



Trabajo de Fin de Máster

Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P ...) en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica.

Alonso Márquez Romero

Máster en Biotecnología- Curso 2019/2020.

Tutores: Ana Blandino Garrido y Carlos José Álvarez Gallego

Resumen.

La acumulación descontrolada de plásticos en el entorno es uno de los mayores problemas del mundo actual. Aún somos enormemente dependientes de estos plásticos convencionales, la producción cada año aumenta y la perspectiva de su retirada se hace cada vez más difícil. Muchas son las propuestas para el aprovechamiento de este plástico, con el objetivo de convertir lo que es actualmente desechado, en algo de lo que se pueda obtener beneficio.

Este problema se puede atajar desde el otro extremo, creando materiales que sustituyan a estos plásticos. Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una alternativa cada vez más factible, con las mismas características físicas pero biodegradables. La producción de PHAs es más cara que la de plásticos convencionales, por ello es necesaria la profundización en este campo de estudio para hacer más eficiente el proceso y abaratar el producto final.

Abstract.

The uncontrolled accumulation of plastics in the environment is one of the biggest problems in the world today. We are still enormously dependent on these conventional plastics; production increases every year and the prospect of their withdrawal becomes increasingly difficult. There are many proposals for the use of this plastic, with the aim of converting what is currently waste, into something that can be profited from.

This problem can be tackled from the other end, creating materials that replace these plastics. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are an increasingly feasible alternative, with the same physical characteristics but biodegradable. The production of PHAs is more expensive than that of conventional plastics, which is why it is necessary to deepen in this field of study to make the process more efficient and lower the cost of the final product.

INDICE

1. Introducción	4
1.1. Antecedentes y estado del arte.	5
2. Objetivos.	7
3. Materiales y métodos en la búsqueda de información.	7
3.1. Scopus®	8
3.2. Google Scholar®	8
3.3. NCBI®	8
3.4. PDB® y Expasy®	9
3.5. Mendeley®	9
4. Producción de Polihidroxialcanoatos y fuentes de carbono.	10
4.1. Definición de PHAs, localización celular y uso de copolímeros.	10
4.2. Síntesis enzimática de Polihidroxialcanoatos.	16
4.3. Fuentes lignocelulósicas de carbono.	20
4.4. Pretratamientos para la masa lignocelulósica.	21
4.4.1. Pretratamiento mecánico.	22
4.4.2. Prerataamiento térmico	23
4.4.3. Prerataamiento ácido.	24
4.4.4. Pretratamiento alcalino.	25
4.4.5. Prerataamiento oxidativo	27
4.4.6. Otros pretratamientos.	28
4.4.7. Elección del pretratamiento.	29
4.5. Producción de Polihidroxialcanoatos.	30
4.5.1. Extracción de Polihidroxialcanoatos.	32
4.6. Influencia de las condiciones de operación.	33
4.6.1. pH.	33
4.6.2. Temperatura	36
4.6.3. Oxígeno disuelto	38
4.6.4. Relación C:N:P.	38
4.6.5. Otras variables importantes.	41
5. Perspectivas de futuro	44
6. Conclusiones y propuesta final	45
7. Bibliografía.	46

1. Introducción.

Aunque se han aportado muchas propuestas de eliminación del plástico que contamina nuestro entorno, la cantidad diseminada en los compartimentos ambientales es tan grande que cualquier iniciativa implicaría una inversión enorme y fuera de toda rentabilidad. Por tanto, sería más eficiente cualquier política que incentive las vías de aprovechamiento mediante reciclaje del plástico al final de su vida útil o la producción de polímeros que fueran biodegradables. Por citar algunas de ellas, se ha evaluado su incorporación en materiales de construcción y se ha trabajado activamente en la búsqueda de microorganismos capaces de degradar dichos plásticos (Dietrich et al., 2017; Gu & Ozbakkaloglu, 2016).

Además del problema de la eliminación de los plásticos ya acumulados, es necesario producir materiales sustitutivos con propiedades similares al plástico fósil y que además sean de fácil reciclaje y/o biodegradables. En el año 2016 la producción de plástico a nivel mundial fue de 335 millones de toneladas, en 2017 la producción subió hasta las 348 millones de toneladas (PlasticsEurope, 2018; PlasticsEurope & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH, 2017), y finalmente en 2018 el dato fue de 359 millones de toneladas (Plastics Europe & Conversion Market & Strategy GmbH, 2019). Este nivel de producción y consumo deja claro que dependemos de un material con las mismas características que el plástico. En esta dirección se han centrado numerosas investigaciones y son muchos los polímeros biodegradables propuestos, provenientes de fuentes renovables y no renovables. Entre los polímeros biodegradables provenientes de petróleo encontramos los poliésteres hidrolizables, como las poliamidas, los poliuretanos, poliureas y polianhídridos. También encontramos los que necesitan una oxidación previa para su degradación, y que no son hidrolizables, como los polímeros vinílicos (Eriksen et al., 2014; PlasticsEurope, 2018; PlasticsEurope & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH, 2017).

Los polímeros biodegradables que tienen un origen natural reciben el nombre de bioplásticos biobasados y biodegradables. Estos son sintetizados a partir de biomasa por organismos vivos y en la mayoría de los casos reciben un tratamiento químico para mejorar su eficiencia, sin perder nunca su condición de biodegradable. Son en su mayoría polisacáridos, aunque también pueden tener una naturaleza proteica e incluso lipídica.

Pueden tener origen animal, como el colágeno, usado en mezcla junto con polímeros sintéticos normalmente, u origen vegetal como la celulosa o el almidón, que son actualmente las alternativas a los plásticos más comunes (Dietrich et al., 2017; S. Philip, 2007; Vroman & Tighzert, 2009).

En este trabajo se aporta una revisión de las actuales tendencias en producción de un tipo concreto de plástico biobasado y biodegradable (polihidroxicanoatos) con especial atención a la opción de utilizar efluentes de digestión anaerobia acidogénica (ricos en ácidos grasos volátiles) de biomasa lignocelulósica.

1.1. Antecedentes y estado del arte.

Los plásticos se han establecido como uno de los materiales más importantes en la actualidad, tras las últimas 6 décadas han pasado a estar presentes en todos los sectores de la sociedad en todo el mundo. Desde la actividad industrial más compleja hasta en los objetos más mundanos de la vida cotidiana, podemos encontrar la presencia de plásticos. Esto es debido a las propiedades que hacen del plástico un material versátil y muy barato de producir.

Cuando hablamos de plásticos estamos hablando de un amplio rango de polímeros con distinta composición química que se sintetizan para satisfacer según el uso previsto. Estos polímeros se pueden clasificar en dos grupos: los que pueden calentarse y enfriarse de forma indefinida y los que solo pueden sufrir este ciclo una vez. Los polímeros que se engloban en el segundo grupo sufren una reacción química cuando se calientan que les hace perder sus propiedades iniciales, por lo que solo pueden moldearse una vez. En la figura a continuación se observan ambos grupos (PlasticsEurope & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH, 2017).

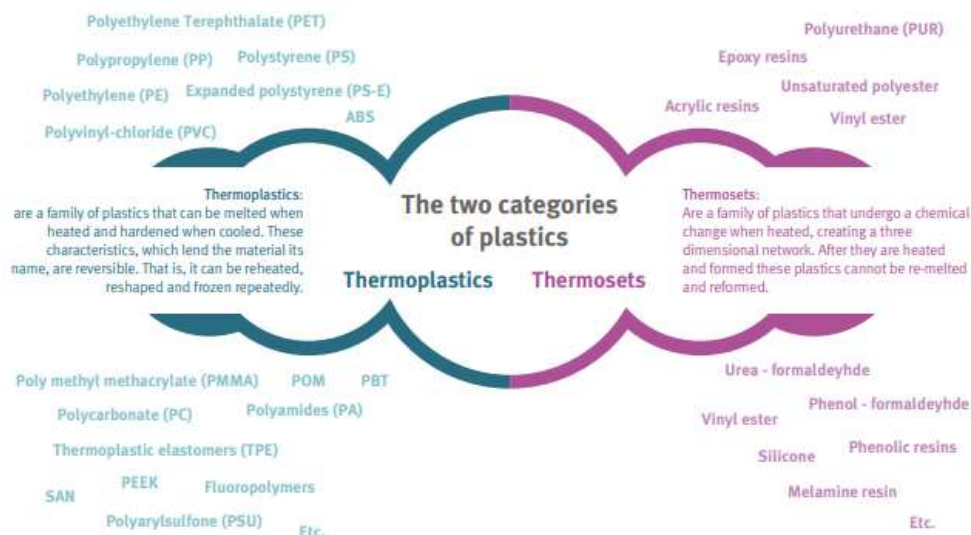


Ilustración 1. clasificación de polímeros plásticos según su respuesta a ser calentados (PlasticsEurope & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH, 2017)

La mayoría de los plásticos que empleamos son de origen fósil y difíciles de degradar. Es por ello por lo que esta producción masiva de plásticos nos ha llevado a una situación crítica medioambientalmente hablando. En los últimos años en Europa el reciclaje de los plásticos ha aumentado exponencialmente, de 2006 a 2016 la tasa de reciclaje ha subido en un 80% y por primera vez en un año la cantidad reciclada superó a la cantidad acumulada. Los plásticos, al tener un origen sintético, no se degradan naturalmente a corto plazo, llevando a su acumulación en el entorno. Así, se estima que en los océanos existen aproximadamente 268.000 toneladas de residuos plásticos. Este problema, junto con el encarecimiento del petróleo ha propiciado la búsqueda de nuevos materiales que sustituyan los plásticos, además de muchas propuestas de eliminación del plástico acumulado (Bravo, 2019; Eriksen et al., 2014; PlasticsEurope & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH, 2017).

Este trabajo, en inicio diseñado para ser experimental, tiene carácter de revisión bibliográfica y se enmarca en la línea de investigación que sus tutores desarrollan dentro del Grupo de Tecnologías del Medio Ambiente (TEP-181). En esta línea ya se han desarrollado trabajos previos experimentales como el Trabajo Fin de Máster del Máster Interuniversitario en Ingeniería Química de la Universidad de Cádiz titulado “*Estudio de un proceso de arranque para la selección de una microbiota adecuada destinada a la producción de polihidroxialcanoatos a partir de un inóculo de lodos mixtos de EDAR*” realizado por Gloria Bravo Porras en 2019, en el que se aborda una valoración preliminar del proceso sin incidir en la influencia de las principales variables de operación. El objeto

del presente trabajo, desarrollado bibliográficamente, es precisamente incidir en la influencia de estas variables.

Aunque se podría ampliar, el conjunto de variables seleccionadas por ser consideradas como las más importantes y que se abordan en este trabajo son el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto y la relación de nutrientes (C:N:P).

2. Objetivos.

El objeto inicial de este trabajo fin de master era el de realizar una serie de ensayos en reactores de laboratorio para averiguar las condiciones óptimas de operación del cultivo de una microbiota productora de polihidroxicanoatos, para maximizar la producción de estos plásticos. Para ello, se pretendía utilizar cosetas agotadas de remolacha (bagazos) como fuente lignocelulósica de carbono, siguiendo la línea de investigación previa del Grupo TEP-181.

Pero ante la imposibilidad de desarrollar los trabajos experimentales por las restricciones impuestas por causa de la enfermedad COVID-19, se optó por cambiar el carácter del trabajo al de revisión bibliográfica.

Para adaptar el objetivo al carácter bibliográfico, se redefinió el nuevo objeto manteniendo la misma idea central, pero ampliando el sustrato a utilizar (biomasa lignocelulósica). Así pues, el objeto de este trabajo es la búsqueda de información sobre procesos de producción de polihidroxicanoatos a partir de fuentes de carbono lignocelulósicas en general, no solo de cosetas de remolacha agotadas, de las que no hay prácticamente información previa, lo que justificaba la novedad del trabajo experimental, y realizar una síntesis de los valores experimentales ya existentes que se traducirá en una propuesta concreta para la optimización de las variables de proceso con el objetivo de maximizar la producción de PHAs.

3. Materiales y métodos en la búsqueda de información.

Para la búsqueda y tratamiento de la información necesaria para la realización de este trabajo se han utilizado dos motores de búsqueda de artículos científicos y diversos programas de gestión de referencias y edición de textos para la organización y tratamiento de la información encontrada.

3.1. Scopus®.

La herramienta predominante ha sido Scopus®, que ofrece una base de datos muy extendida en la comunidad científica y que cubre más de 24.000 títulos de más de 5.000 editores internacionales (Elsevier, 2020). Como motor de búsqueda ofrece múltiples opciones como la búsqueda por autores (incluyendo códigos ORCID), palabras clave, palabras del título y el abstract (resumen). También año de publicación y número de citas entre otras muchas opciones.

La búsqueda de información se ha realizado principalmente en inglés, ya que la mayoría de los artículos se encuentran en este idioma. En el momento de realización de este trabajo, al buscar usando el vocablo “PHA” Scopus® nos devuelve un total de 29.180 resultados (comprobado en julio de 2020). Podemos acotar estos resultados con otra palabra clave para encontrar información más concreta. Al introducir la palabra “bioplastic” la búsqueda se reduce a 704 artículos totales.

También se ha tenido en cuenta que el año de publicación sea relativamente cercano a la actualidad para que la información esté lo más actualizada posible. Además, tienen preferencia los artículos con mayor número de citas, que es un buen indicador de que la información que contiene es interesante. El acceso a la información suele estar limitado por una barrera de pago que exige cada revista que publica el artículo, pero la condición de estudiante universitario ha permitido el acceso a la mayoría de los artículos necesarios para elaborar este trabajo.

3.2. Google Scholar®.

Otro motor de búsqueda interesante es Google Scholar® o Google Académico®. Este software se ha utilizado de forma secundaria porque no ofrece una base de datos tan extensa ni con tantas opciones de búsqueda como Scopus®, pero presenta un manejo más intuitivo y es una buena alternativa para una búsqueda sencilla.

3.3. NCBI®.

NCBI® (National Center for Biotechnology Information) es una base de datos de recursos biotecnológicos de Estados Unidos. Comprende varias ramas como el NIH® (National Institute of Health), NLM® (National Library of Medicine) y HHS® (Health and Human Services).

NCBI[®] ofrece una serie de herramientas muy útiles para la redacción de trabajos de carácter químico y médico. PubChem[®] es una base de datos que permite conocer las propiedades estructurales, físicas y químicas, su actividad biológica y otras características de un gran número de moléculas. Es una base de datos en constante evolución, en el momento de redacción de este trabajo contaba con 103 millones de entradas de estructuras moleculares, 206 millones de entradas sobre actividad biológica y 31 millones de artículos científicos.

PubChem[®] Está orientado a las moléculas de menor tamaño, aunque también cuenta con nucleótidos y lípidos, glúcidos y otras macromoléculas. Para encontrar información sobre moléculas peptídicas hay otras herramientas más eficientes como la base de datos Protein que pone a disposición NCBI[®] desde su propio buscador.

Pubmed[®] es un buscador de artículos científicos similar a Scopus[®] y Google Scholar[®], está enfocado a los artículos científicos de carácter biomédico, por lo que su uso en este trabajo ha sido limitado.

3.4. PDB[®] y Expasy[®].

PDB[®] (Protein Data Bank) es una herramienta muy útil para la búsqueda de proteínas, es un buscador muy fácil de usar que devuelve información muy completa de la estructura, secuencia, función y demás características. En este trabajo se ha usado para buscar las polimerasas de PHAs.

De manera similar, Expasy[®] ofrece herramientas bioinformáticas para la información en algunos casos más detallada de la proteína que busquemos, aunque su uso se hace mucho menos intuitivo que el de PDB[®].

3.5. Mendeley[®].

El carácter bibliográfico del trabajo obliga un tratamiento cuidadoso de las referencias bibliográficas utilizadas de forma que la información se cite de forma correcta y estandarizada. Para ello, se ha seleccionado un programa gratuito y multiplataforma de gestión de referencias ampliamente utilizado: Mendeley[®]. A su carácter de gestor de referencias tradicional como base de datos, se le une la ventaja de su integración en los principales editores de texto (como Microsoft Word[®] que será utilizado a tal fin) y en los gestores de redes sociales científicas lo que permite la compartición rápida y versátil de

la información. Los artículos se han almacenado en Mendeley[®], un modo de biblioteca virtual que se puede compartir con los tutores de este trabajo y que permite crear citas bibliográficas de cada artículo en el editor de texto.

Para el procesamiento del texto e imágenes se ha utilizado el programa Microsoft Word[®] que es el software de este tipo de mayor extensión actualmente.

4. Producción de Polihidroxicanoatos y fuentes de carbono.

4.1. Definición de polihidroxicanoatos (PHAs), localización celular y uso de copolímeros.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros de origen biológico que son sintetizados por algunos microorganismos como sustancia de reserva en condiciones anóxicas, por falta de nutrientes o por exceso de carbono. Se caracterizan por tener unas características físico-químicas similares a los plásticos derivados del petróleo, aunque su precio de producción a día de hoy es más elevado (Bravo, 2019; González García et al., 2013; Marang et al., 2018; Reddy et al., 2003; Vroman & Tighzert, 2009).

Estos polímeros provienen de la unión de monómeros ácidos denominados hidroxicanoatos. Estos monómeros contienen un grupo carboxilo terminal y uno hidroxilo en posición beta respecto al carboxilo, como elementos funcionales pero el resto de la molécula es variable en extensión. En la Ilustración 2 se muestra la fórmula general de uno de los posibles monómeros, donde m es el número de carbonos de la cadena central del polímero, n el número de veces que se repite el monómero en el polímero y R el grupo prostético variable, muy importante porque va a determinar la naturaleza del polímero. En la tabla 1 podemos ver algunos ejemplos.

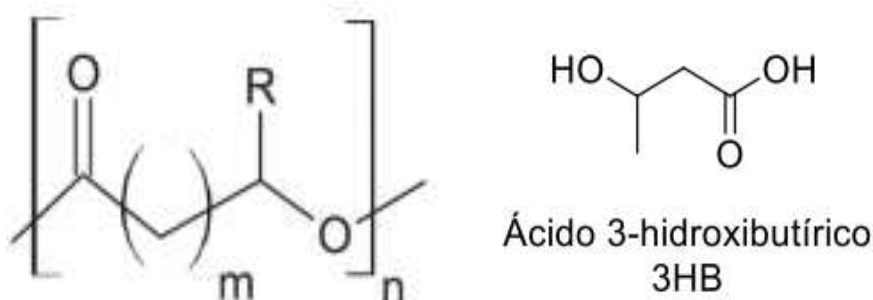


Ilustración 2. Esquematización de un monómero simple hidroxicanoico (Izquierda). Ejemplo de monómero Ácido 3-hidroxi-butírico, con un metilo como grupo R (Derecha) (Avila, 2016).

Nombre del monómero	m	Grupo R
Acido 3-hidroxiopropiónico	1	Hidrógeno
Acido 3-hidroxiбутírico	1	Metilo
Acido 3-hidroxiivalérico	1	Etilo
Acido 4-hidroxiбутírico	2	Hidrógeno
Acido 4- hidroxiivalérico	2	Metilo

Tabla 1. Varios monómeros ácidos hidroxialcanoico según el número de carbonos de la cadena (m) y el grupo prostético (R) (Avila, 2016; Carrasco et al., 2004).

Los PHAs son sustancias naturales que se encuentran en inclusiones celulares en algunos microorganismos que los generan a modo de sustancia de reserva. Su función principal es la de ser utilizados como fuente de carbono en condiciones adversas a través de un mecanismo de despolimerización enzimática. En la ilustración mostrada a continuación, se observa un esquema del proceso de polimerización y despolimerización de los PHAs como sustancia de reserva. (R)-hidroxialcanoil-CoA es el monómero que se unirá por esterificación a la cadena de PHA en el orgánulo de reserva por la acción de una enzima polimerizadora, perdiendo el grupo coenzima A. Una enzima despolimerizadora romperá los enlaces y liberará de nuevo los monómeros de ácido hidroxialcanoico que mediante una molécula Acil-CoA y consumo de ATP pasarán a ser (R)-hidroxialcanoil-CoA, de nuevo en condiciones normales. (Avila, 2016; Bravo, 2019; Reddy et al., 2003; Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

Dado que la formación de PHAs obedece a situaciones adversas, la estrategia seguida en los procesos de producción biotecnológica es la de mantener condiciones de estrés para que la bacteria solamente acumule PHA y no lo consuma. Estas condiciones de estrés se alcanzan, por ejemplo, limitando ciertos nutrientes en el medio de cultivo.

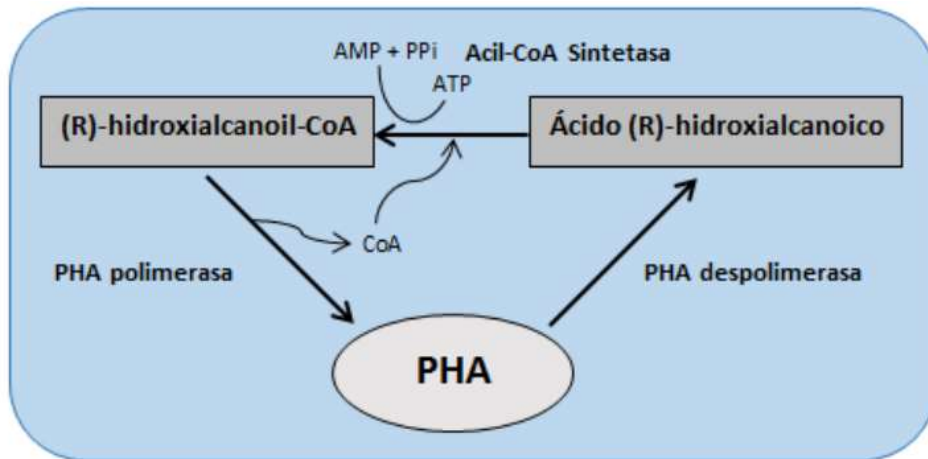


Ilustración 3. Esquematación del almacenamiento de PHAs y su uso como sustancia de reserva (Avila, 2016)

Estas inclusiones de PHAs llegan a representar hasta el 90% del peso seco de la célula en algunas especies concretas como *Cupriavidus necator* (anteriormente conocida como *Ralstonia eutropha* o *Wautersia eutropha*). Por ejemplo, Mozumder, Goormachtigh, et al., 2014 obtienen unos valores de producción de PHB de 21,6 g/L en una biomasa de concentración 30,7 g/L.

En otros muchos géneros la acumulación también es posible. Es por esta razón que se emplean una serie de especies que a nivel industrial han demostrado buenos resultados de producción y acumulación de PHAs a partir de fuentes de carbono relativamente poco costosas. Entre las especies más representativas podemos encontrar también *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp. K.*, *Paraccus denitrificans*, *Protomonas extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhizobium ORS571*, *Rhodospirillum rubrum*, *Caulobacter crescentus* y *E. coli* recombinante (con genes de *Cupriavidus necator*). Entre ellos *C. necator* es especialmente reconocida por su capacidad de acumular una alta tasa de peso seco como PHAs en medios nutritivos con sustratos relativamente simples como glucosa o fructosa diluida.

A continuación, se muestra una tabla con algunos de estos organismos y el correspondiente nutriente limitante utilizado para crear las condiciones de estrés necesarias para la producción de PHAs.

Espece	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	
<i>Ralstonia eutropha</i> (C. necátor)	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Tabla 2. Diferentes microorganismos productores de PHAs y su nutriente limitante (Lemos Delgado & Mina Córdoba, 2015)

También es importante destacar el tipo de cultivo que se va a emplear para sintetizar los PHAs. Este cultivo puede tener un carácter puro o mixto, dependiendo de si está compuesto de una sola especie bacteriana o varias. Inicialmente la producción de PHAs se hacía con cultivos monoespecíficos, pero a medida que se iba profundizando en este campo de estudio empezaron a surgir claras ineficiencias en el proceso. Mantener la esterilidad en los reactores es un proceso muy costoso. Los cultivos mixtos no tienen este problema, además tienen cierto rango de adaptabilidad a distintas fuentes de carbono, permitiendo el uso de compuestos más baratos como alimentación (como residuos de agricultura, por ejemplo), y son, por tanto, la alternativa más eficiente para la producción en gran escala. Los resultados obtenidos en el trabajo de Gloria Bravo Porras respaldan esta afirmación, ya que con el cultivo mixto que utiliza en su trabajo obtiene una producción considerable de PHAs (10-60 mg/L) con un tiempo hidráulico de residencia de 12,5 a 9 días. Los cultivos puros, por su parte, son útiles cuando se quiere obtener un tipo de copolímero específico que solo produzca una bacteria determinada (Bravo Porras, 2019; Laycock et al., 2013).

No todas las especies bacterianas productoras de PHAs son igual de importantes a escala industrial, puesto que cada una de ellas tiene sus propias necesidades nutricionales,

tiempo de crecimiento y capacidad de fermentación. Así, no existe una especie predominante en el uso industrial, sino que su uso viene determinado por las necesidades de producción dependiendo de sus características.

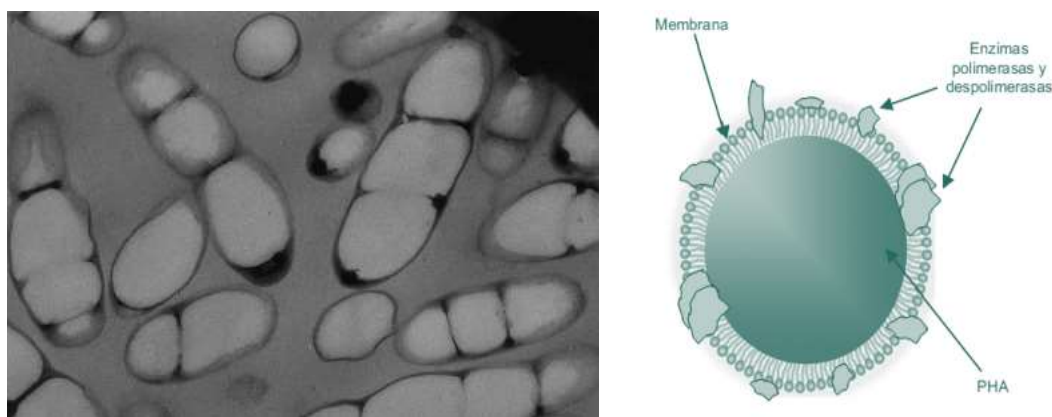


Ilustración 4. Inclusiones de PHA bajo el microscopio electrónico en *C. necator*. (izquierda). Esquematación de una inclusión de PHA (derecha) (Lemos Delgado & Mina Coroba, 2015; Chek et al., 2000).

Aunque hasta mediados de 1980 se pensaba que los PHAs se encontraban en estado cristalino en estas inclusiones, con posterioridad se demostró su carácter de polímero amorfo mediante estudios de RMN. Sin embargo, cuando la célula es sometida a daños en la membrana celular la masa polimérica se libera y cristaliza, llevando a pensar en los estudios anteriores que ese es el estado *in vivo* de las inclusiones. Esta cristalización no permitiría la acción de las enzimas despolimerizadoras, pero sería muy importante en la producción de bioplásticos. Una característica muy importante a tener en cuenta es que se pueden observar con la tinción SUDAN BLACK, lo cual demuestra su naturaleza lipídica (Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015; Avila, 2016; Eriksen et al., 2014; Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003; Sudesh et al., 2000).

Los PHAs se clasifican en homopolímeros o copolímeros según si sus monómeros constituyentes tienen la misma o distinta naturaleza, respectivamente. Según la longitud se pueden clasificar en polímeros de cadena corta, con un total de 3 a 5 átomos de carbono, de cadena media de 6 a 24 átomos de carbono y de cadena larga con más de 24 átomos de carbono. Las características estructurales de los plásticos generados con estos polímeros cambian según la longitud: los de cadena corta formarían plásticos rígidos y frágiles y los de cadena larga formarían plásticos más flexibles y maleables (Ana Carolina Lemos Delgado & Alexis Mina Cordoba, 2015; Eriksen et al., 2014).

Uno de los PHAs más usados en la industria es el poli-3-hidroxi- β -butirato (HB, PHB o P3HB), el cual *C. necator* es capaz de almacenar hasta en un 90% de su peso seco total.

El PHB se caracteriza por tener como grupo prostético un metilo. Las propiedades físicas del PHB se pueden comparar con el polipropileno, uno de los plásticos más tradicionales. Ambos polímeros mantienen semejanzas en sus valores de termolabilidad y cristalinidad, aunque el PHB es un material más débil, de mayor peso molecular y con una pobre resistencia ante solventes, pero con una mayor resistencia ante luz ultravioleta que el polipropileno.

Una estrategia para mejorar las características físicas del bioplástico es mediante la combinación de distintos PHAs para generar un copolímero artificial. El PHVB es un copolímero con un porcentaje de PHV (Polihidroxi- β -valerato, con grupo prostético etilo) del 20 al 25%, que presenta un punto de fusión menor (de 179°C a 139°C) que el PHB, lo que permite un rango de calentamiento para su fundición más amplio sin degradarse. Su temperatura de vitrificación (transición a vidrio) disminuye a -6°C, lo que permite su manejo en temperaturas más frías sin peligro de quebradura. También aumenta su flexibilidad, su resistencia a impactos y su capacidad de cristalización. En la tabla mostrada a continuación se observan las principales características del copolímero PHVB dependiendo del porcentaje de PHV. En líneas generales, se puede afirmar que en un copolímero PHVB la flexibilidad y resistencia de este aumentan a medida que lo hace el porcentaje de HV del mismo. La principal desventaja del PHVB para sustituir a los polímeros tradicionales es el coste de producción, que se sitúa entre 18-22 \$/kg de PHVB frente a los 0,7-1 \$/kg de polipropileno (Anjum et al., 2016; Carrasco et al., 2004; Laycock et al., 2014; S. Philip, 2007).

Porcentaje molar de HV (%)	Temperatura de fusión	Temperatura de transición vítrea (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Resistencia al impacto (J/m)
0	179	10	4,0	40	50
3	170	8	2,9	38	60
9	162	6	1,9	37	95
14	150	4	1,5	35	120
20	145	-1	1,2	32	200
25	137	-6	0,7	30	400

Tabla 3. Características físicas del PHVB dependiendo del porcentaje molar de PHV (Carrasco et al., 2004).

4.2. Síntesis enzimática de Polihidroxicanoatos.

La síntesis de PHAs se puede llevar a cabo de forma sintética o aprovechando el metabolismo de las bacterias que los producen. La producción química de estos compuestos se puede llevar a cabo mediante un proceso que implica la rotura de un anillo de β -lactona. Con este proceso tampoco se puede asegurar la distribución espacial correcta de los grupos funcionales unidos a la cadena, problema que no existe con la fermentación bacteriana. El proceso sintético resulta mucho más costoso y presenta más desventajas, por lo que no existe ninguna razón para plantearse esta vía, excepto en casos puntuales en los que las bacterias no puedan metabolizar de forma natural el polímero (Carrasco et al., 2004).

La síntesis biológica de PHAs la llevan a cabo muchos géneros de bacterias y la familia Halobacteriaceae de Archaeas, normalmente durante periodos de estrés nutricional. A partir de hidroxialcanoatos, una enzima de la familia de las PHA-polimerasas cataliza la síntesis de poliésteres, con la correspondiente salida del grupo coenzima A. Tanto las enzimas polimerasas como las despolimerasas se encuentran ancladas a la membrana lipídica de los gránulos de PHA en el citoplasma celular.

Es importante destacar que para la síntesis de PHAs no sirve cualquier fuente de carbono. A excepción del PHB que es un PHA simple que *C. necator* si puede sintetizar en masa a partir de sustratos simples, la mayoría de PHAs no pueden ser producidos a partir de fuentes de carbono de moléculas “simples” o del CO_2 . La estructura del sustrato de carbono que el organismo productor de PHA utiliza debe tener cierta similitud con el producto final. Los grupos prostéticos se deben encontrar en la fuente de carbono y por tanto se evita que la célula tenga que añadirlos con rutas paralelas, sino más bien realizar translocaciones dentro del esqueleto carbonáceo de la molécula. Para una producción masiva de otros PHA más grandes hay que tener en cuenta que la adición de estos sustratos más complejos es más cara y presenta más complicaciones en el proceso. Una alternativa para la producción masiva de PHA sería usar plantas transgénicas con los genes que codifiquen para la producción de PHAs provenientes de bacterias, utilizándose CO_2 como fuente renovable y barata de carbono. Se ha probado con éxito esta hipótesis en la producción de PHAs simples, para en un futuro conseguir la producción de PHAs más complejos (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

Las inclusiones insolubles de polímeros de carbono se sintetizan a modo de sustancia de reserva, hay hasta un total de 14 rutas de síntesis reconocidas hasta el momento para Hidroxialcanoil-CoA a partir de diversas fuentes de carbono (Chek et al., 2017).

A continuación, se presentan varias esquematizaciones con el proceso a partir de distintas fuentes de carbono.

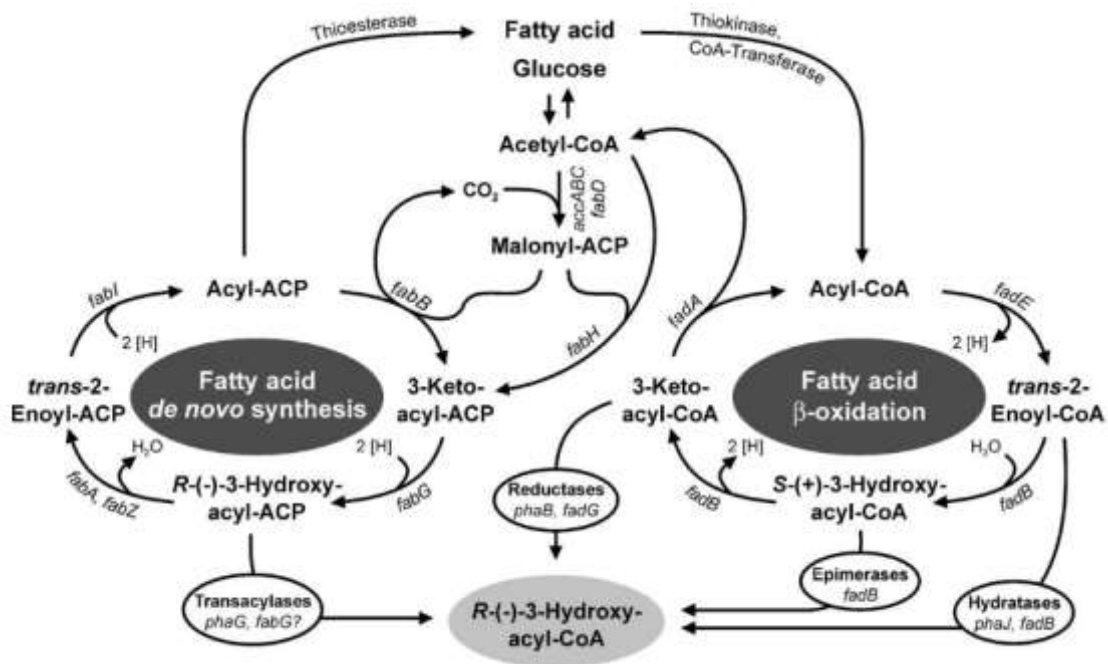


Ilustración 5. Conexión del metabolismo de ácidos grasos con la síntesis de Hidroxialcanoil-CoA para PHAs de cadena media en *Pseudomonas* (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

Esta ruta metabólica para la síntesis PHAs a partir de ácidos grasos es probablemente la más importante por sus aplicaciones en Biotecnología. Cuando fue demostrada por primera vez, abrió la posibilidad de la utilización de aceites provenientes de restos de agricultura para la síntesis de bioplásticos. El alto contenido en Acetil-CoA hace de estos aceites una fuente de carbono muy interesante (Poirier et al., 1995; Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

S. Philip et al., 2007 presentan una versión realmente interesante por incluir tres rutas principales, y las enzimas productoras de PHAs implicadas, en un solo esquema simple.

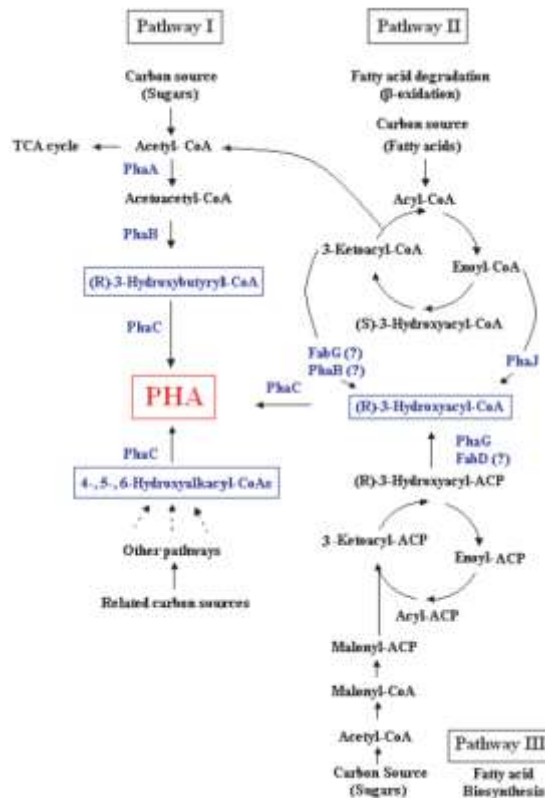


Ilustración 6. Esquemización de las tres rutas principales de producción de PHAs (S. Philip et al., 2007).

Bravo, 2019 utiliza un esquema similar a este basado en un artículo de Días et al. 2006. Este esquema que se muestra en la ilustración 7 es interesante porque ofrece una visión más simplificada, en la que se pueden observar los PHA que se pueden formar en esta ruta.

En la ilustración 8 se esquematiza las rutas metabólicas de la síntesis de PHAs de cadena corta a partir de carbohidratos como fuente de carbono. Aunque estas rutas metabólicas tengan distintas fuentes de carbono, al compararse se pueden observar los puntos comunes. En estas rutas se observa la conversión de la molécula Acetil-CoA a Hidroxibutiril-CoA, Hidroxivaleril-CoA o Hidroxiacil-CoA. Estos son los diferentes monómeros que serán polimerizados en la molécula final de PHA. A estos monómeros hace referencia la ilustración 2, y su naturaleza determinará que polímero de PHA final se forma.

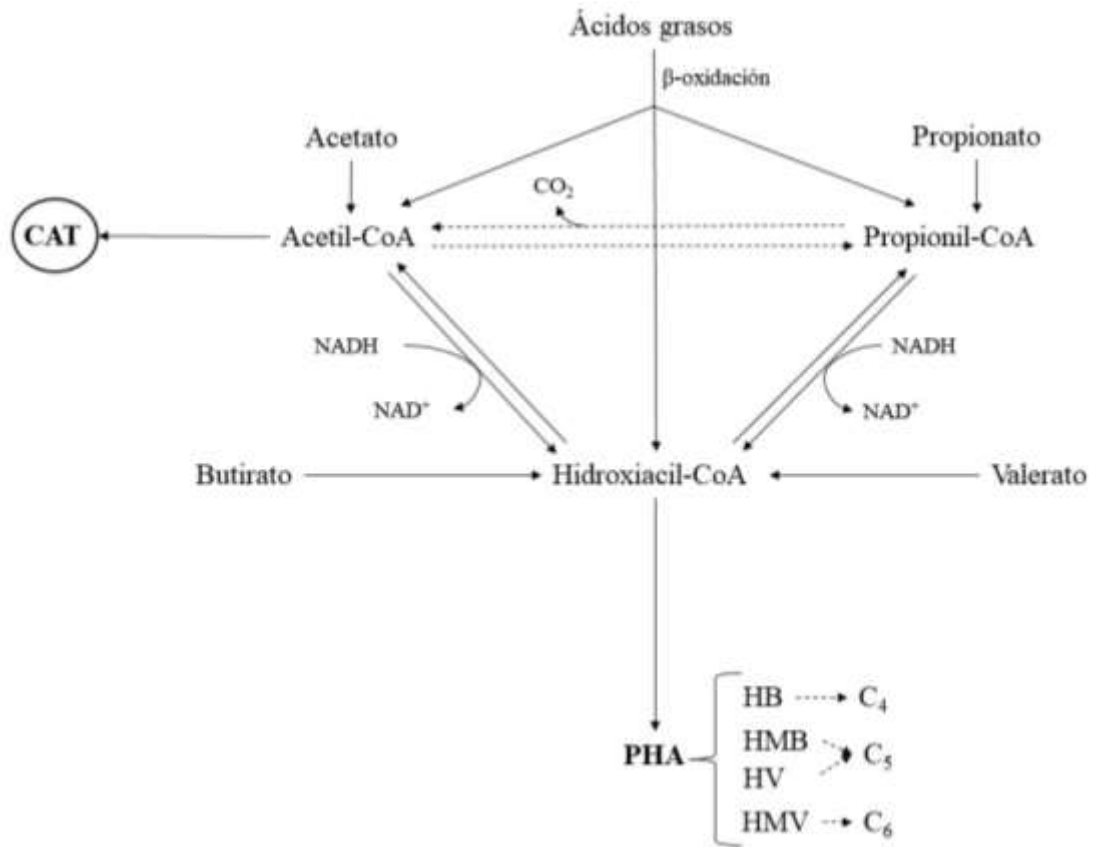


Ilustración 7. Esquema del metabolismo de PHA a partir de ácidos grasos (Bravo, 2019).

En el trabajo de Bravo, 2019 se ha optado por utilizar como fuente de carbono los ácidos grasos volátiles (VFA o AGV) obtenidos de los efluentes acidogénicos de procesos de digestión anaerobia a partir de biomasa lignocelulósica. Podemos observar la ruta que siguen dichos ácidos grasos en los esquemas anteriores.

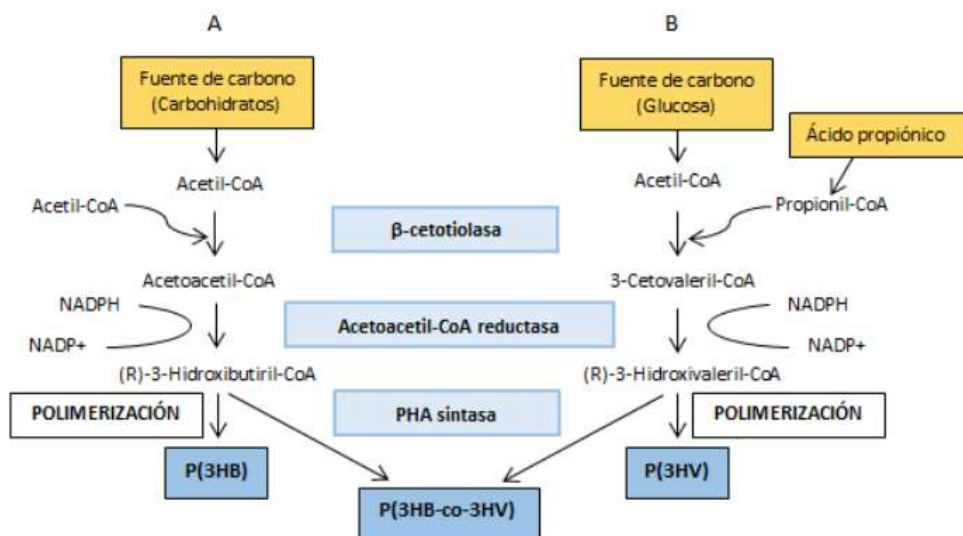


Ilustración 8. Síntesis de PHAs de cadena corta a partir de Carbohidratos (Avila, 2016)

4.3. Fuentes lignocelulósicas de carbono

El término lignocelulosa hace referencia a tres compuestos distintos: lignina, celulosa y hemicelulosa, que son los componentes mayoritarios de las maderas y las plantas herbáceas. La celulosa es uno de los polisacáridos más conocidos y es una de las moléculas de origen orgánico más abundantes. Constituye la mayoría del peso seco vegetal, hasta un 50% del total y es un polímero compuesto por subunidades de β -glucosa unidas en enlace 1-4 (Beguin & Aubert, 1993; Bobleter, 1994; Hendriks & Zeeman, 2009; Li, 2011).

La hemicelulosa es un polímero complejo compuesto por un esqueleto de monómeros de β -glucosa unidas en enlace 1-4 y además monómeros de xiloglucanos, xilanos (forman la madera dura) y glucomananos (madera blanda). Es un componente esencial de la pared celular vegetal y constituye un 25% del peso total. La molécula de hemicelulosa tiene menor peso molecular que la de celulosa, y cuenta con ramificaciones constituidas por los distintos glúcidos mencionados anteriormente, lo que hace que sea más susceptible a la hidrolización. Esta molécula sirve de unión entre el centro de celulosa y la lignina. (Bobleter, 1994; Ebringerová, 2005; Hendriks & Zeeman, 2009; Li, 2011; Scheller, 2010).

La lignina también es una molécula muy abundante de origen orgánico. Constituye el 20% del peso total y se encuentra en la pared celular y proporciona estabilidad estructural, impermeabilidad, defensa ante patógenos y resistencia a la oxidación. Es una molécula muy compleja que, a diferencia de las anteriores, no es un polisacárido sino un polímero aromático. Se encuentra formando una matriz alrededor de las fibrillas de celulosa y hemicelulosa que ofrece mucha resistencia a la hidrolización. Está formado de una serie de precursores aromáticos de distinta naturaleza, cuya composición y distribución va a determinar las características físicas de la madera. Este dato es importante porque, por ejemplo, en el caso de las maderas blandas la composición de la lignina es mayormente de guaiacol, mientras que en las maderas duras la composición es de guaiacol y siringol. El guaiacol es un componente que dificulta la acción (aunque no inhibe) de las enzimas celulasas, por lo que la elección de la fuente lignocelulósica de carbono se tiene que hacer teniendo en cuenta también este aspecto.

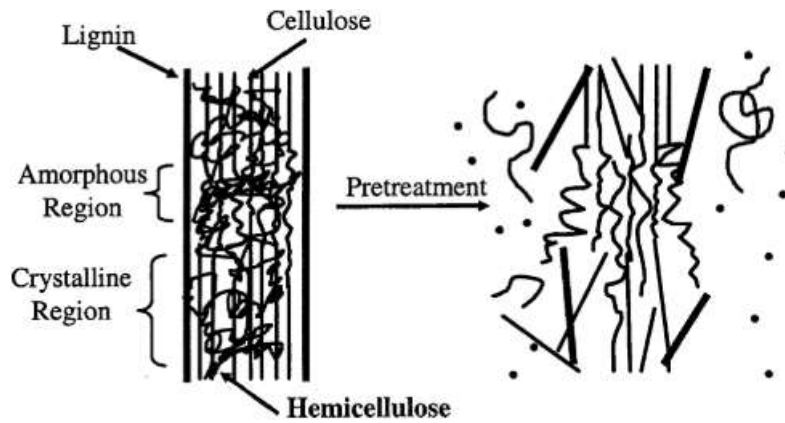


Ilustración 10. Esquema del pretratamiento de la masa lingocelulósica (Mosier et al., 2005)

A continuación, se citan una serie de pretratamientos que hacen que la celulosa contenida en la matriz lignocelulósica se más accesible para la hidrólisis enzimática. Estos pretratamientos pueden también tener un efecto de mayor o menor impacto en la cristalización de la celulosa, la solubilidad de la hemicelulosa y la lignina y la posible alteración de la composición de la lignina (Hendriks & Zeeman, 2009).

4.4.1. Pretratamiento mecánico.

En el pretratamiento mecánico la masa de lignocelulosa se tritura en fragmentos más pequeños mediante métodos físicos (Mata-Alvarez et al., 2000). Uno de los métodos que recomiendan distintos autores como Hendriks & Zeeman, 2009; Millett et al., 1980; Mosier et al., 2005 o Sun & Cheng, 2002 es la molienda con esferas de cristal. Esta molienda se puede producir en un medio seco o húmedo y mediante vibración o presión. Según Millett et al., 1980, el proceso que mejor resultados ofrece es el vibracional.

Palmowski, 1999, describe como la degradación del contenido en celulosa de la biomasa lignocelulósica es del 50% del total sin tratamiento mecánico y aumenta hasta en un 20% cuando se aplica la molienda. Otros artículos consultados hablan de distintos porcentajes y centran su evaluación en otros usos de la biomasa pretratada, como son la producción de biogás o de bioetanol. Pero todos los trabajos coinciden en que la molienda mecánica produce un aumento considerable de la velocidad y rendimiento de hidrólisis de la celulosa contenida en la matriz lignocelulósica.

Uno de los inconvenientes que presenta este método es que, para proceder a la molienda con esferas, el tamaño de partícula de la masa lignocelulósica tiene que ser de 10 a 30 mm, por lo que podría ser necesaria una fragmentación anterior. Otro inconveniente es la

energía que consume, que depende del tamaño de partícula inicial, pero que entre las dos moliendas necesarias podría hacerse demasiado costosa (Sun & Cheng, 2002).

Por último, cabe destacar que la combinación de un pretratamiento mecánico con otro de otra naturaleza no mejora la hidrólisis de la celulosa, a diferencia de lo que suele ocurrir con la combinación de distintos métodos químicos (Mata-Alvarez et al., 2000).

4.4.2. Pretratamiento térmico.

En el pretratamiento térmico se aplican altas temperaturas para solubilizar la hemicelulosa y la lignina y liberar la celulosa de la matriz. La solubilización de la hemicelulosa y la lignina empieza cuando se alcanzan temperaturas de 160°C y superiores.

Como medio para aplicar el calor se utiliza el agua, en forma líquida o de vapor. De esta manera, a este pretratamiento se le puede denominar hidrotermal. Como la transformación que se produce en la biomasa lignocelulósica es tanto estructural como química, no se puede decir que forme parte ni de los pretratamientos físicos ni de los químicos, sino que constituye su propia categoría (Kang et al., 2013; Laser et al., 2002).

La mayor ventaja de este método es que no es necesaria la adición de ninguna sustancia química, manteniendo el sustrato limpio y los contenedores para la hidrólisis posterior libres de corrosión. El pretratamiento con agua líquida con altas temperaturas es muy eficiente para eliminar la hemicelulosa y es muy poco invasivo para la celulosa, cuya pérdida es ínfima. Taherzadeh & Karimi, 2008 explican que la hemicelulosa se elimina completamente de un sustrato de maíz previamente desalmidonado a una temperatura de 220°C durante 2 minutos,.

El uso de vapor de agua como medio para la aplicación de altas temperaturas parece presentar claras desventajas con respecto al agua líquida. Laser et al., 2002 , estudiaron la producción de etanol a partir de cosetas de caña de azúcar con pretratamiento de agua caliente y compararon la eficiencia de este pretratamiento con el uso de vapor de agua. Los resultados indicaron que en la recuperación de azúcares como los xilanos, el pretratamiento con agua líquida presenta muchos mejores resultados, aunque ambos métodos mejoran la hidrólisis posterior de la celulosa.

Las condiciones óptimas para el pretratamiento hidrotermal con agua líquida según Laser et al., 2002, son de 220°C, pH 4,0, sólidos totales por debajo del 5% y tiempo hidráulico de residencia por debajo de 2 minutos.

La mayor desventaja de este pretratamiento es que elimina sobre todo hemicelulosa, por lo que es necesario secuenciarlo con otro pretratamiento de carácter químico (ácido, alcalino, etcétera) para la correcta eliminación de la lignina. Otro de los problemas más importantes de este pretratamiento es la reactividad de los componentes en los que se degrada la lignina, que, si no son retirados correctamente, pueden generar componentes tóxicos para el posterior cultivo microbiano. A modo de ejemplo, pueden citarse los furfurales y los ácidos acético, fórmico o levulínico, que son generados tanto en el pretratamiento con vapor como con agua caliente, y producen un porcentaje de inhibición de hasta el 89% si la concentración es de 0,15 g/L o más (Chandra et al., 2007; Laser et al., 2002).

Con la utilización de agua líquida Laser et al., 2002, estimaron que se produce hasta un 96% de inhibición de la fermentación de la glucosa cuando se alcanzan temperaturas de 220°C durante 2 minutos, si la concentración de sólidos era menor del 3%. Por encima de este porcentaje no se observó inhibición para los mismos parámetros. En cuanto a los pretratamientos con vapor, dos de cuatro ensayos presentaron inhibición completa en temperaturas de 200-220°C en un periodo de 2-10 minutos.

4.4.3. Pretratamiento ácido.

El pretratamiento ácido consiste en el uso de compuestos de bajo pH como el ácido clorhídrico diluido, ácido sulfúrico diluido o ácido fosfórico diluido (Bobleter, 1994; Taherzadeh & Karimi, 2008). Este pretratamiento, de carácter químico, tiene el objetivo de solubilizar la lignina y la hemicelulosa atacando los enlaces glucosídicos, para hacer más accesible a la celulosa para las enzimas de la hidrólisis. El ácido usado en este pretratamiento puede ser diluido en agua o ser puro. Normalmente para este tipo de procesos se usa ácido diluido ya que el ácido puro puede resultar muy agresivo, degradando el contenido en celulosa y generando una mayor concentración de inhibidores para la etapa de hidrólisis posterior (Alvira et al., 2010; S. Sun et al., 2016)

Al usar ácidos diluidos, se acompaña el proceso con altas temperaturas. Con ácido sulfúrico diluido la temperatura se establece entre los 100 y 200°C y el porcentaje de dilución entre 0,5 y 2,5% (Hendriks & Zeeman, 2009; S. Sun et al., 2016).

Hernández et al., 2013 llevaron a cabo el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre frutos secados y molidos de *Moringa oleífera*, alcanzando un 87% de recuperación de la celulosa total. García et al., 2014 aplica también este pretratamiento en frutos de *Jatropha curcas*, consiguiendo un porcentaje de recuperación de celulosa del 80%.

El pretratamiento descrito se centra en la eliminación de la hemicelulosa. Para la eliminación de la lignina en profundidad es conveniente usar ácidos orgánicos como el acético, fórmico, málico, propiónico... etcétera. Así, para la deslignificación en *Miscanthus x giganteus*, Vanderghem et al., 2012 se ha utilizado una mezcla de ácido propiónico, ácido acético y agua en proporción 40/40/20, con una temperatura de 107°C durante 3 horas. El porcentaje de lignina solubilizada fue del 79,6% con un porcentaje de recuperación de celulosa del 75,3%.

Durante este pretratamiento también se forman componentes potencialmente tóxicos e inhibitorios para la actividad de las enzimas de la hidrólisis de la celulosa, como los mencionados en el apartado anterior (Hendriks & Zeeman, 2009).

4.4.4. Pretratamiento alcalino.

El pretratamiento alcalino se basa en el uso de compuestos de pH elevado como el NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ o NH₄OH. Este pretratamiento es muy efectivo para la eliminación de los enlaces de monómeros de lignina y hemicelulosa, solubilizándolas. A diferencia de otros pretratamientos, este se puede realizar a temperaturas bajas llegando a ser incluso más efectivo para la recuperación de celulosa que a temperaturas altas (Alvira et al., 2010; S. Sun et al., 2016). Zhao et al., 2008 estudiaron la eficiencia pretratamiento alcalino en madera de picea (*Picea*, género de *Pinaceae*), previamente reducida a pequeños fragmentos, a tres temperaturas diferentes: -15°C, 23°C y 60°C. Los resultados que obtuvieron demuestran que este pretratamiento es mucho más efectivo en temperaturas bajas, en combinación con urea, obteniéndose hasta un 60% de recuperación de glucosa tras la hidrólisis posterior. Estos resultados se observan en la siguiente ilustración.

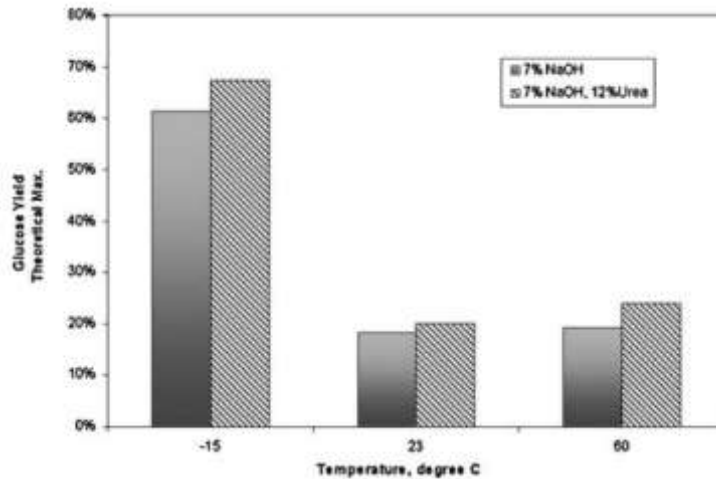


Ilustración 11. Porcentaje de recuperación de glucosa tras la hidrolización de la celulosa obtenida tras el pretratamiento alcalino a distintas temperaturas (Zhao et al., 2008).

En este pretratamiento, al igual que ocurre con el pretratamiento ácido, es conveniente diluir el agente alcalino. Zhao et al., 2008 diluyeron el NaOH en agua a concentraciones de: 1%, 2%, 3%, 7% y 12%. Cuando combinaron el NaOH con urea las concentraciones fueron de: 1%, 3% y 7% de NaOH y 12% de urea en todos los casos.

A altas temperaturas, este pretratamiento es el que mejores resultados proporciona para la eliminación de lignina, especialmente para residuos de plantas de agricultura más que en maderas (S. Sun et al., 2016; Taherzadeh & Karimi, 2008). Haque et al., 2012 estudiaron la eficiencia del pretratamiento alcalino en restos de cebada (*Hordeum vulgare*) previamente reducidos a pequeños fragmentos (0,25 milímetros). Las condiciones de operación del pretratamiento fueron de: NaOH al 2%, 105°C y 10 minutos de tiempo hidráulico de residencia. El porcentaje de eliminación de lignina fue de 84,8%, de hemicelulosa 79,5% y el porcentaje de recuperación de celulosa fue de 86,5%.

El CaOH es un agente alcalino comúnmente usado para este tipo de pretratamientos, por detrás del NaOH. Aunque presenta resultados por lo general algo peores que el NaOH, su uso es menos costoso y deja menos residuos (Hendriks & Zeeman, 2009; S. Sun et al., 2016).

Con estos resultados, este pretratamiento se convierte en uno de los más interesantes para este trabajo si el sustrato lignocelulósico fuera rico en lignina.

4.4.5. Pretratamiento oxidativo.

El pretratamiento oxidativo se basa en el uso de agentes oxidantes como catalizadores para el tratamiento de la biomasa lignocelulósica. Entre estos catalizadores se encuentran: O₂, O₃, H₂O₂, ClO₂, NaClO y Cl₂. Es un proceso muy utilizado en la industria del papel para el blanqueamiento de la pulpa de madera, pero como el contenido en lignina disminuye drásticamente, es interesante para procesos que hagan uso de la celulosa, como la hidrólisis. En la bibliografía, al uso de O₃ como agente oxidativo se le nombra como ozonólisis, a veces dándole su propia categoría como pretratamiento, pero como sigue siendo una oxidación química se ha considerado adecuado incluirlo en este epígrafe (Alvira et al., 2010; S. Sun et al., 2016; Y. Sun & Cheng, 2002).

García-Cubero et al., 2009 realizaron un estudio sobre el efecto de la ozonólisis en trigo (*Triticum spp*) y cebada (*Secale cereale*) para ver si mejoraba la eficiencia de la hidrólisis posterior. Las muestras de trigo y cebada fueron reducidas a fragmentos de <1mm, 3mm y 5mm. Estos fragmentos, hidratados con agua al máximo, fueron expuestos a una corriente de aire y ozono (60 l/h) a temperatura ambiente en un tiempo de mínimo 2,5 horas. Tras esto se secaron a 45°C y se almacenaron en un congelador para su análisis. Los resultados obtenidos mostraron que en el trigo la eficiencia de la hidrólisis del contenido celulósico aumentaba del 29% sin pretratamiento al 53-88,6% tras la ozonólisis. En el caso de la cebada, la eficiencia de la hidrólisis era del 16% sin pretratamiento, y aumenta hasta el 36-57% tras éste. En cuanto a la lignina, la cantidad se redujo considerablemente. En el caso del trigo se redujo de un 17,1% del peso total a un 13,5-11,2%. En el caso de la cebada se redujo de un 22,1% a un 18,3-12,1%.

La aplicación de otros agentes oxidantes se realiza de forma similar, en forma de gas o disueltos en agua (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Debido a que este pretratamiento se suele realizar en temperaturas bajas, no se producen tóxicos inhibitorios para la hidrólisis posterior (S. Sun et al., 2016).

Este pretratamiento, aunque efectivo y respetuoso con la celulosa, puede ser demasiado caro debido a las enormes cantidades de ozono que se necesita. También se muestra inefectivo en su combinación con pretratamientos alcalinos, como con el NaOH, aunque puede usarse como segundo pretratamiento, para la eliminación de la lignina residual (Alvira et al., 2010; García-Cubero et al., 2009; Mosier et al., 2005).

4.4.6. Otros pretratamientos.

Entre otros pretratamientos interesantes se incluyen: irradiación, biológico y “organosolv”.

- Las técnicas de pretratamiento mediante irradiación se incluyen dentro de la categoría de mecánicas. Consiste en la irradiación de un haz energético sobre la superficie de la masa lignocelulósica. Esta técnica puede tener un porcentaje de recuperación de celulosa alto y mejorar la hidrólisis posterior, pero puede ser muy invasiva. Por encima de 100 MR (MegaRoetgen) los anillos de glucosa que forman la celulosa se descomponen. Esta técnica, aunque se puede combinar con otras de naturaleza química, da mejores resultados cuando se aplica de forma independiente (Alvira et al., 2010).
- En el pretratamiento biológico se crecen organismos vivos en la biomasa lignocelulósica, en su mayoría hongos microscópicos y bacterias. El hongo *Phanaerochaete chrysosporium* es uno de los pocos capaz de realizar una deslignificación completa. Otro hongo importante es *Trichoderma reesei*. Por regla general, en este pretratamiento se usan Actinomicetos (Bacterias), que no consiguen una degradación completa de la lignina, pero sí que consiguen una accesibilidad óptima al núcleo de celulosa para las enzimas de la posterior etapa de hidrólisis. La ventaja de este pretratamiento son las bajas necesidades de mantenimiento, la hidrólisis parcial de hemicelulosa y la reducción de la polimerización de la celulosa. La mayor desventaja es que comparado con el resto de los pretratamientos, la mejora del rendimiento de hidrólisis posterior de la celulosa es mucho menor (Alvira et al., 2010; Cellulaire, 1994; Taherzadeh & Karimi, 2008).
- El pretratamiento “organosolv” se basa en el uso de un disolvente orgánico como el metanol, el etanol o la acetona para solubilizar la lignina y hacer más accesible la celulosa para la hidrólisis. Entre las ventajas que presenta está la total recuperación de la lignina y del disolvente. La mejora de rendimiento de la hidrólisis es bastante alta, y además este proceso devuelve la fracción de celulosa de la biomasa lignocelulósica con una pureza bastante alta. Entre las desventajas, destacar el enorme gasto de energía y las condiciones de seguridad que este pretratamiento requiere debido a la inflamabilidad de los compuestos. Además, estos disolventes son inhibitorios de la actividad de las enzimas de la hidrólisis

posterior. En definitiva, este pretratamiento solo es interesante si se va a hacer un uso de la lignina recuperada (Alvira et al., 2010; Taherzadeh & Karimi, 2008; X. Zhao et al., 2009).

4.4.7. Elección del pretratamiento.

No existe un pretratamiento que presente ventajas sobre los demás en todos los aspectos. Para la elección del pretratamiento se debe hacer teniendo en cuenta las características de la biomasa utilizada, las posibilidades económicas y el objetivo final del proceso. Siguiendo el trabajo previo, se usan cosetas agotadas de remolacha como fuente de lignocelulosa por lo que los pretratamientos a elegir serían el mecánico o una combinación de hidrotermal y alcalino o ácido. El pretratamiento mecánico es eficaz, sencillo y económico, aspecto muy importante teniendo en cuenta que uno de los objetivos es el abaratamiento del proceso. Por otra parte, requiere de una reducción previa del material y no es combinable con otros pretratamientos, por lo que su rango de mejora es muy reducido. El tratamiento hidrotermal es económico y tiene buenos resultados de recuperación de la celulosa, pero no degrada bien la lignina. Por lo que una combinación de este pretratamiento con uno ácido o alcalino resultaría eficiente.

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Mecánico	<ul style="list-style-type: none"> • Económico • No genera compuestos tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> • No es combinable
Térmico	<ul style="list-style-type: none"> • Económico 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede degradar la celulosa • Genera compuestos tóxicos
Ácido	<ul style="list-style-type: none"> • Buena eliminación de lignina y hemicelulosa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Genera compuestos tóxicos
Alcalino	<ul style="list-style-type: none"> • El mejor para eliminación de lignina • Temperatura baja 	<ul style="list-style-type: none"> • Genera compuestos tóxicos
Oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> • No genera compuestos tóxicos • Temperatura baja 	<ul style="list-style-type: none"> • Caro • No es combinable

Tabla 4. Resumen de las ventajas e inconvenientes de los distintos pretratamientos.

4.5. Producción de Polihidroxialcanoatos.

A grandes rasgos, se pueden diferenciar tres etapas en el proceso de producción de PHA mediante cultivo bacteriano. Una primera etapa de fermentación en la que se acumulan los PHA por la limitación de algún nutriente y un exceso de la fuente de carbono en el medio de cultivo, una segunda de extracción de los PHA de la biomasa seca y una etapa final de purificación del polímero (Avila, 2016).

En la primera etapa de fermentación la fuente de carbono es utilizada por el cultivo microbiano y la cantidad de biomasa aumenta.

En el trabajo realizado con anterioridad por Gloria Bravo Porras, dicha fuente de carbono fueron ácidos grasos volátiles procedentes como efluente de la acidogénesis de un reactor con un cultivo microbiano acidogénico. Se acoplaron secuencialmente dos reactores semicontinuos, uno anaerobio y otro anóxico/aerobio. El reactor anaerobio realizaba una acidogénesis a partir de cosetas de remolacha previamente trituradas. Este reactor contaba con un microbiota capaz de producir ácidos grasos volátiles tales como el ácido acético, butírico, valérico o propiónico, entre otros. Por otro lado, de este reactor también producía biohidrógeno como producto de la acidogénesis. El segundo reactor fue inoculado con un cultivo procedente de lodos de EDAR, y bajo condiciones de aireación intermitente a intervalos de 24 horas producía PHAs a partir de los ácidos grasos volátiles procedentes del reactor anterior. La intermitencia en el suministro del oxígeno ha sido descrita como una de las formas de estresar a los microorganismos productores de PHAs. Éste es, por tanto, un método de cultivo mixto en dos etapas, esquematizado en la ilustración 10 (Avila, 2016; Bravo, 2019; Shen et al., 2014).

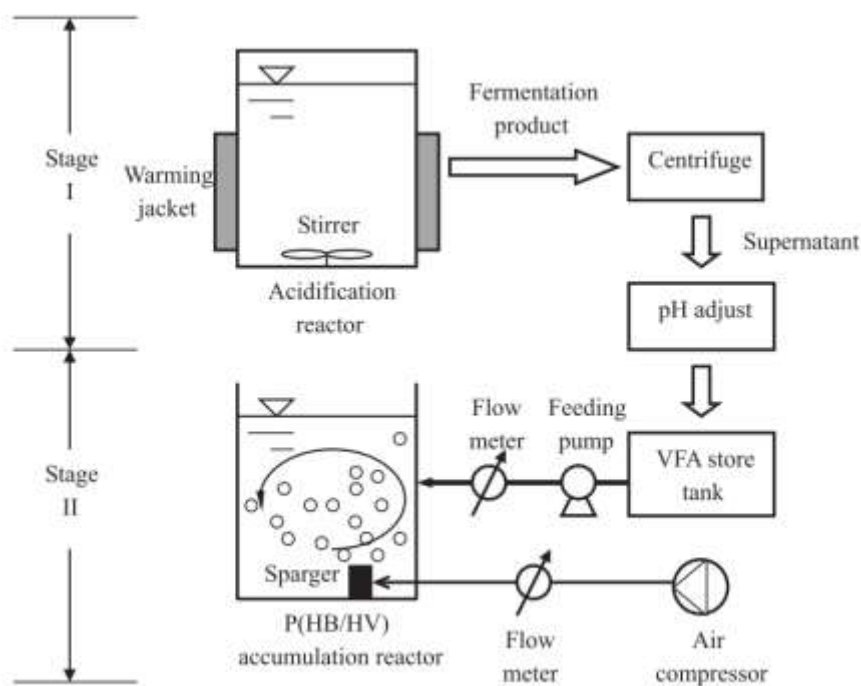


Ilustración 12. Esquematación del proceso de dos etapas de la producción de PHAs (Shen et al., 2014).

Pero este no es un procedimiento fijo. Aunque la producción de PHAs en dos etapas es la forma más común, también se han encontrado ejemplos de producción en una sola etapa y en reactores continuos. Albuquerque et al., 2011 establecen un reactor continuo acidogénico y de fermentación. Concluyeron que, junto a un régimen de alimentación continua, la producción de hidroxivalerato aumentaba en un 8%. Huang et al., 2017 utiliza un método de tres reactores, el primero de ellos con un régimen de alimentación festín-carestía y los dos siguientes (ya con la microbiota productora de PHAs seleccionada) con alimentación continua. Del último de los reactores sale un efluente que llega al segundo de ellos, con el objetivo de que la regulación del pH se haga de forma autónoma. La conclusión de este artículo es que se puede llegar a un equilibrio del pH automático, lo que reduciría costes.

El régimen de alimentación del reactor es un punto clave en la producción de PHAs. Existen varias estrategias para suministrar la fuente de carbono al cultivo microbiano. Entre estas estrategias se destaca la de festín-carestía. Las estrategias que se basan en la limitación del oxígeno también son importantes, aunque de uso menos común: la estrategia aerobio-microaerofílico minimiza el suministro de oxígeno en la segunda fase, mientras que la estrategia óxico-anóxica elimina completamente el suministro de oxígeno en la segunda fase. Como se ha explicado anteriormente, la limitación de nutrientes

favorece la acumulación de PHAs y las estrategias de alimentación se basan en este hecho (Bravo, 2019; Huschner et al., 2015).

La estrategia festín-carestía (*feast-famine*) se basa en la disponibilidad intermitente de nutrientes, ya sea carbono o nitrógeno. A esta estrategia también se le denomina de alimentación aeróbica dinámica (ADF). Durante la etapa de festín, donde se suministra nutrientes de sobra, el cultivo microbiano almacena el sustrato intracelularmente. Durante la etapa de hambruna o carestía, el cultivo microbiano utiliza este almacén de nutrientes para crear sustancias de reserva, en este caso PHAs. Este proceso se repite durante varios ciclos, cuya duración se determina para cada cultivo microbiano. Esta estrategia alcanza cotas de producción de PHAs realmente altas, hasta el 90% del peso seco celular (Bravo, 2019; Cui et al., 2016; Kedia et al., 2014; Madison & Huisman, 1999).

4.5.1. Extracción de PHAs.

Por último, se procede a la etapa de recuperación y purificación de los gránulos de PHAs. Antes de extraerlos, se pueden realizar pretratamientos sobre la masa microbiana para hacer más accesible los PHAs acumulados al disolvente. Uno de los métodos que describe Samorì et al., 2015 incluye varios pretratamientos para tal fin. Uno de ellos es utilizar un molino de bolas, con pequeñas esferas de 1 gramo y 0.5 mm de diámetro, que mediante movimiento pulverizan el cultivo de masa microbiana. En este proceso se disponen 100 gramos de masa en una suspensión acuosa de 5 mililitros y se administran con un sonicador ultrasónico 10 pulsos de 2 minutos de duración cada uno. Tras este paso se quitan las esferas de cristal y se centrifuga la suspensión microbiana a 4.000 rpm, lo que separa las fases acuosa y gelatinosa (definida como “slurry” en el artículo). De esta fase gelatinosa se extraen los PHAs con un disolvente orgánico. Entre otros pretratamientos previos a la extracción están el uso de agentes químicos ácidos o alcalinos.

Uno de los disolventes más usados en la extracción de PHAs es el hexano. Martino et al., 2014 utilizan hexano junto a agua en una concentración 1:1 para extraer los gránulos de PHAs del cultivo alimentado con una mezcla de aceites. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. Los pellets resultantes se lavaron con agua desionizada y fueron liofilizados.

López-Abelairas et al., 2015 estudiaron la separación de los gránulos de PHB de un cultivo de *C. necator* H16 utilizando varios agentes químicos: cloroformo (CHCl₃), NaOH, NaOCl (con o sin diclorometano) o ácidos como el H₂SO₄. Primero, redujeron el tamaño de la biomasa con una batidora, de forma similar a la explicada anteriormente. La pulpa resultante era tratada con los compuestos mencionados y el precipitado sólido separado.

Para la cuantificación del polímero se usa cromatografía de gases. López-Abelairas et al., 2015 dispusieron las muestras resultantes del proceso anterior en una solución de metanol, cloroformo y ácido sulfúrico. A esta solución se le realizó una cromatografía de gases usando una curva de calibración para PHB ya determinada.

Para determinar la pureza de PHAs en la muestra y el porcentaje de recuperación en base a la muestra inicial se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Peso del polímero}}{\text{Peso total de la muestra}} * 100$$

$$\text{Porcentaje de recuperación (\%)} = \frac{P_f * P_{uf}}{P_i * P_{ui}}$$

Donde Pf = peso seco tras la recuperación, Puf= pureza del sólido tras la recuperación, Pi= peso seco inicial y Pui= pureza del sólido inicial.

4.6. Influencia de las condiciones de operación.

4.6.1. pH.

El pH es una de las variables más importantes en el diseño del proceso de producción de PHAs, puesto que va a determinar el tipo de microbiota que predomina, tanto en el reactor de hidrólisis (o acidogénesis) de la biomasa lignocelulósica, como en la obtención del biopolímero a partir de los efluentes del reactor anterior. El proceso que se va a llevar a cabo en el primer reactor es una acidogénesis para producir ácidos grasos volátiles a partir de varias fuentes lignocelulósicas, por lo que un pH ácido favorecerá la actuación de bacterias acidogénicas. En el trabajo previo realizado en el grupo de investigación, utilizando como sustrato cosetas de remolacha azucarera agotada, se mantuvo un pH entre 5-6 durante los 526 días de experimentación, regulándose con K₂CO₃ como agente alcalino cuando fue necesario. Según Y. Sun & Cheng, 2002 la hidrólisis de la celulosa ocurre a un pH de 4,8, aunque este valor no tiene en cuenta las condiciones óptimas del

cultivo microbiano mixto para la posterior producción de PHAs. Cuando hablamos de pH nos referimos al óptimo de condiciones de vida del cultivo microbiano y no al de la reacción enzimática asociada a la transformación química, aunque normalmente estos dos valores sean parecidos. Tal y como veremos a continuación, los valores óptimos de pH varían para cada especie bacteriana.

H. Chen et al., 2013 llevaron a cabo la etapa de acidogénesis a diferentes valores de pH para un cultivo microbiano mixto proveniente de lodos activados. Se realizaron diferentes ensayos con pH en valores de 5, 7, 9 y 11.

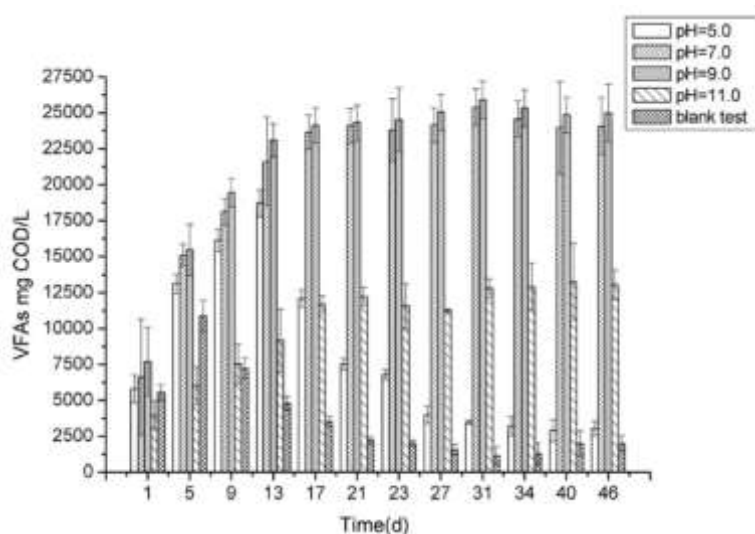


Ilustración 13. concentración de AGVs a lo largo del tiempo en ensayos con diferentes valores de pH (H. Chen et al., 2013).

Tal y como se observa en la imagen 13, los valores de productividad máxima se obtuvieron en el rango de pH 7-9 con poca variación entre ambos.

Otra de las conclusiones que sacaron de este trabajo es que la combinación de fuentes de carbono puede resultar en una mayor productividad de AGV. Así, se consigue hasta un 88% de metabolización total del sustrato cuando se combina aguas residuales y residuos de comida.

Qu & Liu, 2009 llevaron a cabo un estudio de las condiciones óptimas de operación en un cultivo mixto proveniente de lodos activados alimentado bajo un régimen de festín-carestía. El sistema era de dos fases en ciclos de 6 horas, con capacidad de 2 litros, de los cuales 1 litro era administrado y retirado en cada ciclo, resultando en un tiempo hidráulico de residencia de 12 horas. Durante los 7 días de experimentación, el pH se mantuvo sin necesidad de establecer un control, mientras que el oxígeno disuelto se

mantuvo constante. Por otra parte, se realizaron otros ensayos controlando los valores de pH (mediante la adición de HCl o NaOH) y los resultados obtenidos demostraron que el cultivo podía soportar un aumento del pH hasta un valor de 10, pero una disminución hasta 6 produce inhibición por acidez. Adicionalmente, se concluyó que el pH tiene poco impacto en la producción de PHB, ya que en los rangos de 7-10 la concentración no cambió y la acumulación de PHA máxima se alcanzaba sin necesidad de control de pH.

Kedia et al., 2014 también estudiaron la influencia del pH en el régimen de alimentación con un cultivo de *C. necator*. Utilizaron ácidos grasos volátiles como fuente de carbono, ácido butírico y acético concretamente. Concluyeron que un régimen de alimentación en continuo, basado en los niveles de pH, resultaba en una producción de PHAs mucho más alta que un régimen de alimentación por cargas o discontinuo en el que todo el sustrato era suministrado al principio. En el ensayo en discontinuo, en el que los ácidos grasos volátiles fueron suministrados en su totalidad al principio, solo el 18% de ácido acético y el 12% de ácido butírico fueron consumidos y la producción de PHAs fue del 65% del peso total o menor. En el segundo ensayo se tuvo en cuenta el pH óptimo de *C. necator* para la producción de PHAs, que es 6,9-7,1. El suministro de ácidos grasos volátiles se hizo de forma continua, a la vez que también se suministraba NaOH 5M para controlar el pH a estos niveles. Aunque el consumo de ácido butírico es un poco más lento que el de ácido acético, para ambos se alcanza el máximo de producción de PHAs más rápido que con un régimen de alimentación sin control de pH. Kourmentza & Kornaros, 2016 confirman el valor de 6,9 como pH óptimo durante la etapa de fermentación. Aunque en este caso se utilizó un cultivo mixto, este pH resultó en la mayor velocidad de producción de PHB.

Hay que tener en cuenta también que, durante la acidogénesis, el pH afecta la composición de los AGV que se forman. Como se ha mencionado anteriormente, la estructura molecular de los compuestos que se suministran como fuente de carbono durante la etapa de acumulación de PHAs va a ser determinante de la naturaleza de dichos PHAs. Por tanto, el pH no solo es importante para seleccionar bacterias acidogénicas, sino que también va a influir en la naturaleza de los PHAs resultantes. (Kourmentza & Kornaros, 2016) y, por ende, en las características funcionales del polímero final.

Tsuge et al., 2001 consiguieron una producción de PHB de 1,30 g/L*h empleando una estrategia basada en cambios en el intervalo de alimentación según los niveles de pH. Para ello se dispuso un pH-metro en contacto constante con el cultivo microbiano *C.*

necator, empleando como sustrato una mezcla de ácidos orgánicos, entre ellos acetato y lactato. Como se sabe de trabajos previos, superar el rango de tolerancia de pH de los microorganismos que componen el cultivo conlleva a una reducción en la producción de PHAs, o incluso a la inhibición. El pH-metro estaba conectado a un ordenador que controlaba el suministro del sustrato al cultivo. Cuando el sustrato se iba consumiendo, el pH se volvía más alcalino, de modo que cuando era superior a 7 se volvía a suministrar el sustrato. Al mismo tiempo se iba documentando a qué velocidad se consumía el sustrato, para conocer a qué pH la producción de PHB era más eficiente. Determinaron que el óptimo estaba a pH 7 con un aumento de la producción del 5%. Este sistema es especialmente útil cuando se usa una mezcla de ácidos grasos como sustrato, ya que el control del pH en estos casos se hace muy difícil. No obstante, según también estos mismos autores, para cultivos con especies muy sensibles a los cambios de pH no es recomendable y establecer un intervalo de alimentación sigue siendo recomendable.

4.6.2. Temperatura.

En cuanto a la temperatura, en el trabajo previo del grupo de investigación ya citado de Bravo, 2019 se trabajó en régimen termofílico (55°C) ya que se demostró como óptima en estudios anteriores para la acidogénesis. Según Y. Sun & Cheng, 2002 para la hidrólisis de la celulosa es necesario una temperatura de entre 45-50°C. Sin embargo, en muchos otros artículos la temperatura que se establece se encuentra en el rango de los 20-25°C. Esta disparidad se debe a que, tal y como ocurre con el pH, la temperatura va a depender de cada especie bacteriana. Por regla general a medida que la temperatura aumenta por encima del rango óptimo, la producción de PHAs disminuye. Esto se debe a que se favorece el crecimiento celular en oposición a la acumulación de sustancias de reserva (Krishna & Van Loosdrecht, 1999; Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004).

Krishna & Van Loosdrecht, 1999 estudiaron el efecto que tienen los cambios de temperatura en un cultivo mixto procedente de lodos activos para la producción de PHAs. Se establecieron 5 ensayos con temperaturas distintas: 15, 20, 25, 30 y 35°C.

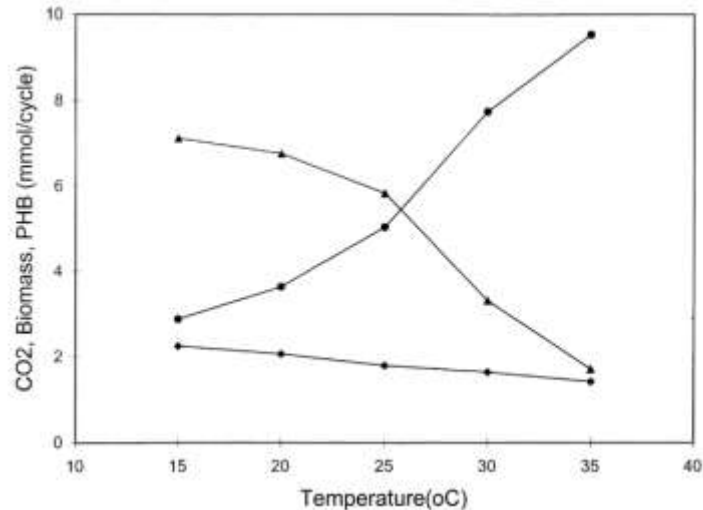


Ilustración 14. Valores de biomasa (rombo), concentración de CO₂ (circulo) y concentración de PHB (triángulo) a distintas temperaturas (Krishna & Van Loosdrecht, 1999).

Tal y como se observa en la imagen 14, la acumulación de PHB disminuye drásticamente a medida que la temperatura aumenta. Paralelamente puede comprobarse que el CO₂ aumenta, indicando que se favorece la oxidación de la materia orgánica. Por último, en este trabajo también concluyen que el aumento de temperatura tiene un impacto mayor cuanto más corto es el tiempo hidráulico de residencia

Lopez-Vazquez et al., 2009 también estudiaron cómo afecta el empleo de distintos valores de temperatura a un cultivo mixto utilizando propionato y acetato como sustratos. En este artículo se habla de organismos acumuladores de fósforo (PAOs) o acumuladores de glucógeno (GAOs) (Bravo, 2019; Tian et al., 2013). Esta es otra manera de clasificar los organismos dentro de un cultivo mixto, según su tendencia metabólica con respecto al sustrato que se encuentra en competición. Adecuar la proporción de PAOs y GAOs dentro del cultivo se hace según el objetivo del mismo. Los organismos PAO tienen actividad desnitrificadora y pueden resultar útiles para el tratamiento de aguas residuales, conociendo las preferencias de estos organismos (pH, temperatura, sustrato...) podemos ajustar el cultivo a nuestras necesidades (Tian et al., 2013).

Lopez-Vazquez et al., 2009 realizaron ensayos a temperaturas distintas: 10, 20 y 30°C y a pH distintos: 6, 7 y 7,5. Los resultados concluyeron que independientemente de si se empleaba como sustrato acetato o propionato, a una temperatura de 10°C solo sobrevivían los microorganismos PAO, ya que el metabolismo GAO resultaba inhibido. A temperaturas más altas de los 30°C, los organismos GAO siempre se imponían sobre los PAO, sin importar ni el pH ni el tipo de sustrato, mientras que a temperaturas de 10-20°C

los PAO eran los dominantes tanto si el propionato como el acetato eran suministrados. Si solo uno de los dos era suministrado, se veían favorecidos los GAO, excepto a pH 7,5. Este artículo demuestra la importancia de considerar las condiciones de operación en conjunto y no de forma independiente.

4.6.3. Oxígeno disuelto.

El oxígeno disuelto en el reactor también es un factor muy importante; en este sentido, se ha observado como limitando la cantidad de oxígeno disuelto la producción de PHAs mejora. En el anterior trabajo de Bravo, 2019 se limitó a un rango de 2-6 ppm.

La identificación del periodo de tiempo que dura la fase de festín y de carestía se puede realizar a la través de la medida de la cantidad de oxígeno disuelto, puesto que aumenta al ser consumida la fuente de carbono (Marang et al., 2018). Así, la DQO o demanda química de oxígeno es un parámetro muy útil para observar el crecimiento del cultivo. A medida que el cultivo consume el sustrato nutricional, la DQO disminuye y el oxígeno disuelto aumenta, esto se debe a la necesidad de oxígeno para oxidar los compuestos de carbono.

Una de las maneras de mantener una concentración de oxígeno disuelto constante en el medio es mediante la regulación de la inyección de un flujo de aire en el reactor. Otra manera menos eficaz es la agitación del medio mediante unas palas y, aunque se puede ajustar la velocidad de estas, esta metodología no permite un control de la concentración de oxígeno tan precisa. Qu & Liu, 2009 utilizaron un oxímetro, conectado a un ordenador, que mediante una bomba de aire mantenía el nivel de oxígeno en valores siempre mayores al 40% del valor de saturación. Una alta concentración de oxígeno disuelto favorece (o “acelera”, tal como dice el artículo) el consumo de AGV en un régimen de festín-carestía. Como el crecimiento celular es limitado, este exceso de AGV se almacena como PHAs. Para este cultivo celular se alcanzó el óptimo, con una concentración de oxígeno del 70% del valor de saturación. Se puede establecer una conclusión clara de este trabajo una alta concentración de oxígeno disuelto aumenta la producción de PHAs.

4.6.4. Relación C:N:P.

La relación de carbono, nitrógeno y fósforo va a ser determinada por la naturaleza del sustrato. Se ha observado como una alta concentración de nutrientes, especialmente de componentes orgánicos disueltos, influye directamente en la acumulación final de PHAs.

La naturaleza del sustrato también va a determinar el régimen de crecimiento de la población microbiana que realiza la acidogénesis (Eriksen et al., 2014; Vroman & Tighzert, 2009).

Haas et al., 2017 estudiaron el efecto que la limitación del nitrógeno tiene sobre un cultivo microbiano mixto, mientras se mantenía abundancia de fuente de carbono. Hay que matizar que esta abundancia no significa altas concentraciones de carbono, sino falta de nitrógeno en comparación con el necesario para la concentración de carbono disponible en el medio. La fuente de carbono utilizada en este estudio fueron residuos lignocelulósicos de origen agroalimentario de bajo contenido en carbono. El objetivo era conseguir que una fuente de carbono pobre pudiera emplearse para la producción de PHB. Se llevaron a cabo dos ensayos: uno en el que todo el sustrato se suministró al principio y otro en el que se controlaban los niveles de carbono y nitrógeno suministrándose en cantidades conocidas en periodos de tiempo controlados. Para ello se dispuso una membrana semipermeable con una presión de 0,1 bares por la que pasaban glucosa como fuente de carbono y NH_3 (amoníaco) como fuente de nitrógeno. Las cantidades de glucosa eran proporcionales a la que contienen los residuos agrícolas y así se simulaba un cultivo con poca cantidad de carbono. Cuando la concentración de NH_3 alcanzó un nivel de 37 g/L se detuvo el suministro, manteniéndose constante el de glucosa. Los resultados finales concluyeron que en el segundo ensayo se obtuvo un 36% más de PHB. Esto demuestra que, aunque el sustrato sea pobre en carbono, éste se puede aprovechar de manera eficiente si la concentración de nitrógeno se mantiene más baja en comparación. Basak et al., 2011 también ratifican la eficiencia de la limitación de nitrógeno, en un ensayo diseñado sobre la misma hipótesis.

De la misma manera que ocurre con el nitrógeno, cuando el fósforo es limitante con respecto al carbono también se obtienen mayores producciones de PHAs. Montiel-Jarillo et al., 2017 llevaron a cabo varios ensayos con cultivos mixtos en los que se estudió el impacto de las concentraciones de N y P en la síntesis de PHAs. Realizaron cinco ensayos con la ratio molar C/N/P distinta: **1.** 100/65,9/2,4 (N-abundante) **2.** 100/4,1/2,4 (N-limitado) **3.** 100/8,8/90,5 (P-abundante) **4.** 100/8,8/1,3 (P-limitado) y **5.** 100/4,1/1,3 (N y P-limitados).

La producción de PHAs resultó mayor en los ensayos 2 y 4, lo que indica que limitar el nitrógeno y el fósforo al mismo tiempo es menos eficiente que hacerlo individualmente. En la ilustración a continuación se observa de forma más clara este efecto.

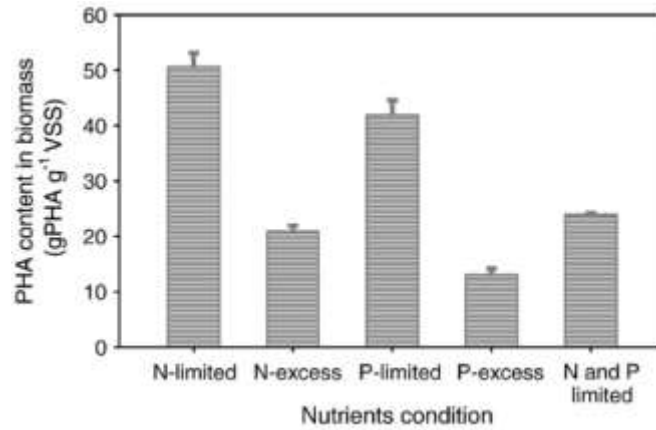


Ilustración 15. Contenido en PHA en ensayos con limitación de N:P (Montiel-Jarillo et al., 2017).

Se puede concluir también que la limitación por nitrógeno resulta más eficiente que por fósforo, pero esto pueden ser resultados obtenidos puntualmente por este grupo de investigación, bajo determinadas condiciones de operación. Tal y como se menciona este mismo artículo, otros grupos han obtenido mayores valores de producción de PHA para la limitación por fósforo. Es el caso de Wen et al., 2010, que realizaron un ensayo de las mismas características, pero encontraron la limitación por fósforo más eficiente que por nitrógeno. No debe olvidarse que, tratándose de cultivos mixtos, la composición de las poblaciones microbianas puede ser muy diferentes de un estudio a otro.

Johnson et al., 2010 también afirman que limitar el nitrógeno es eficiente para la producción de PHAs; sin embargo, concluyen que para cultivos con altos tiempos hidráulicos de residencia la limitación por carbono puede dar mejores resultados. Así, en periodos largos, el cultivo usa el sustrato para el crecimiento en lugar de almacenarlo, y lo que fue almacenado como PHAs (PHB en este caso) se destinó al crecimiento celular. La eficiencia de crecimiento usando PHAs es más baja que con el sustrato original (un 7% más baja que con acetato) y como existe una limitación de nitrógeno, el uso del carbono es aún más ineficiente. Por tanto, si el tiempo hidráulico de residencia va a ser alto, tiene más sentido mantener el carbono como nutriente limitante.

4.6.5. Otras variables importantes.

Otras variables para tener en cuenta son también el régimen de alimentación, el tiempo hidráulico de retención del reactor, la velocidad de carga orgánica y la velocidad de agitación (Eriksen et al., 2014). El tiempo hidráulico de retención (THR) es el tiempo necesario para renovar todo el contenido en un reactor.

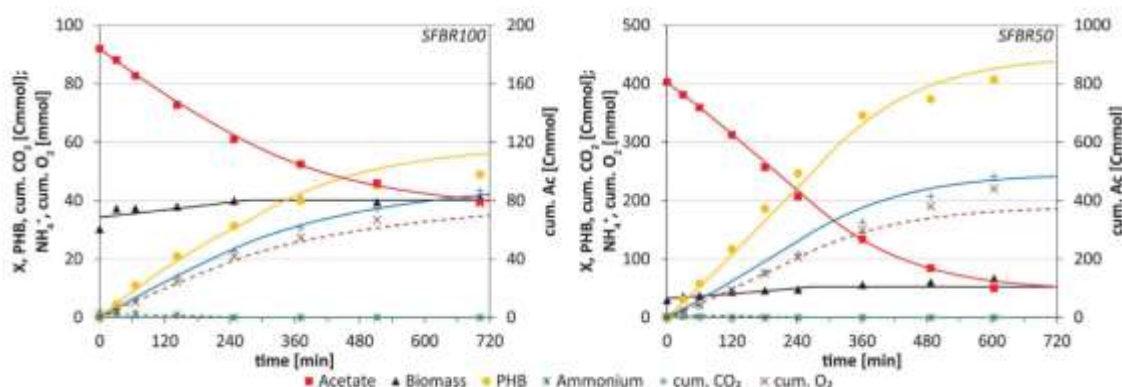


Ilustración 16. comparación de resultados del reactor SFBR100 y SFBR50 bajo regímenes de alimentación continuos y semicontinuos respectivamente (Marang et al., 2018)

Marang et al., 2018 proponen un método continuo de alimentación, contrario al método usual de festín-carestía, pero con ciertas similitudes. El acetato fue el sustrato elegido para alimentar el cultivo microbiano proveniente de lodos activados de EDAR. Se dispusieron dos reactores: en el primero (SFBR100) se impuso un régimen de alimentación continuo y se favoreció el crecimiento de *Zooglea sp* sobre el resto de las especies del cultivo. En el segundo (SFBR50) se impuso un régimen semicontinuo de alimentación, en el que se suministraba la mitad de la cantidad de acetato al inicio y, cuando el reactor se estabilizaba (tras medir el oxígeno disuelto, se conoce el fin de la fase de festín), se suministraba la otra mitad del acetato como un flujo constante. En este segundo reactor la especie dominante fue *Plasticicumulans acidovorans*. Los resultados mostraron, que, de la biomasa obtenida del primer reactor tras un periodo de 12 horas, el 53% del peso seco eran PHAs (PHB). En el segundo reactor, tras un periodo de 4 horas, el 80% del peso seco eran PHAs y se llegaba hasta el 85% tras 12 horas. Esto demuestra que en el periodo de falta de nutrientes se seleccionan las bacterias que mejor acumulan PHAs, como es el caso de *P. acidovorans*. Lo que se concluye de este trabajo es que para las especies que son buenas acumuladoras de PHAs (*P. acidovorans*) no es estrictamente necesaria la fase de carestía total, lo que abarataría enormemente los costes en un cultivo a gran escala que no mantenga condiciones monoespecíficas.

Cui et al., 2016 estudiaron la posibilidad de producir PHAs en condiciones de alta concentración de sales (halofilia). Para ello realizaron tres ensayos distintos bajo festín-carestía. Cada uno de estos ensayos contaron con el mismo tipo de cultivo microbiano, pero diferente fuente de carbono. Las fuentes de carbono elegidas fueron: acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$), glucosa y almidón. Realizaron un total de 350 ciclos, aunque a partir del ciclo 310 ya se había alcanzado el máximo de almacenamiento de PHAs. Los resultados concluyeron que en el ensayo con acetato de sodio se seleccionaban los géneros *Pseudomonas* y *Stappia*, capaces de almacenar más PHAs que los cultivos de los otros dos ensayos. Por tanto, el cultivo en condiciones halofílicas es posible, aunque se requiere de un estudio más profundo sobre sus posibilidades. En la ilustración a continuación se puede visualizar la cantidad de PHAs acumulada por cada uno de los 3 ensayos.

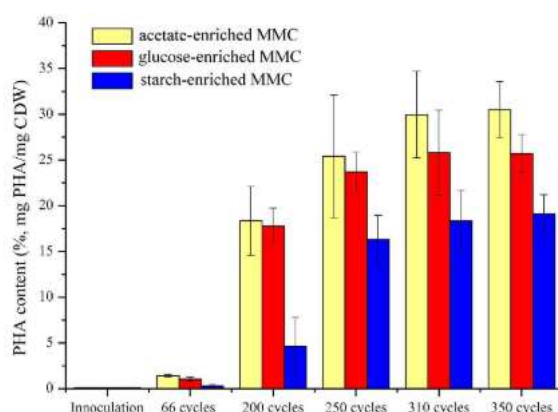


Ilustración 17. Contenido celular de PHAs en peso seco de tres ensayos con tres fuentes de carbono distintas, una en condiciones de halofilia (Cui et al., 2016).

La concentración de solutos en el reactor es otro aspecto para tener en cuenta. Aunque Cui et al., 2016 demuestra la posibilidad de que algunas especies son capaces de tener altos niveles de producción en condiciones halofílicas, esta no es la realidad en la mayoría de los casos. Palmeiro-Sánchez et al., (2016) estudiaron si las aguas fecales eran un posible sustrato para la producción de PHAs. Estas aguas contienen altos niveles de sales, además de otros compuestos posiblemente inhibitorios. Este estudio se centra en la viabilidad de un cultivo microbiano mixto en un ambiente salino, añadiendo NaCl (sal común). Los resultados muestran como para cultivos no halofílicos, una concentración de 7 g/L de NaCl causa un 50% de inhibición de la producción total con respecto al mismo ensayo sin NaCl. No sólo eso, sino que la naturaleza de los PHAs almacenados también cambia. Bajo condiciones de inhibición por NaCl se ha observado que se favorece la creación de PHB con respecto a PHV, lo cual indica que el inhibidor está implicado también en la propia síntesis.

La velocidad de carga orgánica es la cantidad de sustrato orgánico que se introduce al reactor por unidad de tiempo, por lo que está intrínsecamente relacionada con el régimen de alimentación. Huang et al., 2017 estudiaron la producción de PHAs bajo un régimen de alimentación “extendida” con el objetivo de aumentar masivamente la biomasa del cultivo. Este régimen de alimentación se basa en la alimentación aumentada y prolongada del cultivo microbiano mixto sin descarga, es decir, en un reactor discontinuo. El mismo ensayo fue realizado en un reactor semicontinuo y se compararon los resultados. Se utilizó un sistema de tres fases: Fermentación-enriquecimiento-acumulación. Tras diez días de alimentación extendida, se pasó a la etapa de carestía. En el ensayo discontinuo se consiguió una acumulación de PHAs de un 71,4% del peso seco y en el ensayo sin descarga una acumulación del 66,7% del peso seco. Aunque los porcentajes sean menores que en otros casos, es una buena propuesta para ensayos a gran escala. Además, la alimentación extendida ha demostrado el desplazamiento de las especies en el cultivo que no son capaces de almacenar carbono y se favorece la prevalencia de las productoras de PHAs. El régimen de alimentación puede ir ligado también a otros parámetros, como la concentración del pH, tal y como se ha explicado en apartados anteriores (Tsuge et al., 2001).

Z. Chen et al., 2017 establecen que para un cultivo mixto el THR óptimo es de 5 días con una concentración de sustrato de 3,65 g/L. Con estas condiciones se alcanzaron 61,26% en contenido de PHAs en peso seco total usando aguas residuales como fuente de carbono.

Por último, Grousseau et al., 2013 proponen una manera muy interesante de disminuir la velocidad de producción de PHAs sin disminuir la cantidad de producción. La síntesis de NADHP está relacionado en las mismas rutas metabólicas con el crecimiento celular y por tanto con la producción de PHAs. Este ensayo se lleva a cabo en una cepa de *C. necator* (DSM 545) cuyo único sustrato son AGV. Se realizaron varios ensayos con distintas velocidades de crecimientos y se concluyó que, como la producción de PHAs (en este caso PHB) está directamente relacionada con la cantidad de NADPH, una velocidad de crecimiento algo menor que el máximo mejora la producción, ya que se puede dedicar el NADPH a la síntesis de PHAs en lugar de al crecimiento celular. Esta velocidad de crecimiento óptima se establece en 0,05 h⁻¹ para una producción máxima de PHB del 85% del peso seco. Este experimento demuestra que una velocidad de crecimiento baja no tiene por qué alterar el rendimiento de producción.

5. Perspectivas de futuro.

A la vista de la revisión bibliográfica realizada, puede afirmarse que conocer los valores óptimos de las condiciones de operación en cada una de las fases del proceso de producción de los PHAs, resultaría en el abaratamiento del precio final del bioplástico. Así, autores como Kourmentza & Kornaros (2016) sugieren que conocer cómo afecta el pH a la síntesis de diversos AGV puede ser determinante para la producción de PHAs en cultivos acidogénicos. Es decir, conocer qué valores de pH favorecen la síntesis de los diferentes AGV nos permitiría controlar mejor la producción del tipo de PHA deseado. A pesar de ello, aún existe poca bibliografía al respecto, por lo que es necesario que se desarrollen estudios que profundicen en el efecto de esta variable sobre la producción de los PHAs sobre todo en el caso de cultivos mixtos donde las actividades metabólicas no son únicas.

Por otra parte, uno de los aspectos que se menciona pocas veces en la bibliografía es la producción de PHAs sostenibles. Es cierto que la producción de PHAs tiene como objetivo la sustitución de los plásticos convencionales, lo que es un paso enorme y fundamental hacia un modelo de materiales renovables. Sin embargo, la síntesis de PHAs no solo tiene que mejorarse en la búsqueda de un procesos con mayor eficiencia; también es necesario desarrollar procesos más sostenibles. Koller et al., 2017 hablan de una economía circular, lo que implica que las fuentes de carbono que se utilicen en la producción de PHAs no pueden competir por recursos con otras industrias como la alimentaria. Una propuesta sería realizar una búsqueda de las industrias que generan residuos ricos en carbono y que fueran adecuados como sustratos para los cultivos microbianos de PHAs. Igualmente, los propios procesos productivos deben someterse a escrutinio para seleccionar las variantes que asocien el menor impacto a la propia producción del PHA. (Moita et al., 2014; Špoljarić et al., 2013).

También es necesario realizar una clasificación de fuentes de carbono para la producción de PHAs, lignocelulósicas o no. Para las fuentes lignocelulósicas es necesario conocer su composición en lignina, hemicelulosa y celulosa y valorar si es óptima su hidrolización. Lo óptimo sería encontrar una fuente lignocelulósica con poca proporción de lignina y hemicelulosa con respecto a una alta proporción de celulosa. A la vez tiene que ser un material económicamente rentable de conseguir. No existe bibliografía determinante al respecto, lo que refuerza la propuesta de crear una línea de investigación que se dedique a dicha clasificación.

Como en todos los trabajos realizados en el ámbito de la biotecnología, la modificación genética siempre es una posibilidad para conseguir mayor eficiencia en el proceso. Madison & Huisman, 1999 proponen usar organismos transgénicos con genes *pha*, productores de PHAs. Esto abre un abanico de posibilidades todavía por explorar, como el uso de distintos organismos, incluso pluricelulares.

6. Conclusiones y propuesta final.

Tal y como se ha descrito en la memoria, son múltiples las rutas metabólicas que sintetizan los monómeros de Hidroxiacil-CoA, o precursores de PHA, y, además, pueden provenir de variadas fuentes de carbono. Esto abre un abanico enorme de posibilidades a explorar: es imperativo ahondar en el estudio del metabolismo del PHA, es necesario conocer cómo optimizar su síntesis y encontrar una fuente de carbono económicamente rentable para conseguir equiparar el precio de producción de estos precursores de bioplástico con el plástico proveniente de fuentes no renovables de carbono y, finalmente, plantear una alternativa viable.

Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, y tomando como punto de partida los trabajos realizados en el grupo de investigación con cosetas de remolacha azucarera agotada (Bravo, 2019), se proponen desarrollar los siguientes estudios experimentales, con el objetivo de comprobar si son eficaces para aumentar la producción de PHAs o abaratar el proceso:

1. Realizar un pretratamiento a la biomasa lignocelulósica. Siguiendo el trabajo realizado con anterioridad con las cosetas de remolacha, los pretratamientos que se recomiendan son: mecánico, hidrotermal y alcalino. Probar en ensayos distintos la eficiencia de cada uno de ellos sobre la producción final de PHAs. Asimismo, se podría estudiar el efecto de la combinación del tratamiento hidrotermal y alcalino.
2. Hacer una serie de ensayos que prueben si las siguientes modificaciones en las condiciones de operación durante la producción de PHAs en dos fases son eficaces:
 - a. Aplicar un régimen de alimentación festín-carestía estricto y un régimen de alimentación semicontinuo y observar si existe cambio en la producción total de PHAs. Si el cultivo microbiológico utilizado en el trabajo previo

por Gloria Bravo Porras está ya seleccionado para la producción de PHAs no será estrictamente necesaria la fase de carestía total.

- b. Dentro de un régimen de alimentación festín-carestía, aumentar la velocidad de carga orgánica y extenderla hasta un periodo de 10 días.
- c. Establecer un ensayo con una biomasa inicial de 3,65 g/L y un tiempo hidráulico de retención de 5 días.
- d. Establecer el pH en 4,8 y observar cómo afecta a la producción de PHAs. Si se trata de un cultivo alimentado con efluentes ácidos, averiguar el pH óptimo (Tsuge et al., 2001).
- e. Aumentar la concentración de oxígeno disuelto hasta un rango de 40-70% del valor de saturación y mantener constante con una bomba de aire en el reactor de acumulación de PHAs y observar si la tasa de producción aumenta.
- f. En ensayos separados, limitar individualmente las concentraciones de fósforo y nitrógeno con respecto al carbono con el objetivo de encontrar la proporción óptima de C:N:P que maximice la producción de PHAs.

7. Bibliografía.

1. Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, *151*(1), 66–76.
2. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4851–4861.
3. Ana Carolina Lemos Delgado, & Alexis Mina Cordoba. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, *79*(1), 93–101. Retrieved from http://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/139/195
4. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 161–174.
5. Avila, L. (2016). Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos. *Universidad de Sevilla*.
6. Basak, B., Ince, O., Artan, N., Yagci, N., & Ince, B. K. (2011). Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *34*(8), 1007–1016.
7. Béguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*. 1994;13(1):25-58.

8. Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, 19(5), 797–841.
9. Bravo Porras, Gloria (2019). Estudio de un proceso de arranque para la selección de una microbiota adecuada destinada a la producción de polihidroxicanoatos a partir de un inóculo de lodos mixtos de EDAR. *TFM, Universidad de Cádiz*.
10. Carrasco, F., Majone, M., Dionisi, D., Petrangeti-Papini, M., Carucci, G., & Beccari, M. (2004). Los polihidroxicanoatos: Plásticos biodegradables producidos por microorganismos. *Ingeniería Química*, 36(414), 244–251.
11. Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., & Saddler, J. N. (2007). Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(May), 67–93.
12. Chek, M. F., Kim, S. Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
13. Chen, H., Meng, H., Nie, Z., & Zhang, M. (2013). Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: Effect of pH and feeding regimes. *Bioresource Technology*, 128, 533–538.
14. Chen, Z., Huang, L., Wen, Q., & Guo, Z. (2015). Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process. *Journal of Biotechnology*, 209(October 2017), 68–75.
15. Chen, Z., Huang, L., Wen, Q., Zhang, H., & Guo, Z. (2017). Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process: From activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 52, 76–84.
16. Cui, Y. W., Zhang, H. Y., Lu, P. F., & Peng, Y. Z. (2016). Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. *Scientific Reports*, 6(April).
17. Dias, J. M. L., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., . . . Reis, M. A. M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromolecular Bioscience*, 6(11), 885–906.
18. Dietrich, K., Dumont, M. J., Del Rio, L. F., & Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*, 9 (March 2016), 58–70.
19. Dionisi, D., Beccari, M., Gregorio, S. D., Majone, M., Papini, M. P., & Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(11), 1306–1318.
20. Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., & Beccari, M. (2004). Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 569–579.
21. Ebringerová, A., & Thomas, H. (2005). *Hemicellulose*. August, 3–4.
22. Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., . . . Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9(12), 1–15.

23. Fradinho, J. C., Oehmen, A., & Reis, M. A. M. (2014). Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. *Journal of Biotechnology*, *185*, 19–27.
24. García, A., Cara, C., Moya, M., Rapado, J., Puls, J., Castro, E., & Martín, C. (2014). Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, *53*, 148–153.
25. García-Cubero, M. T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., & Bolado, S. (2009). Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, *100*(4), 1608–1613.
26. González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *29*(1), 77–115.
27. Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M. G. E., Paul, E., & Uribe Larrea, J. L. (2013). Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *148*, 30–38.
28. Gu, L., & Ozbakkaloglu, T. (2016). Use of recycled plastics in concrete: A critical review. *Waste Management*, *51*, 19–42.
29. Haas, C., El-Najjar, T., Virgolini, N., Smerilli, M., & Neureiter, M. (2017). High cell-density production of poly(3-hydroxybutyrate) in a membrane bioreactor. *New Biotechnology*, *37*, 117–122.
30. Haque, M. A., Barman, D. N., Kang, T. H., Kim, M. K., Kim, J., Kim, H., & Yun, H. D. (2012). Effect of dilute alkali on structural features and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare*) at boiling temperature with low residence time. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(12), 1681–1691.
31. Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10–18.
32. Hernández, E., García, A., López, M., Puls, J., Parajó, J. C., & Martín, C. (2013). Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* empty pods. *Industrial Crops and Products*, *44*, 227–231.
33. https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/11274/supporthub/scopus/
34. Huang, L., Chen, Z., Wen, Q., & Lee, D. J. (2017). Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy. *Bioresource Technology*, *241*, 802–811.
35. Huschner, F., Grousseau, E., Brigham, C. J., Plassmeier, J., Popovic, M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2015). Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochemistry*, *50*(2), 165–172.
36. Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, *44*(7), 2141–2152.
37. Kang, S., Li, X., Fan, J., & Chang, J. (2013). Hydrothermal conversion of lignin: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 546–558.
38. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, *37*, 24–38.

39. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Brauneegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, *37*, 24–38.
40. Kourmentza, C., & Kornaros, M. (2016). Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. *Bioresource Technology*, *222*, 388–398.
41. Krishna, C., & Van Loosdrecht, M. C. M. (1999). Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Research*, *33*(10), 2374–2382.
42. Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., & Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, *81*(1), 33–44.
43. Laycock, B., Arcos-Hernandez, M. V., Langford, A., Pratt, S., Werker, A., Halley, P. J., & Lant, P. A. (2014). Crystallisation and fractionation of selected polyhydroxyalkanoates produced from mixed cultures. *New Biotechnology*, *31*(4), 345–356.
44. Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, *38*(3–4), 536–583.
45. Li, J. (2011). *Isolation of lignin from wood*. 57.
46. López-Abelairas, M., García-Torreiro, M., Lú-Chau, T., Lema, J. M., & Steinbüchel, A. (2015). Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*, *93*, 250–259.
47. Lopez-Vazquez, C. M., Oehmen, A., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., Yuan, Z., & van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature. *Water Research*, *43*(2), 450–462.
48. Martino, L., Cruz, M. V., Scoma, A., Freitas, F., Bertin, L., Scandola, M., & Reis, M. A. M. (2014). Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, *71*, 117–123.
49. Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, *74*(1), 3–16.
50. Marang, L., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2018). Enrichment of PHA-producing bacteria under continuous substrate supply. *New Biotechnology*, *41*(February 2017), 55–61.
51. Millett, M. A., Baker, A. J., & Satter, L. D. (1975). Pretreatments to enhance chemical, enzymatic, and microbiological attack of cellulosic materials. *Biotechnology and bioengineering symposium*, (5), 193–219.
52. Millett, M. A., Effland, M. J., & Caulfield, D. F. (1980). *Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials--acid vs enzymic*.
53. Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., & Suárez-Ojeda, M. E. (2017). Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations. *Science of the Total Environment*, *583*, 300–307.
54. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *96*(6), 673–686.

55. Mozumder, M. S. I., De Wever, H., Volcke, E. I. P., & Garcia-Gonzalez, L. (2014). A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry*, 49(3), 365–373.
56. Palmeiro-Sánchez, T., Fra-Vázquez, A., Rey-Martínez, N., Campos, J. L., & Mosquera-Corral, A. (2016). Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 332–339.
57. Palmowski, L. and J. M. (1999). *Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. Proceedings of the 2nd International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. July*, Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. Proceedings on the 2nd International Symposium on anaerobic digestion of solid waste.
58. Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233–247.
59. PlasticsEurope, & PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) / Consultic Marketing & Industrieberatung GmbH. (2017). *Plastics – the Facts 2017*, 16.
60. PlasticsEurope. (2018). *Plastics – the Facts. Plastics – the Facts 2018*, 38.
61. Plastics Europe, G. M. R., & Conversio Market & Strategy GmbH. (2019). *Plastics - the Facts 2019*.
62. Poirier, Y., Nawrath, C., & Somerville, C. (1995). *Elastomers, in Bacteria and Plants*.
63. Qu, B., & Liu, J. X. (2009). Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime. *Chinese Science Bulletin*, 54(1), 142–149.
64. Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137–146.
65. Rehm, B. H. A., & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1–3), 3–19.
66. Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22(3), 261–279.
67. Samorì, C., Abbondanzi, F., Galletti, P., Giorgini, L., Mazzocchetti, L., Torri, C., & Tagliavini, E. (2015). Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery. *Bioresource Technology*, 189, 195–202.
68. Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 2010; 61:263-289.
69. Shen, L., Hu, H., Ji, H., Cai, J., He, N., Li, Q., & Wang, Y. (2014). Production of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) from waste organics by the two-stage process: Focus on the intermediate volatile fatty acids. *Bioresource Technology*, 166(422), 194–200.
70. Špoljarić, I. V., Lopar, M., Koller, M., Muhr, A., Salerno, A., Reiterer, A., & Horvat, P. (2013). In silico optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 625–635.
71. Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 81–96.

72. Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 25(10), 1503–1555.
73. Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49–58.
74. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.
75. Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9, Issue 9).
76. Tian, W. De, Lopez-Vazquez, C. M., Li, W. G., Brdjanovic, D., & van Loosdrecht, M. C. M. (2013). Occurrence of PAOI in a low temperature EBPR system. *Chemosphere*, 92(10), 1314–1320.
77. Tsuge, T., Tanaka, K., & Ishizaki, A. (2001). Development of a novel method for feeding a mixture of L-lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-D-3-hydroxybutyrate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(6), 545–550.
78. Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., & Majone, M. (2014). Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 31(4), 264–275.
79. Vanderghem, C., Brostaux, Y., Jacquet, N., Blecker, C., & Paquot, M. (2012). Optimization of formic/acetic acid delignification of *Miscanthus×giganteus* for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 280–286.
80. Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
81. Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
82. Wen, Q., Chen, Z., Tian, T., & Chen, W. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 22(10), 1602–1607.
83. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12–13), 1781–1788.
84. Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 815–827.
85. Zhao, Y., Wang, Y., Zhu, J. Y., Ragauskas, A., & Deng, Y. (2008). Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(6), 1320–1328.

Apéndice 1. Descripción de la propuesta de TFM asignada originalmente.

Título:

Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P ...) en la producción de polihidroxicarboxilatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica.

Tutores:

Ana Blandino Garrido (Dpto. de Ing. química y tecnología de Alimentos) y Carlos José Álvarez Gallego (Dpto. de Ing. Química y tecnología de Alimentos)

Breve descripción:

La presente propuesta de TFM se corresponde a la adaptación a la modalidad bibliográfica de la propuesta aprobada que llevaba por título: Influencia del pH, temperatura y relación C/N/P en la producción de polihidroxicarboxilatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa residual de la industria de la remolacha azucarera.

Dado que se trataba de un trabajo experimental el alcance del mismo era muy concreto y en la modalidad bibliográfica se propone ampliarlo en dos sentidos: Incluir en el estudio bibliográfico más variables de operación además de las tres previstas inicialmente (pH, temperatura y relación C/N/P) Considerar un sustrato más general (biomasa lignocelulósica en lugar de biomasa residual de la industria de la remolacha azucarera).

Como justificación de esta ampliación del alcance se indica que los trabajos experimentalmente planteados no habían sido abordados previamente en la literatura científica y no se puede adaptar el trabajo a la modalidad bibliográfica circunscribiéndolo específicamente a la propuesta anterior en sus mismos términos. Por ello, se ha decidido esta ampliación que permite abordar la misma temática desde la modalidad bibliográfica. Los polihidroxicarboxilatos (PHAs) son precursores de bioplásticos que pueden ser sintetizados por microorganismos seleccionados a partir de un sustrato rico en ácidos grasos volátiles (AGVs) como la biomasa lignocelulósica sometida a un proceso previo de fermentación acidogénica.

El uso de cultivos microbianos puros como *Cupriavidus necator* permite alcanzar altos rendimientos de producción, pero el empleo de cultivos mixtos- tales como lodos activos de depuración biológica de aguas residuales- se muestra como la opción económicamente

más viable al no implicar tantos costes asociados al trabajo en condiciones estériles. Como objetivo de esta propuesta se plantea “Estudiar el efecto de las principales condiciones de operación (pH, T, relación C/N/P y otros) del proceso de producción aerobia de PHAs a partir de efluentes procedentes de la fermentación acidogénica de sustratos de carácter lignocelulósico”. En el estudio bibliográfico se prestará especial atención a las tres variables citadas específicamente.

La biomasa lignocelulósica es un sustrato ampliamente utilizado en procesos biológicos de biorefinería y, específicamente, un medio con una amplia composición de carbohidratos (en forma de polímeros como celulosas, hemicelulosas y ligninas fundamentalmente) que es un sustrato ideal para la producción de AGVs por fermentación oscura y para su uso posterior como materia prima de un proceso de producción de precursores de bioplásticos como los PHAs.

Declaración Personal de NO Plagio

D. / D^a. **Alonso Márquez Romero** con N.I.F.: **45380573D**, estudiante del Máster en **Bioteología** en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, curso 2019-2020, como autor/a de este documento académico, titulado:

Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P ...) en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica.

y presentado como Trabajo de Fin de Máster, para la obtención del Título correspondiente,

DECLARO QUE

es fruto de mi trabajo personal, que no copio, que no utilizo ideas, formulaciones, citas integrales o ilustraciones diversas, extraídas de cualquier obra, artículo, memoria, etc. (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía.

Así mismo, que soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden legal.

En Cádiz, a 19 de septiembre de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alonso Márquez Romero', written over a light blue horizontal line.

Fdo.: Alonso Márquez Romero