

Efecto de la incorporación de un soporte inerte para la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB) por fermentación a partir de cascarilla de cacao

Effect of incorporating an inert support for the production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from cocoa bean shells by fermentation

Autores:

Marta Sánchez

Marta Farelo

Amanda Laca

Adriana Laca

Debería decir: Departamento de Ingeniería
Química y Ambiental, Universidad de Oviedo,
España

Autor de correspondencia:

Marta Sánchez

marta.ssotero@gmail.com



Recepción: 29 - Septiembre - 2024

Aprobación: 18 - Marzo - 2025

Publicación online: 30 - Junio - 2025

Citación: Sánchez, M., Farelo, M., Laca, A y Laca, A. (2025). Efecto de la incorporación de un soporte inerte para la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de cáscaras de habas de cacao por fermentación. *Maskana*, 16(1), 91-103. <https://doi.org/10.18537/mskn.16.01.05>



Efecto de la incorporación de un soporte inerte para la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB) por fermentación a partir de cascarilla de cacao

Effect of incorporating an inert support for the production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from cocoa bean shells by fermentation

Resumen

El poli(3-hidroxibutirato) (PHB) puede emplearse como sustituto de los plásticos convencionales no biodegradables. En un contexto de economía circular, resulta de gran interés el desarrollo de tecnologías fermentativas para producir estos bioplásticos a partir de sustratos como la cascarilla de cacao (CBS). Este trabajo evaluó el efecto de la presencia de un soporte sólido inerte en la producción de PHB utilizando *Bacillus firmus*. Se emplearon hidrolizados de CBS como sustrato para tres fermentaciones diferentes: (i) sin sólidos, (ii) con estropajo de polyester (PSS) y (iii) con polvo de basalto (BP). Los mejores resultados se obtuvieron en las fermentaciones en las que se añadió un soporte sólido, con rendimientos en torno a 36 mg de PHB/g CBS, valor aproximadamente 10 veces mayor que el obtenido sin sólidos. Estos resultados indican que la presencia de sólidos resulta esencial en el metabolismo de los microorganismos para la producción de PHB a partir de CBS.

Palabras clave: bacillus firmus; cascarilla de cacao; hidrólisis; polihidroxibutirato (PHB), soporte sólido.

Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) can be used as substitute of non-biodegradable conventional plastics. In a context of circular economy, it is interesting the development of efficient fermentative technologies to produce these bioplastics from low-cost substrates, such as cocoa bean shell (CBS). The present research evaluates the beneficial effect of the presence of inert solid supports on PHB production by fermentation using *Bacillus firmus*. To this end, filtered CBS hydrolysates were employed as substrates for three different fermentations: (i) without solids, (ii) with polyester scouring sponge (PSS) and (iii) with basalt powder (BP). The best results were obtained when solid supports were added, with similar yields of around 36 mg of PHB/g of CBS in both cases. This value is ten times that obtained without solids. These results highlight the significant role that the presence of solids plays in microorganisms' metabolism, being essential for the production of PHB from CBS.

Keywords: bacillus firmus; cocoa bean shell; hydrolysis; polyhydroxybutyrate (PHB); solid support.

1. Introducción

En la actualidad, la creciente demanda de materiales plásticos en todos los sectores ha provocado un aumento de la contaminación por plásticos, lo que supone un gran reto en la gestión de residuos sólidos (Mishra y Panda, 2023). Se calcula que en 2022 se produjeron más de 400 millones de toneladas de plásticos en todo el mundo, el 40% de las cuales proceden del sector de los envases (OCDE, 2022; Departamento de Búsqueda de Statista, 2024). A nivel mundial, solo el 10% de estos plásticos sintéticos se reciclan, mientras que más del 70% acaban en vertederos o se gestionan de forma inadecuada, lo que provoca graves amenazas medioambientales, concretamente en los ecosistemas acuáticos (Saratale et al., 2021). Además de los problemas medioambientales, las partículas de plástico pueden provocar problemas de salud humana como daños en los tejidos, alergias o afecciones cutáneas cuando se inhalan o ingieren (Arora et al., 2023).

Debido a las preocupaciones medioambientales relacionadas con la producción de plásticos no biodegradables y el agotamiento de los recursos petrolíferos, está aumentando el interés por los polímeros biodegradables de origen microbiano como alternativa sostenible (Briassoulis et al., 2021; Sohn et al., 2020). Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres bacterianos biodegradables y biocompatibles, que pueden acumularse en forma de gránulos intracelulares en respuesta a condiciones de estrés (Li y Wilkins, 2020; Sánchez et al., 2023a). El poli(3-hidroxibutirato) (PHB), el PHA más característico, es un polímero de cadena corta acumulado como reserva de carbono y energía por muchos microorganismos, incluyendo los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Azotobacter* y *Comamonas*, siendo *Bacillus* uno de los principales géneros capaces de producir PHB completamente después de 30 días), hidrofobicidad, biocompatibilidad y propiedades térmicas y mecánicas, el PHB puede ser ampliamente aplicado en la industria de envasado de alimentos y en el sector médico (específicamente en ingeniería de tejidos) (Panda

y Dash, 2023). En los últimos años, no solo se ha estudiado una amplia gama de especies de bacterias implicadas en la producción de PHAs, sino que también se ha abordado el uso de diferentes residuos alimentarios como sustratos en su producción (Sirohi, 2021).

Según el Informe sobre el Índice de Desperdicio de Alimentos, en 2021 se generaron más de 900 millones de toneladas de residuos alimentarios en todo el mundo a lo largo de la cadena de suministro de alimentos, desde la producción hasta el consumo doméstico (Jaouhari et al., 2023). En este sentido, la Comisión Europea, a través del Plan de Acción de Economía Circular, ha adoptado recientemente los Objetivos de Desarrollo Sostenible dirigidos a priorizar la prevención, el reciclaje y la valorización de los residuos, considerando la eliminación de residuos como la opción más negativa (Mariatti et al., 2021). El escalado industrial de la producción de PHB por vía microbiana suele estar limitado por el elevado coste de las fuentes de carbono, que supone en algunos casos el 50% del gasto total de producción (Saratale et al., 2021). Por lo tanto, recientemente, ha habido un creciente interés en la búsqueda de fuentes de carbono novedosas, baratas y fácilmente disponibles. En este contexto, la biomasa lignocelulósica con un tratamiento adecuado podría ser una fuente renovable prometedora para ser empleada como materia prima para la producción de bioplásticos por fermentación. La cáscara del grano de cacao (CBS) es la parte externa que recubre el grano de cacao y es uno de los principales subproductos derivados de la industria chocolatera. Por lo general, la CBS se desecha como residuo o se utiliza en aplicaciones de escaso valor, es decir, como fertilizante o como alimento para animales. Este residuo representa entre el 10-20% del peso total del grano de cacao y está constituido principalmente por carbohidratos, compuestos fenólicos, fibras dietéticas y grasas (Sánchez et al., 2023b). En los últimos años, ha habido una tendencia creciente en el uso de CBS

para obtener productos de valor añadido con aplicaciones potenciales en el sector alimentario, farmacéutico y cosmético, no solo debido a su interesante composición, sino también porque su valorización podría ser económicamente atractiva (Okiyama et al., 2017).

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de soportes inertes (esponja de poliéster y polvo de basalto) sobre la producción de PHB mediante *Bacillus firmus* CECT 14, empleando hidrolizados de CBS como fuente de carbono.

2. Materiales y métodos

Este trabajo es una investigación experimental.

2.1. Materia prima

El CBS, obtenido tras tostar habas de cacao Forastero (Costa de Marfil), fue suministrado por una fábrica local de chocolate situada en Asturias (España).

2.2. Tratamiento de hidrólisis

Con el objetivo de obtener un caldo con un alto contenido en azúcares fermentables y teniendo en cuenta trabajos previos (Sánchez et al., 2023b, 2024), se empleó el siguiente procedimiento. En primer lugar, se molió la materia prima en una batidora (Braun 4041) hasta obtener 1-2 mm de tamaño de partícula. Se introdujo una mezcla del CBS molido y 5% de H₂SO₄ (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (20% p/p) en una botella Pyrex de 1 L y se hidrolizó a 135°C y 2 bar en un autoclave (AES 110, Raypa, España) durante 10 minutos. Una vez autoclavado, los sólidos de mayor tamaño se eliminaron con un tamiz y la fase líquida resultante se filtró con un filtro estéril de celulosa de 20 µm (Whatman™). El sobrenadante recuperado se ajustó a pH 6-7 con NaOH 5M (Merck, Rahway, NJ, EE.UU.) y se colocó en un matraz de fermentación para su inoculación.

2.3. Proceso de fermentación

Antes de la fermentación, se añadieron dos soportes diferentes a los medios de fermentación en condiciones estériles: esponja de poliéster para fregar (PSS) y polvo de basalto (BP) (46,7% de sílice, 12,76% de hierro, 11,28% de calcio, 9,5% de magnesio, 0,4% de fósforo, 0,2% de manganeso, 0,02% de cobre y 0,02% de zinc) (Cultivers, España). Para la preparación de las

piezas de poliéster se siguió el procedimiento descrito en Ruiz et al. (2015). La esponja se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm de lado y se añadió 1 g de estos fragmentos al matraz de fermentación en condiciones estériles. En el caso del polvo de basalto, se añadieron 36 g al caldo de fermentación para que el contenido en sólidos fuera similar al sustrato no centrifugado. La Figura 1 muestra el soporte empleado para el proceso de fermentación. Además, se llevó a cabo una fermentación sin sólidos y sin ningún soporte como control. Todas las fermentaciones se realizaron al menos por duplicado.

Los caldos se inocularon con *Bacillus firmus* CECT 14 suministrado por la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) con una carga microbiana inicial de 6x10³ UFC/mL. Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 6 días a 37°C y 250 rpm y se tomaron muestras de los matraces periódicamente y se centrifugaron (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se midió el pH del sobrenadante y, a continuación, se congeló hasta el análisis del contenido total de carbohidratos y azúcares reductores. El pellet también se congeló hasta la determinación del contenido en PHB. Además, el crecimiento microbiano se siguió tomando 1 g de muestra, que se homogeneizó en un Stomacher (Stomacher 80 Biomaster, Worthing, West Sussex, Reino Unido) con 9 mL de solución estéril de NaCl al 0,7%. Las diluciones seriadas se sembraron por triplicado en medio de agar caldo nutritivo y se incubaron a 30°C durante 24 horas antes del recuento.

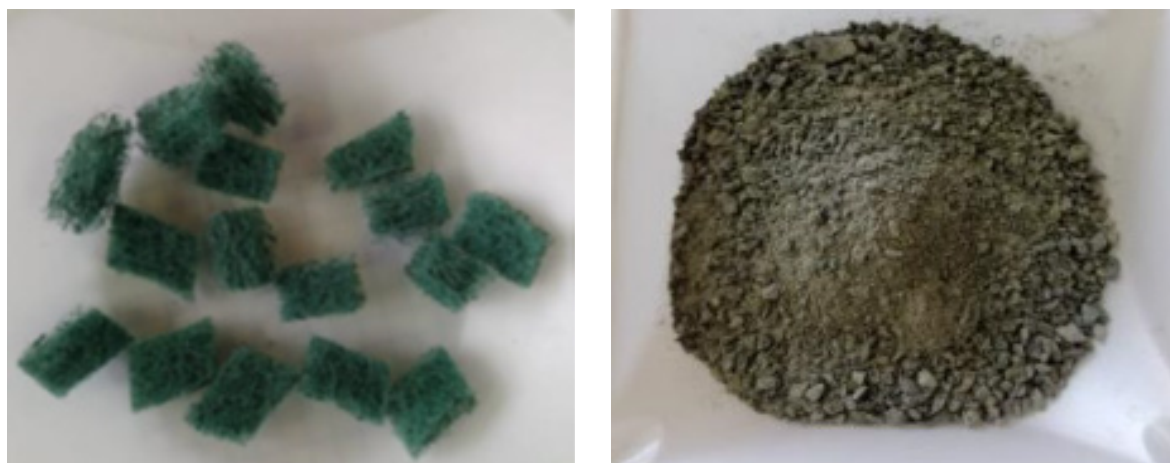


Figure 1: Soportes empleados en el proceso de fermentación: esponja de poliéster (izquierda) y polvo de basalto (derecha).

Fuente: elaboración propia

2.4. Métodos analíticos

Todos los análisis realizaron por triplicado y todos los reactivos fueron suministrados por Merck (Rahway, NJ, EE.UU.).

2.4.1. Carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se cuantificaron utilizando el método del ácido fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) como se describe en Sánchez et al. (2022). Para este ensayo, se mezcló 1 mL de muestra con 2.5 mL de H₂SO₄ al 96% y 0.5 mL de solución de fenol al 5% y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm utilizando un espectrofotómetro (DR/2500 HACH, CO, USA). Se empleó glucosa como patrón.

2.4.2. Azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores totales en las muestras se midió como se informa en Díaz et al. (2017), utilizando una adaptación del método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para el análisis de azúcares reductores, se añadieron 0,5 mL de reactivo DNS a 0,5 mL de muestra y la mezcla se incubó durante 5 minutos en un baño de agua a 95°C. A continuación, las muestras se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo y se midió la absorbancia empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis

GENESYS™ 150, Waltham, MA, EE.UU.) a 540 nm. Se utilizó glucosa como patrón.

2.4.3. Cuantificación de PHB

La extracción y cuantificación del contenido de PHB en las muestras se realizó siguiendo el método de Law y Slepecky (Law y Slepecky, 1960). En primer lugar, el pellet obtenido en la fermentación se digirió con 10 mL de solución de NaClO al 6-14% en un baño de agua a 37°C durante 1 hora. A continuación, la mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 rpm (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y el pellet se lavó sucesivamente con agua destilada, acetona y etanol. El sobrenadante se desechó, y el pellet se mezcló con 10 mL de cloroformo y la mezcla se filtró a través de un filtro de celulosa de 20 µm recuperando el filtrado.

Para la cuantificación del contenido de PHB en las muestras, se mezclaron 100 µL del filtrado con 10 mL de H₂SO₄ al 96% y se incubaron a 95°C en un baño de agua. Después de 10 minutos, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y se midió la absorbancia empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150, Waltham, MA, EE.UU.) a 235 nm. Se utilizó ácido crotonico como patrón.

2.4.4. Extracto seco

Para expresar los resultados en base al peso seco (p/p), se determinó gravimétricamente el contenido de humedad de la CBS. Para ello, se pesaron 3 g de muestra con arena marina en una cápsula de acero inoxidable. La mezcla se secó en un horno durante 24 h a 105°C y, tras enfriarse, se pesó de nuevo. El extracto seco y el contenido de humedad se calcularon considerando la diferencia entre el peso inicial y el final.

2.4.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 9.0; GraphPad Software Inc.). Los resultados se expresaron como valor medio $\pm$ desviación estándar (DE). Para el análisis estadístico se utilizaron análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey calculadas con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados y discusión

Se ha reportado que el pretratamiento de residuos lignocelulósicos es el primer paso para producir polihidroxialcanoatos bacterianos (Andler et al., 2021), en consecuencia, con el objetivo de maximizar la extracción de azúcares fermentables, el CBS fue sometido a un tratamiento hidrotérmico. En particular, el PHB puede producirse utilizando como sustrato diferentes materias primas, incluyendo residuos agroindustriales (Sirohi et al., 2020). Concretamente, el hidrolizado de CBS obtenido tiene una composición adecuada para la producción de PHB por fermentación (azúcares reductores: 28,0 g/L, nitrógeno total: 2,2 g/L y fósforo total: 0,8 g/L) (Sánchez et al., 2023b). Según la literatura, el PHB es producido por microorganismos en condiciones restringidas de nitrógeno y fósforo y en presencia de una fuente de carbono en exceso, por ejemplo, 22-30 g/L de carbono, 0,5 g/L de fósforo y 2 g/L de nitrógeno, valores similares a los del hidrolizado de CBS (Hamdy et al., 2022). Ramos et al., (2023) estudiaron la producción de PHA a partir de cáscara de mazorca de cacao y reportaron una acumulación máxima de PHA en un medio de fermentación con 20 g/L de glucosa. Rebocho et al. (2019) emplearon un hidrolizado de pulpa de manzana con una concentración de azúcares reductores de 25,2 g/L para la obtención de PHAs. Además, Hamdy et al. (2022) evaluaron la producción de PHB por *Bacillus cereus* utilizando diferentes fuentes de nitrógeno y observaron que la mayor concentración de PHB se alcanzó con

2,4 g/L de nitrógeno en el medio inicial. Con respecto al pH, Amulya et al. (2016) obtuvieron la mayor productividad de PHA en condiciones neutras. El pH óptimo para el crecimiento de *Bacillus* se encuentra entre 6,5 y 7, mientras que para valores de pH inferiores a 5,8 se observó una supresión completa del crecimiento de *Bacillus* (Li y Wilkins, 2020). Por estas razones, el pH inicial del medio empleado en este trabajo se ajustó inicialmente a alrededor de 6,8.

A pesar de las aparentes características adecuadas para la producción de PHB del medio líquido obtenido de hidrolizar CBS, se obtuvieron concentraciones muy bajas de PHB sin sólidos (< 1 g/L). Por el contrario, en trabajos anteriores (Sánchez et al., 2023b), se alcanzaron interesantes productividades de PHB cuando el CBS no solubilizado se mantuvo en el medio durante la fermentación. Se ha demostrado que la presencia de sólidos en los medios de fermentación puede favorecer la formación de productos fermentativos debido a que estas partículas proporcionan una superficie sólida para la fijación de los microorganismos, lo que mejora la tasa de crecimiento celular (Sánchez et al., 2023b; Bathgate, 2019).

3.1. Consumo de azúcares

La evolución tanto de los carbohidratos totales como de los azúcares reductores se monitorizó

durante la fermentación y los resultados se muestran en la Figura 2. Como se puede apreciar, en el control el consumo de azúcar fue muy bajo (aproximadamente 5 g/L) en comparación con los resultados obtenidos en los caldos con BP y PSS. Además, el consumo tuvo lugar solo durante las primeras 24 h de fermentación y no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones de azúcar medidas después de 48 h. Sin embargo, cuando se añadió un soporte sólido, la concentración de azúcares se redujo de forma más notable. En ambos casos, con BP y PSS, se observó un rápido consumo de azúcares durante el primer día de fermentación, disminuyendo posteriormente de forma más lenta. Las concentraciones finales de carbohidratos totales y azúcares reductores fueron muy próximas para ambas fermentaciones, lo que significa que, cuando había partículas sólidas en el medio, las enzimas liberadas por *B. firmus* podían hidrolizar los carbohidratos complejos disueltos en azúcares simples. Los carbohidratos totales consumidos en el tiempo final (144 h) fueron 13,8 g/L y 14,6 g/L con BP y PSS, respectivamente (alrededor del 40%).

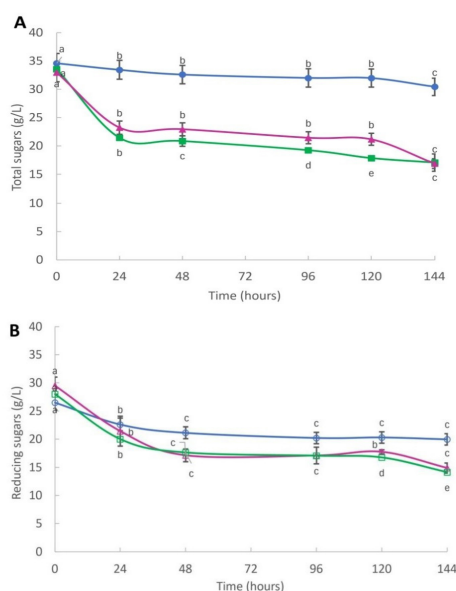


Figura 2: Evolución de (A) carbohidratos totales (rellenos) y (B) azúcares reductores totales (sin rellenar) durante la fermentación para el control (●, ○), BP (■, □) y PSS (▲, △), expresada en g/L. Para cada fermentación, las medias seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

mediante la prueba de Tukey.

Fuente: elaboración propia

Estos resultados están de acuerdo con los reportados en la literatura para la producción de PHB a partir de otros residuos lignocelulósicos. Pereira et al. (2021) estudiaron la producción de PHAs a partir de extractos de pulpa de manzana por medio de *Pseudomonas chlororaphis* y observaron un consumo máximo de azúcares fermentables de 15,2 g/L después de 4 días de fermentación. Además, Andler et al. (2024) evaluaron el uso de hidrolizados de residuos de uva para producir PHB, usando un cultivo en suspensión de *Azotobacter vinelandii*, y reportaron que en el transcurso de la fermentación se consumieron aproximadamente 17 g/L de azúcares reductores. Quintero-Silva et al. (2024) que estudiaron la producción de PHAs utilizando mucílago de cacao como medio de fermentación, reportaron un consumo de 18 g/L de azúcares reductores durante el proceso y una concentración máxima de PHA de 2,3 g/L.

3.2. Crecimiento microbiano

Como puede verse en la Figura 3, se observa una disminución del recuento de UFC en la muestra de control durante las primeras 24 h de fermentación. En la fermentación con BP, la viabilidad aumentó ligeramente durante las primeras 48 h, disminuyendo drásticamente después de este momento. Por el contrario, en el caldo con PSS se produjo un notable crecimiento bacteriano durante las primeras 48 h de fermentación, lo que coincide con el rápido consumo de azúcares comentado anteriormente (Figura 2). Además, es destacable que el consumo de azúcares fue muy similar para ambos caldos BP y PSS, mientras que la concentración bacteriana máxima alcanzada fue muy diferente, a saber, $8,0 \times 10^3$ y $1,2 \times 10^5$ UFC/ml, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la viabilidad microbiana tras 48 h de fermentación en las muestras de control y PSS. Por último cabe destacar que el comportamiento del crecimiento microbiano parece indicar que se liberaron algunos tipos de inhibidores durante el proceso de fermentación, ya que la viabilidad bacteriana empezó a disminuir cuando la concentración de azúcares reductores aún era elevada (Figura 2).

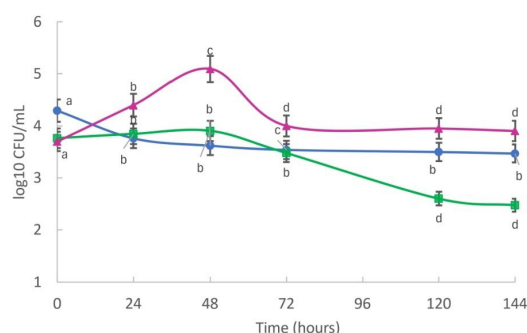


Figura 3: Evolución del crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación. Evolución del crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación: control (●), BP (■) y PSS (▲). Para cada fermentación, las medias seguidas de letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

mediante la prueba de Tukey

Fuente: elaboración propia

Los resultados demuestran que existe una clara relación entre la presencia de un soporte sólido en el medio de fermentación y el crecimiento bacteriano. Se ha informado de que el género *Bacillus* puede producir biopelículas en respuesta al estrés, especialmente en presencia de superficies como plásticos, partículas del suelo y alimentos (Viju et al., 2020). Estas estructuras potencian el metabolismo y favorecen la supervivencia de los microorganismos en condiciones adversas. Zhu et al. (2020) evaluaron el efecto de diferentes parámetros de cultivo, es decir, pH, temperatura y fuente de carbono, en la formación de biopelículas de *Bacillus pumilus*. Observaron una estructura de biopelícula estable en la superficie de un medio sólido (medio de agar LB) e informaron de que se obtenía una biopelícula mayor y más resistente a 37°C y pH 7, utilizando glucosa como fuente de carbono, condiciones similares a las empleadas aquí. Por lo tanto, las diferencias observadas al comparar las fermentaciones con y sin sólidos se deben a la formación de biopelículas bacterianas en la superficie de los sólidos, que protegieron las células y aumentaron la viabilidad de *B. firmus*.

3.3. Producción de PHB

Se ha seguido la producción de PHB por *B. firmus* durante las fermentaciones sin sólidos (control), con BP y con PSS, y los resultados se muestran en la Figura 4.

Como puede apreciarse, se observaron diferencias notables en cuanto a la producción de PHB, dependiendo de si se añadía o no un soporte sólido. Tras 144 h de fermentación sin sólidos (control), se obtuvo una concentración de PHB de solo 0,6 g/L. Estos resultados concuerdan con la pérdida observada en la viabilidad celular por encima de lo comentado (de 104 a 103 UFC/mL), ya que una baja producción de PHB puede estar asociada a una viabilidad celular reducida. Sin embargo, cuando los soportes sólidos estaban presentes en el caldo de fermentación, la bacteria produjo PHB y se alcanzaron concentraciones entre 6 y 7 g/L después de 72 h. Comparando la producción de PHB en fermentaciones realizadas con BP y PSS, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque el crecimiento celular fue mucho mayor en el caso del PSS. En ambos casos, el rendimiento máximo se obtuvo tras 120 h de fermentación con valores en torno a 36 mg PHB/g CBS (peso seco). La mayor tasa de producción de PHB ocurrió simultáneamente al crecimiento exponencial de las células, durante el 1º y 2º día de fermentación, con una productividad media del biopolímero de 0,11 g/L h. Se ha reportado que algunas bacterias del género *Bacillus* presentan una producción de PHB asociada al crecimiento y acumulan el polímero durante la fase exponencial (Yanti et al., 2021).

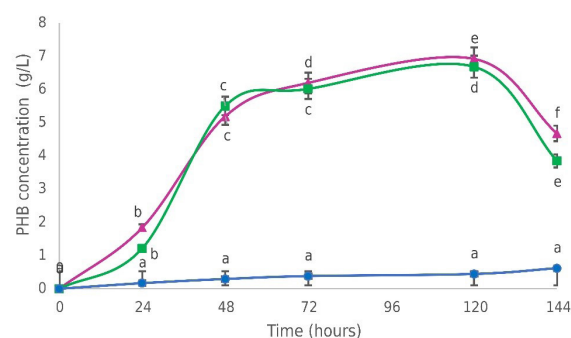


Figura 4: Concentración de PHB durante el proceso de fermentación: control (●, ○), BP (■, □) and PSS (▲, △). Para cada fermentación, las medias seguidas de letras diferentes significan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) por la prueba de Tukey.

Fuente: elaboración propia

Otros autores reportaron producciones similares de PHB utilizando como sustrato otros residuos lignocelulósicos. Amir et al. (2024) estudiaron la adición de diferentes residuos sólidos de alimentos secos y molidos (es decir, cáscara de papa, cáscara de banano, cáscara de maíz y bagazo de yuca) en el medio de fermentación para la producción de PHB empleando *Pseudomonas stutzeri* y reportaron una concentración máxima de PHB de 6,1 g/L después de 5 días de fermentación. Además, Soni et al. (2023) obtuvieron aproximadamente 0,9 g/L de PHB a partir de residuos de cáscara de plátano hidrolizados con un 5% de H₂SO₄ en un medio de fermentación sin soporte sólido, valores muy similares a los obtenidos aquí con el medio sin sólidos. Hassan et al. (2019) evaluaron el uso de diferentes residuos sólidos agroalimentarios (es decir, salvado de maíz, mazorca de maíz, salvado de trigo y salvado de arroz) como suplemento para optimizar la producción de PHB por *Bacillus subtilis* y la concentración máxima alcanzada fue

solo de 0,3 g/L de PHB cuando se empleó arroz como materia prima, casi la misma concentración que la obtenida aquí en el caldo control.

Esta investigación ha demostrado que la disponibilidad de un soporte sólido en el medio de fermentación, en el que los microorganismos pueden formar una biopelícula, mejora no solo el crecimiento y la viabilidad bacteriana, sino también la producción de PHB. Sin embargo, las concentraciones de PHB obtenidas aquí con soportes inertes fueron todavía inferiores a las obtenidas en un trabajo anterior con sólidos CBS (20 g/L de PHB) (Sánchez et al., 2023b). Por tanto, la presencia de sólidos en el medio de fermentación es efectivamente un factor clave en la producción de PHB, pero también su composición y naturaleza son fundamentales ya que pueden actuar como fuente adicional de micronutrientes y/o factores de crecimiento para los microorganismos.

4. Conclusiones

Se ha empleado CBS como materia prima para la producción de PHB, una alternativa sostenible a los plásticos sintéticos, mediante fermentación con *B. firmus*. Se observó una producción muy baja de PHB cuando se emplearon hidrolizados de CBS sin sólidos, con una concentración máxima de PHB de 0,6 g/L. Sin embargo, el uso de soportes inertes (es decir, BP y PSS) incrementó notablemente la producción y se alcanzaron concentraciones de PHB entre 6 y 7 g/L tras 72 horas de fermentación, respectivamente. Esta producción de PHB tuvo lugar en paralelo a un aumento de los recuentos de *B. firmus*. En particular, en la fermentación con PSS la concentración de células viables aumentó notablemente de 6x10³ a 1,2x10⁵ UFC/mL. Por el contrario, en ausencia de sólidos (caldo de control) la viabilidad microbiana disminuyó desde el primer día de fermentación. De acuerdo

con estos resultados, queda clara la necesidad de partículas sólidas para el crecimiento bacteriano y, por tanto, para producir PHB a partir de CBS. Esto se explica por las ventajas derivadas de la formación de una biopelícula en la superficie de los sólidos, que protege a las bacterias de los compuestos inhibidores y de las condiciones adversas.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto el potencial de la CBS para ser empleada como materia prima para la fermentación con el objetivo de obtener productos de valor añadido como los bioplásticos. Como trabajo futuro, se deberán optimizar otras condiciones de fermentación (i.e., inóculo, temperatura, agitación, tiempo, tipo de partículas sólidas, etc.) para considerar el posible escalado del proceso.

5. Agradecimientos

Se agradece a Chocolates Lacasa el suministro de la cáscara de haba de cacao empleada en este trabajo.

6. Referencias bibliográficas

- Amir, M., Rizvi, S. F., Asif, M., Ahmad, A., Alshammari, M. B., Gupta, A., Zaheer, M. R., y Roohi, R. (2024). Polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic characterization from the isolate *Pseudomonas stutzeri* PSB1 synthized using potato peel feedstock to combat solid waste management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 57(Marzo), 103097. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103097>
- Amulya, K., Reddy, M. V., Rohit, M. V., y Mohan, S. V. (2016). Aguas residuales como materia prima renovable para la producción de bioplásticos: Understanding the role of reactor microenvironment and system pH. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4618-4627. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.009>
- Andler, R., González-Arancibia, F., Vilos, C., Sepúlveda-Verdugo, R., Castro, R., Mamani, M., Valdés, C., Arto-Paz, F., Díaz-Barrera, A., y Martínez, I. (2024). Producción de nanopartículas de poli-3-hidroxibutirato (PHB) utilizando residuos de uva como única fuente de carbono. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261(enero). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129649>
- Andler, R., Valdés, C., Urtuvia, V., Andreeßen, C., y Díaz-Barrera, A. (2021). Fruit residues as a sustainable feedstock for the production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Journal of Cleaner Production*, 307(abril). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127236>
- Arora, Y., Sharma, S., y Sharma, V. (2023). Microalgae in Bioplastic Production: A Comprehensive Review. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48, 7225-7241. <https://doi.org/10.1007/s13369-023-07871-0>
- Bathgate, G. N. (2019). La influencia del procesamiento de la malta y el mosto en el carácter del espíritu: los estilos perdidos del whisky de malta escocés. *Journal of the Institute of Brew*, 125, 200-213. <https://doi.org/10.1002/jib.556>
- Briassoulis, D., Tserotas, P., y Athanasoulia, I. (2021). Alternative optimization routes for improving the performance of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) based plastics. *Journal of Cleaner Production*, 318(marzo), 128555. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128555>
- Díaz, A. I., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. (2017). Tratamiento de residuos vegetales de supermercado para su utilización como sustratos alternativos en bioprocesos. *Gestión de Residuos*, 67, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.018>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). A colorimetric method for the determination of sugars. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
- Hamdy, S. M., Danial, A. W., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M., y Hesham, A. E. L. (2022). Production and optimization of bioplastic

- (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology. *BMC Microbiology*, 22(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>
- Hassan, M. A., Bakhiet, E. K., Hussein, H. R., y Ali, S. G. (2019). Estudios de optimización estadística para la producción de polihidroxibutirato (PHB) por el novedoso *Bacillus subtilis* utilizando residuos agrícolas e industriales. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(7), 3497-3512. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1900-y>
- Jaouhari, Y., Travaglia, F., Giovannelli, L., Picco, A., Oz, E., Oz, F., y Bordiga, M. (2023). From Industrial Food Waste to Bioactive Ingredients: A Review on the Sustainable Management and Transformation of Plant-Derived Food Waste. *Foods*, 12. <https://doi.org/10.3390/foods12112183>
- Law, J. H., y Slepecky, R. A. (1960). Ensayo del ácido poli- β -hidroxibutírico. *Journal of Bacteriology*, 82, 33-36.
- Li, M., y Wilkins, M. R. (2020). Avances recientes en la producción de polihidroxialcanoato: Feedstocks, strains and process developments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>
- Mariatti, F., Gunjević, V., Boffa, L., y Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102601>
- Miller, G. L. (1959). Uso del reactivo de ácido dinitrosalicílico para la determinación del azúcar reductor. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mishra, P., y Panda, B. (2023). Polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation by a mangrove isolated cyanobacteria *Limnothrix planktonica* using fruit waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252(abril), 126503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126503>
- Nath, P. C., Sharma, R., Debnath, S., Nayak, P. K., Roy, R., Sharma, M., Inbaraj, B. S., y Sridhar, K. (2024). Recent advances in production of sustainable and biodegradable polymers from agro-food waste: Applications in tissue engineering and regenerative medicines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259(P1), 129129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.129129>
- OCDE. (2022). Perspectivas mundiales de los plásticos: *Policy Scenarios to 2060*. <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., y Rodrigues, C. E. C. (2017). Cáscara de cacao y sus compuestos: Aplicaciones en la industria alimentaria. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Panda, P. K., y Dash, P. (2023). Preparation, Characterization, and Evaluation of Antibacterial Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) (PHBV)-Based Films and Coatings. En *Biopolymer-Based Films and Coatings*.
- Pereira, J. R., Araújo, D., Freitas, P., Marques, A. C., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C., Fortunato, E., Reis, M. A. M., y Freitas, F. (2021). Producción de polihidroxialcanoatos de longitud de cadena media por *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Cultivo en residuos de pulpa de fruta y caracterización del polímero. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.162>
- Quintero-Silva, M. J., Suárez-Rodríguez, S. J., Gamboa-Suárez, M. A., Blanco-Tirado, C., y Combariza, M. Y. (2024). Producción de Polihidroxialcanoatos a partir de Residuos Líquidos de Fruta de Cacao Utilizando una Cepa Nativa de *Bacillus megaterium*: Estudio Preliminar. *Journal of Polymers and the Environment*, 32(3), 1289-1303. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-03018-2>
- Ramos, L. H., Cisneros-Yupanqui, M., Santisteban Soto, D. V., Lante, A., Favaro, L., Casella, S., y Basaglia, M. (2023). Exploitation of Cocoa Pod Residues for the Production of Antioxidants, Polyhydroxyalkanoates, and Ethanol.

- Fermentation*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/fermentation9090843>
- Rebocho, A. T., Pereira, J. R., Freitas, F., Neves, L. A., Alves, V. D., Sevrin, C., Grandfils, C., y Reis, M. A. M. (2019). Producción de polihidroxialcanoatos de longitud de cadena media por *Pseudomonas citronellolis* cultivada en residuos de pulpa de manzana. *Applied Food Biotechnology*, 6(1), 71-82. <https://doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>
- Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., y Matioli, G. (2015). Biosíntesis de succinoglicano por *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 inmovilizado en esponja loofa y cultivado en melaza de caña de azúcar. Caracterización estructural y reológica del biopolímero. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.016>
- Sánchez, M., Bernal, T., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. (2024). Hidrólisis Hidrotérmica de la Cáscara del Grano de Cacao para la Obtención de Compuestos Bioactivos. *Processes*, 12(956).
- Sánchez, M., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. (2022). Hacia la economía circular alimentaria: tratamiento hidrotérmico de residuos vegetales y frutales mezclados para la obtención de azúcares fermentables y compuestos bioactivos. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 3901-3917. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22486-y>
- Sánchez, M., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. (2023a). Cáscara de Grano de Cacao : Un Subproducto con Alto Potencial para Aplicaciones Nutricionales y Biotecnológicas. *Antioxidants*, 12(1028). <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>
- Sánchez, M., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M. (2023b). Cáscara de haba de cacao como materia prima prometedora para la producción de poli(3-hidroxibutirato) (PHB). *Ciencias Aplicadas*, 13(975).
- Saratale, R. G., Cho, S. K., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Bharagava, R. N., Kim, D. S., Nair, S., y Shin, H. S. (2021). Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* sp. and its characterization. *Bioresource Technology*, 324(enero), 124673. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124673>
- Sirohi, R. (2021). Sustainable utilization of food waste: Producción y caracterización de polihidroxibutirato (PHB) a partir de granos de trigo dañados. *Environmental Technology and Innovation*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101715>
- Sirohi, R., Prakash Pandey, J., Kumar Gaur, V., Gnansounou, E., y Sindhu, R. (2020). Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). En *Bioresource Technology* (Vol. 311). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123536>
- Sohn, Y. J., Kim, H. T., Baritugo, K. A., Jo, S. Y., Song, H. M., Park, S. Y., Park, S. K., Pyo, J., Cha, H. G., Kim, H., Na, J. G., Park, C., Choi, J. Il, Joo, J. C., y Park, S. J. (2020). Recent Advances in Sustainable Plastic Upcycling and Biopolymers. *Biotechnology Journal*, 15(6), 1-16. <https://doi.org/10.1002/biot.201900489>
- Soni, S., Chhokar, V., Beniwal, V., Kumar, R., Badgujar, H., Chauhan, R., Dudeja, S., y Kumar, A. (2023). Cost effective media optimization for PHB production by *Bacillus badius* MTCC 13004 using the statistical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233(Noviembre 2022), 123575. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123575>
- Departamento de búsqueda de Statista. (2024, 16 de julio). *Producción mundial de plástico 1950-2022*. <https://www.statista.com/>
- Viju, N., Punitha, S. M. J., y Satheesh, S. (2020). Antibiofilm activity of symbiotic *Bacillus* species associated with marine gastropods. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01554-z>
- Yanti, N. A., Sembiring, L., Margino, S., y Ahmad, S. W. (2021). Bacterial Production of Poly-b-hydroxybutyrate (PHB): Converting Starch

into Bioplastics. En *Bioplastics for Sustainable Development*. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-1823-9>

Zhu, M. L., Wang, Y. H., Dai, Y., Wu, X. Q., y Ye, J. R. (2020). Effects of Different Culture Conditions on the Biofilm Formation of *Bacillus pumilus* HR10. *Current Microbiology*, 77(8), 1405-1411. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01944-1>