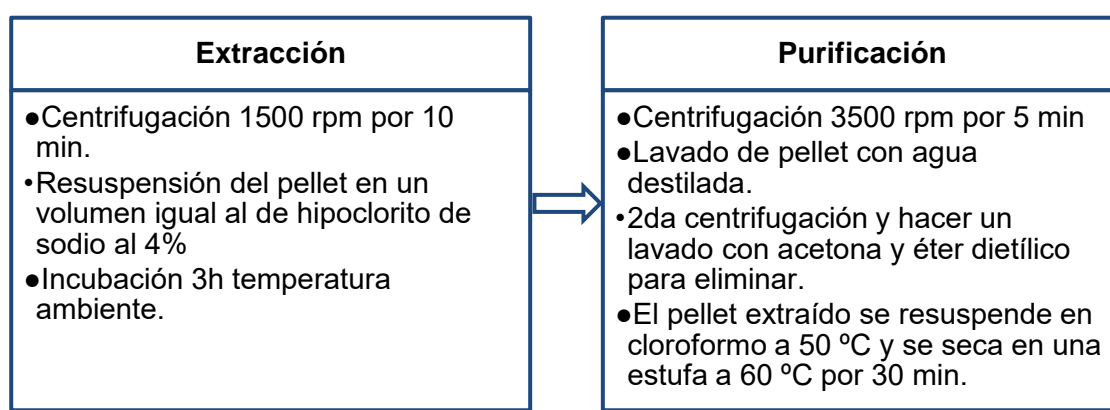
pH	Temperatura	Medio
5.67	35.8 °C	M1
6.20	37 °C	M2
7.77	36.7 °C	M3

3.5.7. Extracción y purificación del PHB

Pasado el tiempo de producción de PHB, se procedió a su extracción y purificación aplicando la metodología mencionada en el trabajo de Farfán (2019) "Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*." con la digestión cloroformo-hipoclorito de sodio (4% v/v). (Figura 18).

Figura 18

Esquema de extracción y purificación del PHB



3.5.8. Rendimiento del PHB a partir del sustrato

Una vez purificadas todas las muestras se pesó el producto el obtenido en mg/ml para determinar el rendimiento experimental obtenido en cada tratamiento.

Para calcular el rendimiento del producto a partir del sustrato se utilizó la siguiente fórmula:

$$RPS = \frac{\text{producto formado}(mg)}{\text{sustrato consumido}(mg)} \quad [3]$$

3.5.9. Caracterización del PHB en el FT-IR

Para la caracterización de PHB se usó la técnica analítica de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, la cual se analizó en Thermo Scientific Nicolet TM S10 FT-IR (Figura 19) evaluando los espectros generados a través del software OMNIC, también se realizó una comparación con el poli(3-hidroxibutirato) de la biblioteca HR Hummel Polymer and Additives.

Figura 19

Análisis de muestras en el FT-IR

**3.6. Análisis estadístico**

Se analizaron estadísticamente los datos obtenidos de los distintos tratamientos de producción fermentativa de PHB mediante el software estadístico R versión 4.3.1, los cuales se analizaron con la prueba estadística ANOVA de una vía, mediante la aplicación de un DCA *Diseño Completamente al Azar*, nivel de significancia $p= 0.05$; evaluando normalidad y homogeneidad de varianzas.

Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Análisis proximal químico

Los resultados obtenidos del análisis bromatológico realizado a la cáscara de piña vienen influenciados por la variedad de piña, su temperatura, temporal de secado, método de secado utilizado, entre otros. En esta investigación los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.1.1. Análisis químico de humedad

Tabla 7.

Resultados de las pruebas de Humedad

Piña	Peso inicial	Peso final	% de Humedad
Muestra 1	3.304g	2.84g	-13.17
Muestra 2	3.355g	2.98g	-10.70
Muestra 3	3.276g	2.96g	- 10.01

$$\text{Promedio humedad total} = \frac{-13.17 - (-10.70) - (-10.01)}{3}$$

$$\text{Humedad total} = 2.51\%$$

El porcentaje promedio resultante de las muestras por triplicado nos proporciona un valor de 2.51% para la cáscara de piña. Aguirre, J (2022) referenciando a López (2014), quien afirma que la humedad es inversamente proporcional a la temperatura y temporal de secado y que está es la razón por la cual los porcentajes de humedad ocupan un amplio rango, desde 2.33 % a 3-68% a trabajar a temperaturas de 70- 80°C Por otra parte los resultados obtenidos por Cedeño & Zambrano (2014) y Aguirre, J (2021) correspondían a 9,44 y 9,84% respectivamente atribuyendo como factor causal los 60°C como temperatura de secado a la que se trabajó.

Tabla 8.
Resultados de cenizas totales

Muestras	Peso del crisol vacío (P ₁)	Gramos de muestra	Peso del crisol con ceniza (P ₂)	Gramos de muestra seca (P ₂ - P ₁)	% Ceniza
Muestra 1	28,02	2,02 g	28,11	0,09	4,45%
Muestra 2	25,96	2,01 g	26,06	0,10	4,92%
Muestra 3	27,15	2g	27,27	0,12	5,94%

$$\text{Cenizas}(\%) = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100$$

$$M1 \text{ Cenizas}(\%) = \frac{0.09}{2.02} \times 100 = 4,45\%$$

$$M2 \text{ Cenizas}(\%) = \frac{0.10}{2.03} \times 100 = 4,92\%$$

$$M3 \text{ Cenizas}(\%) = \frac{0.12}{2.02} \times 100 = 5,94\%$$

Promedio de cenizas totales

$$\text{Cenizas Total}(\%) = \frac{4.45\% + 4.92\% + 5.94\%}{3} = 5.10\%$$

La cantidad de ceniza o residuos inorgánicos promedio de las tres muestras analizadas fue de 5.10%, levemente diferente al valor que explica Peralta, A (2020) referenciando a López (2011) quien en su estudio obtuvo la composición nutricional para diferentes partes de la piña, correspondiente a cenizas un 5,2 %

4.1.3. Grasas Totales

Tabla 9.
Porcentaje de grasa presentes en la cáscara de piña

Muestras	Recipiente vacío	Gramos de muestra	Peso final	Grasas %
Muestra 1	35.57	1 g	35.60	3%
Muestra 2	34.68	1 g	34.70	2%
Muestra 3	35.57	1 g	35.59	2%

$$\%grasas = \frac{\text{peso final} - \text{recipiente vacío}}{g \text{ muestra}} \times 100$$

$$M1 \%grasas = \frac{35.60 - 35.57}{1} \times 100 = 3 \%$$

$$M2 \%grasas = \frac{34.70 - 34.68}{1} \times 100 = 2\%$$

$$M3 \%grasas = \frac{35.59 - 35.57}{1} \times 100 = 2\%$$

Promedio de grasas totales

$$\%grasas = \frac{3 + 2 + 2}{3} = 2.33 \%$$

Los datos porcentuales del contenido de grasa presente en cada muestra de cáscara de piña por triplicado se presentan en la Tabla 9. Siendo el valor promedio de grasas totales 2.33 % lo cual concuerda con la literatura como indica Kosseva, M. R., & Rusbandi, E. (2018) existe un rango de 2-3% pero que, según la variedad de piña, el mismo se amplía 0.6 – 5.57%.

4.2. Cuantificación de azúcares reductores

Como resultado de la hidrólisis del sustrato (cáscara de piña) se cuantificaron los monosacáridos (glucosa y fructosa) presentes (Tabla 10). Se hizo el análisis de la cantidad de fructosa presente como estándar ya que representa la xilosa como pentosa.

Tabla 10.*Resultados de cuantificación de azúcares reductores*

C. H₂SO₄ (%)	Tiempo (min)	Temperatura °C	Glucosa (mg)	Fructosa (mg)
4	20	115	513,68	442,34
4	10	121	428,21	343,985
4	83	98	312,25	338,907
4	15	121	492,16	295,52
5	30	118	5125,81	5035,24
5	80	100	268,13	399,78
5	25	121	887,26	1023,95
5	28	120	4782,261	5025,272
5	15	121	682,664	550,971
5	80	98	713,551	1513,26
5	60	105	601	450,44
6	15	121	700,86	762,33
6	83	98	1097,87	1742,49
6	30	121	621,509	967,964
6	20	115	774,86	1189,54
6	25	115	697,991	813,303

Con los resultados obtenidos en la Tabla 10 a partir del diseño de superficie de respuesta se realizaron distintos análisis por cada monosacárido.

4.2.1. Análisis estadístico de azúcares reductores: Glucosa

- R-cuadrada = 43,4753 %
- R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 %

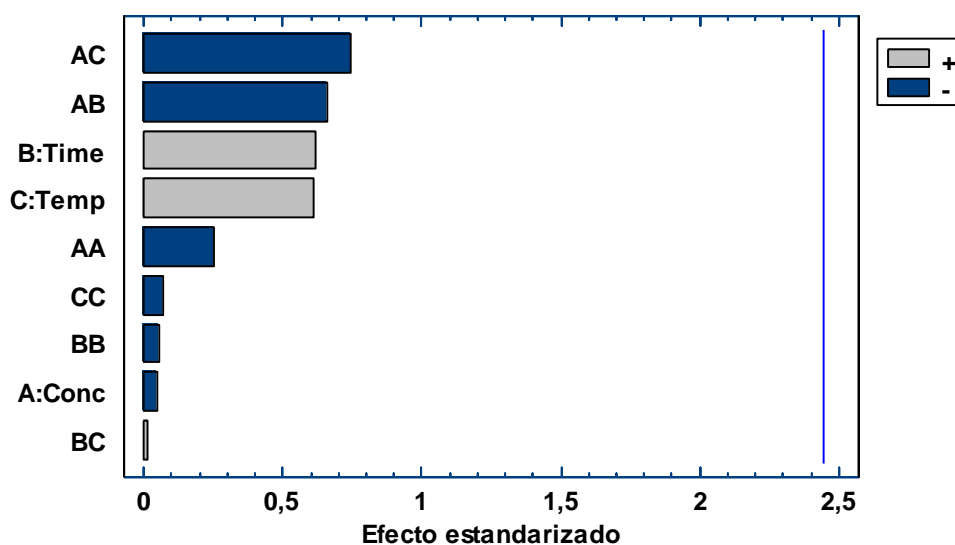
Los valores obtenidos indican la calidad moderada de predicción del moldeado siendo:

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 % nos indica que el modelo no necesita ser ajustado de forma abrupta porque se está trabajando con un diseño central basado 2x2, flexible a ligeros cambios, el modelo se logra fijar a un 100%, por ende, el R cuadrado no logra variar. R cuadrado (ajustada por g.l.) rechaza la inclusión de variables irrelevantes en el modelo, lo que ayuda a evitar el sobreajuste

El valor de R cuadrado correspondiente a 43,4753 % se da por que nos referimos a un estudio exploratorio donde se habla de interpretación en un intervalo de confianza del 95%, es decir, el rango donde podemos movernos.

Figura 20.

El Diagrama de Pareto presenta la significancia para los parámetros más influyentes y su interacción

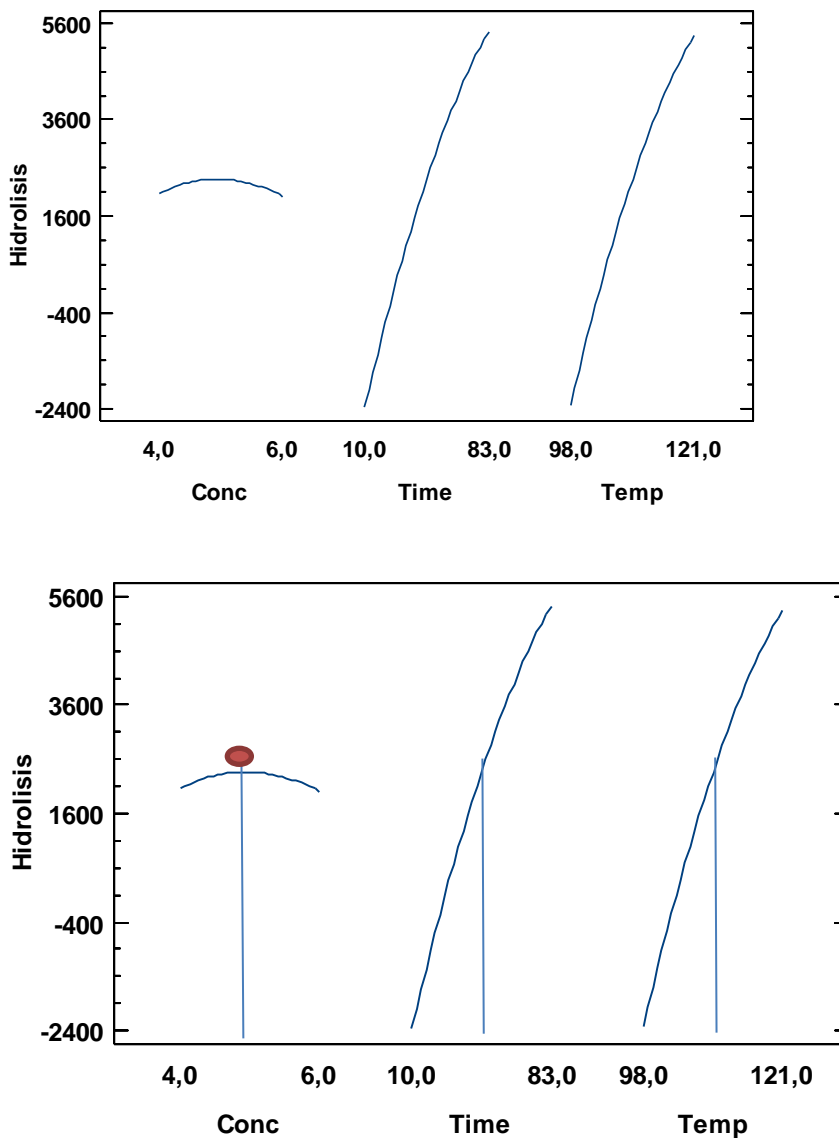


Nota. El gráfico representa el efecto estandarizado para hidrolisis. Donde A: Concentración, B: Tiempo, C: Temperatura, AC: Concentración/Temperatura, AB: Concentración/tiempo, BC: Tiempo/Temperatura, AA: Concentración/ Concentración, BB: Tiempo/ Tiempo, CC: Temperatura/ Temperatura

La Figura 20 representa la significancia para los parámetros más influyentes y su interacción. Siendo importante recalcar que ningún parámetro de los principales concentración, temperatura y tiempo fueron significativos ($p= 0,5952$)

Figura 21.

Gráfica de efectos principales para hidrolisis



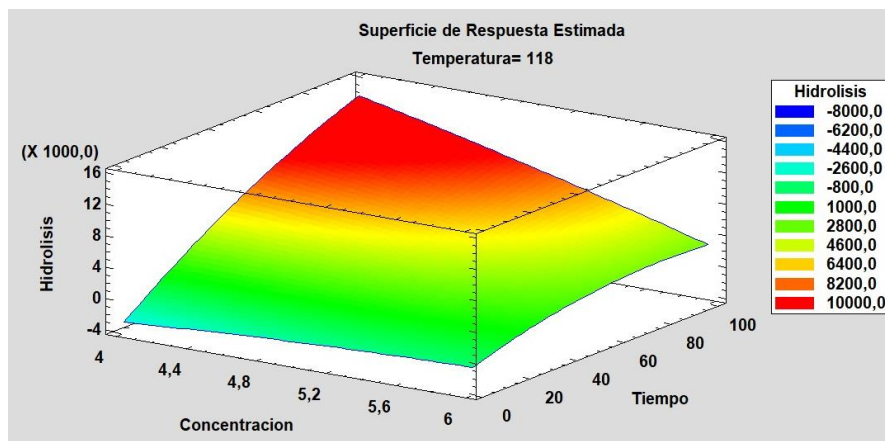
Nota: Conc: Concentración, Time: Tiempo y Temp: Temperatura.

En la figura 21 se presentó los valores que deben tomar las principales variables influyentes en el proceso de hidrolisis aplicado para el pretratamiento a la cáscara de piña, con el fin de conseguir una mejor separación de la matriz lignocelulósica.

Para el factor concentración el ácido debe tener concentración 5%, el tiempo o temporal fermentativo debe estar en los rangos de 30-45 min y la temperatura idónea en 118,154°C valores que concuerdan y respaldan lo expuesto por las gráficas de Pareto y grafica de superficie de respuesta.

Figura 22.

Gráfica de superficie de respuesta



Nota. Hidrólisis de glucosa donde Concentracion: (mL), Tiempo: (min).

El diagrama de superficie de respuesta demostró una hidrólisis óptima correspondiente a un valor cercano a 5130 con una concentración de ácido cercana a 5,35% óptima en un tiempo cercano a 35 min.

4.2.2. Análisis estadístico de azúcares reductores: Fructosa

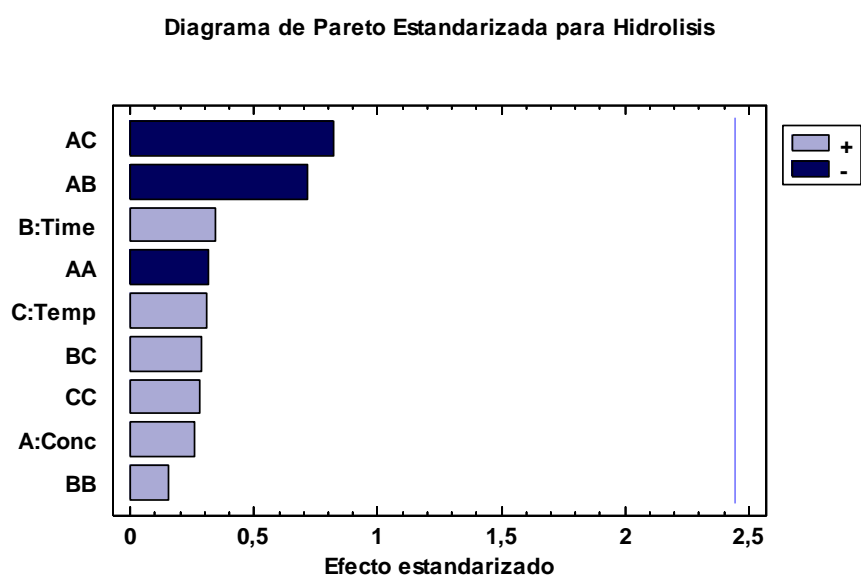
En este análisis, 0 efectos tienen un valor- p menor a 0,05, indicando que no son significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95%.

Los valores obtenidos indican la calidad moderada de predicción del moldeado siendo: El estadístico R-Cuadrada correspondiente a la proporción de variabilidad en datos de hidrólisis de 40,2629% El error estándar es de 1774,94 la cual nos indica la desviación estándar de los residuos. El error absoluto medio (MAE) de 903,678 corresponde a la margen de error promedio de los residuos en las predicciones a raíz del modelo utilizado. El estadístico de Durbin-Watson (DW) de 1,7972 para este estudio nos indica la ausencia de autocorrelación significativa en errores del modelo, es decir, que estos datos no tienen una

influencia significativa por el orden en el que se presenta. Esto se encuentra justificado por el *valor de p* que es mayor a 5%, no habiendo así una autocorrelación serial.

Figura 23.

El Diagrama de Pareto presenta la significancia para los parámetros más influyentes y su interacción.



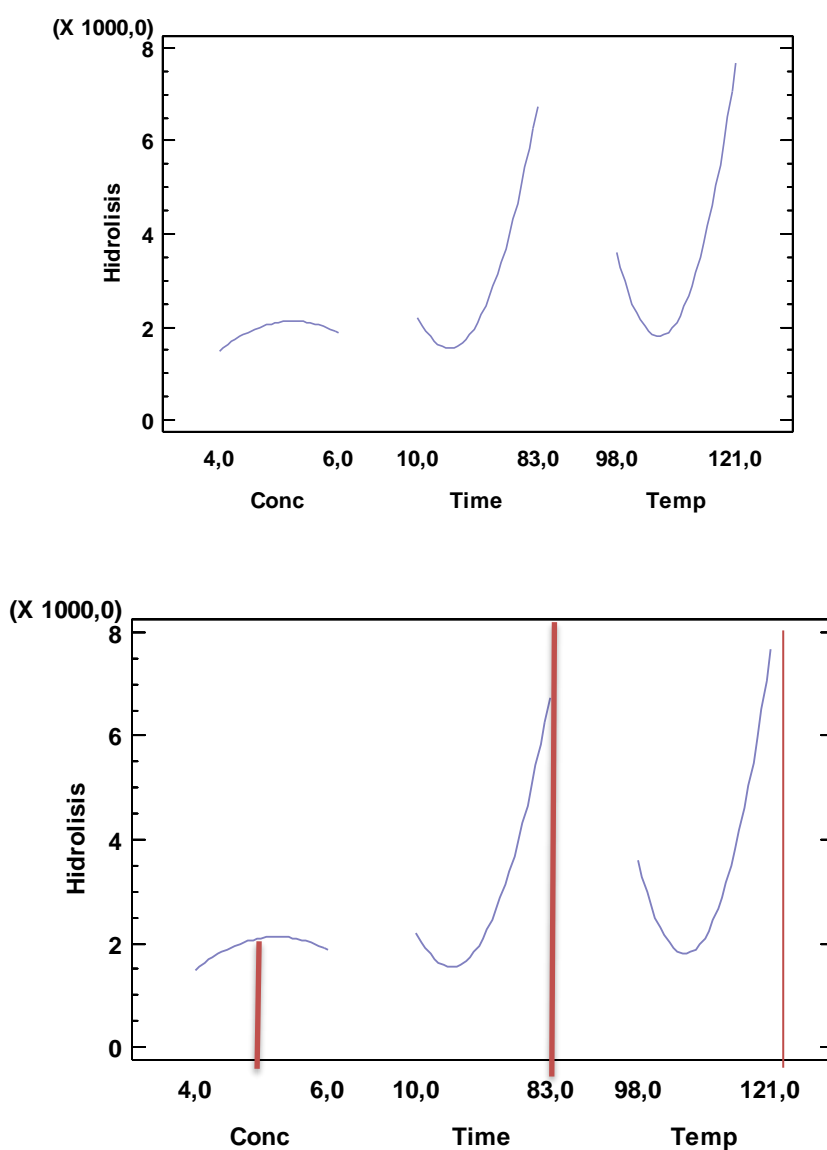
Nota. El gráfico representa el efecto estandarizado para hidrolisis. Donde A: Concentración, B:

Tiempo, C: Temperatura, AC: Concentración/Temperatura, AB: Concentración/tiempo, BC: Tiempo/Temperatura, AA: Concentración/ Concentración, BB: Tiempo/ Tiempo, CC: Temperatura/ Temperatura

La Figura 23 representa la significancia para los parámetros más influyentes y su interacción. Siendo importante recalcar ningún parámetro de los principales concentración, temperatura y tiempo fueron significativos ($p= 0,565$)

Figura 24.

Gráfica de efectos principales en la hidrólisis



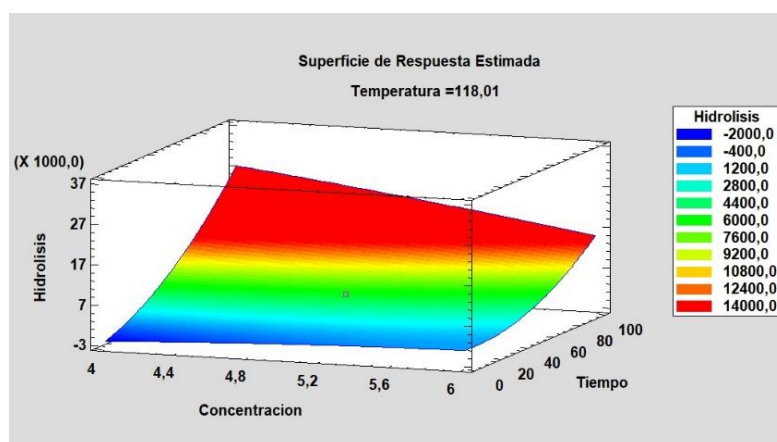
En la figura 24 se presentó los valores que deben tomar las principales variables influyentes en el proceso de hidrólisis aplicado para el pretratamiento a la cáscara de piña,

con el fin de conseguir una mejor separación de la matriz lignocelúlsica.

Para el factor concentración el ácido debe tener concentración 5,25%, el tiempo o temporal fermentativo debe estar en los rangos de 45 min y la temperatura idónea cercana a 118°C valores que concuerdan y respaldan lo expuesto por las gráficas de Pareto y gráfica de superficie de respuesta.

Figura 25.

Gráfica de superficie de respuesta



Nota Representa a la cuantificación de fructosa. Superficie de respuesta óptima para la hidrólisis donde Concentración (mL), Tiempo (min), Temperatura °C.

El diagrama de superficie de respuesta demostró una hidrólisis óptima correspondiente a un valor cercano a 5035,24 con una concentración de ácido cercana a 5,35% óptima en un rango de tiempo de 35- 40 min

4.3. Rendimiento del PHB a partir del sustrato

$$RPS = \frac{\text{producto formado}(mg)}{\text{sustrato consumido}(mg)} \quad [3]$$

Se aplicó la fórmula [3] para los 8 tratamientos propuestos en la metodología con su

triplicado para comprobar el rendimiento que tuvo *Bacillus subtilis* usando la cáscara de piña como productora de PHB. (Tabla 11).

Tabla 11

Rendimientos de PHB a partir del sustrato

Medio	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
M 1	7,50	3,50	3,70	2,60	2,40	109,0	108,8	108,1
M 2	7,20	3,50	3,50	2,50	2,30	108,9	108,6	108,0
M 3	7,80	3,80	3,90	3,80	2,60	109,1	109,0	109,1
Promedio	7,5	3,6	3,7	2,96	2,43	109,0	108,83	108,4

Tratamiento	Producto formado (mg)	Sustrato consumido (mg)	Rendimiento del PHB a partir del sustrato (RPS)
T1	7.5	762.33	9.84×10^{-3}
T2	3.6	399.78	9.00×10^{-3}
T3	3.7	550.971	6.72×10^{-3}
T4	2.96	1742.49	2.12×10^{-3}
T5	2.43	5035.24	1.48×10^{-3}
T6	109.0	295.52	0.37
T7	108.83	343.985	0.31
T8	108.4	442.34	0.0911

La Tabla 11 nos proporciona información correspondiente al rendimiento de PHB obtenido en cada tratamiento, siendo el mayor valor el tratamiento que mejor resultados demostró y el menor valor aquellas condiciones que no favorecieron a un buen rendimiento. Así es posible evidenciar que los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones del tratamiento 6 (T6) con 0.37, valor de rendimiento más alto, seguido del tratamiento 7 (T7) con

0.31 y finalmente tratamiento 8 (T8) con 0.0911.

4.4. Análisis estadístico del producto obtenido (PHB)

Con los pesos obtenidos de PHB (mg) se realizó un análisis estadístico de modelo ANOVA de una vía con un Diseño Completamente al Azar, donde se determinó que la variable de salida no presentó una distribución normal (Tabla 12), por este motivo se hizo una transformación de datos y mediante la prueba de Shapiro-Wilk se probó que los datos presentan una distribución normal (Tabla 13), finalmente se hizo las pruebas paramétricas de comparaciones múltiples por diferencia significativa honesta de Tukey (DSH-Tukey) y los resultados se presentaron con el 95% de intervalos de confianza.

Hipótesis

Hipótesis Nula (H0): Los datos cumplen la distribución normal

Hipótesis Alternativa (H1): Los datos no cumplen la distribución normal.

Tabla 12.

Prueba de Shapiro-Wilk / datos originales

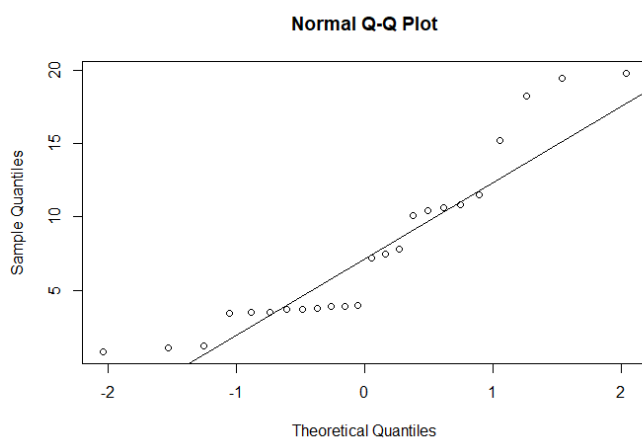
$P < 0.01$ se puede decir que los datos no muestran una distribución normal.

shapiro-wilk normality test

data: producto
w = 0.87585, p-value = 0.006862

Figura 26.

Gráfica de la prueba de normalidad / datos originales

**Tabla 13.**

Prueba de Shapiro-Wilk / datos transformados

$P > 0.01$ se puede decir que los datos muestran una distribución normal.

shapiro-wilk normality test

data: r
 $w = 0.92361$, $p\text{-value} = 0.07024$

Figura 27.

Gráfica de la prueba de normalidad / datos transformados

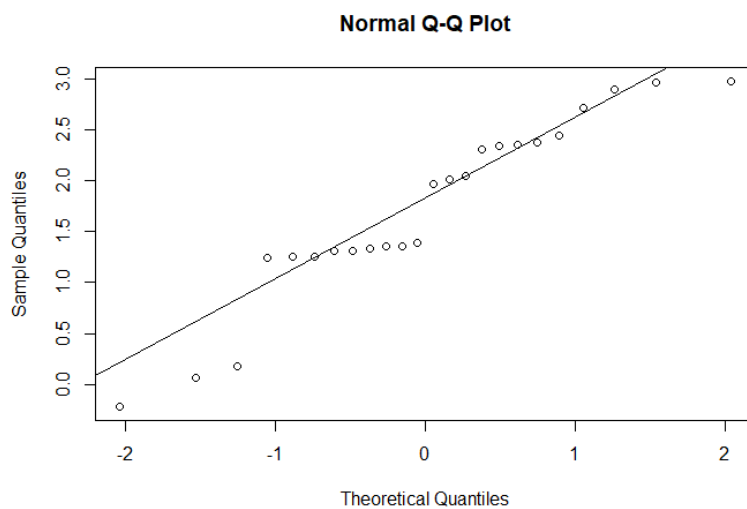


Tabla 14.*Prueba ANOVA*

Si $p < 0$ los resultados difieren con alfa entre sí.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tratamientos	7	18.123	2.5891	223.6	9.56e-15
Residuals	16	0.185	0.0116		

tratamientos ***
Residuals

Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La prueba ANOVA muestra *** para los tratamientos, lo que estadísticamente significa que el valor de la prueba F muestra que los resultados son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

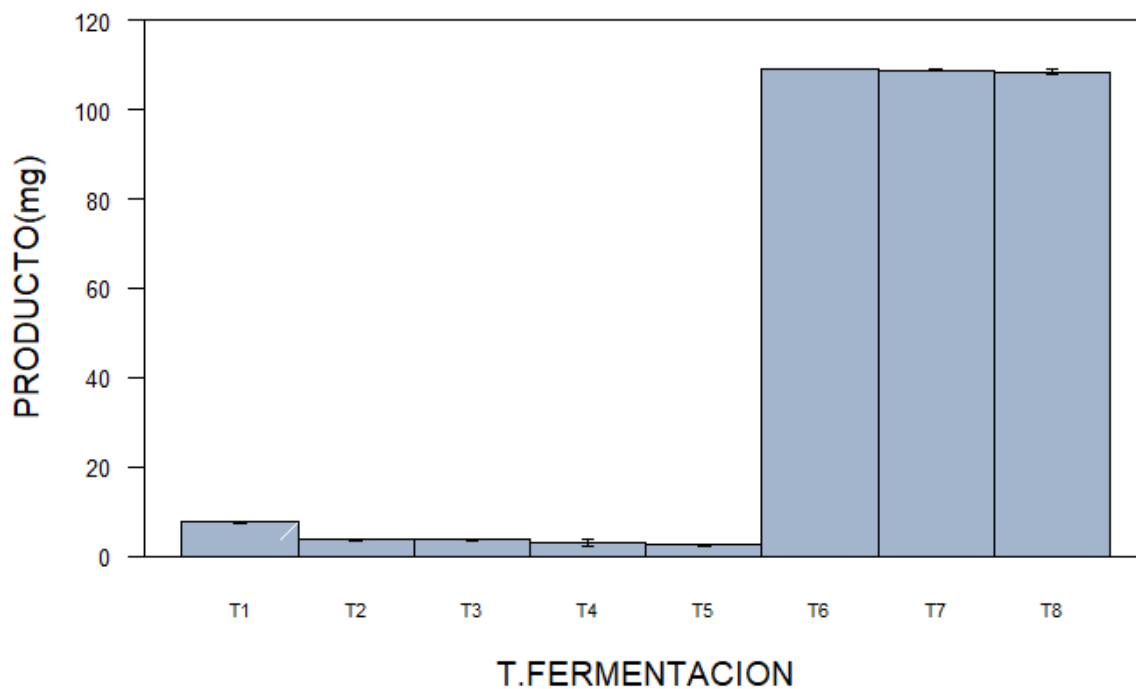
Tabla 15.*Prueba DSH-Tukey*

	producto.t	groups
T6	4.6913476	a
T7	4.6895102	a
T8	4.6858176	a
T1	2.0143693	b
T3	1.3073574	c
T2	1.2801757	c
T4	1.0689344	cd
T5	0.8879631	d

Se puede observar en los resultados de la Tabla 15 que en T6, T7 y T8 (a) y T3, T2, (c) no existe una diferencia significativa entre los tratamientos; mientras que en los tratamientos T1 (b), T4 (cd) y T5 (d) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos.

Figura 28.

Gráfica de Prueba de DSH-Tukey

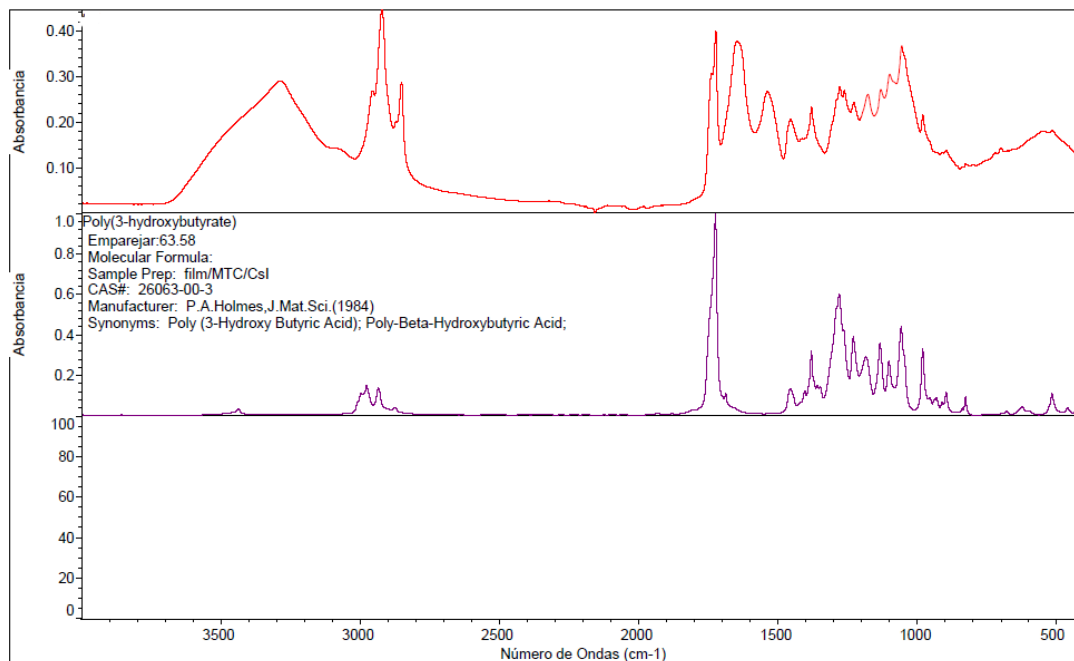


4.5. Caracterización del PHB en polvo por el FT-IR

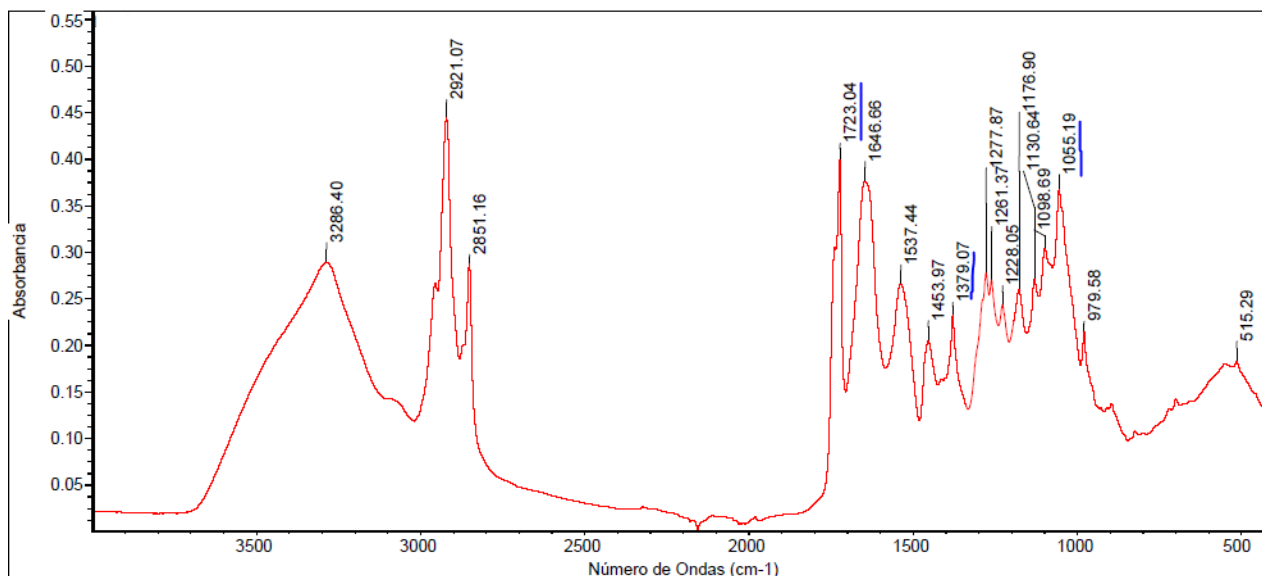
Se observaron todos los productos en polvo resultantes de los tratamientos realizados en el FT-IR haciendo una comparación con los picos representativos de los grupos funcionales del PHB, donde T6, T7 y T8 mostraron la mayor similitud al compararlo al PHB registrado en la biblioteca Hummel Polymers and additives.

Figura 29.

Gráfica comparativa de T6. Resultado muestra 63.58 de similitud

**Figura 30.**

Gráfica de picos T6



Muestra una banda de absorción aguda en 1723.04 cm^{-1} que corresponde a estiramientos del enlace $\text{C}=\text{O}$, otra banda se observó en 1277.87 cm^{-1} que corresponde al grupo $\text{C}-\text{H}$, la presencia de estas bandas han sido reportadas como marcador representativo de PHB. También se observó bandas intensas entre 1000 y 1300 cm^{-1} , características del

grupo éster C-O. Las bandas del 2851.16 y 2921.07 cm^{-1} muestran presencia de CH_3 y CH_2 con estiramientos asimétricos y simétricos respectivamente. Las bandas que muestran el grupo OH terminal son de 3286.40 cm^{-1} .

Figura 31.

Gráfica comparativa de T7

Resultado muestra 59.09 de similitud

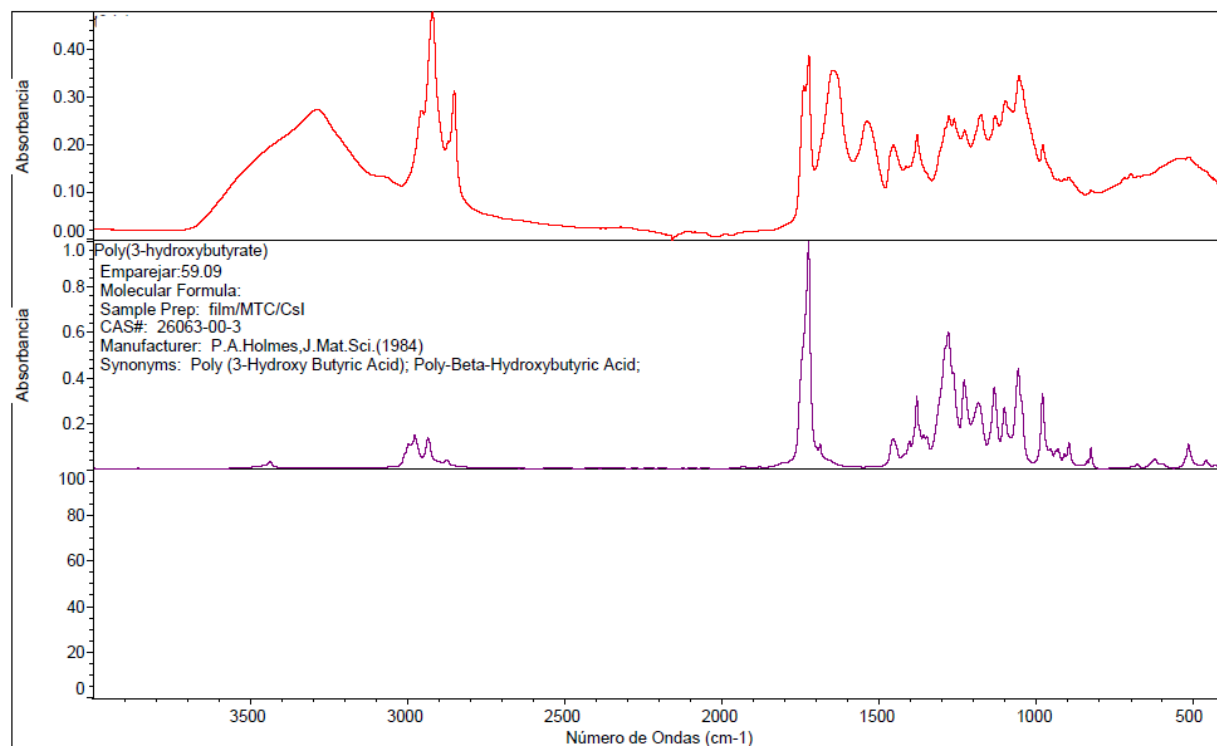
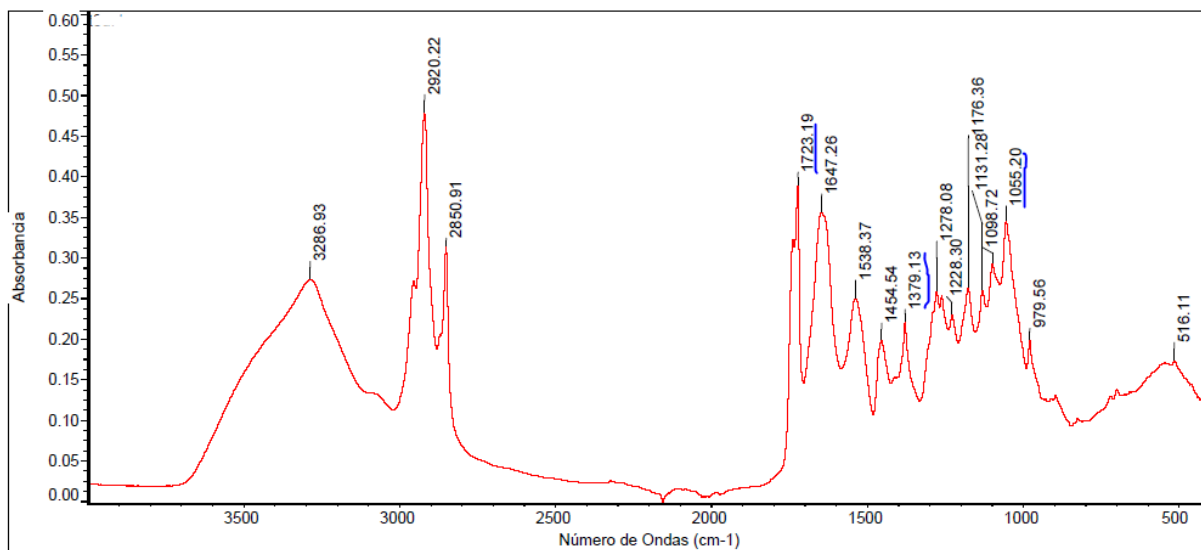


Figura 32.

Gráfica de picos T7



Muestran estiramientos del enlace C=O con 1723.19 cm^{-1} , otra banda se observó en 1278.08 cm^{-1} que corresponde al grupo C-H, la presencia de estas bandas han sido reportadas como marcador representativo de PHB. También se observó bandas intensas entre 1000 y 1300 cm^{-1} , características del grupo éster C-O. Las bandas del 2850.91 y 2920.22 cm^{-1} muestran presencia de CH_3 y CH_2 . Las bandas que muestran el grupo OH terminal son de 3286.93 cm^{-1} .

Figura 33.

Gráfica comparativa de T8. Resultado muestra 45.78 de similitud

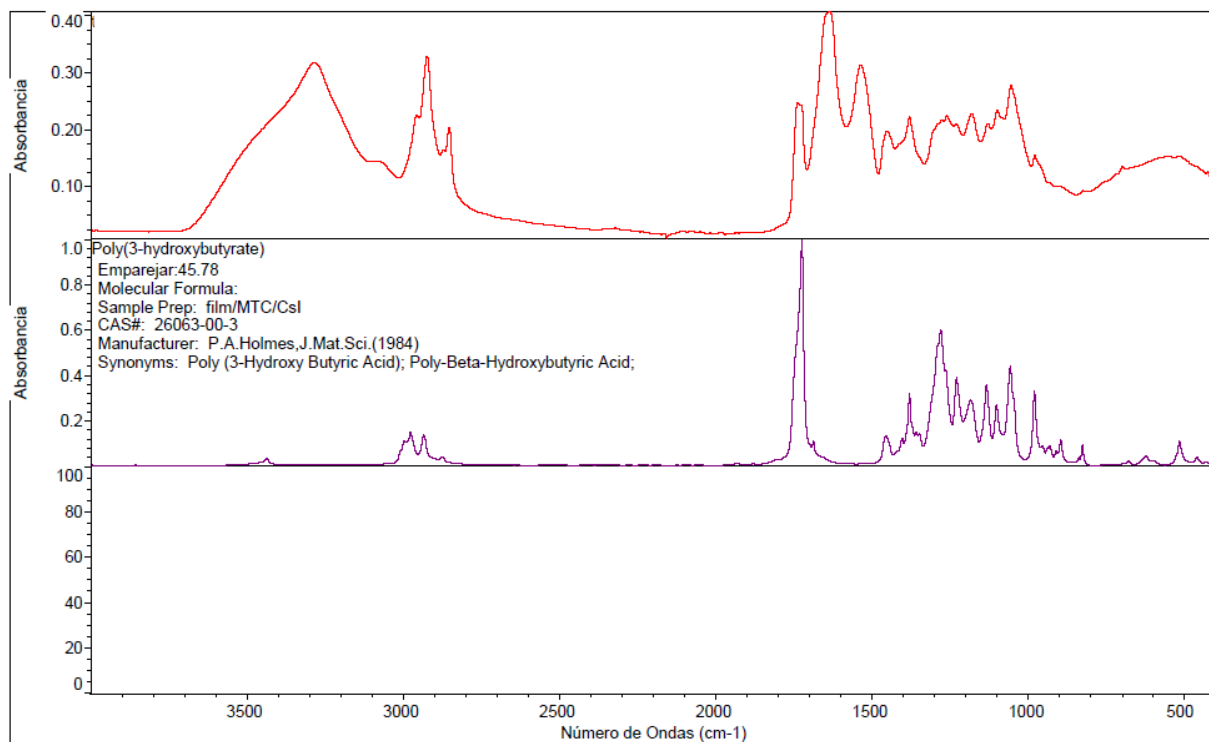
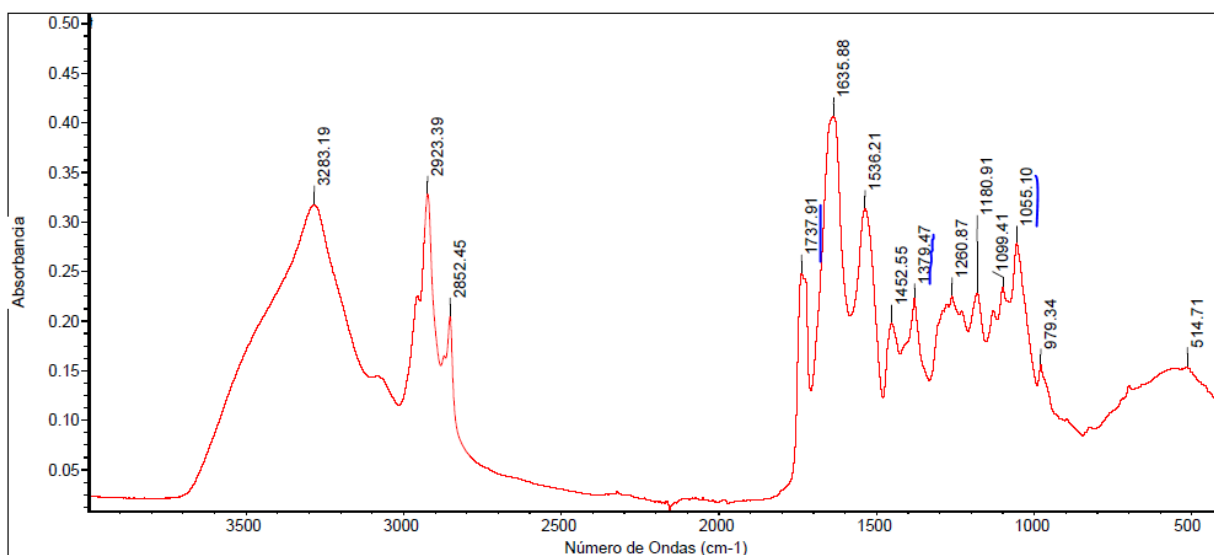


Figura 34.

Gráfica de picos T8



Muestran estiramientos del enlace C=O con 1737.91 cm^{-1} , otra banda que se observó en 1260.87 cm^{-1} que representa en poco porcentaje al grupo C-H, la presencia de estas

bandas han sido reportadas como marcador representativo de PHB. También se observó bandas intensas entre 1000 y 1300 cm^{-1} , características del grupo éster C-O. Las bandas del 2852.45 y 2923.39 cm^{-1} muestran presencia de CH_3 y CH_2 . Las bandas que muestran el grupo OH terminal son de 3283.19 cm^{-1} .

Lo que le da una similitud del 45.78% en este tratamiento como se pueden observar en los picos del espectro es la diferencia de 16.13 cm^{-1} con respecto a 1277 cm^{-1} en la banda representativa del grupo C-H.

Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

En el presente estudio se determinó y optimizó la producción del poli(3-hidroxi-butarato) mediante fermentación microbiana, generando tratamientos de hidrólisis para el sustrato mediante el programa estadístico Statgraphics usando el modelo de superficie de respuesta lo que evito generar errores significativos en el diseño de tratamientos. En cuanto al análisis estadístico de los tratamientos fermentativos se pudo concluir que hubo diferencias significativas según los parámetros fisicoquímicos con los que se experimentó.

También cabe mencionar que al experimentar con puntos críticos para la producción fermentativa en los tratamientos T4 y T5 se observó que el rendimiento del producto fue mínimo, ya que al trabajar con un pH de 5.67 a una temperatura de 35.8 °C, el microorganismo mostro alta sensibilidad a estas condiciones.

El diagrama de superficie de respuesta demostró una hidrólisis óptima correspondiente a un valor cercano a 5400 con una concentración de ácido cercana a 5,35% óptima en un tiempo cercano a 40 min. También se observa que ha menores concentraciones de ácido se puede optimizar el tiempo sin perder un buen hidrolizado.

Con los valores obtenidos en RPS (rendimiento de PHB para cada tratamiento), concluimos que el mejor tratamiento es (T6) con un valor de 0.37, por lo tanto las mejores condiciones a las que se debe trabajar son: temperatura 36°C, pH 7.77, agitación 115 rpm, medio (75 ml sustrato, 25 ml agar, inóculo 3 ml), mientras que el tratamiento que obtuvo el rendimiento más bajo fue el tratamiento 2 (T2) con un resultado de 9.0×10^{-3} donde las condiciones fueron pH 5.67, temperatura 36,4°C, medio (25 sustrato, 75 agar, inóculo 3ml). Al analizar los demás tratamientos y las condiciones que presentan, concluimos que el pH y temperatura son los factores más influyentes para que la bacteria *Bacillus subtilis* potencie su capacidad de producción.

5.2. Recomendaciones

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos se recomienda considerar como factores críticos de fermentación: pH, temperatura y medio de fermentación que según la bibliografía consultada influyen significativamente en el rendimiento de producción de un biopolímero.

Del mismo modo se recomienda estudiar los parámetros que en este estudio no fueron considerados como influyentes con el fin de aportar información valiosa referente a la obtención de PHB.

Otro de los problemas presentados en la investigación, fue que se utilizó reactivos en un estado de reutilización, lo que nos generó falsos resultados y pérdida de materia prima, por lo tanto, se recomienda revisar bien los reactivos antes de usar.

En base a los resultados obtenidos se sugiere trabajar con concentraciones de ácido (H_2SO_4) menores al 4% para el pretratamiento del sustrato con el fin de optimizar el tiempo de hidrólisis.

Finalmente recomendamos para futuras investigaciones, tener en cuenta la metodología de purificación ya que esta puede influir en los resultados de caracterización del FT-IR.

Bibliografía

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Lackner, M. (2021). Compuestos biopolímeros: una revisión. *Revista Internacional de Plásticos de Base Biológica*, 3(1), 40–84. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1881214>
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Snoussi, M., Badraoui, R., Alreshidi, M., Elsbali, A. M., Al-Soud, W. A., Alharethi, S. H., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization. *Polymers*, 14(19), 3982. <https://doi.org/10.3390/polym14193982>
- Aguiar, S., Enríquez EstrellaM., & Uvidia CabadianaH. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento: Agro-industrial waste: its impact, management and use. *AXIOMA*, 1(27), 5-11. <https://doi.org/10.26621/ra.v1i27.803>
- Amadu, A. A., Qiu, S., Ge, S., Addico, G. N. D., Ameka, G. K., Yu, Z., Xia, W., Abbew, A.-W., Shao, D., Champagne, P., & Wang, S. (2021). A review of biopolymer (Poly- β -hydroxybutyrate) synthesis in microbes cultivated on wastewater. *The Science of the Total Environment*, 756(143729), 143729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143729>
- Astudillo, M., Olmedo, L. (2021). "OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL". Cuenca-Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21448/1/UPS-CT009430.pdf>

- Babaniyi, Babafemi. (2020). Production of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) by *Bacillus cereus* on pineapple peels. *GSC Advanced Research and Reviews*. 4. 24-030. 10.30574/gscarr.2020.4.1.0055. https://www.researchgate.net/publication/343255733_Production_of_poly-b-hydroxybutyric_acid_PHB_by_Bacillus_cereus_on_pineapple_peels
- Burgos Montañez, L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista De Investigación*, 13(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Dilkies-Hoffman, L. S., Lant, P. A., Laycock, B., & Pratt, S. (2019). The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.020>
- Dobrogojski, J., Spsychalski, M., Luciński, R. *et al.* Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiol Plant* **40**, 162 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>
- Dos Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2018). De la obtencion a la degradacion de PHB: Una revision de la literatura. Parte II. https://agrosavia.primo.exlibrisgroup.com/discovery/fulldisplay?docid=cdi_gale_infotrac_misc_A547989005&context=PC&vid=57BAC_INST:BAC&lang=es&search_scope=MyInst_and_CI&adaptor=Primo%20Central&tab=ALL&query=any,contains,obtencion%20de%20PHB
- Dudun, A.A. et al. (2022). Biosynthesis of PHBs by the Method of Full-Factorial Design for Obtaining PHB/Magnetite Composites. In: Geetha, K., Gonzalez-Longatt, F.M., Wee, HM. (eds) *Recent Trends in Materials*. Springer Proceedings in Materials, vol 18. Springer, Singapore. https://bibliotecas.ups.edu.ec:2582/10.1007/978-981-19-5395-8_5
- Environment, U. N. (2022). Issue No. 41: On the road to success: Designing an effective

plastics treaty. UNEP - UN Environment Programme.

<https://www.unep.org/resources/perspective-series/issue-no-41-road-success-designing-effective-plastics-treaty>

Facundo Martínez, L. V., Emiliano, U., Castrejón, R., Vargas, A. Á., Cano Canchola, C., & Serafin Muñoz, A. H. (2022). XXVII Verano De la Ciencia. Uqto.mx. Recuperado de <http://repositorio.uqto.mx/bitstream/20.500.12059/7385/1/3709-Texto%20del%20art%C3%ADculo-12241-1-10-20220831.pdf>

Felipe, A., Farfán, R. (2019). Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxi butirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*. Edu.Co. Retrieved April 18, 2023, from <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76043/1014243473.2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García Navarro, B. (2020). Evaluación y caracterización de subproductos de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) y adición de quitosano como agente gelificante en la elaboración de productos imitación mermelada. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2206>

García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.020>

Gómez Cardozo, J. R., Mora Martínez, A. L., Yepes Pérez, M., & Correa Londoño, G. A. (2016). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates and native microorganisms synthesized from fatty waste. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/6541718>

Govil, T., Wang, J., Samanta, D., David, A., Tripathi, A., Rauniyar, S., Salem, D. R., & Sani,

- R. K. (2020). Lignocellulosic feedstock: A review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics. *Journal of Cleaner Production*, 270(122521), 122521. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122521>
- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R. M., Zaharia, C., & Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 30(9), 695–712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>
- Guanca, M. A., Realpe-Delgado, M. E., & García-Celis, J. (2021). Obtención polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión. <https://doi.org/10.23850/22565035.3692>
- Guanca, M. A., Realpe-Delgado, M. E., & García-Celis, J. (2021). Obtención polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión. *Informador técnico*, 86(1), 111–135. <https://doi.org/10.23850/22565035.3692>
- H. V. Lee, S. B. A. Hamid, S. K. Zain, "Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process", *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 631013, 20 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Hassan MA, Bakhiet EK, Hussein HR, Ali SG. Statistical optimization studies for polyhydroxybutyrate (PHB) production by novel *Bacillus subtilis* using agricultural and industrial wastes. *Int J Environ Sci Technol*. 2018;16(7):3497–3512. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1900-y>
- Hassan, M. A., Bakhiet, E. K., Ali, S. G., & Hussien, H. R. (2016). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(4), 046-051. https://japsonline.com/admin/php/uploads/1827_pdf.pdf
- Hassan, M.A., Bakhiet, E.K., Hussein, H.R. et al. Statistical optimization studies for polyhydroxybutyrate (PHB) production by novel *Bacillus subtilis* using agricultural and industrial wastes. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 3497–3512 (2019).

<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1900-y>

Ipsita Panda, Soumyajit Balabantaray, Subhendu Kumar Sahoo & Nivedita Patra (2018)

Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*, *Chemical Engineering Communications*, 205:2, 249-256, DOI: 10.1080/00986445.2017.1384923

Jögi, K., & Bhat, R. (2020). Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18(100326), 100326.

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100326>

Kim MY, Kim C, Moon J, Heo J, Jung SP, Kim JR. Polymer film-based screening and isolation of polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms. *J Microbiol Biotechnol*. 2017; 27(2):342–349. <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10015>

Kodagoda, Gethmini & Marapana, Upul. (2017). Development of non-alcoholic wines from the wastes of Mauritius pineapple variety and its physicochemical properties. *International Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*. 6. 492-497.

Kosseva, M. R., & Rusbandi, E. (2018). Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International journal of biological macromolecules*, 107(Pt A), 762–778.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054>

Lee, S. M., Lee, H. J., Kim, S. H., Suh, M. J., Cho, J. Y., Ham, S., ... & Yang, Y. H. (2021). Screening of the strictly xylose-utilizing *Bacillus* sp. SM01 for polyhydroxybutyrate and its co-culture with *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 for enhanced production of PHB. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 410-417.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.149>

López-Fernández, M. del M., & Franco-Mariscal, A. J. (2021). Indagación sobre la degradación de plásticos con estudiantes de secundaria. *Educación química*, 32(2), 21. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.2.76553>

- Malan, A. (2015). Estudio del metabolismo de xilosa en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 orientado a optimizar la producción de poli-3-hidroxibutirato . Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Montevideo, Uruguay.
Recuperado de
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/17151/1/uy24-17504.pdf>
- Martínez, C. A. M. (2018). *AISLAMIENTO Y ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE CULTIVO DE COMUNIDADES PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS Y DEGRADADORAS DE n-HEXADECANO EN TAPETES MICROBIANOS DE GUERRERO NEGRO, MÉXICO*. Repositorio Institucional.mx.
https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/894/1/martinez_c.pdf
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Melo, M. F. (2023). *El mundo está inundado de residuos plásticos*. Statista.
<https://es.statista.com/grafico/30051/produccion-mundial-de-residuos-plasticos-por-tipo/>
- Mendoza, R. R. C. (2017). *Obtención de polihidroxicanoatos a partir del suero lácteo por cultivos microbianos mixtos* [Centro de investigaciones científicas avanzadas (CICA)].
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/20354/CaleroMendoza_RolandoRafael_TD_2017%20.pdf
- Nada frena los plásticos de un solo uso: más de 260.000 toneladas al año en Ecuador*. (2020, noviembre 10). Plan V. <https://www.planv.com.ec/historias/sociedad/nada-frena-plasticos-un-solo-uso-mas-260000-toneladas-al-ano-ecuador>
- Osorio, P. C., & Peña, D. (2002). Determinación de la relación DQO/DBO5 en aguas

residuales de comunas con población menor a 25.000 habitantes en la VIII región.

Universidad Tec. Fed. Sta Maria.

Penkhrue W, Jendrossek D, Khanongnuch C, Pathom-aree W, Aizawa T, Behrens RL, et al.

(2020) Método de superficie de respuesta para la acumulación de bioplásticos de polihidroxiбутирато (PHB) en *Bacillus drentensis* BP17 usando cáscara de piña. PLoS ONE 15(3): e0230443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230443>

Ramírez Amador, K., Rojas Carrillo, Ó., Alvarado Aguilar, P., & Vega Baudrit, J. (2012).

Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananascomusus*).

https://repositorio.conare.ac.cr/bitstream/handle/20.500.12337/3319/OBTENCION%20DE%20XILOSA%20A%20PARTIR%20DE%20DESECHOS%20LOGNOCELULOSICO_S_RAMIREZ.pdf?sequence=1

Ranganathan, S., Dutta, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Utilization of food waste streams for the production of biopolymers. *Heliyon*, 6(9), e04891.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04891>

Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

Rodríguez A, Koller M, de Sousa Dias MM, Calafell M, Braunegg G, Marqués-Calvo MS.

Novel poly [(R)-3-hydroxybutyrate]-producing bacterium isolated from a Bolivian hypersaline lake. *Food Technol Biotechnol*. 2013;51(1):123–130.

Rodríguez, L. S. (2021). Biopolímeros: Alternativa sostenible en el marco de la economía circular TRABAJO FIN DE MÁSTER MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA. Ual.Es.

<http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/13730/SILVERIO%20RODRIGUEZ.%20OLIDIA.pdf?sequence=1>

Rodríguez, U. (2022). Guanajuato Rumbo al Desarrollo Sustentable, Etapa 2.0: Análisis de

bacterias productoras de polihidroxitirato (PHB) dentro del rol de bioplásticos.

Universidad de Guanajuato. México.

<http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/7385>

Romano, N., Araujo-Andrade, C., Lecot, J., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A. (2018). Infrared spectroscopy as an alternative methodology to evaluate the effect of structural features on the physical-chemical properties of inulins. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 109, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.032>

Sandström, Anders & Heras, Alejandro & Portugal-Nunes, Diogo & Gorwa-Grauslund, Marie. (s/f). *Engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of poly-3-D-hydroxybutyrate from xylose*. Researchgate.net.

https://www.researchgate.net/figure/The-PHB-metabolic-pathway-consisting-of-A-metabolite-structures-involved-enzymes_fig1_274248758

Saratale, R. G., Cho, S. K., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Bharagava, R. N., Kim, D. S., Nair, S., & Shin, H. S. (2021). Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* sp. and its characterization. *Bioresource Technology*, 324(124673), 124673. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124673>

Sistemas de Información – Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2022). Gob.ec.

<https://www.agricultura.gob.ec/sipa/>

Tamdoğan, N., & Sidal, U. (2011). Investigation of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 under different conditions. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17(Suppl A), 173-176. <http://vetdergikafkas.org/pdf.php?id=921>

Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., ... & Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers*, 6(3), 706-754.

Thapa, Christina & Shakya, Pallavi & Shrestha, Rabina & Pal, Sushovita & Manandhar, Prakash. (2019). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria,

Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. Nepal Journal of Biotechnology. 6. 62-68.
10.3126/njb.v6i1.22339.

https://www.researchgate.net/publication/330403719_Isolation_of_Polyhydroxybutyrate_PHB_Producing_Bacteria_Optimization_of_Culture_Conditions_for_PHB_production_on_Extraction_and_Characterization_of_PHB/citation/download

Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., & Singh, R. P. (2013). Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. Biomass & Bioenergy, 55, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.017>

Yousuf RG, Winterburn JB (2016) Date seed characterisation, substrate extraction and process modelling for the production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*. Biores Technol 222:242–251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.107>

Yüksekdağ, Z. N., Aslim, B., Beyatli, Y., & Mercan, N. (2004). Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnology, 3(1), 63-66. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/14917>

Zárate Morales, B. (2020). Estudio del papel del sistema de control post transcripcional RSM en la producción de poli-beta hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA. México.
<https://hdl.handle.net/20.500.12371/10350>

Anexos

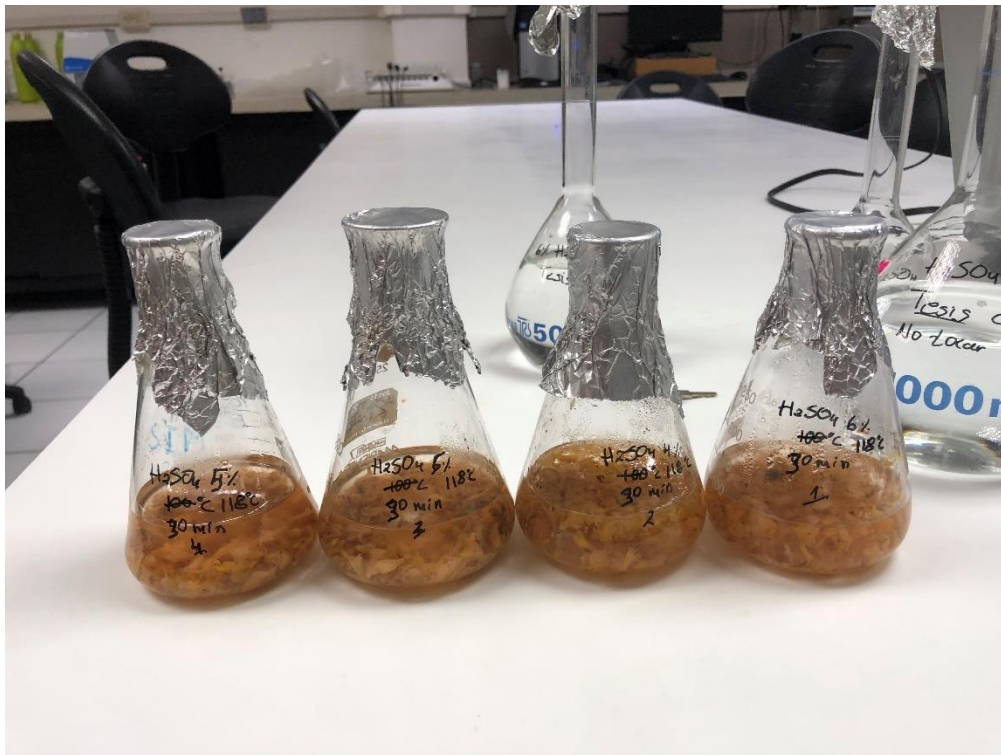
Anexo 1. Residuos de cáscara piña



Anexo 2. Análisis de cenizas totales



Anexo 3. Tratamientos de hidrolisis de sustrato



Anexo 4. Prueba de Fehling



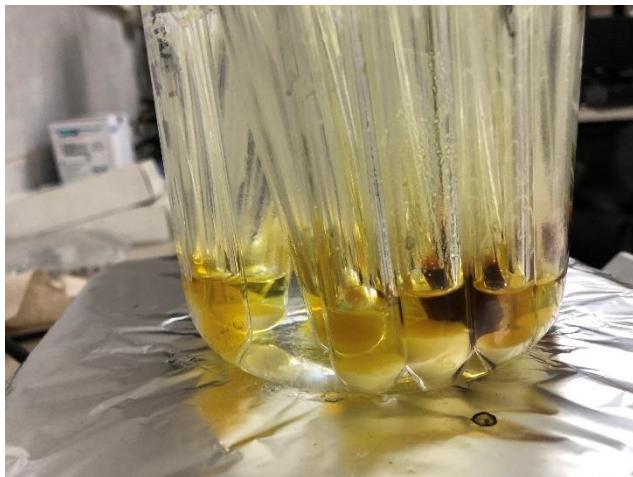
Anexo 5. Proceso de extracción etérea



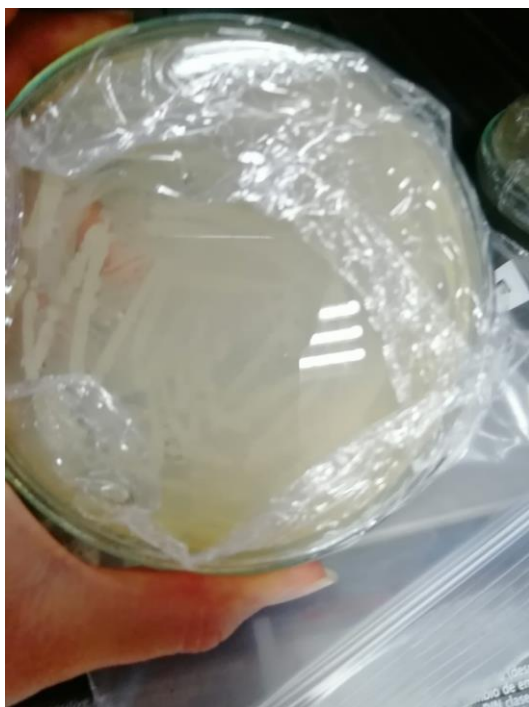
Anexo 6. Hidrolisis en aceite de vaselina a 98 °C



Anexo 7. Método DNS para cuantificación de azúcares



Anexo 8. Cepa *Bacillus subtilis*



Anexo 9. Acumulación de biomasa de PHB en la fermentación



Anexo 10. Extracción de PHB con hipoclorito de sodio al 4%



Anexo 11. Purificación de PHB con acetona y di éter



Anexo 12. Muestras en polvo de PHB

