

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Obtención de biopolímeros (PHB) a partir
de cascarilla de cacao mediante un proceso
de fermentación empleando *Bacillus firmus*”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

CANDELA CORTIZO ALONSO

JULIO/2022



AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación Tecnología de Bioprocesos y Reactores (TBR), por la acogida recibida y por haber sido compañeros y amigos durante mi estancia en el laboratorio. En especial, gracias a Marta Sánchez por haber estado siempre disponible, proporcionarme todas las explicaciones necesarias con sumo detalle y ayudarme de forma desinteresada en todo momento, GRACIAS.

A mis tutoras, Amanda Laca y Adriana Laca, por incluirme en el laboratorio, permitirme desarrollar este proyecto, transmitirme sus conocimientos y por su comprensión y dedicación.

A María del grupo "LaCasa", por proporcionarme la cascarilla de cacao, punto de partida en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de Máster, que ya son amigos, por amenizar las horas de laboratorio, y por compartir y disfrutar conmigo este año.

A familia y amigos por estar y apoyarme siempre.

Gracias

Índice

Resumen	3
Abstract.....	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Índice de abreviaturas y símbolos	8
1. Introducción.....	9
2. Objetivos.....	10
3. Marco teórico.....	11
3.1. Plásticos y derivados del petróleo: problemática actual	11
3.2. Producción biotecnológica de biopolímeros: PHB	12
3.3. Residuos de la industria agroalimentaria	14
3.4. Gestión de residuos y economía circular	15
3.5. Valorización de residuos vegetales	17
3.6. Materia prima: cacao	18
3.6.1. Características del fruto de cacao	20
3.6.2. Procesamiento del cacao.....	21
3.7. Cascarilla de cacao.....	22
3.7.1. Impacto ambiental y económico.....	23
3.7.2. Alternativas de valorización	23
3.8. La industria del chocolate a nivel internacional y en España	24
4. Material y métodos	26
4.1. Material de partida: cascarilla de cacao	26
4.2. Determinación del extracto seco	26
4.3. Preparación del caldo: hidrólisis ácido-térmica.....	27
4.4. Proceso de fermentación	27
4.5. Medida del pH	28

4.6.	Cuantificación de carbohidratos	29
4.6.1.	Totales: método del Fenol-Sulfúrico	30
4.6.2.	Reductores: método del DNS	31
4.7.	Cuantificación del PHB	33
4.8.	Sólidos suspendidos totales	35
5.	Resultados y discusión	36
5.1.	Características de los materiales iniciales.....	36
5.1.1.	Contenido en humedad de la cascarilla	36
5.1.2.	Características del caldo inicial	36
5.2.	Fermentación del caldo sin sólidos.....	37
5.2.1.	Evolución de los azúcares.....	37
5.2.2.	Evolución del pH.....	39
5.2.3.	Producción de PHB	39
5.3.	Fermentación del caldo con sólidos.....	41
5.3.1.	Evolución de los azúcares.....	41
5.3.2.	Evolución del pH.....	43
5.3.3.	Evolución de los sólidos suspendidos	43
5.3.4.	Producción de PHB	45
6.	Conclusiones.....	48
7.	Bibliografía.....	49

Resumen

Los plásticos derivados del petróleo son un problema actual ya que, tanto su fabricación como la gestión de residuos, impacta de manera negativa en el medio ambiente y, por consiguiente, también en la economía y sociedad. Como consecuencia, y gracias al avance de la biotecnología, están siendo progresivamente sustituidos por materiales de origen renovable con propiedades plásticas y biodegradables, como polihidroxialcanoato (PHA) o polihidroxibutirato (PHB), bioplásticos capaces de sustituir a los plásticos convencionales. Por otro lado, otro inconveniente de los países desarrollados es la gran cantidad de residuos que genera la industria agroalimentaria y que son desechados, suponiendo un riesgo medioambiental y pérdidas económicas; sin embargo, muchos de ellos tienen notables cualidades beneficiosas y podrían ser valorizados para obtener otros productos de interés. En concreto, en la industria transformadora chocolatera la cascarilla de cacao es el principal residuo producido. La posibilidad de emplear estos residuos como materia prima en un proceso biotecnológico permitiría aproximarse a la economía circular, objetivo principal de la UE.

La finalidad de este proyecto fue investigar sobre la posible revalorización de la cascarilla de cacao, utilizándola como sustrato para la fermentación de *Bacillus firmus* para obtener PHB. Con este fin, se realizaron hidrólisis ácido-térmicas con una relación de cascarilla de cacao del 23% p/v, con el fin de obtener caldos ricos en azúcares fermentables. Se llevaron a cabo fermentaciones con caldos con sólidos y sin sólidos, para observar si la presencia de la cascarilla residual influía en el comportamiento de la bacteria y en la producción del polímero. Se tomaron muestras de forma periódica durante 9 días y se analizó la evolución de las concentraciones de carbohidratos totales y reductores, PHB, sólidos suspendidos y pH.

En el caldo sin sólidos apenas se modificó la cantidad de carbohidratos durante la fermentación, y tampoco se observó una producción significativa del polímero. Por el contrario, en el caldo con sólidos se obtuvieron buenos resultados, con mayor consumo de azúcares y alta producción de PHB, alcanzándose en 2 días 80 mg de PHB por cada 100 g de peso seco de cascarilla de cacao añadida. Más investigación sería necesaria para conocer el fundamento del efecto beneficioso que la presencia del sólido de cascarilla ejerce sobre la producción de PHB por el microorganismo.

Figura 24. Evolución en mg/g de cascarilla del PHB en el caldo sin sólidos.	40
Figura 25. Evolución en g/L del PHB del caldo sin sólidos.....	40
Figura 26. Evolución de la concentración en g/L de los azúcares totales y reductores en el caldo con sólidos.	41
Figura 27. Evolución de la concentración en g de azúcar/100g de residuo seco de los azúcares totales y reductores del caldo con sólidos.....	42
Figura 28. Evolución del pH del caldo con sólidos.....	43
Figura 29. Evolución en g/L de los sólidos suspendidos del caldo con sólidos.....	44
Figura 30. Evolución en mg/g de cascarilla de la concentración de PHB en el caldo con sólidos.....	45
Figura 31. Evolución en g/L de la cocentración de PHB del caldo con sólidos.....	45

Abstract

The use of the conventional plastics is a current problem, because of the fact that its production and waste management affect to the environmental, economy and society. Consequently and thanks to the development of biotechnology, those plastics are being replaced by renewable materials with plastic and biodegradable properties, such as polyhydroxyalkanoates (PHA) and polyhydroxybutyrate (PHB). Additionally, other disadvantage of developed countries is the great amount of wastes generated by the agri-food industry which are discarded with the consequent environmental risk and economic losses. However, most of these bio-wastes presents beneficial properties that make possible their valorisation to obtain other interesting products. Specifically, the chocolate industry produces cocoa bean shells as waste. The use of this waste as a raw material in biotechnological processes would make possible to approach the circular economy, a primary objective in the EU.

This project aims to research on the valorisation of cocoa bean shells by employing it as substrate in fermentation processes with *Bacillus firmus* to obtain PHB. With this aim, acid-thermal hydrolyses were carried out with a cocoa bean shells in a proportion of 23% w/v, so that broths rich in fermentable sugars are obtained. Fermentations were carried out with broths with solids and without solids in order to know if the presence of residual shell influences the behavior of the bacteria and therefore the production of the biopolymer. Samples were periodically taken for 9 days and the evolution of the concentrations of total and reducing carbohydrates, PHB, suspended solids and pH were analysed.

When the broth without solids, the amount of carbohydrates hardly changed during fermentation, and no significant polymer production was observed. However, with the broth with solids, good results were obtained, with higher consumption of sugars and high production of PHB, reaching in 2 days 80 mg of PHB for every 100 g of dry weight of cocoa bean shells added. Further research would be necessary to know the basis of the beneficial effect that the presence of the shell solid exerts on the production of PHB by the microorganism.

Índice de figuras

Figura 1. Gestión de residuos plásticos a nivel mundial. Adaptado de (OCDE, 2022).	11
Figura 2. Síntesis metabólica de PHB. (Rivera & Nevárez, 2009).	13
Figura 3. Gráfico de generación de residuos en la industria de la alimentación, bebidas y tabaco. Instituto Nacional de Estadística, 2022).	15
Figura 4. 17 objetivos de la Agenda 2030. (Instituto Nacional de Estadística, 2022).	17
Figura 5. Planta de cacao (Ecología Verde, 2022).	19
Figura 6. Principales países cultivadores de cacao. (Cacao México, 2022).	19
Figura 7. Estructura de la mazorca de cacao. (Soto, 2012).	20
Figura 8. Diagrama de flujo de habas de cacao.	21
Figura 9. Diferentes métodos de tostado del grano de cacao (Beckett, 2019).	22
Figura 10. Top 5 países consumidores de chocolate en Europa (Ekos, 2020).	25
Figura 11. Consumo de chocolate y derivados del cacao por parte de los hogares españoles, expresado en millones de kg, desde 2008 hasta 2020 (Instituto Nacional de Estadística, 2020).	25
Figura 12. Centrífuga Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific.	28
Figura 13. pH-metro Basic 20+.	29
Figura 14. Espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500.	30
Figura 16. Recta patrón de azúcares totales, realizada con el programa Excel.	31
Figura 15. Calibrado de glucosa empleado para realizar la recta patrón. Las diferencias de color se deben a las diferencias en la concentración de glucosa.	31
Figura 17. Recta patrón de azúcares reductores, realizada con el programa Excel.	32
Figura 18. Disoluciones empleadas para realizar la recta patrón de azúcares reductores. Las diferencias de color observadas son debidas a las diferencias en la concentración de glucosa.	32
Figura 19. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150.	34
Figura 20. Calibrado de PHB	34
Figura 21. Evolución en g/L de la concentración de azúcares totales y reductores en el caldo sin sólidos.	38
Figura 22. Evolución en g/100g de residuo seco de la concentración de azúcares totales y reductores del caldo sin sólidos.	38
Figura 23. Evolución del pH del caldo sin sólidos	39

Índice de tablas

Tabla 1. Gestión de residuos aplicada en el modelo de economía circular	16
---	----

Índice de abreviaturas y símbolos

PHA: Polihidroxicanoato

PHB: Polihidroxiacetato

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

FTIR: Infrarrojo Transformado de Fourier

INE: Instituto Nacional de Estadística

ICCO: International Cocoa Organization

DNS: ácido 1,3-dinitrosalicílico

ODS: Objetivos de desarrollo sostenible

ONU: Organización de las Naciones Unidas

1. Introducción

A medida que las sociedades evolucionan se van incrementando sus necesidades, haciendo que las industrias deban adaptarse a los nuevos tiempos (Nigam & Pandey, 2009). Uno de los principales elementos más demandados hoy en día son los plásticos, ya que son muy recurrentes debido a su fácil manejo y producción. A pesar de contar con ciertas ventajas, los plásticos son producidos a partir de petróleo, lo cual hace que sean muy resistentes y no se degraden con facilidad, ocasionando problemas socio-económicos y ambientales; además, a ello se suma un encarecimiento en el precio del petróleo en los últimos años (Segura et al., 2007). Como consecuencia, recientemente se han propuesto diversas alternativas para obtener “bioplásticos”.

Existen dos tipos diferentes de bioplásticos: biopolímeros y plásticos biodegradables. Los biopolímeros, polímeros de base biológica o plásticos biobasados se obtienen a partir de los recursos renovables empleando diferentes vías, siendo una de ellas, la vía microbiana. El problema de utilizar recursos renovables radica en que, en muchas ocasiones, se necesita una fuente de carbono que no es barata (Rivera & Nevárez, 2009). Por otro lado, la producción de residuos por parte del sector agroalimentario es un problema cada vez mayor debido a los impactos ambientales y económicos. Teniendo en cuenta estos dos aspectos, la valorización de los residuos orgánicos empleándolos como fuente de carbono para la producción de polímeros es una alternativa de gran interés.

En concreto, la industria del chocolate, debido a su alcance mundial, produce a nivel global como residuo grandes cantidades de la cascarilla que rodea al grano de cacao (Gutiérrez, 2020). Dicho cascarilla presenta una composición característica que hace que existan diferentes opciones potenciales para valorizarla, tales como la obtención de infusiones, jabones, envases biodegradables (Gaitán, 2021).

2. Objetivos

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el objetivo general de este trabajo ha sido evaluar la posibilidad de valorizar el residuo de cascarilla de cacao mediante su empleo como sustrato en procesos de fermentación para la obtención de biopolímeros. Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el producto obtenido tras la hidrólisis ácido-térmica de la cascarilla de cacao para su uso como sustrato en procesos de fermentación.
- Analizar la producción de PHB por fermentación del medio obtenido tras hidrolizar la cascarilla de cacao empleando *Bacillus firmus*.
- Estudiar el efecto de diversos parámetros sobre el proceso de fermentación con el fin de optimizar la producción de PHB.

3. Marco teórico

3.1. Plásticos y derivados del petróleo: problemática actual

Leo Hendrick Baekeland inventó en 1907 la baquelita, que es considerado el primer plástico sintético. Los plásticos comenzaron a fabricarse de manera masiva en 1950 y desde entonces su producción ha ido en aumento (Nieto & Martínez, 2017). Estos compuestos son tan demandados debido sus características: son fáciles de moldear, impermeables, presentan baja densidad y conductividad eléctrica, son resistentes a la corrosión y a elementos químicos y biológicos, además, y son baratos. Sin embargo, generan residuos que son difíciles de manejar ya que no son degradables y se acumulan en el planeta, ocasionando daños ambientales (Segura et al., 2007).

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la producción de residuos plásticos a nivel mundial se ha duplicado desde el año 2000, y solo se recicla con éxito el 9% de los plásticos producidos (Figura 1). Estos plásticos se obtienen principalmente a partir de petróleo y se utilizan para hacer envases de un solo uso o con una vida útil inferior a 5 años, aunque también se emplean para fabricar bienes de consumo y textiles (Greenpeace, 2022).

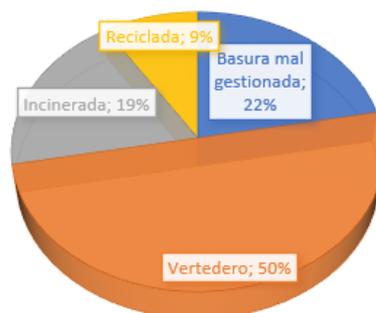


Figura 1. Gestión de residuos plásticos a nivel mundial. Adaptado de (OCDE, 2022).

La elevada cantidad en la que se producen los plásticos, junto con su escaso reciclaje, ha provocado su acumulación en el medio ambiente, lo cual se considera un problema a nivel mundial. Se estima que hay 30 millones de toneladas de residuos en mares y océanos, y 109 millones de toneladas en los ríos (OCDE, 2021). Además, estudios recientes muestran la presencia de microplásticos -residuos plásticos con tamaño inferior a 5 milímetros- de manera ubicua en la naturaleza y en las aguas y son consumidos por los peces, ocasionando daños, muertes y acumulándose en la cadena trófica llegando al ser humano y a las aves. Este problema es de tal magnitud que en el océano Pacífico se ha

triplicado la presencia de estos microplásticos en la última década (Segura et al., 2007). Sumado a todo ello, los plásticos acumulan en su superficie sustancias tóxicas, como bifenilos policlorados, lo que incrementa su potencial dañino. Una alternativa para evitar la acumulación de plásticos residuales es su incineración. Sin embargo, se liberan contaminantes que hacen que esta alternativa no sea la solución a gran escala (Ali, 2016).

La acumulación de estos residuos en el planeta no solo tiene impacto ambiental sobre el medioambiente y la salud humana, también afectan a la economía ya que influyen en sectores como la pesca, la navegación y el turismo (Nieto & Martínez, 2017). Como consecuencia, la Unión Europea ha hecho modificaciones en el uso y comercio de los plásticos con el fin de garantizar la economía circular y el desarrollo sostenible, cumpliendo así con la “Agenda 2030” adoptada por la ONU. Para ello han propuesto eliminar los plásticos de un solo uso, que deberían ser sustituidos por otros reutilizables, adecuados a la naturaleza del producto que contienen. En España esta nueva norma se recoge el Boletín Oficial del Estado (BOE) y entrará en vigor en enero de 2023.

Por tanto, en el contexto actual, la producción de bioplásticos biodegradables empleando como materias primas fuentes renovables es una alternativa de gran interés para afrontar los problemas derivados de la producción de plásticos “convencionales” (Ali, 2016).

3.2. Producción biotecnológica de biopolímeros: PHB

Los biopolímeros son moléculas de elevado peso molecular formadas por la unión de monómeros iguales o diferentes. Son producidos de forma natural a partir de microorganismos, algas, hongos, plantas y animales; pero también se pueden sintetizar a partir de aceites vegetales, azúcares o grasas que son fuentes de monómeros (Molina & Flórez-Castillo, 2020). Son utilizados en diferentes campos como alimentación, electrónica o salud; esto es así ya que reúnen una serie de propiedades de gran interés: son sostenibles, renovables, biodegradables, biocompatibles, compostables, no tóxicos, etc. (Valero et al., 2013).

Una de las muchas aplicaciones que tienen los biopolímeros es la síntesis de plásticos biodegradables, los cuales se pueden fabricar a partir de biopolímeros de origen agrícola, animal (a partir de proteínas, polisacáridos o lípidos) y microbiano (García et al., 2015).

En concreto, el polihidroxialcanoato (PHA) es un polímero biodegradable de origen microbiano, sintetizado por bacterias en condiciones de estrés y almacenado en cuerpos de inclusión, llegando a suponer el 90% del peso seco celular (Almeida et al., 2004). Este biopolímero ha ganado importancia en la industria al considerarse un sustituto de los plásticos por sus propiedades termoplásticas, biodegradabilidad, y su capacidad de ser producidos utilizando fuentes de carbono renovables.

A pesar de sus ventajas, la producción de plásticos derivados del petróleo siguió siendo -hasta ahora- la opción principal, ya que la fabricación de los bioplásticos es muy cara debido a que la fuente de carbono necesaria para sintetizarlos supone el 50% de los costes de la producción, lo que encarece el precio (Sindhu et al., 2013). Sin embargo, en los últimos años el coste del petróleo ha ido en aumento, así como el impacto medioambiental derivado de la producción de plásticos “convencionales”, por lo que se está incrementando el interés por los bioplásticos producidos con PHA (Almeida et al., 2004).

Dentro de los PHA, el polihidroxibutirato (PHB) es el más conocido y estudiado. Fue descubierto por Lemoigne en 1925 en el interior de *Bacillus megaterium* (Almeida et al., 2004), y en 1950 se descubrió que estos microorganismos utilizaban el polímero como reserva de energía cuando se encontraban en condiciones de estrés. El PHB es un bioplástico biodegradable sintetizado a partir de carbohidratos -glucosa, fructosa o sacarosa- procedentes fuentes renovables (Figura 2) (López, 2011).

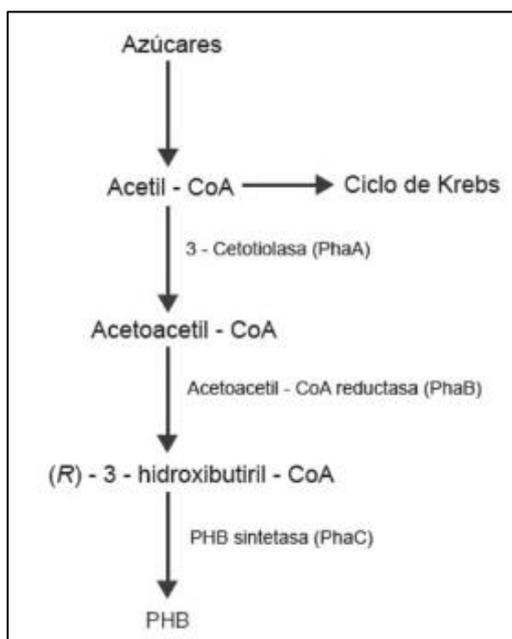


Figura 2. Síntesis metabólica de PHB. (Rivera & Nevárez, 2009).

Debido a sus propiedades físicas, el PHB suele compararse con el propileno, ya que ambos tienen características similares -puntos de fusión y grados de alcalinidad equivalentes- (Sindhu et al., 2013).

Recientemente se han llevado a cabo diferentes estudios para obtener PHB. Entre ellos, se ha tratado de producir PHB en plantas de cultivo utilizando la luz solar como fuente de energía, pero el metabolismo de estos seres vivos no facilita el proceso.

Se ha optado, además, por la producción de este biopolímero mediante la fermentación de microorganismos sometidos a situaciones de estrés (Rivera & Nevárez, 2009). Para ello se emplean bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* o *Cupriavidus*, entre otros (Palazzo & Eisenberg, 2014). El método tiene como fundamento que cuando estos microorganismos se encuentran en un medio limitante producen PHB para utilizarlo como sustancia de reserva energética, este PHB posteriormente se puede extraer. Este proceso de producción cuenta con una serie de limitaciones (Astudillo & Olmedo, 2021):

- Dificultad a la hora de lisar las células para extraer el polímero.
- Es necesaria una elevada densidad celular para obtener una cantidad adecuada.
- El proceso de fermentación para alcanzar una densidad óptima de PHB es largo.

Además, como se ha comentado anteriormente, las bacterias necesitan una fuente de carbono la cual no es barata y encarece el método. Sin embargo, esta limitación puede solventarse utilizando como sustrato sustancias de deshecho o residuos procedentes de otras industrias (Rivera & Nevárez, 2009). Por ejemplo, se ha tratado de obtener PHB a partir del almidón de cáscaras de plátano usando *Alcaligenes latus* (Bello, 2021). Con esta alternativa no solo se abarata la fuente de carbono, sino que además se da una segunda vida a los residuos producidos.

3.3. Residuos de la industria agroalimentaria

A medida que crece la sociedad se incrementan sus necesidades haciendo que el sector agroalimentario deba ir transformándose aumentando la complejidad de sus procesos, lo que conlleva también a un incremento en la generación de residuos. Estos residuos son obtenidos tras procesar alimentos como cereales, verduras o frutas (Nigam & Pandey, 2009). Actualmente a la hora de valorar las industrias se tiene en cuenta, entre otras cosas,

su relación con el medioambiente, por lo que es fundamental el control de la producción de residuos (Cury et al., 2017).

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2018 en industria se produjeron 40.588.192 toneladas de residuos en total, siendo el sector agroalimentario uno de los que más desechos genera (Figura 3). Aunque entre 2016 y 2018 se redujo ligeramente la producción de residuos en la industria de la alimentación, bebidas y tabaco; aún sigue siendo muy elevada. En este caso, los principales desechos generados son restos animales y productos alimenticios mezclados, así como residuos vegetales.



Figura 3. Gráfico de generación de residuos en la industria de la alimentación, bebidas y tabaco. Instituto Nacional de Estadística, 2022).

■ -> Residuos animales y productos alimenticios mezclados. ■ -> Residuos vegetales ■ -> Total de residuos producidos en la industria de la alimentación, bebidas y tabaco.

Esta elevada producción de residuos hace que sea necesaria una correcta gestión de los mismos.

3.4. Gestión de residuos y economía circular

Debido a las cantidades masivas de residuos generados es necesario la implantación de leyes y normas, a nivel estatal y europeo, que determinen cómo gestionarlos para evitar el impacto ambiental y económico que pueden ocasionar y garantizar el desarrollo sostenible, de forma que las actividades actuales no comprometan a las sociedades futuras. La gestión de residuos dicta todos los pasos que se deben seguir a la hora de tratar los desechos, desde su recogida hasta su eliminación, reutilización o valorización; incluyendo las fases de almacenamiento y transporte (Ferrando & Granero, 2012).

En España es el Ministerio Para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico el que establece las normativas que indican cómo deben gestionarse los diferentes residuos generados, incluyendo la forma de recogerlos y separarlos.

En 2015 la Unión Europea propuso, para gestionar los residuos, el **modelo economía circular**, que es un modelo de producción y consumo que trata de alargar lo máximo posible la vida útil de productos y materiales a través del reciclaje, renovación o reutilización. Con ello se consigue, entre otras cosas (Cerdá & Aygun, 2015):

- Reducir el consumo de recursos naturales.
- Sustituir recursos no renovables por otros renovables.
- Disminuir la producción de residuos y evitar su acumulación.

Respecto a los residuos, este modelo aplica las conocidas “3 R” (Ghisellini et al., 2016): Reducir, reutilizar y reciclar (Tabla 1).

Tabla 1. Gestión de residuos aplicada en el modelo de economía circular

REDUCIR	Modificar la producción para disminuir la producción de residuos
REUTILIZAR	Volver a utilizar los residuos para la misma actividad en la que fueron producidos o para otra diferente.
RECICLAR	Valorización: consiste en la transformación de residuos para obtener nuevos materiales que puedan ser utilizados de nuevo.

El Ministerio de Transportes, Movilidad y Agenda Urbana recoge la Agenda 2030, aprobada en 2015 en la Cumbre de Desarrollo Sostenible, la cual incluye 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (Figura 4) que debían empezar a aplicarse en 2016 por parte de los países que forman la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para lograr que en 2030 el planeta sea sostenible. Estos objetivos no son obligatorios de forma jurídica, pero se espera que los gobiernos los apliquen siempre que sea posible (Agenda 2030, 2015).

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE



Figura 4. 17 objetivos de la Agenda 2030. (Instituto Nacional de Estadística, 2022).

Para cumplir con los ODS 7, 11, 12, 13 y 14 es necesario controlar la producción de plásticos, más aún desde la pandemia por Covid-19 donde se incrementó la utilización de materiales plásticos de 1 solo uso (mascarillas, guantes...) con el fin de disminuir el contagio. Esta producción se puede controlar aplicando el modelo de Economía Circular descrito anteriormente (“Los Plásticos Son Clave Para Alcanzar Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de Las Naciones Unidas Del Eje Medioambiental.,” 2021).

3.5. Valorización de residuos vegetales

La valorización de residuos es una de las alternativas más recurrentes a la hora de tratar los desechos. Con ella no solo se reduce el impacto ambiental asociado a la gestión de dichos residuos, sino que también se obtienen beneficios económicos.

Algunas industrias, como la forestal o alimentaria, producen residuos con alto contenido en lignocelulosa que, además de afectar al medio ambiente, suponen pérdidas económicas ya que por sus propiedades pueden ser valorizados para obtener otros productos de interés.

Una de las alternativas de reciclaje propuestas para valorizar estos residuos de naturaleza orgánica es el compostaje. El compostaje consiste en llevar a cabo una biodegradación en aerobiosis, con temperatura y humedad controladas, para obtener compost como producto

final, el cual se puede utilizar como enmienda orgánica de suelos (Negro et al., 2000). También se puede llevar a cabo una digestión anaerobia, proceso en el que se obtiene una mezcla de gases denominada biogás (constituido fundamentalmente por dióxido de carbono y metano), y residuo sólido (digestato). Este tipo de degradación se aplica sobre biomasa residual con altos niveles de humedad, tales como restos de hojas, comida, o lodos de plantas depuradoras. El biogás obtenido puede emplearse como fuente de calor para la calefacción, como fuente de energía para la luz, o como combustible de motores unidos a generadores eléctricos (Lorenzo & Obaya, 2005).

Otra opción para la gestión de residuos orgánicos consiste en realizar una fermentación en biorreactores utilizando diversos tipos de bacterias con el fin de obtener enzimas y otros metabolitos que pueden ser utilizados en otras actividades. Aunque esta es una alternativa menos frecuente que el compostaje y la digestión anaerobia, es una de las mejores opciones en los procesos de valorización (Grijalva, 2013). Se ha realizado este tipo de fermentaciones para valorizar diferentes tipos de residuos agroalimentarios. Por ejemplo, se han empleado para obtener enzimas pectinolíticas a partir de salvado de trigo, bagazo de manzana o de caña de azúcar; estas enzimas se usan, sobre todo, en la industria del vino (Martín & Morata, 2021). También se han utilizado para valorizar residuos resultantes de la industria del café, como la pulpa del café, con el fin de obtener enzimas como las lacasas, usadas en la industria de bebidas (Giraldo, 2020). Estas fermentaciones, además, se realizan para valorizar el suero láctico con el fin de obtener ácido lactobiónico, el cual se utiliza como potenciador de sabor, prebiótico o antioxidante (Riestra, 2019).

En los últimos años se han comenzado a utilizar estos residuos para producir biopolímeros. Aunque esta actividad solo supone un 1% de los procesos de valorización, poco a poco está incrementándose (Angamarca & Delgado, 2022; Rivera & Nevárez, 2009).

3.6. Materia prima: cacao

El cacao es una planta original de la zona tropical de América, de hoja perenne con una altura de 6 metros, hojas de hasta 30 cm y flores de color rosa a lo largo del tronco y en algunas ramas, de las cuales una minoría forma las semillas conocidas como habas de cacao (Figura 5). Estas habas son utilizadas para elaborar los productos de cacao y derivados (Quintero & Morales, 2004; Solorzano, 2017).



Figura 5. Planta de cacao (Ecología Verde, 2022).

Aztecas y mayas fueron los pioneros en utilizar las habas de cacao, las usaban para producir una bebida de chocolate y como moneda en el comercio. Hasta el siglo XVI solo era utilizado en México y América Central pero, tras la colonización, el cacao fue introducido en Europa y en 1520 llegó a España (Monserrat, 2020).

Actualmente es cultivado en América Central y del Sur, Oeste de África, y Asia; siendo Malasia, Ecuador, Nigeria, Camerún, Brasil, Ghana, Indonesia y Costa de Marfil los principales productores (90% de la producción mundial) (Figura 6) (Morales et al., 2012).



Figura 6. Principales países cultivadores de cacao. (Cacao México, 2022).

3.6.1. Características del fruto de cacao

La mazorca, nombre con el que se conoce al fruto de cacao, suele tener unos 15-30 cm de largo y 7-10 cm de ancho, con una morfología puntiaguda (Figura 7). Está compuesta por una cáscara externa, que supone un 50-76 % del total del fruto. Dentro de la cáscara se encuentra una pulpa viscosa que da lugar a la cascarilla, la cual rodea las semillas de cacao. Cada mazorca contiene unas 30-40 semillas o habas (Arias, 2017; Baena & García, 2012).

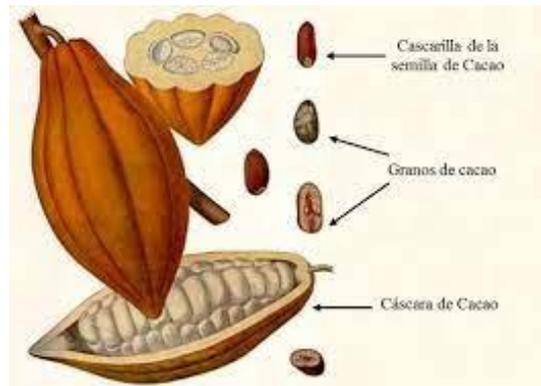


Figura 7. Estructura de la mazorca de cacao. (Soto, 2012).

Existen diferentes tipos de cacao, de los cuales las variedades más comunes son: criollo, trinitario y forastero. El cacao criollo suele ser un árbol de pequeño tamaño cuyos frutos tienen una cáscara lisa. El cacao forastero representa el 80% de la producción de cacao a nivel mundial; sus frutos son más duros y con cáscara rugosa. El trinitario, por su parte, resulta del cruce de los dos anteriores, dando como resultado mazorcas de diversos colores y formas (Arias, 2017; Baena & García, 2012).

La parte del fruto que se utiliza es la semilla y tanto la cáscara como la cascarilla son residuos, pero debido a sus propiedades pueden ser aprovechados para otras actividades. Por ejemplo la cascarilla, que supone un 12% del peso del haba y es el mayor subproducto de la industria del cacao, tiene propiedades antioxidantes y se puede utilizar para hacer infusiones (Sangronis et al., 2014).

La cáscara se suele utilizar como fertilizante de cultivos de cacao, aunque puede ser un vector de enfermedades y ocasionar grandes pérdidas. Por ello, una alternativa es utilizarla como fuente de energía renovable, fuente de lipasas o como fuente de pectina la cual se extrae empleando ácidos fuertes (Mendoza et al., 2017).

3.6.2. Procesamiento del cacao

Las semillas de cacao deben ser extraídas para ser utilizadas en industria para fabricar el cacao comercial. Para ello, es necesario que la industria alimentaria lleve a cabo diferentes etapas para procesar las habas de cacao (Figura 8). En primer lugar, el productor es el encargado de cultivar el fruto y limpiarlo, quitándole la cáscara y extrayendo la pulpa para obtener la semilla de cacao. La limpieza del grano es una de las etapas más importantes, debe realizarse de forma eficaz para garantizar el rendimiento y calidad de las siguientes etapas (Soto, 2012). En este paso se genera el primer residuo: la cáscara externa.

A continuación, las semillas de cacao son transportadas hasta la industria. Allí se eliminan las habas que no son consideradas de calidad, y el resto siguen los pasos mostrados en el diagrama de flujo de cacao. Deben secarse y pesarse para comprobar que cumplen con los parámetros de calidad. Posteriormente son sometidas a una segunda limpieza, y a continuación se lleva a cabo el tostado que permite separar el grano de cacao de la cascarilla, generando así un segundo residuo. Finalmente, el grano se deja enfriar y es sometido a otras etapas en base al producto que se quiera obtener: chocolate o derivados del cacao (como cacao en polvo o manteca de cacao).

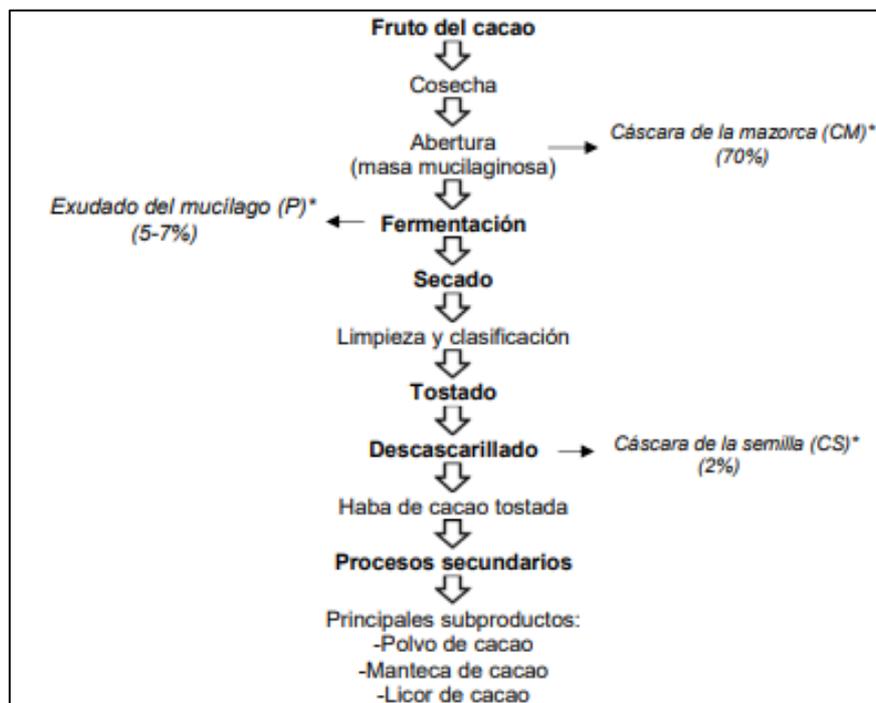


Figura 8. Diagrama de flujo de habas de cacao. Con* se indican los residuos generados. (Gutiérrez, 2020).

Estas etapas son las llevadas a cabo para tostar el grano completo. Sin embargo, en ocasiones se puede optar por un pretratamiento térmico tras la limpieza (Figura 9), el cual consiste en someter las semillas a una fuente de calor elevado durante un tiempo corto para que no influya en el sabor o calidad del haba (Beckett, 2019). Independientemente del método de tostado elegido, tras este proceso se lleva a cabo el descascarillado ya que con el calor la cascarilla se separa del grano, generando así el segundo residuo resultante del procesamiento del haba (Soto, 2012).

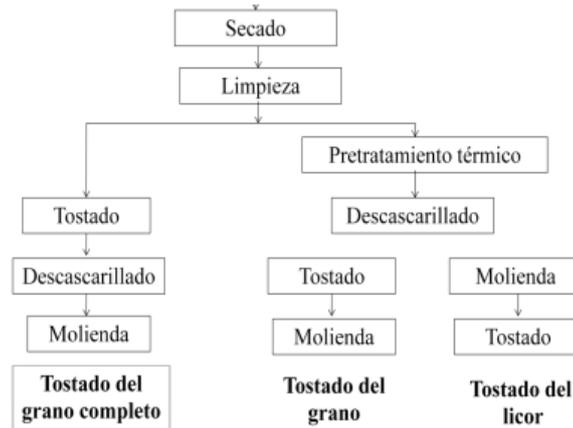


Figura 9. Diferentes métodos de tostado del grano de cacao (Beckett, 2019).

Por tanto, la industria alimentaria solo utiliza el haba de cacao que supone el 12% del total del fruto; y el 82% restante (cáscara externa, exudado de la pulpa y cascarilla) constituyen los residuos (Llerena et al., 2019). Recientemente se está tratando de dar uso a estos desechos generados para intentar valorizarlos; por ejemplo, la cáscara externa suele utilizarse para alimentación animal (L. K. Arias, 2017). Sin embargo, estos residuos cuentan con numerosas propiedades que son desaprovechadas, como propiedades antioxidantes debido a su elevado contenido en polifenoles (Baena, 2021).

3.7. Cascarilla de cacao

Según la International Cocoa Organization (ICCO), en la cosecha 2020/2021 se procesaron 4.69 millones de toneladas de semillas de cacao, un 0.5% más que en la campaña del año anterior; por lo que la producción de residuos también se ha incrementado.

La cascarilla de cacao es el residuo principal obtenido tras el procesamiento del grano. Contiene tanto macronutrientes como micronutrientes, por lo que puede valorizarse y

obtener productos secundarios con ciertas propiedades beneficiosas. Por ejemplo, contiene propiedades antioxidantes que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares o degenerativas (Llerena et al., 2019). Sin embargo, es de destacar que la composición es variable ya que depende de factores como el origen y variedad de cacao o las condiciones en las que se procesa (Diomande et al., 2015). Aun así, se sabe que la cascarilla está formada en un 17.8-23.2% por carbohidratos (principalmente glucosa, aunque también galactosa o manosa), aunque algunos estudios establecen que pueden llegar a suponer el 70%; seguidos de proteínas (6.3-20.9%) y grasas (1-2%) (Rojo-Poveda et al., 2019). Subrayar que a pesar de que el porcentaje de proteínas no es muy elevado, este residuo contiene todos los aminoácidos esenciales necesarios y son fácilmente extraíbles por métodos alcalinos, dato a tener en cuenta a la hora de proponer estrategias de valorización (Gutiérrez, 2020).

3.7.1. Impacto ambiental y económico

La falta de estrategias sostenibles la hora de gestionar este residuo ha hecho que se pueda afectar negativamente tanto a la industria como al medioambiente. Esto es así porque la cascarilla es un vector de plagas, además si no es gestionado adecuadamente puede contaminar aguas y suelos. Además, afecta negativamente al crecimiento de nuevas plantas de cacao produciendo grandes pérdidas en los cultivos, provocando por consiguiente pérdidas económicas (Gutiérrez, 2020).

Para solventar estos problemas una de las alternativas que se ha propuesto es llevar a cabo su valorización mediante diversos procesos.

3.7.2. Alternativas de valorización

La cascarilla contiene compuestos como pectina, antioxidantes, vitaminas o ácidos grasos oleico y linoleico. Todo ello hace que tenga potenciales propiedades antimicrobianas, cardioprotectoras o anticancerígenas (Gutiérrez, 2020). Debido a esto, este residuo ha sido utilizado con fines nutricionales y medicinales desarrollando infusiones, tés y galletas.

Además, ha observado que la cascarilla contiene nanofibras, las cuales pueden ser empleadas para estabilizar aceites u otros productos o como fuente de fibra dietética (Baena, 2021). Con estas aplicaciones no solo se incrementa el olor o sabor, sino que

además se influye positivamente sobre la vida útil del alimento. Al tener funciones estabilizantes no solo se ha utilizado en alimentación, también se ha empleado para fabricar jabones y exfoliantes de cacao (Valbuena & Serrano, 2018).

A parte de sus aplicaciones con fines nutricionales, recientemente se ha comenzado a estudiar este residuo como posible fuente para fabricar envases biodegradables. Esta idea ha surgido debido al incremento del precio del petróleo y al impacto ambiental de los plásticos convencionales (Gaitán, 2021). También se ha empleado para fabricar bloques aislantes de hormigón (Valbuena & Serrano, 2018).

3.8. La industria del chocolate a nivel internacional y en España

El chocolate es elaborado a partir del grano de cacao y es consumido de forma masiva en todo el mundo, independientemente de factores como la edad o cultura. Al principio era una bebida, no fue hasta 1847 cuando se comenzó a ingerir en estado sólido. Unos años más tarde, en 1876, se creó la primera tableta de chocolate con azúcar en Suiza (Jaramillo et al., 2001). Se considera fue principios del siglo XIX cuando se desarrolló la industria de este producto gracias al crecimiento de sus plantaciones y a la industrialización. (*Pequeña Historia Industrial: Origen Del Chocolate*, 2022).

En Europa se procesa el 40% del cacao, el 23% en Asia, el 22% en América del Sur y el 15% en África. De modo que únicamente el 40% del cacao que se consume a nivel internacional es procesado en el mismo país donde se cultiva. Hoy en día son principalmente cinco las multinacionales que llevan a cabo el procesamiento del cacao (procesan el 60% del cacao mundial): Nestlé, Hershey, Mars, Mondelez-Kraft y Ferrero (Vargas et al., 2021). Actualmente en Europa se encuentran los países que más chocolate consumen, siendo los principales (Figura 10): Suiza, Austria, Alemania, Reino Unido y Suecia. Estos se encuentran seguidos de países pertenecientes a otros continentes, tales como Estados Unidos, Japón o China (“Ranking de Países Con Mayor Consumo de Chocolate,” 2020).

Consumo de chocolate per cápita		
Posición	País	Kilogramos anuales
1.	Suiza	9,9
2.	Austria	8,1
3.	Alemania	7,9
4.	Reino Unido	7,6
5.	Suecia	6,6

Figura 10. Top 5 países consumidores de chocolate en Europa (Ekos, 2020).

En el caso de España, según el informe publicado por la Asociación Española de Dulce, en 2020 en el sector del dulce la principal categoría es la del chocolate y cacao que supone un 27.6%, incrementándose su consumo respecto a 2019 (*Informe Anual Produlce*, 2020). Este crecimiento puede achacarse al confinamiento, ya que España fue la líder en el crecimiento de chocolate en el continente europeo durante la cuarentena por el Covid-19 (Figura 11).

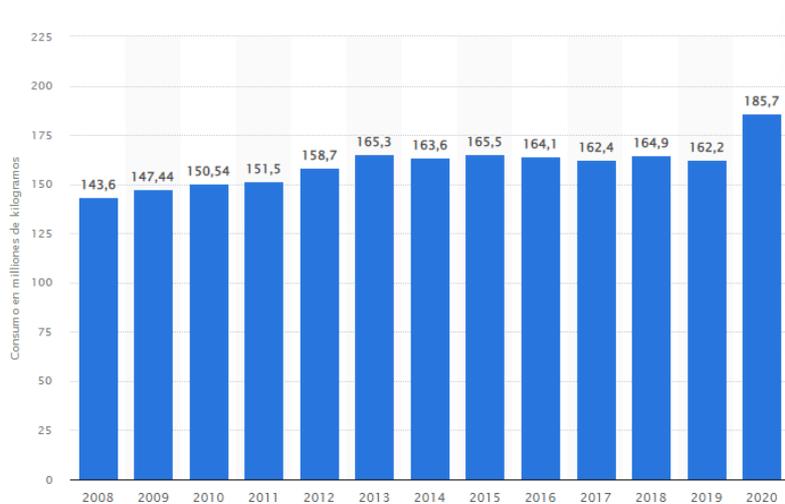


Figura 11. Consumo de chocolate y derivados del cacao por parte de los hogares españoles, expresado en millones de kg, desde 2008 hasta 2020 (Instituto Nacional de Estadística, 2020).

4. Material y métodos

4.1. Material de partida: cascarilla de cacao

Para proyecto de investigación se ha utilizado como material de partida la cascarilla de cacao, residuo generado por la industria del chocolate. Dicha cascarilla ha sido suministrada por Chocolates del Norte S.A., fábrica perteneciente al grupo LACASA situada en Siero, Asturias.

A partir de este material se han realizado diferentes ensayos, todos ellos llevados a cabo por triplicado. A continuación, se detallan los materiales, métodos y análisis empleados en este trabajo.

4.2. Determinación del extracto seco

Los resultados obtenidos se expresan por peso de cascarilla seca, para lo cual es necesario determinar el porcentaje de humedad del residuo empleando el procedimiento descrito a continuación. Se añadieron 20g de arena de mar lavada (Panreac) a 2 cápsulas de acero inoxidable. Se introdujeron las cápsulas en una estufa (Gallenkamp Hotbox Oven) a 100°C durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Posteriormente se sacaron las cápsulas y se dejaron enfriar en un desecador. Seguidamente se pesaron en una balanza analítica (Adventurer Analytical Electronic Balance, AX224 – OHAUS), obteniendo así un valor denominado M_0 .

A continuación, se pesaron 3-5g de cascarilla de cacao, se introdujeron en la cápsula con arena y se trituró con ayuda del mortero; se pesó todo el contenido (cápsula, mortero, arena y cascarilla) obteniendo así el valor M_1 . Posteriormente se introdujeron las cápsulas en la estufa a 100°C durante 12-48h. Pasado ese tiempo, se sacaron y se dejaron enfriar en el desecador. Una vez frías se pesaron nuevamente obteniendo así el extracto seco total, valor M_2 .

A partir de M_0 , M_1 y M_2 se obtuvo el porcentaje de humedad de la cascarilla de cacao aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

A partir del valor de humedad se obtiene el porcentaje de residuo seco de la cascarilla:

$$\% \text{ de residuo seco} = 100 - \% \text{ de humedad}$$

4.3. Preparación del caldo: hidrólisis ácido-térmica

Para la hidrólisis se emplearon botellas de Pyrex de 1 litro y a cada botella se añadieron 60g de cascarilla de cacao molida y 240 ml de H₂SO₄ al 5% (Supelco). A continuación, se realizó una hidrólisis la ácido-térmica introduciendo las botellas en el autoclave a 135°C y 2 atm durante 10 minutos. La hidrólisis es necesaria para extraer los carbohidratos de la cascarilla de cacao, se realizó de tipo ácido-térmico ya que se ha comprobado que se obtienen resultados óptimos (Borrallo, 2019). Además, la hidrólisis ayuda a la conversión de los carbohidratos en azúcares reductores, que son fermentables y pueden ser consumidos por los microorganismos (Gómez et al., 2013).

Tras dejar enfriar las botellas se obtuvieron dos tipos de caldo para llevar a cabo las fermentaciones. Los caldos se prepararon en condiciones estériles, tal y como se describe a continuación:

- Caldo con sólidos: se pasó el contenido de cada una de ellas a un vaso de precipitados y se ajustó el pH entre 6 y 7, utilizando NaOH 10M (Merk). A continuación, se introdujo en un matraz para su posterior inoculación.
- Caldo sin sólidos: para conseguir un caldo sin cascarilla de cacao es necesario filtrar el contenido de las botellas con ayuda de un colador. A continuación, se recuperó el líquido y se ajustó el pH de igual forma que en el caso anterior. De nuevo, el contenido líquido se introdujo en un matraz, para su posterior inoculación.

4.4. Proceso de fermentación

La bacteria empleada en las fermentaciones es *Bacillus firmus* CECT 14 suministrada en forma de liofilo por la Colección Española de Cultivos Tipo.

Se utilizó medio Nutrient Broth para preparar el preinóculo, elaborándolo como sigue: se mezclan 2g de peptona (Sigma-Aldrich), 1g de NaCl (VWR), 1g de extracto de carne (Biokar diagnostics) y 250 ml de agua destilada, y se distribuye en matraces de 250 ml (50 ml/matraz) que se autoclavan durante 20 min a 121 °C. Una vez que el medio se ha enfriado, se inoculan 1 ó 2 colonias a partir de una placa Petri en cada uno de los matraces, y se agita para su homogeneización.

Finalmente se dejan los matraces en un incubador (New Brunswick G-25 Incubator Shaker) durante 24h a 37°C y 250 r.p.m. para que crezca el microorganismo.

Una vez pasado ese tiempo se añaden, tanto a los matraces sin sólidos como a los que contienen sólidos, 600 microlitros de preinóculo, y se dejan agitando en las mismas condiciones: 37°C y 250 r.p.m.

Para hacer un seguimiento del proceso se tomaron muestras cada 24-48 horas, según el caso, las cuales se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 min (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series) (Figura 12) y se separó el pellet del contenido líquido. El pellet se utiliza para medir el PHB y los sólidos totales suspendidos, y el sobrenadante, para hacer un seguimiento de los carbohidratos totales y reductores. Las muestras se congelaron hasta el momento del análisis, excepto el pH que se midió en el sobrenadante antes de su congelación.



Figura 12. Centrifuga Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific.

4.5. Medida del pH

El pH es un parámetro que sirve para controlar el proceso de fermentación, por lo que se midió el sobrenadante de todas las muestras extraídas para comprobar que dicho proceso se estaba produciendo con normalidad. Para ello se utilizó un pH-metro Basic 20+ (Figura 13).



Figura 13. pH-metro Basic 20+.

4.6. Cuantificación de carbohidratos

Se cuantificaron los carbohidratos totales y reductores utilizando métodos espectrofotométricos. Se empleó el método analítico del Fenol-Sulfúrico para cuantificar los azúcares totales; y el método del reactivo DNS para los azúcares reductores (Díaz et al., 2017). Interesa conocer el contenido en carbohidratos reductores debido a que, como se ha comentado antes, pueden atravesar la pared celular, son considerados carbohidratos fermentables y pueden ser utilizados por los microorganismos.

La cantidad de azúcares se expresan de dos formas diferentes:

- Gramos de azúcares por litro de caldo:

$$\text{g azúcares/litro} = \frac{\text{Absorbancia} \times F}{\frac{m}{1000}}$$

Siendo:

- Absorbancia: obtenida tras medir cada muestra.
- m: valor de la recta de calibrado, en la cual en el eje X se representa la absorbancia y en el eje Y la concentración de glucosa en ppm.
- F: factor de dilución empleado en cada muestra.

- Gramos de azúcares en 100 gramos de residuo seco:

$$\text{g de azúcar/100g de residuo seco} = \frac{\text{Absorbancia}}{r \times F} \times \frac{Vf}{Po} \times \frac{100 \text{ g de residuo fresco}}{X \text{ g de residuo seco}} \times 100$$

Siendo:

- Absorbancia: obtenida tras medir cada muestra.

- r: valor de la recta de calibrado, en la cual en el eje X se representa la absorbancia y en el eje Y la concentración de glucosa en ppm.
- F: factor de dilución empleado en cada muestra.
- Vf: volumen final del caldo (0.24 L)
- Po: peso inicial del caldo (60g)
- X: porcentaje de residuo seco de la cascarilla de cacao. En este caso 93% como se observa en el apartado 5.2.

4.6.1. Totales: método del Fenol-Sulfúrico

Para cuantificar los carbohidratos totales se llevó a cabo una adaptación del método Fenol-Sulfúrico descrito por (Dubois et al., 1956) que consta de los siguientes pasos:

- Añadir a tubos de cristal 1 ml de muestra 0.5 ml de fenol al 5% y 2.5 ml de H₂SO₄ al 96% (Supelco).
- Dejar reposar los tubos durante 1 hora para que se enfríen, ya que es una reacción exotérmica.
- Pasado ese tiempo, medir las muestras en el espectrofotómetro (Analytik Jena SPEKOL 1300/1500) (Figura 14) utilizando una longitud de onda de 492 nm.



Figura 14. Espectrofotómetro Analytik Jena SPEKOL 1300/1500

Para evaluar estos carbohidratos es necesario realizar una recta patrón utilizando glucosa a diferentes concentraciones, representando la absorbancia frente a la concentración del azúcar. Se realiza un blanco utilizando agua destilada en vez de glucosa.



Figura 16. Calibrado de glucosa empleado para realizar la recta patrón. Las diferencias de color se deben a las diferencias en la concentración de glucosa.

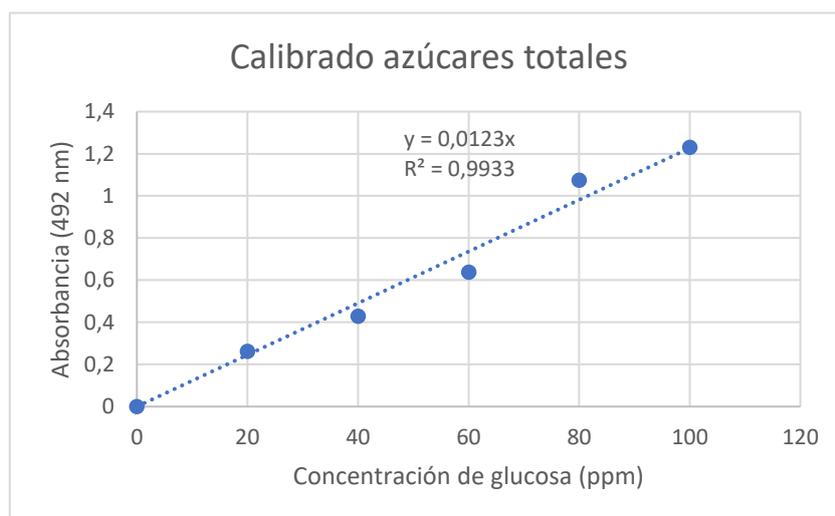


Figura 15. Recta patrón de azúcares totales, realizada con el programa Excel.

4.6.2. Reductores: método del DNS

Para cuantificar los carbohidratos reductores se utilizó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por (Bello Gil et al., 2006), el cual consta de los siguientes pasos:

- Añadir a tubos opacos 0.5 ml de muestra y 0.5 ml de DNS.
- Introducir los tubos en el baño de agua (MEMMERT Type: WNB 10) a 95°C durante 5 min.

- Pasado ese tiempo, introducir los tubos en hielo durante 5 minutos.
- Añadir a cada tubo 5 ml de agua destilada y agitar.
- Medir las muestras en el espectrofotómetro a 540 nm.

Al igual que en la cuantificación de los carbohidratos totales, en este caso también se debe realizar una recta patrón utilizando glucosa en diferentes concentraciones, y preparando un blanco con agua destilada, representando la absorbancia frente a la concentración del azúcar.

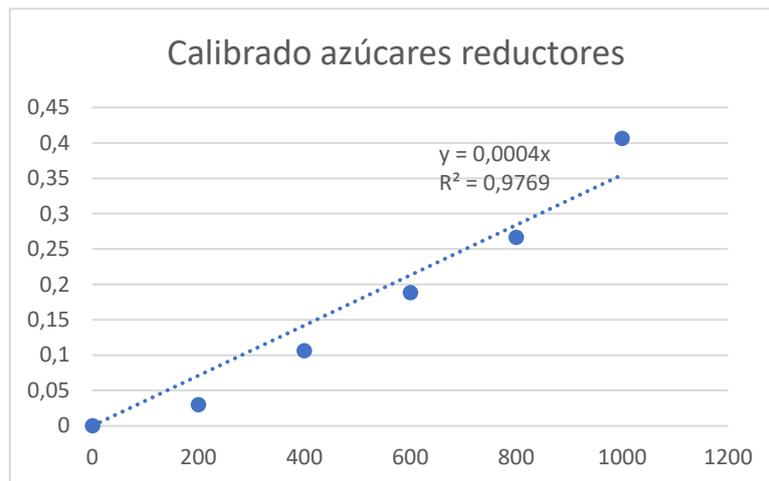


Figura 17. Recta patrón de azúcares reductores, realizada con el programa Excel.

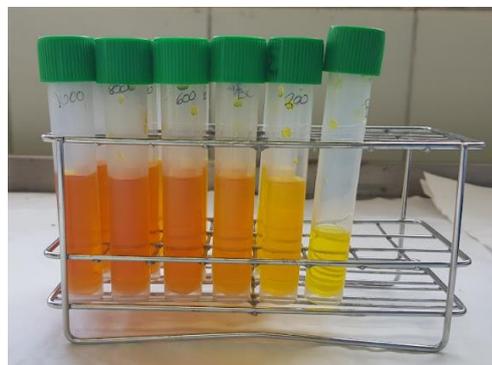


Figura 18. Disoluciones empleadas para realizar la recta patrón de azúcares reductores. Las diferencias de color observadas son debidas a las diferencias en la concentración de glucosa.

Se prepararon 100 ml de DNS siguiendo la siguiente metodología:

- Se midieron 80 ml de agua destilada con probeta y se introdujeron en un vaso de precipitados.
- Se añade al agua destilada 1.6g de NaOH, 30g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (VWR) y se dejan agitando hasta que se disuelven.

- Se añade 1g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y se deja en agitación al menos 12h.
- Se introduce el contenido del vaso de precipitados en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua destilada.

Tanto el vaso de precipitados -donde se deja el contenido en agitación- como el matraz, deben ser envueltos en papel de aluminio con el fin de evitar el deterioro del DNS ya que es fotosensible.

4.7. Cuantificación del PHB

Este biopolímero fue determinado utilizando una adaptación del método descrito por (Murthy et al., 2010), que se basa en la cuantificación del ácido crotónico, el cual es proporcional a la cantidad de PHB, tras la conversión del polímero utilizando ácido sulfúrico. Para analizar los datos es necesario realizar primero una recta patrón utilizando ácido crotónico (Merk).

Para poder cuantificar el PHB de las muestras previamente se debe llevar a cabo su extracción del pellet sólido obtenido tras centrifugar la muestra. En primer lugar, es necesario determinar el peso del pellet, ya que la masa inicial permitirá determinar la cantidad de PHB. A continuación, se comienza a proceder a la extracción siguiendo una serie de pasos:

- Añadir al pellet 10 ml de hipoclorito de sodio 6-14% (Merk) e introducir en el baño de agua a 37°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 30 min y desechar el sobrenadante.
- Realizar 3 lavados al pellet resultante de la centrifugación, tal y como se detalla a continuación:
 - o Añadir 10 ml de agua destilada, centrifugar a 10.000 durante 10 minutos y desechar el sobrenadante.
 - o Añadir 10 ml de acetona (VWR), centrifugar en las mismas condiciones y tirar el sobrenadante.
 - o Añadir 10 ml de etanol (VWR) y centrifugar en las mismas condiciones, y desechar el sobrenadante.
- Tras finalizar los lavados se añaden 10 ml de cloroformo, se agita y se deja reposar la muestra durante 5-10 min.

- Filtrar el contenido y recuperar el líquido introduciéndolo en un Falcon de 15 ml. Se filtra utilizando una bomba de vacío (Vacuubrand - MZ 2C NT), con un filtro de 20 μm .
- De cada Falcon se extraen 100 microlitros y se añaden a un tubo de cristal.
- Añadir 10 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- Introducir las muestras en el baño de agua destilada a 95°C durante 10 min y, posteriormente, introducirlas en hielo durante el mismo tiempo.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150) utilizando una longitud de onda de 235 nm (Figura 19).



Figura 19. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150.

La cantidad de PHB se expresa teniendo en cuenta la dilución realizada para que la absorbancia se encuentre dentro del calibrado, el extracto seco de la cascarilla de cacao y la proporción sólido:líquido inicial.

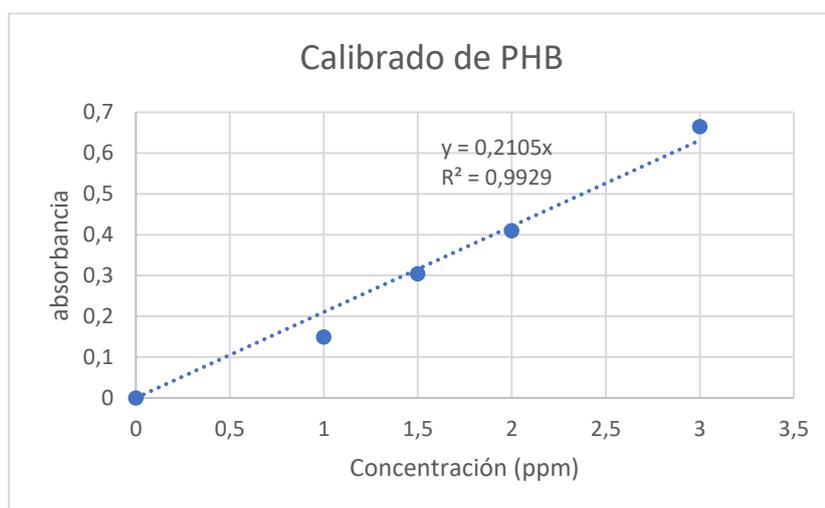


Figura 20. Calibrado de PHB

Para calcular la cantidad de PHB producida se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia}}{r} \times \frac{1l}{1000ml} \times 10ml \times \text{peso del pellet} \times \text{volumen total del matraz de fermentación}$$

Siendo:

- 10 ml: volumen de H₂SO₄
- Volumen total del matraz de fermentación: 300 ml.

A partir de este cálculo se obtienen los mg de PHB presentes en el matraz en el que se realiza la fermentación. Para expresar este valor en base a los gramos de cascarilla se debe realizar la siguiente operación:

$$\frac{\text{mg PHB en el matraz}}{\text{peso seco}} \times 60g \text{ de cascarilla}$$

4.8. Sólidos suspendidos totales

Se siguió la evolución del peso del contenido sólido total en el caso de la fermentación en la que se emplea el caldo con sólidos suspendidos. Para ello, se siguió el siguiente proceso:

- Introducir un pocillo de cerámica con un filtro en la estufa a 100°C durante 10 min.
- Dejar enfriar en el desecador y pesar los pocillos en una balanza analítica.
- Filtrar la muestra (5 ml) utilizando el filtro previamente pesado.
- Introducir el filtro en la estufa y dejar 24 horas.
- Pasado ese tiempo, dejar el filtro enfriar y pesarlo.

Se obtiene el valor de sólidos por diferencia de pesada.

5. Resultados y discusión

5.1. Características de los materiales iniciales

5.1.1. Contenido en humedad de la cascarilla

Como se ha explicado en el apartado 4 (Material y métodos), para determinar el extracto seco de la cascarilla de cacao primero se debe calcular su humedad.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{87,0127 - 86,72815}{87,0127 - 83,05075} \times 100 = 7 \%$$

Según (EFSA, 2008), el porcentaje de humedad de la cascarilla de cacao oscila entre 5.4% y 15.3%. El valor obtenido se encuentra dentro de estos parámetros, por lo que es correcto. A partir del porcentaje de humedad se establece el contenido en extracto seco:

$$\text{Extracto seco} = 100 - 7 = 93\%$$

Por tanto, la cascarilla de cacao utilizada tiene una humedad del 7%, implicando un 93% de extracto seco. Este dato nos permite expresar los resultados obtenidos por peso seco de cascarilla de cacao.

5.1.2. Características del caldo inicial

Este caldo de partida se obtuvo, como se indica en el apartado “Material y métodos”, añadiendo 60 g de cascarilla de cacao molida a 240 ml de una solución acuosa de H₂SO₄ al 5% (Supelco), obteniendo una relación p/p del 23%. A continuación, se realizó una hidrólisis ácido-térmica en las condiciones descritas previamente (135 °C, 2 atm y 10 min) ya que se ha observado en estudios previos que estas son las mejores circunstancias para extraer la máxima cantidad posible de carbohidratos fermentables de la cascarilla de cacao (Borrallo, 2019).

En el momento en el que se inició la fermentación (tiempo 0) el caldo con sólidos tenía 51,7 g /L de azúcares totales, 23,3 g/L de azúcares reductores y un pH de 6,76. Además, la cascarilla de cacao contiene un 1.2-4.37% de nitrógeno y un 0.69% de fósforo (Guerrero, 2016; León et al., 2006), cantidades suficientes para fermentar los azúcares presentes. Por otro lado, este caldo contiene sólidos suspendidos formados por cascarilla que no se ha solubilizado, el contenido inicial de estos sólidos es de 77,7 g/L. Antes de realizar la hidrólisis el contenido de cascarilla era de 233 g/L, que en peso seco serían 217

g/L, por lo que, tras la hidrólisis, se solubilizó aproximadamente el 57% de la cascarilla inicialmente añadida.

El caldo en el que se eliminaron los sólidos antes de iniciar la fermentación, por su parte, contaba con 44,6 g/L de azúcares totales y 29,0 g/L de azúcares reductores y un pH de 6.79. La ligera diferencia entre la cantidad de azúcares disueltos en ambos caldos puede atribuirse a la falta de heterogeneidad en el lote de cascarilla utilizado.

Estas características iniciales son similares a las de otros caldos utilizados para fermentar caldos con sólidos por parte de *Bacillus sp* y obtener polihidroxitiratos, aunque los sólidos no son de cascarilla de cacao sino de otros residuos agroalimentarios. Por ejemplo, Castro & Ballona (2019) utilizaron residuos de banano sobre los que realizaron una hidrólisis a 127°C durante 17 min -menos temperatura pero más tiempo que en este estudio- y obtuvieron una concentración inicial de 47,5638 g/L de azúcares totales y 21,86 g/L de azúcares reductores; concentraciones similares a las obtenidas en este ensayo. Por otro lado, Galicia (2015) realizó una extracción de azúcares reductores de *Agave angustifolia* empleando una disolución de ácido sulfúrico al 1%, obteniendo una concentración de 21,7 g/L de azúcares reductores; lo cual se aproxima a la concentración conseguida en este estudio.

5.2. Fermentación del caldo sin sólidos

Se ha optado por filtrar los sólidos antes de iniciar la fermentación para observar cómo influye esta eliminación tanto en el consumo de azúcares por parte del microorganismo, como a la hora de producir PHB. Se ha optado por esta opción, ya que en algunos estudios publicados se retiran los sólidos antes de inocular el microorganismo y comenzar con el proceso fermentativo (Arias, 2022; Domínguez et al., 2012; Honorio, 2019).

5.2.1. Evolución de los azúcares

Los microorganismos que producen PHB, como el *Bacillus firmus* que se ha utilizado en este estudio, necesitan una fuente de carbono para llevar a cabo la síntesis (Honorio, 2019; Sindhu et al., 2013). En este ensayo se han utilizado los carbohidratos naturalmente presentes en la cascarilla de cacao como fuente de este mineral. Es por eso que se ha hecho un seguimiento de la evolución de los azúcares reductores (fermentables) para

determinar si son consumidos o no por el microorganismo, y cómo este consumo influye en la producción del biopolímero. Además, también se han cuantificado los azúcares totales para observar cómo evolucionan los carbohidratos de forma genérica.

Tras los análisis, se obtuvieron los siguientes resultados:

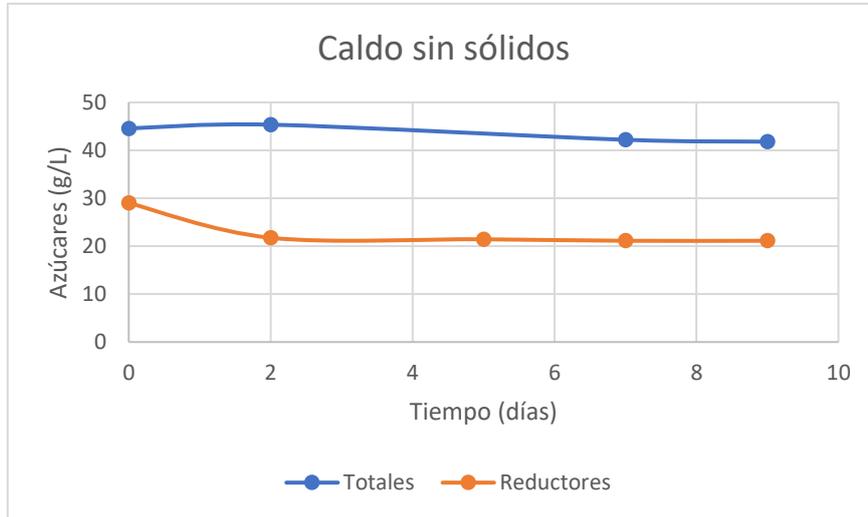


Figura 21. Evolución en g/L de la concentración de azúcares totales y reductores en el caldo sin sólidos.

Además de expresarse en unidades g/L, también se representaron en base a los g de azúcar/100g de residuo de casquilla seco:

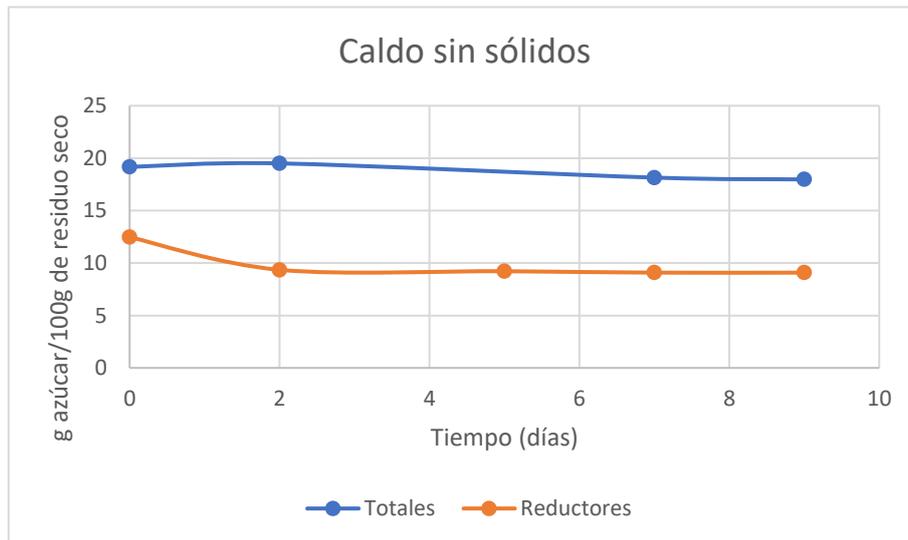


Figura 22. Evolución en g/100g de residuo seco de la concentración de azúcares totales y reductores del caldo sin sólidos.

Ambas gráficas son similares, ya que se trata de la misma información expresada de distinta manera, y se observa la siguiente evolución: Lógicamente, la cantidad de azúcares

totales es superior a la de azúcares reductores, los cuales disminuyen hasta el segundo día. A partir del día 3 la concentración de azúcares reductores se mantiene aproximadamente constante hasta el final de la fermentación, mientras que los azúcares totales disminuyen ligeramente. Este comportamiento es debido a que los carbohidratos totales se hidrolizan dando lugar a azúcares reductores (Domínguez et al., 2012), que a su vez están siendo consumidos por el microorganismo. No obstante, cabe destacar que la cantidad de azúcares consumida es inferior a la que se consume en otras síntesis de biopolímeros; así, Galicia (2015), quien fermenta bagazo de *Agave angustifolia* utilizando *Bacillus sp.* IBT42, ha reportado un consumo del 89,5% de azúcares reductores tras 24 h de fermentación.

5.2.2. Evolución del pH

Como se observa en la siguiente gráfica, el pH se mantiene en todo momento entre 6 y 7, siendo estos los valores óptimos para el crecimiento de la bacteria *Bacillus firmus*.



Figura 23. Evolución del pH del caldo sin sólidos

A $t=0$, el pH fue ajustado de forma manual utilizando NaOH 10M. El resto de días de ensayo, el pH se mantuvo dentro de esos valores de forma natural.

5.2.3. Producción de PHB

Se llevó a cabo la cuantificación de PHB durante los 9 días que se produjo la fermentación, expresando los resultados en mg de PHB/100g de cascarilla, obteniendo los siguientes resultados:



Figura 24. Evolución en mg/g de cascarilla del PHB en el caldo sin sólidos.

Con el fin de poder comparar la concentración de PHB con la producida en otros trabajos, se ha expresado la cantidad de este polímero en unidades g/L:

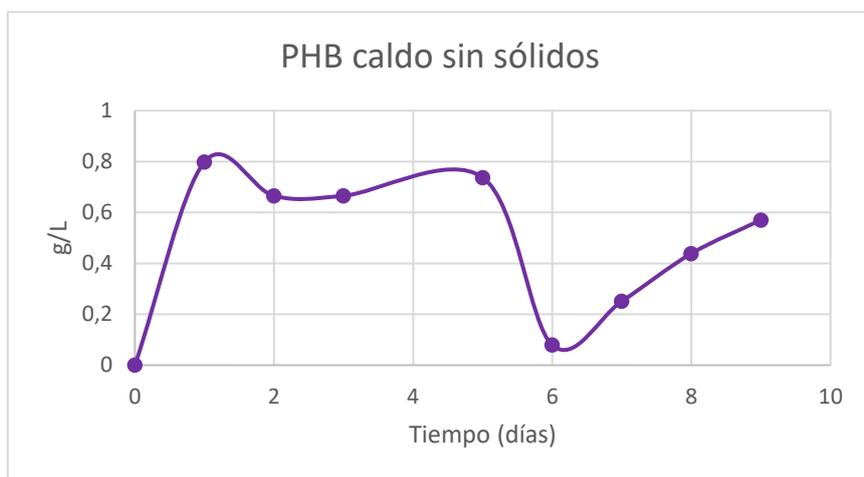


Figura 25. Evolución en g/L del PHB del caldo sin sólidos.

Como se observa, en el caso del caldo sin sólidos apenas hubo producción de PHB en comparación con otros trabajos donde se produce una mayor síntesis; Arias (2022) llevó a cabo una fermentación de residuos de banano a partir de *Campylovirus nectator* utilizando fructosa como fuente de carbono, obteniendo 3.8 g/L de PHB a las 96h; frente a los 0.8 g/L de PHB que se han obtenido como máximo en este proyecto. La baja producción obtenida en el presente trabajo era esperable, teniendo en cuenta el escaso consumo de azúcares, que indica la escasa actividad desarrollada por el microorganismo (Sindhu et al., 2013).

A partir de estos resultados, teniendo en cuenta que no hay consumo de azúcares ni producción de PHB en cantidades apreciables, sería lógico pensar que el crecimiento de

la bacteria en el caldo sin sólidos haya sido también escaso. Dado que, al cabo de 9 días de fermentación, aún permanece en el medio una concentración de azúcares reductores de 21 g/L, es evidente que no es la falta de carbohidratos lo que limita el crecimiento y la producción de la bacteria, debiendo existir otros factores limitantes. Podría tratarse de la escasez de algún nutriente o la presencia de alguna sustancia inhibidora. Esta explicación fue dada por Galicia (2015), quien fermenta *Agave angustifolia* usando *Bacillus sp.* IBT42 y obtiene unos resultados similares en los que apenas hay producción de biopolímero a pesar de haber una concentración suficiente de carbohidratos reductores.

5.3. Fermentación del caldo con sólidos

Además de fermentar un caldo sin sólidos, se optó por llevar a cabo este proceso también sobre un caldo en el que no se elimine la cascarilla no disuelta tras la hidrólisis para observar si existen diferencias significativas entre ambos medios, tanto en el consumo de azúcares por parte del microorganismo como en la producción de PHB. Se ha decidido realizar el ensayo de fermentación con el caldo sin filtrar ya que existen estudios anteriores en los que no se lleva a cabo un filtrado previo a la fermentación, obteniéndose mejores resultados en cuanto a concentración de biopolímero sintetizada (Torres & Tresierra, 2012).

5.3.1. Evolución de los azúcares

Para observar la evolución de los azúcares se utiliza el mismo procedimiento que en el cultivo sin sólidos. Se obtiene la siguiente gráfica:

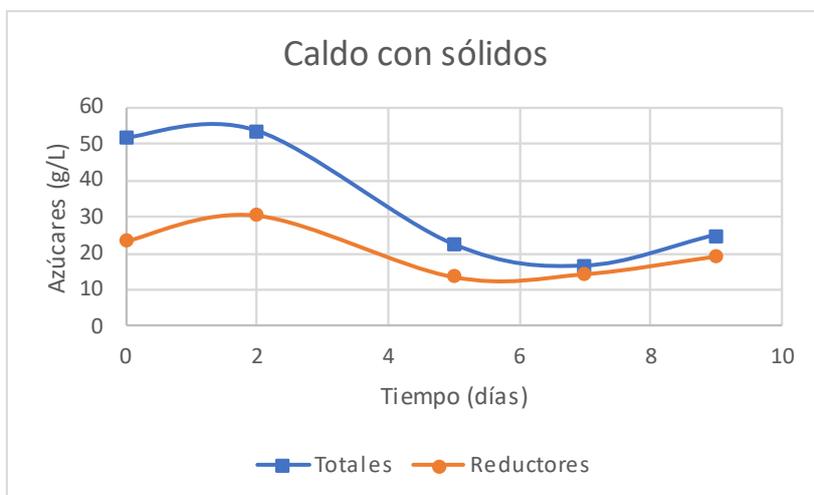


Figura 26. Evolución de la concentración en g/L de los azúcares totales y reductores en el caldo con sólidos.

En la siguiente gráfica, se expresaron en g de azúcar por 100g de residuo seco:

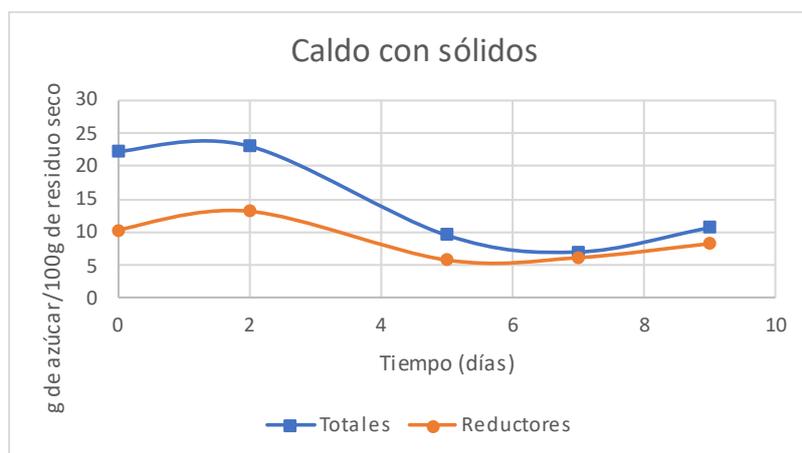


Figura 27. Evolución de la concentración en g de azúcar/100g de residuo seco de los azúcares totales y reductores del caldo con sólidos.

Ambas gráficas son similares y siguen la misma evolución. Al inicio de la fermentación ($t=0$) la cantidad de azúcares totales es algo más del doble que de azúcares reductores. Estos niveles se incrementan ligeramente hasta $t=2$ días, lo cual puede ser debido a que continúa habiendo extracción de azúcares de la cascarilla de cacao, y estos se hidrolizan a azúcares reductores, por eso la diferencia entre ambos se reduce.

A partir de $t=2$ días los carbohidratos totales comienzan a descender, aproximándose a la concentración de azúcares reductores. Esto es debido a que el microorganismo está consumiendo azúcares (por eso disminuyen) pero, además, hay hidrólisis de azúcares totales dando lugar a azúcares fermentables, de tal forma que la mayor parte de azúcares presentes en el caldo son de este tipo. Así, a los 7 días, prácticamente todos los azúcares complejos se han hidrolizado a reductores, por lo que se puede considerar que todos los azúcares presentes en el medio son fermentables.

La hidrólisis de azúcares totales en azúcares reductores es debida a que el ácido, empleado en la hidrólisis ácido-térmica, es capaz de romper los polisacáridos haciendo que estos den lugar a sus respectivos monómeros, los cuales conforman los llamados azúcares fermentables o reductores. Esta evolución de los azúcares es similar a la producida en el trabajo elaborado por Urbaneja et al. (1997), quienes realizaron una hidrólisis ácida de la pulpa del café obteniendo que los azúcares totales y reductores se incrementaron ligeramente al inicio del estudio, pero luego descendieron.

Por otro lado, se observan notables diferencias respecto al caldo sin sólidos, en el que apenas hay consumo de azúcares. Esto puede ser debido a que, según (Galicia, 2015), cuando mejor crece la bacteria es en un medio donde hay fuente de carbono, nitrógeno y fósforo; pero solo con fuente de carbono no se consiguen buenos resultados. Esta puede ser la diferencia más significativa entre el caldo con sólidos y el caldo sin sólidos, ya que al realizar la hidrólisis ácido-térmica se han extraído azúcares de la cascarilla que pasan a estar presentes en el medio, lo cual ocurre en ambos tipos de caldo. Sin embargo, al realizar el filtrado para formar el caldo sin sólidos se retira la cascarilla, eliminando así una posible fuente adicional de nitrógeno y fósforo.

5.3.2. Evolución del pH

Como se observa en la siguiente gráfica, al igual que cuando se eliminan los sólidos por filtración, el pH se mantiene en todo momento entre 6 y 7, siendo estos valores óptimos para el crecimiento del microorganismo.



Figura 28. Evolución del pH del caldo con sólidos.

De nuevo, el pH se ajustó de forma manual a $t=0$ utilizando NaOH y el resto de días se mantuvo dentro de esos valores de forma natural.

5.3.3. Evolución de los sólidos suspendidos

Los sólidos suspendidos son aquellos que pueden ser retenidos por un proceso de filtración, y en este caso estarán principalmente constituidos por la cascarilla de cacao no solubilizada y por las bacterias inoculadas, responsables de llevar a cabo la fermentación.

Para iniciar la fermentación el caldo se inoculó con 600 μL de preinóculo, de manera que la concentración inicial de microorganismo era aproximadamente de 300 ufc/mL (Paparsenos, 2021). Considerando que 1 mg de peso seco equivalga a unas 5×10^9 bacterias, el peso seco aportado por las bacterias inoculadas a tiempo cero es prácticamente despreciable frente al peso aportado por la cascarilla no solubilizada.

Para cuantificar los sólidos suspendidos se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso filtro con sólidos} - \text{peso filtro}}{0.005L}$$

Siendo 0.005L el volumen filtrado.

A continuación, se representan los pesos obtenidos frente al tiempo:



Figura 29. Evolución en g/L de los sólidos suspendidos del caldo con sólidos.

Como se puede observar, el contenido en sólidos suspendidos se mantiene aproximadamente constante durante todo el proceso, lo que indica que en caso de producirse solubilización de la cascarilla, el descenso registrado en los sólidos suspendidos es demasiado bajo para poder ser detectado. Lo mismo ocurre con el aumento esperable en la población microbiana.

5.3.4. Producción de PHB

Para determinar la producción de PHB se sigue el mismo procedimiento que en el caldo sin sólidos. En este caso se obtiene la siguiente evolución:

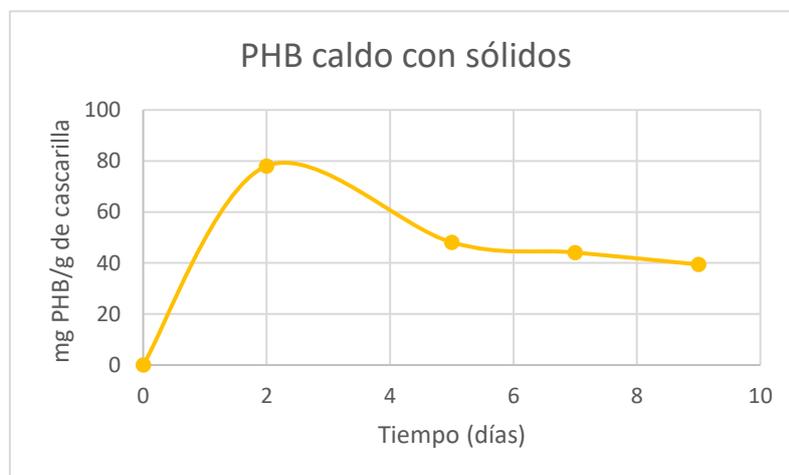


Figura 30. Evolución en mg/g de cascarilla de la concentración de PHB en el caldo con sólidos.

En este caso, también se ha optado por representar la concentración de biopolímero en g/L, con el fin de llevar a cabo comparaciones con otros estudios:

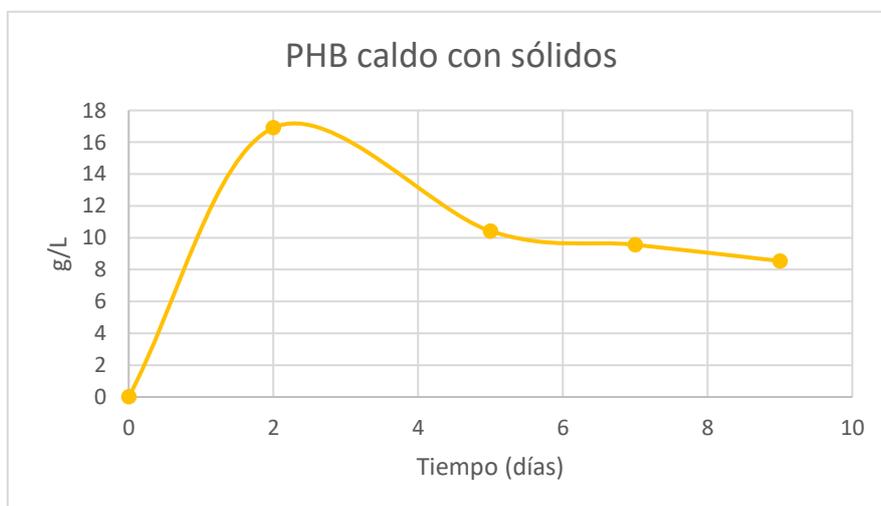


Figura 31. Evolución en g/L de la cocentración de PHB del caldo con sólidos.

Se observa un rápido incremento de PHB durante los dos primeros días de la fermentación, alcanzando el máximo nivel a $t=2$. A partir de entonces, la concentración de polímero desciende ligeramente hasta $t=5$ y se mantiene constante hasta el final del ensayo ($t=9$).

La rapidez con la que aumenta la concentración de polímero se observa también en otros trabajos que utilizan especies del género *Bacillus* para llevar a cabo la fermentación de malezas y licor de maíz, alcanzando concentraciones de 1.4 g/L de PHB a las 45-48 horas (Tortoló & Bell, 2015). El descenso que ocurre a partir del día 3 también se observa en otros ensayos donde se utiliza *Bacillus*, aunque no son exactamente las mismas condiciones de fermentación, ya que se utiliza otro tipo de residuos como fuente de carbono; por ejemplo, Álvarez (2015) utiliza lactosuero como sustrato en la fermentación y obtiene 3.8 g/L de PHB tras 48h, a partir de entonces la concentración comienza a disminuir. Esta bajada se puede deber a que el microorganismo necesite otros elementos además de los carbohidratos para producir el biopolímero, los cuales han podido agotarse a medida que avanza el proceso fermentativo, unido a una posible degradación del PHB por parte del propio microorganismo. La cantidad de PHB obtenida en los trabajos referenciados es notablemente inferior a la producida en este trabajo, en el que se han conseguido 16.9 g/L de polímero a las 48h de ensayo. Con esto se muestra que es una buena alternativa valorizar la cascarilla de cacao mediante la producción de polihidroxibutirato.

En relación con los carbohidratos, se observa que la producción de PHB no es proporcional al consumo de azúcares. Así, durante los 2 primeros días en los que no se observa consumo de azúcares es cuando tiene lugar la mayor producción de PHB. Esto ya se observó en el estudio realizado por Honorio (2019), quien evaluó la influencia de las diferentes concentraciones de azúcares reductores en la producción de PHB por parte de *Bacillus sp.* B23, utilizando como sustrato residuos de la industria cervecera. En su estudio se observa que, en ocasiones, con un escaso consumo de carbohidratos se produce mayor concentración de polímero que en otros momentos en los que se consumen mayores cantidades de azúcares. Esto puede ser debido a que, como indica Galicia (2015), el microorganismo necesita otros componentes extra para producir el polímero y no solo una fuente de carbono. En el presente trabajo, entre el segundo y quinto día es cuando se registra mayor consumo de azúcares, que lejos de hacer que aumente el contenido en PHB, va acompañado de una reducción de su concentración, manteniéndose ya aproximadamente constante hasta el final.

Respecto al caldo sin sólidos, es evidente que los mejores resultados son obtenidos cuando el medio no se filtra, obteniéndose concentraciones de PHB unas 20 veces

superiores por cada g de cascarilla seca. Esto puede ser debido a que, como se indicó anteriormente, la bacteria en el caldo sin sólidos tiene fuente de carbono pero carencia de otros nutrientes necesarios para la producción del biopolímero. Otra posible hipótesis, sería pensar que la presencia de un soporte sobre el que poder adherirse, como es la cascarilla, active la síntesis del biopolímero. Más investigación sería necesaria para conocer con exactitud las causas que promueven la producción de PHB en el medio con sólidos.

6. Conclusiones

A continuación, se detallan las principales conclusiones extraídas a partir de los resultados conseguidos en la elaboración de este proyecto:

- ✓ No se observó la misma evolución en la concentración PHB ni en el consumo de carbohidratos en los caldos filtrados y sin filtrar, por lo que la presencia o ausencia de sólidos de cascarilla es determinante en el comportamiento del microorganismo *Bacillus firmus*.
- ✓ En cuanto al pH, con ambos tipos de caldo se mantiene constante y dentro de los valores deseados, por lo que únicamente es necesario ajustarlo al inicio del proceso, pero no requiere de control durante la fermentación.
- ✓ Los mejores resultados de producción de PHB se consiguen en el caldo con sólidos, siendo el valor máximo de 16.9 g/L que suponen un rendimiento de unos 8g de PHB por cada 100 g de peso seco de cascarilla procesada. En el caldo sin sólidos se obtienen cantidades muy pequeñas (0.8g/L).
- ✓ No se observa una relación proporcional entre el consumo de azúcares y la producción de PHB.
- ✓ Los resultados obtenidos cuando se emplea el hidrolizado de cascarilla sin filtrar son prometedores, siendo el tiempo necesario para obtener la máxima producción de 48 h cuando se fermenta con *Bacillus firmus* a 37°C.

7. Bibliografía

- Agenda 2030. (2015). Ministerio de Transportes, Movilidad y Agenda Urbana. <https://www.mitma.gob.es/arquitectura-vivienda-y-suelo/objetivos-desarrollo-sostenible>
- Ali, S. (2016). *Introduction to Bioplastics Engineering*. Elsevier.
- Almeida, A., Ruiz, J., Lopez, N., & Pettinari, J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva*, 3(3), 122–133.
- Álvarez, C. (2015). *Análisis de la producción de polihidroxibutirato usando lactosuero como materia prima*.
- Arias, L. K. (2017). *Utilización de la pulpa de cacao (Theobroma Cacao) para la elaboración de postres como alternativa gastronómica*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Arias, M. (2022). *Aprovechamiento de un subproducto del procesamiento del banano para la producción de polihidroxibutirato (PHB) mediante fermentación sumergida*.
- Astudillo, M. C., & Olmedo, L. E. (2021). *Obtención de polihidroxibutirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Baena, C. (2021). El cacao no es solo chocolate. *Universitas Científica*, 24(1), 28–31.
- Baena, L. M., & García, N. A. (2012). *Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de la cascarilla de las semillas tostadas de Theobroma Cacao L. de industria chocolatera colombiana*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Beckett, S. T. (2019). *The Science of Chocolate*. Royal Society of Chemistry.
- Bello, A. J. (2021). *Pre-factibilidad de la producción de polihidroxibutirato (phb) a partir alcaligenes latus utilizando almidón extraído de cascara de plátano*. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Bello, D., Manfred, Z., Helmut, B., & Otero, M. (2008). Aislamiento y caracterización de Polil-beta-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de Bacillus megaterium. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 42, 101–105.
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Instituto Cubano de Investigación de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 40(2), 45–50.
- Borralló, C. (2019). *Valorización de la cascarilla de cacao, residuo de la industria chocolatera, para su empleo como sustrato en procesos fermentativos*. Universidad de Oviedo.
- Castro, B., & Ballona, J. (2019). *Efecto de los azúcares reductores en la producción de Polihidroxialcanoatos a partir de hidrolizados de Citrus Nobilis empleando Bacillus sp*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cacao México. (2022). <https://cacaomexico.org/>
- Cerdá, E., & Aygun, K. (2015). *Economía circular, estrategia y competitividad empresarial*.
- Cury, R. K., Aguas, M., Martínez, M. A., Olivero, V. R., & Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales. Su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana De Ciencia Animal*, 9, 122–132.
- Díaz, A. I., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2017). Treatment of supermarket vegetable wastes to be used as alternative substrates in bioprocesses. *Waste Management*, 67, 59–66.
- Diomande, D., Antheaume, I., Leroux, M., Lalande, J., Balayssac, S., Remaud, G. S., & Tea, I. (2015). Multi-element, multi-compound isotope profiling as a means to distinguish the geographical and varietal origin of fermented cocoa (Theobroma cacao L.) beans. *Food Chemistry*, 188(576–582).
- Domínguez, M., Álvarez, A., Granados, M., & Hernández, F. (2012). Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method

- for the determination of sugars and related substances. *Anal Biochem*, 28, 350–356.
- Ecología verde*. (2022). <https://www.ecologiaverde.com/>
- EFSA. (2008). Theobromine as undesirable substances in animal feed - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 6(9).
- Ferrando, M., & Granero, J. (2012). *Gestión y minimización de residuos*.
- Gaitán, E. E. (2021). *Planteamiento de un proceso para el desarrollo de platos biodegradables a base de cascarilla de cacao*. Universidad EAN.
- Galicia, C. (2015). *Estudio de la influencia de la temperatura y la aireación sobre la producción de PHB utilizando Bacillus sp. IBT42 a partir de hidrolizados ácidos optimizados de bagazo de Agave angustifolia HAW*.
- García, L. A., Novoa, J. A., Franco, A. M., & Higueta, L. M. (2015). Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. *Quid: Investigación, Ciencia y Tecnología*, 25, 69–78.
- Ghisellini, P., Cialani, C., & Ulgiati, S. (2016). A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner Production*, 114, 11–32.
- Giraldo, G. M. (2020). *Aprovechamiento de la pulpa de café mediante procesos biotecnológicos para la obtención de nuevos productos*.
- Gómez, A., Jiménez, D., & Graciada, J. (2013). SÍNTESIS DE POLIHIDROXIACANOATOS POR *Wautersia eutropha* UTILIZANDO DESECHOS DE LA HIDRÓLISIS DE *Beta vulgaris* L. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Gouda, M., Azza, S., & Sanaa, O. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 153(3).
- Greenpeace. (2022). *Datos sobre la producción de plásticos*.
- Grijalva, N. (2013). Vegetal waste degradation by microbial strains inoculation. *Enfoque UTE*, 4(1), 1–13.
- Guerrero, N. (2016). *Contenido en nitrógeno (N) fósforo (P) y potasio (K), en la cáscara de Cacao (Theobroma cacao L.) y otras características del fruto en 5 diferentes clones del semillero interclonal de la Universidad Nacional de Ucayali*. Universidad Nacional de Ucayali.
- Gutiérrez, J. (2020). *Estrategias para la valorización de la biomasa generada en la producción y transformación del cacao (Theobroma cacao L.)*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Honorio, C. (2019). *Efecto de la concentración de azúcares reductores y extracto de levadura en la producción de polihidroxibutirato por Bacillus sp. empleando residuos de cervecería*. Informe Anual Produlce. (2020). Produlce.
- Jaramillo, M. P., Salinas, V. P., & Arango, A. L. C. (2001). El chocolate y la salud cardiovascular. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 4, 99–111.
- La contaminación por plástico crece sin cesar, en tanto que la gestión de residuos y el reciclaje se quedan cortos, dice la OCDE*. (2021). Económico, Organización Para La Cooperación y El Desarrollo. <https://www.oecd.org/centrodemexico/medios/perspectivas-globales-del-plastico.htm>
- León, J. A., Gómez, R., Hernández, S., Álvarez, J. D., & Palma, D. J. (2006). Mineralización en suelos con incorporación de residuos orgánicos en altos de Chiapas, México. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 22(2), 163–174.
- Llerena, T., William, F., Guevara, G., Mora, M. D., Mora, O., & Melinda, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) como infusión: caso Tungurahua-Ecuador. *Cuadernos de Contabilidad*, 20(50).
- López, J. A. (2011). *Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB)*. Universidad Nacional Del Sur.
- Lorenzo, Y., & Obaya, M. C. (2005). La Digestión Anaerobia. Aspectos teóricos. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 39(1), 35–48.
- Los plásticos son clave para alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas del eje medioambiental. (2021). *Interempresas*.

- Martín, C., & Morata, V. (2021). Producción de enzimas pectinolíticas por fermentación: Eficacia del método de producción y downstream. *Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas*, 1(1).
- Mendoza, L., Jiménez, J., & Ramírez, M. (2017). Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 131–138.
- Molina, A., & Flórez-Castillo, J. . (2020). *Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación*. ResearchGate.
- Monserrat, M. (2020). Aproximación al chocolate y promoción del territorio: un análisis comparativo entre México y España. *Communication Papers*, 9(19), 97–107.
- Morales, J., García, A., & Méndez, E. (2012). ¿Qué sabe usted de...Cacao? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 79–81.
- Murthy, G. S., Kumar, D., Strauss, S. H., Dalton, D., & Vinocur, J. (2010). Feasibility analysis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) extraction from hybrid poplar leaves. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*.
- Naranjo, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*.
- Negro, M. J., Villa, F., Aibar, J., Aracón, R., Ciria, P., & Cristóbal, M. (2000). *Producción y gestión del compost*. Digital.CSIC.
- Nieto, E., & Martínez, T. (2017). Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global. In *Ecologistas en Acción*.
- Nigam, P. S.-N., & Pandey, A. (2009). *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues*. (S. S. & B. Media (Ed.)).
- Palazzo, G., & Eisenberg, P. (2014). *Producción de PHB y evaluación del comportamiento térmico de compuestos con fibras de bagazo de caña de azúcar*.
- Paparsenos, S. (2021). *Revalorización de la cascarilla de cacao mediante su empleo como sustrato en procesos de fermentación para la obtención de biopolímeros (PHB)*. Universidad de Oviedo.
- Pequeña historia industrial: origen del chocolate*. (2022). Club Del Chocolate. <https://www.clubdelchocolate.com/content/83-pequena-historia-industrial-origen-del-chocolate>
- Ranking de países con mayor consumo de chocolate. (2020). *Ekos*.
- Riestra, J. (2019). *Separación y purificación de ácido lactobiónico obtenido por vía fermentativa a partir de permeados de suero lácteo*. Universidad de Oviedo.
- Rivera, L. R., & Nevárez, G. V. (2009). Fuentes de carbono económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. *El Científico Frente a La Sociedad*, 3(2).
- Rojopoveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019). Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4), 867.
- Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como patería prima de infusiones. *ALAN*, 64(2).
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14(3), 361–372.
- Sigüencia, J., Soler, J., & Menéndez, M. (2018). Hidrólisis ácida de cascarilla de arroz para la generación de azúcares reductores. *Jornada de Jóvenes Investigadores Del I3A*, 6.
- Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., & Pandey, A. (2013). Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 67–72.
- Solorzano, S. (2017). *Influencia de las restricciones ecuatorianas de derivados de cacao hacia el mercado internacional*. Universidad Técnica de Machala.
- Soto, M. J. (2012). *Desarrollo del proceso de producción de cascarilla de semilla de cacao en polvo destinada al consumo humano*. Universidad Simón Bolívar.
- Torres, G., & Tresierra, Á. (2012). Producción de poli-beta-hidroxibutirato por *Pseudomonas* a partir de residuos de la industria petroquímica. *Ciencia Amazónica*, 2(2), 70–75.

- Tortoló, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 449(1), 22–26.
- Urbaneja, G., Ferrer, J., Páez, G., Arenas, L., Colina, G., & Sandoval, L. (1997). Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 14, 265–275.
- Valbuena, D., & Serrano, C. (2018). *Aprovechamiento de la cascarilla de cacao para la generación de un producto derivado en la Asociación de Productores Orgánicos del Municipio de Dibulla (APOMD)*. Universidad de La Salle.
- Valero, M. F., Ortigón, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *DYNA*, 80(181), 171–180.
- Vargas, O., Vite, H., & Quezada, J. (2021). El impacto económico del cultivo de cacao en Ecuador del primer semestre 2019 versus el primer semestre 2020. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(2), 169–179.
- Vega, O. (2016). *Extracción y caracterización estructural de un PHA, obtenido de residuos de cáscaras de yuca y piña mediante procesos de fermentación; y su aplicación en la fabricación de fibras por electrospinning*.