



UCA

Universidad
de Cádiz

FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS PUERTO REAL

APROVECHAMIENTO DE LA CÁSCARA DE ARROZ PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS

Grado de Biotecnología

Curso 2019/2020

Remedios Montenegro Elvira

Tutoras:

Ana Belén Díaz Sánchez

Ana María Blandino Garrido

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho este huequito de mi trabajo para agradecer a mis padres que me dejaran hacer esta carrera fuera de casa hace cuatro años aun no teniendo ni idea de lo que era la Biotecnología (puede que sigan sin saber qué es). A mis hermanos, por su constante apoyo y cariño, y a mi abuela por todo el amor que me manda cuando me ve y cuando, por cuestiones de estudio, se pasa semanas sin verme.

Quiero darles también las gracias a mis tutoras, Ana Belén Díaz y Ana María Blandino, por tener paciencia e intentar sacar huequitos para ayudarme cuando estaban agobiadas con otros trabajos. Además, quiero agradecerle a Ana Belén y a todos los del laboratorio 1 todo lo que pude aprender en el periodo anterior a la cuarentena.

Gracias Victoria y Andrea, y gracias Iván, Noelia y Diego, por ser mi familia en Cádiz.

Para acabar, agradecer a mis compañeros de clase todas las risas que me han regalado estos cuatro años y todas las meriendas en cafetería durante los tiempos de espera de la PCR. No nos hemos podido despedir como tocaba, pero habéis sido la mejor clase.

ÍNDICE

1	PROPUESTA	1
2	RESUMEN	2
3	SUMMARY	3
4	INTRODUCCIÓN.....	4
	PLÁSTICOS CONVENCIONALES	4
	BIOPLÁSTICOS: Alternativa a los plásticos tradicionales.....	5
	PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	9
	HIDRÓLISIS.....	10
	FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA	11
5	OBJETIVO.....	12
6	METODOLOGÍA	13
7	CONTENIDO.....	15
	ACONDICIONAMIENTO	15
	PRETRATAMIENTOS.....	15
	HIDRÓLISIS.....	19
	PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS	22
8	CONCLUSIONES.....	28
9	PERSPECTIVAS DE FUTURO	29
10	BIBLIOGRAFÍA.....	30

1 PROPUESTA

Aprovechamiento de la cáscara de arroz para la producción de bioplásticos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros que acumulan algunos microorganismos como fuente de carbono y energía que se producen cuando hay limitaciones nutricionales en el medio de cultivo. La importancia de estos compuestos radica en que pueden reemplazar a los plásticos tradicionales derivados del petróleo, que se degradan lentamente, acumulándose en grandes cantidades causando serios problemas medioambientales. Los residuos lignocelulósicos son una materia prima prometedora para la producción de PHAs de forma sostenible. Por este motivo, el objetivo principal del TFG es estudiar la producción de estos compuestos de alto valor añadido a partir de cáscara de arroz, que es el principal residuo de la industria arrocera. Dada su composición, con un alto contenido en celulosa y hemicelulosa, es una interesante materia prima para la obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática y posterior fermentación para la producción de PHAs. De esta forma, se aprovecharía un residuo de la industria agroalimentaria abundante en la zona para la producción de estos compuestos de interés, consiguiéndose un doble beneficio medioambiental.

2 RESUMEN

Los polihidroxicanoatos son polímeros biodegradables obtenidos por fermentación microbiana, generalmente bacteriana, con características que los convierten en materiales muy atractivos y prometedores para el reemplazo de los plásticos convencionales. El empleo de estos polihidroxicanoatos como bioplásticos lograría reducir el empleo de recursos fósiles, la emisión de gases contaminantes y los problemas que la acumulación de plásticos ocasiona en el medio ambiente.

Actualmente, el empleo de recursos lignocelulósicos como desechos agrícolas, industriales o forestales es muy reducido, a pesar de constituir estos una buena y económica fuente de biomasa. La biotecnología, junto con otras disciplinas, se ha encargado de desarrollar métodos para su aprovechamiento. Entre ellos, está el empleo de estos residuos como sustratos para la producción de estos polihidroxicanoatos una vez pretratada la materia y liberados sus azúcares.

Un residuo agro-industrial de gran producción mundial es la cascarilla de arroz, material que está siendo investigado para su empleo como materia prima en la producción de bioplásticos.

En esta revisión bibliográfica, se presentarán diferentes estudios realizados con la cáscara de arroz para la obtención de bioplásticos, en los que se estudian desde sus condiciones de pretratamiento óptimas hasta sus condiciones de fermentación más adecuadas, así como los mejores microorganismos para conseguirlo.

Palabras claves: polihidroxicanoatos, PHA, cáscara de arroz, lignocelulosa, pretratamiento, hidrólisis, fermentación

3 SUMMARY

Polyhydroxyalkanoates are biodegradable polymers obtained by microbial fermentation, usually bacterial fermentation, presenting characteristics that make them very interesting and promising towards replacing conventional plastics. Using these polyhydroxyalkanoates as bioplastics would help reducing fossil resources exploitation, polluting gases emissions and problems that plastic accumulation generates in the environment.

Nowadays, lignocellulosic resources, such as agricultural and industrial wastes or forestry residues, are not being sufficiently exploited, even though they are a great and cheap biomass source. Biotechnology, along with other science disciplines, has developed methods and ways to take advantage of this source. One of them is the use of these wastes as substrates in the polyhydroxyalkanoates production once the material has been pretreated and its sugars has been realised.

An important agro-industrial waste produced globally is rice husk, material that is being studied now for its use as raw material in polyhydroxyalkanoates production.

In this bibliographic review, different studies are going to be analysed, as they use rice hulls in order to obtain bioplastics. These investigations study different factors, from optimal pretreatment conditions to optimal fermentation conditions, as well as the best microorganisms to achieve it.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, PHA, rice husk, lignocellulose, pretreatment, hydrolysis, fermentation

4 INTRODUCCIÓN

PLÁSTICOS CONVENCIONALES

El creciente desarrollo de la población, así como el estilo de vida que ésta lleva actualmente, han provocado un aumento descontrolado de la producción de plásticos. El plástico se ha vuelto imprescindible en el día a día de las personas, sobre todo en embalaje y empaquetado. Hoy en día resulta difícil no encontrar alimentos, bebidas, productos de higiene o productos de limpieza, entre otros, contenidos en recipientes plásticos o plastificados.^[1]

Esta situación se ha alcanzado en tan solo setenta años,^[2] cuando se empezó a producir plástico convencional a gran escala a partir del petróleo en las refinerías mediante procesos de polimerización y policondensación.^[3] Desde entonces, la industria petroquímica no ha parado de transformar los componentes del petróleo para poder obtener una mayor cantidad de plásticos, de acuerdo con el aumento de las necesidades que la sociedad actual, también cada vez mayor, demanda (Figura 1).

Toda esta producción ha supuesto un importante impacto ambiental. Tan solo en el año 2019 se produjeron 360 millones de toneladas de plásticos en todo el mundo, de las que 61,8 millones fueron producidas en Europa. De los residuos plásticos europeos, fueron recuperados 29,1 millones de toneladas, de las que sólo el 32,5 % fueron recicladas.^[4] El 24,9 % fue depositado en vertederos y el 42,6 b% restante fue empleado como fuente de energía.



Figura 1. Producción de plásticos en millones de toneladas desde 1950 hasta 2015.^[4]

A la producción masiva de plásticos se aúna la resistencia que presentan estos frente a la degradación, suponiendo una seria amenaza medioambiental por la acumulación de plásticos en los ecosistemas, responsable tanto de la liberación de compuestos tóxicos como de la muerte directa de diferentes especies marinas por enredamiento o asfixia.^[5] Se han encontrado plásticos hasta en los lugares más

inexplorados por el hombre, como la Fosa de las Marianas en el Océano Pacífico, lo que supone una amenaza para especies que ni siquiera han podido ser conocidas aún.^[6]

Aunque resulta difícil determinar el tiempo de descomposición del plástico, puesto que dependerá del grosor del objeto fabricado, del ambiente en el que se encuentre (si se haya en el suelo o en el océano) y porque, por lo general, requiere muchos años de investigación y seguimiento,^[7] se han desarrollado algunos modelos para intentar estimar las vidas medias de algunos de los plásticos convencionales en objetos más comunes. Con esto, se estima que una bolsa de plástico o los recipientes de detergente o botellas podrían necesitar entre 5 y 250 años, respectivamente, para que se degradara la mitad de su masa en el suelo, mientras que en ambiente marino sus vidas medias disminuirían a 3,4 años y 58 años, respectivamente.^[8] Si se habla de tuberías, que se elaboran con el objetivo de ser bastante resistentes, la degradación completa podría tomar mucho tiempo más, unos miles de años.

A estos problemas se suma la emisión de gases efecto invernadero. La producción y la incineración de plásticos produjo más de 850 millones de toneladas métricas de gases de efecto invernadero en 2019,^[9] aunque no sólo se emiten gases durante su producción. Varios estudios confirman que los plásticos emiten estos gases en todas las fases de su vida.^[10]

Alternativas al petróleo: la biomasa

Frente al problema de la contaminación que los productos de origen fósil llevan asociado y del inevitable agotamiento de las reservas de petróleo, recurso no renovable, surge la necesidad de buscar alternativas menos contaminantes y más sostenibles, abriéndose un abanico de posibilidades.

Entre estas alternativas se encuentra la biomasa, un recurso natural y fuente de energía renovable y sostenible. Se trata de un grupo bastante heterogéneo, tanto por su origen como por su composición, y es por ello que se pueden emplear diferentes tipos para la obtención de energía, fertilizantes, piensos y otros productos como los bioplásticos.

Los cultivos tradicionales (maíz, caña de azúcar, remolacha, patata, trigo y cebada) resultan muy atractivos como materia prima por su gran cantidad de azúcares y su fácil disponibilidad, siendo considerados materia prima de primera generación, pero a nivel socioeconómico su empleo genera un grave conflicto por la competencia entre la alimentación y la biorrefinería. Por ello, surge como alternativa y solución al problema el empleo de materia prima de segunda generación, los residuos, generando un amplio horizonte de posibilidades para el futuro de la biorrefinería.

BIOPLÁSTICOS: ALTERNATIVA A LOS PLÁSTICOS TRADICIONALES

La asociación *European bioplastics*, una asociación de compañías europeas con interés en estos materiales, define los bioplásticos como un conjunto heterogéneo de nuevos materiales con diferentes

propiedades y aplicaciones que deben haberse obtenido a partir de biomasa, ser biodegradables, o ambos. Entre los bioplásticos más interesantes, destacan aquellos que cumplen ambas características, que son los polímeros producidos por fermentación microbiana y los polímeros procedentes de productos naturales modificados químicamente.^[11]

Conviene definir también algunos conceptos para entender mejor las características de los bioplásticos: un material es biodegradable cuando, por acción de los microorganismos, se dan unos procesos químicos que transforman el material en compuestos más simples en el mismo medio natural. En contraposición, será no degradable cuando no pueda ser degradado en ambientes microbianos y necesite operaciones más complejas (físicas o químicas) para descomponerse. Un material bio-basado es un material producido a partir de fuentes renovables de biomasa (como microorganismos o vegetales), al contrario de lo que sería uno basado en los recursos fósiles.^[12]

Se diferencian tres tipos de bioplásticos biodegradables:

- Polímeros biodegradables obtenidos por síntesis química: en este grupo se encuentran poliésteres, polímeros con ésteres y uniones con heteroátomos, y los poliaminoácidos. Entre los más conocidos destacan el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) y el alcohol polivinílico (PVA).
- Polímeros biodegradables obtenidos por fermentación microbiana: estos bioplásticos son los polisacáridos neutros, polisacáridos de gelificación natural, como la goma gellan, el pululano o la laminarina, muy común en las paredes celulares de bacterias u hongos; y poliésteres, como los polihidroxicanoatos (PHA), compuestos empleados por bacterias y arqueas como fuente de energía bajo determinadas condiciones.
- Polímeros biodegradables obtenidos de la modificación química de polímeros naturales como el almidón o la celulosa.^{[11][13]}

De estos tres grupos, los de verdadero interés para este trabajo serán los producidos por fermentación microbiana, específicamente los poliésteres polihidroxicanoatos.

Características y ventajas de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (Figura 2), conocidos como PHA, se acumulan de manera natural en muchas bacterias y resultan interesantes como bioplásticos por sus similitudes con el propileno, hidrocarburo empleado en la síntesis del polipropileno (PP), un plástico convencional ampliamente extendido.^[14] Ambos comparten una alta resistencia a la tracción y una elevada temperatura de fusión. Los PHA también destacan por sus características elásticas, que los asemejan a la goma natural. Se trata de compuestos biodegradables insolubles en agua, que se pueden emplear en aplicaciones médicas gracias a su biocompatibilidad (no provocan rechazo por el sistema inmune), que presentan una densidad que favorece su hundimiento en agua (permitiendo así que se dé una buena degradación anaerobia junto con

los sedimentos) y no son tóxicos. Son poco resistentes a ácidos y bases, lo que puede suponer problemas según su función.^{[11][15]} Son también solubles en disolventes organoclorados y, aunque son frágiles y su temperatura de fusión es elevada, se pueden combinar con otros polímeros para cambiar estas propiedades.^[16]

Los PHA, además, presentan una mayor eficiencia energética, puesto que su producción requiere menos energía que la producción de plásticos convencionales, dejan una huella de carbono muchísimo menor y generan menos gases de efecto invernadero, colaborando con la reducción de emisiones.^[17]

Otra de sus ventajas es la sostenibilidad, ya que se emplea para su producción biomasa (con especial interés en los residuos como fuente de esta), materia orgánica procedente principalmente de plantas, que son un recurso totalmente renovable.^[15]

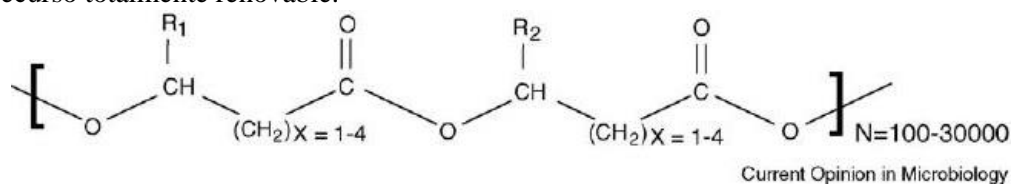


Figura 2. Estructura general del PHA.^[18]

Materia prima para la producción de PHA

Los polihidroxicanoatos se obtienen a partir de diferentes tipos de fuentes de carbono. Se pueden obtener de residuos alimentarios, efluentes de alazaras e incluso de aguas residuales urbanas.^[19] La opción más sencilla y rápida para su producción es el empleo de biomasa rica en azúcares solubles como la sacarosa. Entre las plantas ricas en estos azúcares destacan la caña de azúcar y la remolacha, aunque también el sorgo, el arce azucarero o la palma.^[20] Con esta opción se puede integrar la producción de PHA en azucareras de caña de azúcar o remolacha, aprovechando la instalación. El almidón, un compuesto de almacenamiento en plantas, supone también una prometedora fuente de carbono para este fin. Se encuentra en gran medida en cereales como maíz y trigo, tubérculos como patata o yuca y en las legumbres, y el acceso a sus azúcares fermentables es sencillo empleando enzimas amilasas.^[21] Sin embargo, el uso de esta materia prima rica en azúcares o almidón con el objetivo de la producción de bioplásticos genera competencia, puesto que son plantas destinadas tradicionalmente al consumo humano y animal. Como alternativa se presenta la biomasa lignocelulósica –un componente muy extendido en la naturaleza formado por celulosa, hemicelulosa y lignina–, que normalmente es desaprovechada o descartada por su escasa utilidad. A este tipo de biomasa pertenece la madera y los residuos agrícolas, generados tanto en la etapa de producción agrícola como en la de procesado. Estos materiales, entre los que se encuentran el bagazo, la pulpa, las podas o la paja, entre otros, no son atractivos para otras industrias y pueden ser transformados mediante procesos bioquímicos en productos de valor tras su correspondiente proceso de pretratamiento y de sacarificación.

Residuos agrícolas

La necesidad de una mayor cantidad de alimentos para el consumo humano y animal está directamente relacionada con la cantidad de residuos agrícolas generados, siendo, por tanto, muchísimo mayor ahora de lo que era hace años. Los residuos agrícolas son materiales que se generan durante la cosecha y el procesamiento industrial posterior de los cultivos. Suelen ser fibrosos y con bajo contenido en nitrógeno. Se estima que los principales cultivos ocupan 702 millones de hectáreas,^[22] representando la mitad del terreno cultivable del mundo, siendo sus principales residuos la paja de arroz, cebada, soja y trigo, los rastrojos del maíz y el bagazo de la caña de azúcar.

Tradicionalmente, estos residuos se han aprovechado como alimentación para el ganado o como fuente de calor doméstica. Su presencia en los terrenos es a menudo beneficiosa, previniendo la erosión y mejorando la calidad del suelo.^[23] Con todo, la cantidad de residuos empleada para estas funciones es pequeña, y gran parte de estos pueden ser usados en biorrefinería para conseguir combustibles, energía o productos como los comentados bioplásticos.

Un tipo de cultivo que genera gran cantidad de residuos es el arroz, que deja, además de la paja durante su recogida, grandes cantidades de cascarilla tras su procesado en la industria arrocera. El arroz, tan solo en España, es un sector que mueve millones de euros y que ocupa unas 109.411 hectáreas de cultivo, el 37 % de ellas en Andalucía.^[24] Cuando el arroz se recolecta, se disminuye su humedad y se lleva hasta las instalaciones industriales, los molinos, donde es procesado, descascarillado, secado y blanqueado, produciéndose como residuo del procesado las cascarillas (Figura 3). Se estima que de cada 100 kg obtenidos de arroz, unos 20 kg de cascarilla de media son producidos como residuo agro-industrial.^[25] En concreto, en Andalucía se generaron 58.693 toneladas de cascarilla de arroz en el año 2017.^[26]

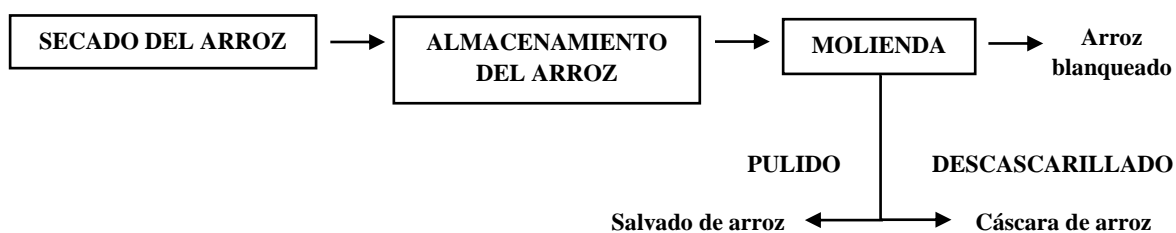


Figura 3. Esquema del procesamiento del arroz. (Elaboración propia)

Aunque la mayoría de los proyectos y estudios nuevos se enfocan en su empleo como fuente de energía, debido a la naturaleza lignocelulósica de su paja y cáscara, representa una materia prima interesante para la producción de bioproductos de alto valor añadido, como son los polihidroxialcanoatos.

La cáscara de arroz, material lignocelulósico, se compone de un 35 % de celulosa, un homopolisacárido amorfo, cristalino e insoluble en agua compuesto por unidades de D-glucopiranosas; un 25 % de hemicelulosa, heteropolisacárido complejo y ramificado formado por pentosas, hexosas y sus ácidos; un 20 % de lignina, polímero ramificado, amorfo y heterogéneo formado por unidades de fenilpropano; y

un 17 % de sílice.^[27] Tanto la sílice como la lignina deben ser eliminadas para conseguir que las bacterias empleen los azúcares y la producción de bioplásticos sea eficaz.

PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

En la producción de polihidroxicanoatos a partir de la biomasa lignocelulósica están implicados los siguientes procesos (Figura 4), que van a permitir que las bacterias puedan emplear y fermentar los azúcares tras su liberación de los polisacáridos que conforman la lignocelulosa.

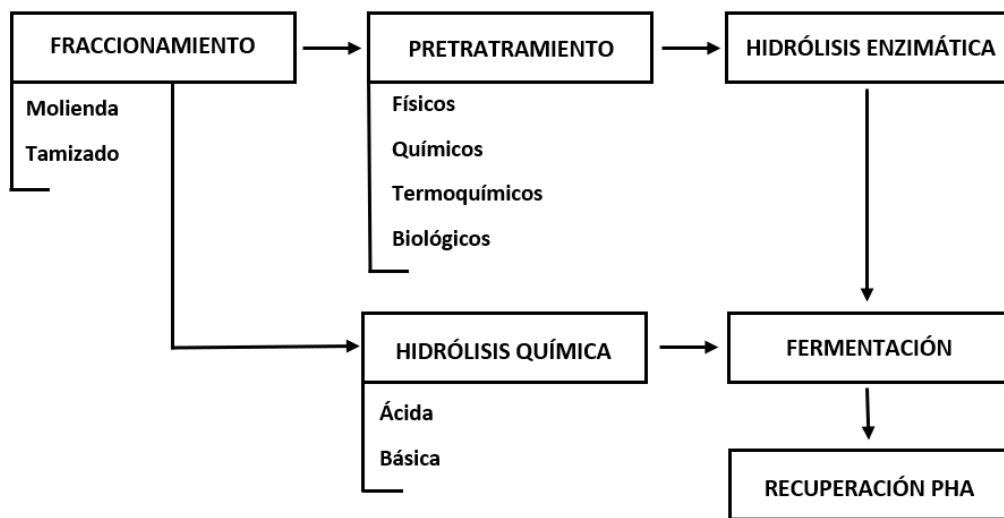


Figura 4. Esquema de procesamiento de materia lignocelulósica hasta obtención de PHA. (Elaboración propia)

Para poder realizar una hidrólisis efectiva es necesario llevar a cabo un proceso de pretratamiento que consiga reducir las barreras físicas y químicas de la estructura lignocelulósica, facilitando el acceso de las celulasas.^[28]

Las barreras químicas están constituidas por los propios componentes de la biomasa. La lignina, además de encontrarse unida covalentemente a la hemicelulosa y a la celulosa por puentes de hidrógeno, resulta, junto con sus derivados, tóxica para los microorganismos e inhibe la hidrólisis, por lo que debe ser eliminada para que las enzimas puedan actuar sobre la celulosa.^{[29][30]} La hemicelulosa es otro impedimento químico: ayuda a empaquetar fibras de celulosas y forma un entramado con la lignina para dar estabilidad a la pared celular. Con ello impide el acceso de las celulasas, por lo que conviene retirarla para aumentar el tamaño de los poros en la biomasa.^[20]

En cuanto a las barreras físicas, la más importante es la cristalinidad de la celulosa, resultado de las uniones por puentes de hidrógeno que mantienen las microfibrillas altamente ordenadas y compactas. También se encuentran entre los impedimentos físicos el área superficial y el grado de polimerización.^[20]

Los diferentes pretratamientos de biomasa lignocelulósica se clasifican en cuatro grupos: pretratamientos físicos (molienda y ultrasonidos), químicos (pretratamientos ácidos y de álcalis –que son tratamientos hidrolíticos de por sí–, con disolventes orgánicos y con oxidantes), termoquímicos (hidrotérmicos, explosión con vapor –el más común–, y expansión de fibras con amoníaco AFEX, llamado así por las iniciales de Ammonia Fiber Expansion) y biológicos (fundamentalmente por la acción de hongos filamentosos). También encontramos pretratamientos un poco más especiales, como el pretratamiento llevado a cabo con líquidos iónicos, irradiación o con fluidos supercríticos.^[20]

HIDRÓLISIS

En la hidrólisis, los polímeros de la biomasa son transformados en azúcares simples que podrán ser empleados por los microorganismos en la fermentación.^[31]

Para poder despolimerizar la celulosa, los tratamientos de hidrólisis más empleados son la hidrólisis química (alcalina y ácida) y la enzimática.^[20] La hidrólisis ácida se suele llevar a cabo con ácido sulfúrico diluido por su bajo coste, aunque pueden emplearse otros ácidos como el sulfuroso, clorhídrico, fosfórico o el fórmico.^{[20] [31]} Con esta hidrólisis, se despolimeriza una parte de la celulosa, además de la hemicelulosa, que se despolimeriza casi por completo. De la hemicelulosa disuelta en la solución con los ácidos, el 90 % de sus azúcares pueden ser recuperados, evitando su transformación en inhibidores.^[32] El principal inconveniente de este tratamiento es la generación de una gran cantidad de subproductos de degradación e inhibidores que dificultarán la fermentación de los azúcares.^[20]

Por otra parte, la hidrólisis alcalina permite eliminar parte de la lignina y la sílice, dejando las fibras de celulosa y de hemicelulosa inalteradas. Las condiciones suaves a las que se lleva a cabo limitan la formación de inhibidores.^[20] Las bases más empleadas son el hidróxido de sodio y el de calcio y su empleo altera la estructura de la biomasa, mejorando la accesibilidad de las enzimas de sacarificación a la celulosa. La mayor limitación que este tratamiento presenta es la formación irreversible de bases a sales.^[33]

El tratamiento predilecto y el que ha desplazado a la hidrólisis química es la hidrólisis enzimática. Además de ser selectiva, opera en medios no corrosivos y en condiciones moderadas y no necesita adiciones externas (al contrario que la ácida, que necesita ser neutralizada al acabar y provoca un aumento de las sales).^[28] La recuperación de las enzimas, sin embargo, no es posible, lo que aumenta el coste.

Para la hidrólisis de la celulosa se emplean tres tipos de celulasas que trabajan en sinergia: las endoglucanasas, que cortan los enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ de la celulosa de manera aleatoria; las exoglucanasas, que principalmente actúan sobre los extremos liberando glucosa o celobiosa; y las β -glucosidasas, que

degradan a glucosa.^[20] La hidrólisis de la hemicelulosa necesita gran variedad de enzimas, como la β -xilosidasa o la endo- β -1,4-xilanasasa entre otras.^[34]

FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA

Hay gran cantidad de bacterias implicadas en la producción de PHA, aunque también se han descrito algunas arqueas y levaduras.^[35] Gracias a la ingeniería genética, también se han conseguido plantas productoras de estos compuestos. Entre las bacterias más comunes, destacan *Ralstonia eutropha*, también conocida como *Cupriavidus necator* e importante productora de polihidroxibutirato (PHB), un tipo de PHA; varias especies de *Pseudomonas* o *Alcaligenes latus*.^[14]

Cupriavidus necator, *Pseudomonas extorquens* o *Pseudomonas oleovorans* producen PHA como metabolitos secundarios, mientras que *Alcaligenes latus*, junto con cepas mutantes como *Azotobacter vinelandii* o recombinantes de *Escherichia coli*, los producen como metabolitos primarios.^[14] La producción de PHA como metabolito secundario suele ocurrir cuando en el medio nutritivo presenta un déficit de nutrientes como nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno o magnesio y, al mismo tiempo, hay presente una gran cantidad de carbono en él.^[36]

Las bacterias productoras de PHA contienen el poliéster en gránulos junto a proteínas implicadas en la ruta metabólica del PHA.^[37] Los polihidroxicanoatos serán empleados como fuente de carbono y energía bajo condiciones de ausencia de sustrato en el medio. El equilibrio entre su consumo y almacenaje depende de las enzimas PHA sintasa, la enzima responsable del ensamblaje de precursores monoméricos de PHA, y PHA despolimerasa, responsable de la degradación del polímero.^[35]

Aunque lo más estudiado es el empleo de cultivos puros, usar cultivos mixtos constituye una alternativa prometedora que supone una reducción de costes, principalmente por no tener que trabajar en condiciones de esterilidad, y un aumento de la producción de polihidroxicanoatos al conseguir combinar diversas actividades metabólicas.^[38] Los cultivos mixtos más estudiados hasta el momento son los procedentes de aguas residuales, con los que se obtienen PHA a partir de materia prima muy económica.^{[38] [39]}

5 OBJETIVO

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como **objetivo principal** evaluar la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir del residuo lignocelulósico cáscara de arroz.

Para alcanzar el objetivo principal, se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

- Realizar una búsqueda bibliográfica de estudios que empleen la cascarilla para la producción de PHA.
- Analizar el trabajo realizado en dichos estudios publicados.
- Evaluar la producción de PHA a partir de cáscara de arroz según el pretratamiento empleado, la hidrólisis y el microorganismo utilizado en la fermentación.

6 METODOLOGÍA

Para realizar este Trabajo de Fin de Grado bibliográfico (“Aprovechamiento de la cáscara de arroz para la producción de bioplásticos”), se buscó y analizó la información relacionada con los temas de interés para posteriormente seleccionar la que más se ajustaba al tema principal.

Se emplearon tres bases de datos para la búsqueda de información, todas multidisciplinarias y de ámbito internacional. Dos de ellas están operadas por la editorial *Elsevier*, mientras que la tercera depende de la editorial *Springer*. Estas bases de datos fueron:

- ✓ *ScienceDirect* (la que más se empleó)
- ✓ *Scopus*
- ✓ *SpringerLink*

Para la búsqueda de artículos científicos enfocados en la producción de bioplásticos a partir de cascarilla de arroz, las palabras claves empleadas fueron: “Rice husk”, “Rice hull”, “PHA”, “Polyhydroxyalkanoates”, “PHB” y “Polyhydroxybutyrate”. Como la búsqueda no daba resultados sobre la producción en concreto (sino que se obtenían resultados sobre la degradación, características...), se añadió el término “production” tras “PHA”, “Polyhydroxyalkanoates”, “PHB” y “Polyhydroxybutyrate”.

En esta tabla (Tabla 1) se muestran los resultados obtenidos en estas tres bases de datos con las palabras claves mencionadas, indicando el número de artículos experimentales cuando el dato se encontraba disponible:

Bases	Palabras claves	Resultados	Artículos experimentales	Experimental + review
<i>ScienceDirect</i>	Rice husk, PHA production	29	9	
	Rice husk, Polyhydroxyalkanoates production	175	53	
	Rice hull, PHA production	78	17	
	Rice hull, Polyhydroxyalkanoates production	57	10	
	Rice husk, PHB production	134	32	
	Rice husk, Polyhydroxybutyrate production	61	10	
	Rice hull, PHB production	33	7	
	Rice hull, Polyhydroxybutyrate production	23	2	
	Rice husk, PHA production	175	—	69
	Rice husk, Polyhydroxyalkanoates production	95	—	33
	Rice hull, PHA production	51	—	21

<i>SpringerLink</i>	Rice hull, Polyhydroxyalkanoates production	37	—	9
	Rice husk, PHB production	71	—	31
	Rice husk, Polyhydroxybutyrate production	35	—	16
	Rice hull, PHB production	30	—	9
	Rice hull, Polyhydroxybutyrate production	14	—	5
<i>Scopus</i>	Rice husk, PHA production	2	2	
	Rice husk, Polyhydroxyalkanoates production	3	3	
	Rice hull, PHA production	0	0	
	Rice hull, Polyhydroxyalkanoates production	0	0	
	Rice husk, PHB production	8	7	
	Rice husk, Polyhydroxybutyrate production	5	4	
	Rice hull, PHB production	2	1	
	Rice hull, Polyhydroxybutyrate production	1	1	

Tabla 1. **Resultados de búsqueda con palabras clave.**

De los resultados obtenidos, la mayoría no guardaba relación con lo buscado: en muchos casos eran estudios sobre pretratamientos de otros materiales lignocelulósicos y residuos, estudios de biodegradación de bioplásticos, estudios y aplicaciones sobre la sílice y la ceniza de la cascarilla, y combinaciones de la cáscara de arroz con bioplásticos para obtener resinas compuestas. Por ello, se acabaron seleccionando los 9 artículos más acordes con el tema propuesto.

Como criterio de búsqueda, se seleccionaron publicaciones realizadas a partir del año 2012.

Como dato curioso, la mitad de los estudios seleccionados que produjeron bioplástico a partir de cascarillas de arroz se llevaron a cabo en India, y el resto se elaboró en China, Malasia y Tailandia. Todos ellos son países con un gran consumo de arroz.

Para la introducción de esta revisión bibliográfica, se buscó información de diferente naturaleza de la temática a abordar: desde los impactos ambientales de la producción de plástico, hasta diferentes métodos de tratamiento de material lignocelulósico y bacterias productoras de PHA. Varios libros sobre bioprocesos y biorrefinerías fueron empleados junto a una selección de artículos científicos publicados en las revistas con mayor índice de impacto. Las palabras claves empleadas fueron más generales para esta búsqueda que para la realizada con el cuerpo del trabajo, e incluyeron “Plastic degradation rate”, “Lignocellulosic wastes”, “Lignocellulose pretreatment”, “Polyhydroxyalkanoates”, y “PHA production”.

7 CONTENIDO

ACONDICIONAMIENTO

La materia prima que se emplea en biorrefinería es previamente sometida, de manera general, a un proceso de acondicionamiento. Este acondicionamiento busca reducir la granulometría, facilitando no solo cuestiones logísticas de transporte o secado,^[40] sino también acciones químicas, físicas o enzimáticas al aumentar la superficie expuesta de la materia prima.^[41] En el caso de los experimentos a nivel de laboratorio con cáscara de arroz, a menudo se describe cómo la materia es secada y molida, convertida en un polvo que será posteriormente tamizado para así obtener una granulometría homogénea.^{[42][43][44]} El tamaño final de la partícula puede variar de un estudio a otro, pero generalmente se fija este parámetro entre 0,5 mm y 0,420 mm (Figura 5).^{[45][46]} La reducción del tamaño influye directamente en los procesos posteriores de pretratamiento e hidrólisis, aumentando el rendimiento de azúcares reductores liberados.^[47]



Figura 5. Cáscara de arroz molida y tamizada. Granulometría de 0,5 mm. (Elaboración propia)

PRETRATAMIENTOS

El pretratamiento más empleado y eficaz para la cascarilla de arroz y otros materiales lignocelulósicos es el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, que en la mayoría de los estudios consigue también hidrolizar los polisacáridos en azúcares más sencillos.^{[48][49]} El ácido sulfúrico es más barato que el ácido nítrico o el fosfórico,^[50] y aunque es más tóxico que otros ácidos, corroe menos el material.^[51]

Khandpur et al. (2012)^[42] emplearon una mezcla de 750 μL de H_2SO_4 (de concentración inicial no indicada, aunque presumiblemente la comercial, 98 %) en 100 mL de agua destilada por cada 50 gramos de cascarilla en polvo, con una proporción sólido-líquido de 1:4. Los frascos con la suspensión del sustrato fueron autoclavados a una temperatura que no se indica, pero que probablemente sería la estándar que se emplea en la esterilización (120 °C a 1 atm de sobrepresión). Las muestras autoclavadas se filtraron con una muselina y el filtrado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se conservó para continuar con el resto de los experimentos.

También Tanamool et al. (2016)^[44] emplearon este tratamiento con ácido sulfúrico diluido, aunque en este caso investigaban la influencia de la concentración de éste y su temperatura sobre la producción de azúcares fermentables. La concentración de ácido sulfúrico varió desde 2,76 % a 11,24 % p/v, mientras que la temperatura osciló desde los 65,68 °C hasta los 129,32 °C. La estrategia que se siguió fue la de añadir a 5 gramos de cáscara de arroz en polvo 100 mL de la disolución de ácido sulfúrico. Esta mezcla fue calentada también en el autoclave en ese rango de temperaturas durante 20 minutos. Posteriormente, la suspensión se filtró, en este caso con estameña, un tejido de lana, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos, reservándose el sobrenadante.

En su estudio, Patel et al. (2014)^[52] hidrolizaron la cáscara de arroz molida (cantidad no señalada) con 2.5 % v/v de ácido sulfúrico y autoclavaron la mezcla a 121,1 °C durante 30 minutos. El hidrolizado resultante se filtró y, en este caso, el sobrenadante fue neutralizado con hidróxido de sodio 6 N para evitar la presencia de inhibidores microbianos que pudieran afectar a la etapa de fermentación.^[53]

El mismo tipo de pretratamiento/hidrólisis ácida fue empleado por Narayanan et al. (2014).^[43] En este caso a 100 gramos de cascarilla pulverizada se añadieron 1000 mL de agua con 0,5 % (v/v) de ácido sulfúrico (la concentración del ácido no se indicaba, probablemente fuera del 98 %). La mezcla, a diferencia de los anteriores estudios, se dejó 24 horas en reposo antes de ser autoclavada durante 15 minutos a 121 °C para solubilizar mejor la lignina. La mezcla se filtró y neutralizó con hidróxido de sodio 10 N.

Dinesh et al. (2020),^[54] que además de cascarilla de arroz también usaron su paja como residuos sólidos, también emplearon pretratamiento/hidrólisis ácida partiendo de H_2SO_4 concentrado al 98 %. El objetivo del estudio no era sólo producir bioplásticos, sino producirlos junto a biohidrógeno. Por cada gramo de cáscara o paja se emplearon 70 mg de este ácido y unos 9 mL de agua para que la proporción sólido-líquido fuese de 10:1. El tratamiento ácido se llevó a cabo a una temperatura de 145 °C durante 20 minutos. Tras la hidrólisis, la fracción líquida fue concentrada, calentándose a 70 °C durante 2 horas. El pH del hidrolizado también fue ajustado, por un lado a 10 con NaOH 1 M y por otro a 5,3 con H_2SO_4 1 M. Como en los estudios anteriores, el precipitado y el sobrenadante se separaron por centrifugación (16.000 g durante 15 minutos). Los sobrenadantes se reservaron para los siguientes pasos.

Otros estudios combinan el pretratamiento ácido con otros pretratamientos, como es el caso del pretratamiento físico de explosión de vapor flash, que emplearon Zhang et al. en 2020^[45] en su estudio para mejorar la sacarificación y la producción de PHA. En este estudio, cada gramo del polvo obtenido se trató con 10 mL de ácido sulfúrico diluido al 0,4 % (pH 1,1), con una buena agitación y mezclado. La muestra sumergida en el ácido se hirvió y se mantuvo a 100 °C durante 30 minutos, tras los cuales fue filtrada con una gasa. El filtrado se reservó para los análisis posteriores, mientras que la cáscara se lavó cuatro veces con agua destilada y se colocó en el reactor del equipo de explosión de vapor flash (Figura 6), donde se aumentó la presión dejando pasar el vapor hasta llegar a los 1,8 MPa, manteniéndose así durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la válvula se cerró y se provocó una explosión de vapor completa. La cáscara pretratada se secó en un horno a 60 °C y la muestra fue de nuevo molida y tamizada. El remojo en ácido provoca cambios en la microestructura de la cáscara y favorece la entrada del vapor en el interior de ésta con el tratamiento de explosión de vapor, mejorando la accesibilidad de las enzimas en procesos posteriores.^{[55][56]} Este tratamiento de explosión de vapor flash permite realizar un fraccionamiento mecánico y una degradación térmica al tiempo que rompe puentes de hidrógeno y reorganiza la estructura de la celulosa.^{[57][58]} Las diferencias que el efecto del pretratamiento genera en la microestructura de la cáscara del arroz puede verse en la Figura 7.

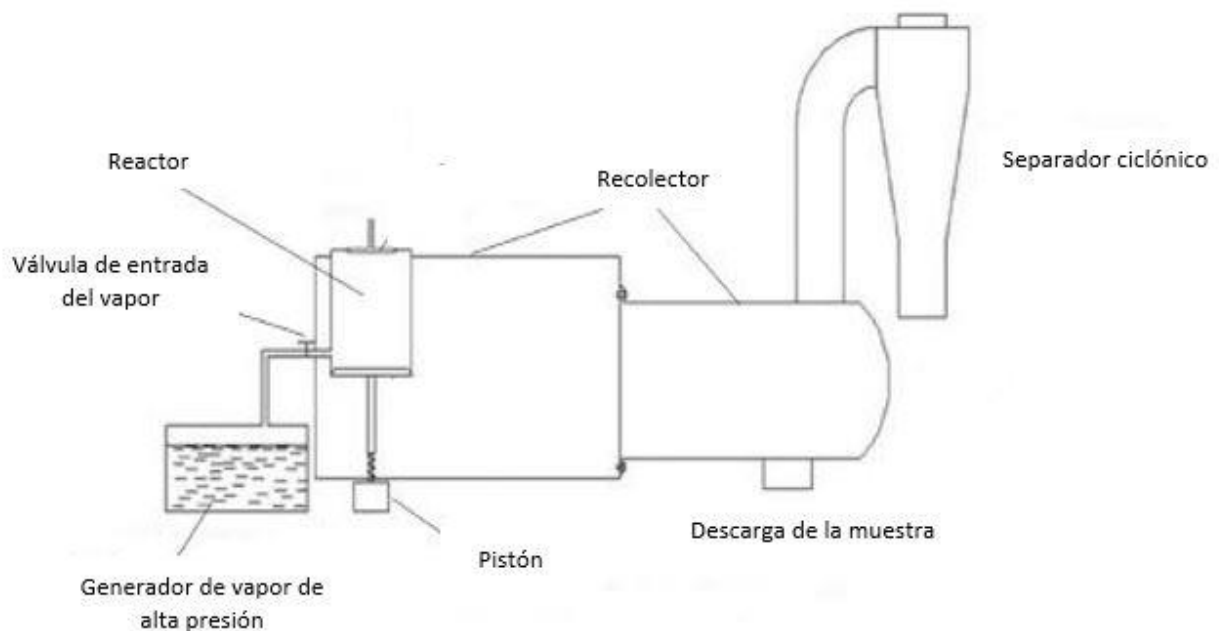


Figura 6. Equipo de explosión de vapor flash.^[45]

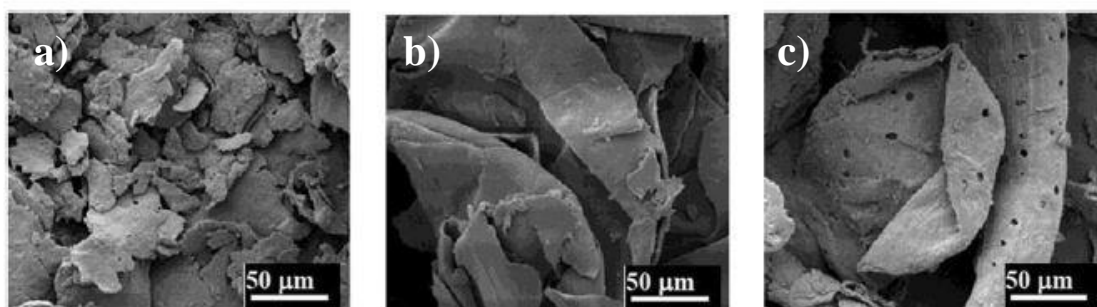


Figura 7. **Imágenes de microscopio electrónico de barrido.** La imagen “a” representa la cáscara de arroz sin tratar, la “b” es cáscara de arroz pretratada con ácido sulfúrico diluido y la “c”, cáscara pretratada con ácido sulfúrico diluido y explosión de vapor flash.^[45]

El objetivo del estudio de Gowda et al. (2014),^[59] a diferencia de los anteriores, que buscan mejorar la sacarificación con el pretratamiento, fue el de evaluar el potencial enzimático de la *Bacillus thuringiensis* para así poder evitar el pretratamiento, el paso más limitante y costoso a la hora de emplear la materia lignocelulósica.^[60] Este género de bacteria suele poseer actividad enzimática suficiente para liberar los azúcares sin ayuda de pretratamiento, por lo que interesaba demostrar esta capacidad en esta especie. Para poder realizar la comparación, se pretrató parte del sustrato también mediante el empleo de ácido sulfúrico diluido (con concentración variable desde 0,5 % hasta 5 % v/v) y fue autoclavado a 121 °C durante 30 minutos. La muestra hidrolizada se filtró y el sobrenadante se neutralizó con NaOH 6 N. Ojha et al. (2018)^[61] tampoco realizaron pretratamiento de la cascarilla antes de añadirla al medio de producción de PHA de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, sino que emplearon el propio potencial enzimático de la levadura para liberar los azúcares que posteriormente emplearía.

Pero no todos los artículos de tratamiento de cascarilla de arroz para la producción de PHA emplean pretratamiento ácido. Este es el caso de Heng et al. (2017),^[62] que realizaron pretratamientos alcalinos con NaOH y KOH usándolos en concentraciones de 0,1 mol/L y 1 mol/L, respectivamente. Junto a estas dos bases, se probaron tres condiciones de pretratamiento para evaluar cuál daba los mejores resultados. Una de ellas fue la temperatura ambiente, otra la irradiación microondas y la última la alta presión y temperatura. La cascarilla en polvo, siempre añadida al 6 % (p/v), se mezcló con las bases y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas en el primero de los casos. En el segundo caso del pretratamiento, que combinaba el microondas con las bases, la mezcla se incubó en el microondas a una frecuencia 2.450 MHz durante 15 minutos. El pretratamiento con alta presión y temperatura se realizó en un autoclave a presión 0,1 MPa durante 15 minutos. Cuando acabaron, las mezclas se filtraron y la fracción sólida se lavó hasta conseguir un pH 7. Para acabar el pretratamiento, esta fracción se secó en un horno hasta que el contenido de humedad fue eliminado.

HIDRÓLISIS

Como se ha visto en la primera parte de esta revisión bibliográfica, la mayoría de los estudios enfocados a la producción de PHA con cascarilla de arroz realizan un único paso con ácido sulfúrico diluido, que lleva a cabo las funciones del pretratamiento y de hidrólisis al mismo tiempo.

En el caso de algunos de estos estudios, una vez acabada la hidrólisis/pretratamiento se midieron los azúcares reductores liberados para poder calcular, posteriormente, la concentración de azúcares totales y reductores o su rendimiento. Tanamool et al. (2016),^[44] con el objetivo de conseguir la producción óptima de PHA, estudiaron este factor, viendo que la concentración de azúcares reductores y azúcares totales que se obtenían oscilaban entre el 12,36-30,12 g/L y el 0,28-6,66 g/L respectivamente. Mediante la metodología de superficie de respuesta obtuvieron dos ecuaciones que predecían sus valores. Los resultados se calcularon mediante un análisis de varianza con el objetivo de comprobar la validez de los modelos. Resultaron significativos estadísticamente, y el coeficiente de determinación en ambos modelos demostraba un buen ajuste con respecto a los resultados experimentales, por lo que el modelo quedó validado. El modelo indicó que la concentración de azúcares reductores aumentaba significativamente con el aumento de temperatura, aunque por encima de los 97,5 °C comenzaba a descender, transformándose parte de éstos en el inhibidor hidroximetilfurfural.^{[63] [64]} De la misma manera, el modelo indicaba que el aumento de la concentración de ácido sulfúrico mejoraba la producción de azúcares, aunque por encima del 10 % (p/v) se transformaban en inhibidores.^[63] Ocurría lo mismo con la cantidad total de azúcares, por lo que se deduce que la hidrólisis de la hemicelulosa en el modelo estaba siendo completa, y con ella parte de la de la celulosa. El análisis de superficie de respuesta determinó que las condiciones óptimas de pretratamiento eran el empleo de ácido sulfúrico al 9,20 % (p/v) y una temperatura de 107,86 °C durante 20 minutos, con lo que se conseguían unas concentraciones de azúcares reductores y totales de 6,93 g/L y 26,80 g/L, respectivamente. Para verificar esto, se realizaron experimentos con estas condiciones, obteniéndose 7,98 g/L y 30,80 g/L, dándose un rendimiento de la hidrólisis incluso mejor del esperado. Los azúcares fueron determinados empleando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).^[65]

Narayanan et al. (2014),^[43] que también llevaron a cabo una hidrólisis ácida, determinaron que el hidrolizado obtenido estaba compuesto, principalmente, de pentosas (xilosa en 5,5-7,1 g/L, arabinosa en 1,19-1,36 g/L), y hexosas como glucosa o galactosa. En esta investigación, la eficacia se determinó mediante el análisis de los azúcares residuales por el método fenol-ácido sulfúrico, dando información sobre el empleo de los azúcares fermentables por parte de la bacteria *Bacillus mycoides* DFC1, aunque los datos no vienen indicados en el documento.

Los resultados de la hidrólisis ácida realizada por Dinesh et al. (2020)^[54] a las cáscaras de arroz muestran que el empleo de ácido sulfúrico da buenos resultados a la hora de generar el hidrógeno y producir el PHB, precisamente porque consigue liberar una buena cantidad de glucosa de la cáscara (29,73 g/L),

además de ácidos grasos volátiles (164 mg/L). En el mismo estudio también se analizó la paja de arroz como sustrato, obteniéndose mejores resultados que con la cáscara de arroz (32,13 g/L de glucosa). Puede ser porque la cáscara contiene más lignina y sílice y menos celulosa y hemicelulosa que la paja.^[66]

Además de la hidrólisis ácida y la explosión de vapor flash, Zhang et al. en 2020^[45] en sus estudios también realizaron una hidrólisis enzimática. Con la primera, se consiguió hidrolizar la hemicelulosa a azúcares con buenos resultados, se cambió la estructura de la lignina y se aumentó la superficie de la celulosa. También aumentó su porosidad, lo que permitió un mejor efecto de la explosión de vapor a alta presión y una mejor accesibilidad enzimática posterior.^[55] Los poros aumentaron su tamaño, señal de que grandes cantidades de azúcares se iban liberando. Tras acabar la primera hidrólisis, la segunda fue llevada a cabo por una mezcla de celobiasa, endoglucanasa y hemicelulasa, obteniendo un rendimiento de azúcares reductores de 266,50 mg/g de cáscara de arroz (con 163,40 mg de glucosa, 87,50 mg de xilosa y 15,60 mg de arabinosa), frente a los 72,67 mg/g de cáscara de arroz obtenidos de la hidrólisis enzimática de la cáscara sin pretratar. Los azúcares obtenidos con las dos hidrólisis y la explosión por vapor triplican este valor, por lo que se puede asegurar que la combinación del tratamiento ácido y el tratamiento de vapor a alta presión resulta muy interesante para el tratamiento de materia lignocelulósica como las cascarillas.

Como se comentaba anteriormente, la intención de Gowda et al. (2014)^[59] es analizar el potencial hidrolítico de la bacteria *Bacillus thuringiensis* IAM12077 para poder prescindir de la hidrólisis ácida y de la hidrólisis enzimática con enzimas comerciales. Para ello, se realizaron pruebas con glucosa pura, almidón y residuos agrícolas y alimentarios, los de interés para este trabajo.

Para detectar la actividad de las enzimas hidrolíticas de la bacteria, se incubaron muestras de la biomasa con almidón y los otros sustratos en diferentes experimentos, y los azúcares liberados se midieron mediante el método del DNS. Los resultados obtenidos demostraron que la bacteria posee una buena actividad amilasa para todos los sustratos que se ensayaron, aunque el artículo no ofrece estos datos para poder determinar cuál fue el poder hidrolítico con la cascarilla de arroz. La ausencia de correlación entre la actividad amilasa y la producción de PHB sugirió, además, que la bacteria contenía también enzimas con otras actividades –como las celulasas–, que actuaron sobre los sustratos hidrolizándolos. Así mismo, se estudió la actividad hidrolítica de la bacteria utilizando los sustratos como la cascarilla pretratados con ácido para poder comparar. Como era de esperar, con el pretratamiento ácido se liberaron azúcares y, por tanto, la producción de PHB fue buena.

Ojha et al. (2018)^[61] en su estudio no indicaron el empleo de ningún pretratamiento. Mencionan que el sustrato pulverizado se añadió directamente al medio de producción, por lo que es presumible pensar que no llevó a cabo pretratamiento y que, al igual que el caso anterior, lo que se va a realizar es una hidrólisis enzimática con las enzimas de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*; en este caso aislada del jugo de caña de azúcar. En ningún momento se dan datos de los azúcares totales o los reductores,

sólo ofrecen información sobre la producción del PHA, por lo que no se puede sacar conclusiones del rendimiento enzimático de la levadura en cuestión.

En el estudio de Heng et al. (2017),^[62] la cascarilla de arroz pretratada con el pretratamiento alcalino es sometida a una posterior hidrólisis enzimática empleando el preparado enzimático comercial Celluclast 1,5 L para todas las condiciones. Con el pretratamiento de NaOH a 1 mol/L a temperatura ambiente, se obtuvo un rendimiento de azúcares reductores del 28 % con respecto al contenido de carbono total de la cáscara. Con la misma base y a la misma condición de temperatura, pero usando una concentración de 0,1 mol/L, el rendimiento fue tan solo del 13 %. Empleando la misma base, pero con la irradiación de microondas, se obtuvo un rendimiento de 35 % cuando la concentración de NaOH fue 1 mol/L, y de un 24 % cuando la concentración fue 0,1 mol/L. Con la condición de alta temperatura y presión, los rendimientos aumentaron, siendo de 62 % cuando la concentración era de 1 mol/L y 34 % cuando era de 0,1 mol/L. El empleo de KOH como base mejoró los rendimientos con respecto al NaOH con las tres condiciones. A temperatura ambiente y con la concentración de 1 mol/L, se obtuvo un 32 % de rendimiento, mientras que con concentración 0,1 mol/L el rendimiento fue 22 %. Empleando irradiación microondas, se consiguió un 42 % con KOH 1 mol/L y un 30 % con KOH 0,1 mol/L. Por último, el pretratamiento con KOH y alta presión y temperatura, resultó en un rendimiento de azúcares reductores de 70 % cuando la concentración era de 1 mol/L, y 60 % cuando era de 0,1 mol/L. Comparando todos los resultados (Figura 8), se puede observar que la mayor eficacia se conseguía empleando KOH.

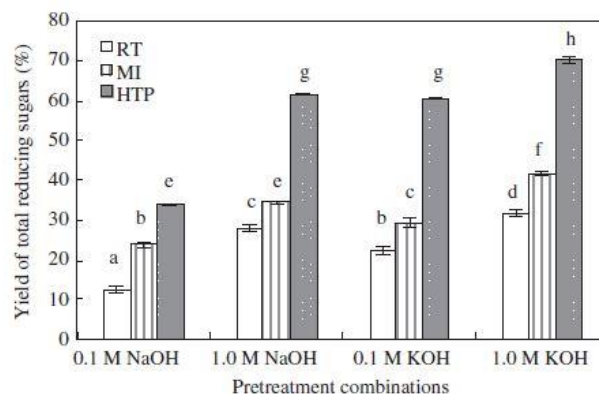


Figura 8. Rendimiento de azúcares totales tras la hidrólisis enzimática en función de la base y su concentración. Las condiciones vienen indicadas como RT (temperatura ambiente), MI (irradiación microondas) y HTP (alta temperatura y presión).^[62]

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pretratamiento, el sustrato hidrolizado pretratado fue sometido a una hidrólisis enzimática diferente: a un 2,5 % (p/v) del sustrato se le añadió Celluclast 1,5L y Novoenzyme 188 al 1 % (v/v) y 0,25 % (v/v), respectivamente, junto con 0,05 mol/L de tampón citrato para regular el pH durante la hidrólisis enzimática a un valor de 4,8). La mezcla se agitó durante 72 horas a 50 °C. Al final de este periodo, el hidrolizado se filtró y se esterilizó a 121 °C y 0,1 MPa durante 15 minutos, previo a su empleo como fuente de carbono de los microorganismos productores de PHA.

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Aunque muchos estudios emplean la bacteria *Cupriavidus necator* por estar tan estudiada y llevar a cabo la ruta de síntesis de PHA más conocida,^[67] lo observado en los estudios enfocados al empleo de la cascarilla de arroz es que existe un gran interés por aislar microorganismos presentes en el suelo o en residuos para analizar su potencial como productores de polihidroxicanoatos.

Khandpur et al. (2012)^[42] usaron *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* suministradas por el Instituto de Investigación Biogenics (Hubli, India) de manera individual para analizar su producción de PHA usando diferentes sustratos como fuente de carbono, entre ellos la cascarilla. Tras dos días de incubación en el medio adecuado, las bacterias se inocularon al medio de producción (con extracto de levadura, el sustrato, NaHPO₄·7H₂O, K₂HPO₄, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄ y CaCl₂), cuya fuente de carbono era el sobrenadante obtenido del pretratamiento de los residuos. Ya observando su crecimiento individual en el medio, se observó que la *Pseudomonas aeruginosa* crecía de forma más rápida. Mediante la tinción empleando cristal violeta, se pudieron determinar células coloreadas al microscopio, confirmándose la producción de PHA por ambas bacterias. Sin embargo, analizando los picos obtenidos por GC-MS, la gráfica de la bacteria *Bacillus subtilis* mostraba muchos picos que indicaban contaminación, mientras que en la de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* los picos eran claros y no sobrepasaban la relación masa/carga esperada para el PHA. La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* consiguió una producción del 48 % de PHA con la cáscara de arroz, aunque la mejor producción la obtuvo con aceite de freír usado (60 %).

Tanamool et al.^[44] aislaron 10 cepas de bacterias del suelo, aunque en ningún momento fueron identificadas. Estas cepas fueron seleccionadas por su habilidad para crecer en un medio de xilosa y posteriormente fueron incubadas durante 24 horas antes de ser transferidas al medio de producción de PHA, cuya fuente de carbono era el hidrolizado sin detoxificar de cáscara de arroz tratado bajo las condiciones óptimas estudiadas (9,20 % p/v de ácido sulfúrico y 107,86 °C). Las bacterias se incubaron durante 3 días con agitación a una temperatura de 30 °C. Obtenidos los resultados, se vio que todas las cepas fueron capaces de emplear el hidrolizado de cascarilla de arroz, obteniéndose un peso seco celular de entre 0,53 y 1,01 g/L y un PHA acumulado de 4,32 a 11,20 % (p/p). La cepa que permitió obtener una mayor producción de polímero fue la NK13, que acumuló el 11,20 % (p/p) de PHA. Para la medida del PHA se utilizó el método de análisis del ácido crotónico: al polímero se le añadió ácido sulfúrico caliente, formando ácido crotónico, que pudo medirse espectrofotométricamente. La absorbancia de la solución de este ácido fue medida y la cantidad de PHA por gramo de peso seco celular se pudo determinar con una curva de calibrado.

Los autores explican la menor producción con respecto a otros estudios (Gowda et al., 2014)^[59] por el hecho de que, como el hidrolizado no fue detoxificado, probablemente contuviera una gran cantidad de inhibidores que afectó al crecimiento microbiano. Con todo, el objetivo del estudio se cumplió: se

consiguió obtener PHA a partir de una fuente de carbono económica y con una bacteria aislada del suelo sin tener que realizar un proceso de detoxificación y, por tanto, reduciendo el precio de la producción de PHA.

Patel et al. (2014),^[52] al igual que en el estudio realizado por Khandpur et al. en 2012, emplearon *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de PHA a partir de cascarilla de arroz. Se empleó un medio de cultivo al que se le añadió el hidrolizado en lugar de glucosa como fuente de carbono y se inoculó con un 10 % (v/v) de un inóculo de 24 h de la bacteria. El medio de cultivo se incubó durante 48-72 horas a 37 °C con agitación. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 6.000 rpm durante 15 minutos y los pellets obtenidos se lavaron y dejaron secar durante un día entero a 60 °C para poder determinar el peso seco celular. A continuación, para la extracción del PHB, se rompieron las paredes celulares mediante la adición a la biomasa de hipoclorito de sodio y su incubación durante 2 horas. Tras otra centrifugación, se separó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el precipitado con una mezcla etanol:acetona 1:1 y así se eliminaron las moléculas que no eran de interés, como proteínas, ácidos nucleicos, etc. Finalmente, el pellet se resuspendió en cloroformo caliente y, tras su evaporación, se obtuvieron los cristales de PHB. Para la medida del PHB se utilizó el método de análisis del ácido crotónico. Con ácido sulfúrico el PHB se transformó en ácido crotónico. La absorbancia de la solución obtenida se midió y la cantidad de PHB por gramo de peso seco celular determinó con la curva de calibrado. Estudiando los datos obtenidos, se observó que la mayor producción del bioplástico se obtenía con la cáscara de arroz y no con otros residuos, y que, además, se obtuvo a las 48 horas del cultivo, siendo 0,26 g/L.

Narayanan et al.^[43] también usaron una bacteria aislada del suelo, en este caso *Bacillus mycoides* DFC1, para obtener PHA. En esta investigación, el polihidroxialcanoato de interés fue un copolímero, una macromolécula formada por dos o más monómeros. El copolímero producido fue poli(3-Hidroxi butirato-co-3-Hidroxi valerato). Para su producción, el medio se realizó empleando el hidrolizado de arroz (10 %) y un hidrolizado de gluten (2 %), que previamente había demostrado ser la mejor fuente de nitrógeno para la producción de PHA en comparación con otras fuentes probadas. También se adicionó ácido valérico, ya que es un precursor muy efectivo para la síntesis del poliéster, por lo que se estudió la concentración óptima de este variando su concentración en el medio desde 0 hasta 50 mM/L. El cultivo se monitorizó cada 12 horas para ver cómo progresaba la producción del polímero y el crecimiento bacteriano, hasta transcurridas las primeras 48 horas. Pasado este tiempo, la biomasa se separó del medio de cultivo por centrifugación a 9.000 g durante 10 minutos y se lavó con agua destilada. El peso seco celular se midió para poder calcular rendimientos y concentraciones. Al igual que en el estudio de Patel et al., se empleó cloroformo e hipoclorito sódico para la rotura celular y la extracción del PHA de la biomasa, y acetona para lavar el precipitado de PHA. De nuevo, se resuspendió el polímero precipitado en hipoclorito sódico y cloroformo y se dejó en agitación durante 3

horas, hasta que se formaron tres fases, siendo la inferior la de interés (por contener cloroformo con el PHA disuelto). El PHA se cuantificó mediante el método gravimétrico descrito por Hahn et al. en 1995.^[68] Por último, el polímero se purificó. Los resultados mostraron que el crecimiento bacteriano aumentaba con la adición de ácido valérico, hasta que la concentración de éste llegó a los 30 mM, a la cual se observó una clara inhibición del crecimiento. En los estudios de producción del copolímero, se analizaron los resultados obtenidos con una concentración 5 mM de ácido valérico y se vio que la mayor producción del polímero se conseguía cuando el ácido se añadía tras 8 o 16 horas de crecimiento bacteriano (se obtenía una acumulación de 34,5 % p/p, concentración de 0,38 g/L). La adición del ácido en las últimas etapas del crecimiento, al contrario, disminuía la producción del copolímero.

El estudio de Dinesh et al. (2020)^[54] difiere del resto de los artículos comentados, puesto que tiene como objetivo la producción de biohidrógeno además de PHB mediante el empleo consecutivo de la fermentación oscura (producción de H₂ a partir de materia rica en carbohidratos) y la fotofermentación (producción de H₂ por la fijación de N₂).^[69] Las bacterias anaerobias se aislaron de aguas residuales de la industria láctea y de un molino de arroz, mientras que las bacterias fototróficas se aislaron sólo de las aguas procedentes de la industria láctea. Se aislaron once cepas de bacterias anaerobias de las aguas residuales de la industria láctea, junto con dos aisladas de las aguas residuales del molino de arroz. Todas fueron estudiadas por su actividad productora de hidrógeno: en un primer análisis, solo cuatro cepas (tres de las once y una de las dos) dieron resultados positivos usando los sustratos de interés, dándose los mejores resultados con el hidrolizado de paja de arroz y el de cáscara de arroz. De estas cuatro cepas, sólo una dio resultados positivos en la producción de PHB, la que fue seleccionada para experimentos posteriores. En cuanto a la búsqueda de bacterias fototróficas productoras, el procedimiento fue muy parecido, con la diferencia de que las muestras inoculadas del agua residual se mantuvieron 7 días bajo una luz intensa. Se obtuvieron dos cepas, que fueron analizadas para estudiar sus capacidades de producción en los sustratos. Ambas producían biohidrógeno con el hidrolizado de cáscara de arroz y sólo una de ellas producía PHB, por lo que esa fue la seleccionada. Las bacterias escogidas fueron identificadas como *Bacillus cereus* la primera y *Rhodospseudomonas rutila* la segunda.

Aunque en el artículo se estudió por separado la fermentación oscura y la fotofermentación, un proceso por lotes en el que se empleen por separado los procesos de producción de biohidrógeno y PHB, no es aplicable a nivel industrial. Lo interesante sería la integración de la fermentación oscura y la fotofermentación en una única unidad de proceso; por ello sería interesante encontrar bacterias anaeróbicas y fotosintéticas que permitan obtener bioenergía y bioplásticos en un único paso realizando dos reacciones consecutivas.

Para conseguirlo en este estudio, el hidrolizado de cascarilla se empleó al 100 % de su concentración y pH 7, al igual que el hidrolizado de paja, puesto que fueron las mejores condiciones observadas durante el estudio de las fermentaciones individuales. El hidrolizado obtenido tras la fermentación oscura se

inoculó con *Rhodospseudomonas rubra*, tanto autoclavado como sin autoclavar, para conseguir la mayor producción de H₂ y PHB posible. En el hidrolizado de cáscara de arroz autoclavado el rendimiento de hidrógeno medido fue de 1,58 mol H₂/mol glucosa y la concentración de PHB obtenida fue de 15,7 g/L. En el hidrolizado sin autoclavar los resultados fueron mejores, siendo el rendimiento de producción de hidrógeno de 1,73 mol H₂/mol glucosa y la concentración de PHB de 16,08 g/L. Estos mismos experimentos, pero empleando hidrolizado de paja de arroz en vez de cascarilla, dieron mejores resultados, como se había visto anteriormente también en otros estudios. A este respecto, cabe destacar la posibilidad de poder escalar el proceso sin necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad, y de poder emplear residuos lignocelulósicos como materia prima de partida, lo que supone una gran ventaja económica que las biorrefinerías deberían considerar.

Zhang et al. en 2020^[45] en su estudio buscaron optimizar las condiciones de cultivo para la producción de PHA mediante la metodología de superficie de respuesta, y para ello tomaron como variables de estudio la concentración de carbono, la de nitrógeno, el valor de pH y la temperatura. Los valores de los coeficientes obtenidos resultaron significativos y mostraron la existencia de interacciones entre las variables. El modelo también resultó ser significativo. El coeficiente de correlación fue muy bueno, lo que daba mayor validez al modelo. Las condiciones óptimas para la producción de PHBs obtenidas por el modelo indicaron que la concentración de carbono debía ser 31,81 g/L, la de nitrógeno 1,8 g/L, el pH 7 y la temperatura 27,1 °C. El rendimiento de PHB óptimo teórico fue de 5,05 g/L. Para comprobarlo, se realizaron experimentos que proporcionaron un rendimiento de 5 g/L, resultados del orden de magnitud de los predichos por el modelo, por lo que se dio por válido y bueno. En este caso, la fermentación se llevó a cabo con la cepa *Cupriavidus necator*.

Gowda et al. (2014)^[59] usaron para el cultivo la misma bacteria que ya habían empleado para la hidrólisis, la *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. El género *Bacillus* en general posee la capacidad de emplear gran variedad de residuos agrícolas para la producción de PHA. Así, en este estudio se quiso comprobar esta característica en la cepa *Bacillus thuringiensis* empleando bagazo, sorgo, cáscara de ragi, paja de arroz, cascarilla de arroz, salvado de trigo, piel de mango, polvo de semillas de yaca y piel de patata como materia prima. En todos los casos se produjo PHA, siendo la cáscara de arroz el tercer mejor sustrato, con un rendimiento de PHA de 1,56 g/L y una acumulación del 32,7 %. Cuando se realizaron los mismos cultivos, pero partiendo de estos mismos sustratos pretratados, los resultados cambiaron: ya no era la piel de mango el mejor, sino el polvo de semilla de yaca. La cascarilla de arroz descendió al quinto puesto, con unos datos menores de rendimiento (1,46 g/L) y de acumulación de PHA (29,4 %). Aunque en el artículo no se especifica la causa, es probable que se debiera a la aparición de inhibidores microbianos fruto de la transformación de los azúcares en condiciones ácidas.^[70]

En el estudio descrito por Ojha et al. (2018),^[61] se optimizó la producción de PHA a partir de melaza de caña de azúcar de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 mediante la metodología de

superficie de respuesta. En este caso las variables a estudiar fueron la concentración de melaza de caña de azúcar, el tiempo de incubación, la adición de licor fermentado de maíz, el pH, la temperatura y la concentración de grasa de palma. La cáscara de arroz sólo fue empleada al inicio de los experimentos cuando se realizó un screening para encontrar la mejor fuente de carbono para la producción de PHA. Para ello, 2 gramos de la materia prima pulverizada (fuente de carbono) se añadieron a 100 mL del medio de producción, junto con un 2 % de inóculo de la levadura. El medio se incubó durante 96 horas a 37 °C a pH 8. Los resultados mostraron que la mejor fuente de carbono era la melaza de caña de azúcar (41,5 % de PHA), con la que se producía bastante más cantidad de polímero que con la cascarilla de arroz (26,4 %). Es por esto que en el resto de la experimentación se continuó trabajando y realizando el análisis con la melaza de caña de azúcar, sustrato sin interés para este trabajo. La identificación del PHA se realizó mediante el análisis del ácido crotonico tal y como se describió anteriormente con el estudio de Tanamool et al. (2016).^[44]

Heng et al. (2017),^[62] por su parte, emplearon dos bacterias para la producción de PHB: *Burkholderia cepacia* USM, aislada de una muestra de agua residual contaminada con aceite y *Cupriavidus necator* NSDG-GG, una cepa modificada genéticamente a partir de *Cupriavidus necator* H16, por la sustitución de su gen *phaC* por el *phaC* mutante de la *Aeromonas caviae*. Esta última emplea mejor la glucosa, puesto que la H16 no puede asimilarla fácilmente de manera natural.^[71] El medio de producción de *Burkholderia cepacia* USM contenía Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Mg₂SO₄·7H₂O y oligoelementos (su pH fue de 7), mientras que el de la *Cupriavidus necator* se realizó con NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, K₂SO₄, Mg₂SO₄, CaCl₂ y oligoelementos (con pH 6.8). Como fuente de carbono se empleó el hidrolizado y como fuente de nitrógeno, se probó tanto con urea como con NH₄Cl. El contenido de PHA fue determinado por análisis de cromatografía de gases.

Una vez que se determinaron las mejores condiciones de pretratamiento y de hidrólisis enzimática, se estudió qué bacteria daba lugar a un mejor rendimiento, además del efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de PHA. *Burkholderia cepacia* USM, incubada a 37 °C, produjo un peso seco celular mayor (4,9 g/L) empleando la cáscara de arroz como materia prima que cuando empleaba la glucosa (4,7 g/L), pero no ocurría lo mismo con el contenido de PHA, que fue menor (40 % en peso) cuando se empleó el hidrolizado de cascarilla. *Cupriavidus necator* NSDG-GG, con incubación a 30 °C, no tuvo muy buenos resultados empleando el hidrolizado comparándolos con los obtenidos con la glucosa (3,7 g/L de peso seco celular y 38 % en peso de PHA, comparados con 10,4 g/L de peso seco celular y 70 % en peso de PHA en glucosa).

Para analizar el efecto de la fuente de nitrógeno, se ensayaron concentraciones de urea y NH₄Cl de 0,5 g/L y 0,27 g/L respectivamente con la bacteria que había dado mejores resultados (*Burkholderia cepacia* USM). Aunque la urea demostró ser mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento bacteriano, el

contenido de PHA proporcionó peores resultados: con NH_4Cl se consiguió el 72 % en peso, mientras que con urea se obtuvo el 62 %.

En la Tabla 2 pueden verse, a modo de resumen, las estrategias seguidas por los diferentes autores y sus resultados.

Microorganismos	Pretratamientos	Hidrólisis	PHA acumulado (peso/peso celular seco)	Concentración PHA (g/L)	Referencias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 120 °C)		48,0 %	–	(Khandpur, 2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 120 °C)		–	–	
NK13 (no identificada)	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 107,86 °C)		11,2 %	–	(Tanamool, 2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 121 °C)		24,1 %*	0,26	(Patel, 2014)
<i>Bacillus mycoides</i>	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 121 °C)		34,5 %	0,38	(Narayanan, 2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	—	Hidrólisis enzimática directa	32,7 %	1,56	(Gowda, 2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Hidrólisis ácida (H_2SO_4 , 121 °C) e hidrólisis enzimática directa		29,4 %	1,46	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrólisis alcalina, diluida (KOH, NaOH)	Hidrólisis enzimática	40,0 %	–	(Heng, 2017)
<i>Cupriavidus necator NSDG-GG</i>	Hidrólisis alcalina, diluida (KOH, NaOH)	Hidrólisis enzimática	38,0 %	–	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	—	Hidrólisis enzimática	26,4 %	–	(Ojha, 2018)
<i>Bacillus cereus y Rhodopseudomonas rubra</i>	Hidrólisis con ácido diluido (H_2SO_4 , 145 °C)		–	16,08	(Dinesh, 2020)
<i>Cupriavidus necator</i>	Hidrólisis ácida (H_2SO_4 , 100 °C) con explosión flash de vapor		–	5,00	(Zhang, 2020)

Tabla 2. Diferentes estrategias seguidas por las principales referencias.

* %PHA calculado a partir de datos aportados en su artículo correspondiente.

8 CONCLUSIONES

El empleo de cascarilla de arroz como materia prima para la obtención de polihidroxicanoatos es un proceso relativamente novedoso y se encuentra aún poco estudiado. Con esta revisión bibliográfica se puede concluir que:

1. El pretratamiento ácido, generalmente con ácido sulfúrico diluido, es el más comúnmente utilizado para eliminar la lignina y romper la compleja estructura de la lignocelulosa de la cascarilla de arroz.
2. La combinación de la hidrólisis ácida con la explosión de vapor flash permite obtener una concentración de azúcares reductores tres veces mayor tras la hidrólisis enzimática que la obtenida empleando exclusivamente la hidrólisis ácida. Esto es debido a que se produce un fraccionamiento mecánico y una degradación térmica del residuo, al tiempo que se rompen puentes de hidrógeno y se reorganiza la estructura de la celulosa.
3. Los microorganismos con potencial hidrolítico suficientemente elevado como para no necesitar pretratar los residuos antes de realizar la hidrólisis deben de seguir siendo estudiados, puesto que suponen un considerable ahorro energético y de costes de operación.
4. Para la producción de PHA a partir cascarilla de arroz pueden emplearse microorganismos de diferente naturaleza, ya sean obtenidos mediante ingeniería genética o aislados directamente del suelo o de aguas residuales. Sin embargo, generalmente se emplean microorganismos del género *Bacillus*, por su capacidad de empleo de gran variedad de residuos agrícolas, y *Cupriavidus necator*, por el amplio conocimiento sobre sus rutas de síntesis de PHA que aparece bien documentado en la literatura.
5. La cascarilla de arroz es una materia materia prima adecuada para la producción de polihidroxicanoatos. La productividad de PHA es superior que la obtenida empleando otros residuos lignocelulósicos, si bien se pueden obtener mejores rendimientos empleando otros como la propia paja de arroz.

9 PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los residuos lignocelulósicos poseen un gran potencial y pueden llegar a ser la solución, o al menos parte de ella, de los problemas que el ser humano ha ido ocasionando hasta el momento con el empleo de recursos fósiles. Sin embargo, para alcanzar esta solución aún habrá que esperar. A pesar de que los resultados de la producción de bioplásticos como el polihidroxialcanoato a partir de residuos como cáscaras de arroz son positivos, todavía queda un largo camino de investigaciones y profundización en las variables del proceso que debe ser recorrido antes de conseguir el escalamiento y la producción a escala industrial, para que sea un proceso rentable y de interés.

La cascarilla de arroz se obtiene en grandes cantidades en la industria arroceras y no tiene muchas aplicaciones, lo que la convierte en una candidata ideal como futura materia prima en las biorrefinerías, ya sea como sustrato para la producción de bioplásticos o como materia prima para la producción de bioetanol, energía u otros productos químicos. Para el futuro resulta muy interesante la obtención en una misma biorrefinería de varios tipos de productos, como es el caso del artículo comentado en esta revisión en el que se obtenía biohidrógeno y bioplástico.

En el año 2015, diferentes estados miembros de las Naciones Unidas, entre ellos los países de la Unión Europea, firmaron y adoptaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible,^[72] con la que se buscaba conseguir 17 objetivos de desarrollo sostenible y otras 169 metas relacionadas en los próximos años. Con las estrategias tomadas para alcanzar los objetivos, se persigue potenciar el empleo de recursos biológicos como principal materia prima de biomateriales y bioenergía mediante el empleo de bioprocesos. La Unión Europea también busca lograr que todos los plásticos de su mercado sean reutilizables o reciclables y reducir así la dependencia europea a los combustibles fósiles.

Los bioplásticos son piezas claves en la construcción de la bioeconomía circular y sostenible planteada por la Unión Europea, y se estima que para 2021 esta cuenta con la cuarta parte de la capacidad productiva global.^[73] Muchas iniciativas europeas científicas apoyan este objetivo, como el proyecto NENU2PHAR,^[74] que obtiene polímeros biodegradables empleando como fuente de carbono biomasa.

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Kedzierski, M., Frère, D., Le Maguer, G., & Bruzard, S. (2020). Why is there plastic packaging in the natural environment? Understanding the roots of our individual plastic waste management behaviours. *Science of the Total Environment*, 740, 139985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139985>
- [2]. Walker, S., & Rothman, R. (2020). Life cycle assessment of bio-based and fossil-based plastic: A review. *Journal of Cleaner Production*, 261, 121158. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121158>
- [3]. Eyerer, P., Gettwert, V., Kauffman, A., Kroh, M., & Beilharz, F. (2010). Polymers - Opportunities and Risks I. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 11(4), 1–293. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-88417-0>
- [4]. Plastics Europe, & EPRO. (2019). *Plastics - the Facts 2019*. (s.f). Recuperado el 18 de febrero de 2020, de <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>
- [5]. Thompson, R. C., Moore, C. J., Saal, F. S. V., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153–2166. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>
- [6]. *Encuentran restos de plástico en el punto más profundo del océano*. (2019, 15 mayo). Recuperado el 14 de junio de 2020, de National Geographic España: https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/encuentran-restos-plastico-punto-mas-profundo-oceano_14257
- [7]. Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- [8]. Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- [9]. Hamilton, L. A., Feit, S., Muffett, C., & Kelso, M. (2019). Plastic & Climate: The hidden costs of plastic planet. *Center of International Environmental Law*, 1–108. <https://www.ciel.org/reports/plastic-health-the-hidden-costs-of-a-plastic-planet-may-2019/>

- [10]. Royer, S.-J., Ferrón, S., Wilson, S. T., & Karl, D. M. (2018). Production of methane and ethylene from plastic in the environment. *PLOS ONE*, 13(8): e0200574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200574>
- [11]. Flieger, M., Kantorová, M., Prell, A., Řezanka, T., & Votruba, J. (2003). Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*, 48(1), 27–44. <https://doi.org/10.1007/BF02931273>
- [12]. Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24(3), 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>
- [13]. Yadav, B., Pandey, A., Kumar, L. R., & Tyagi, R. D. (2020). Bioconversion of waste (water)/residues to bioplastics- A circular bioeconomy approach. *Bioresource Technology*, 298, 122584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122584>
- [14]. Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- [15]. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- [16]. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2015). The main characteristics, properties, improvements, and market data of polyhydroxyalkanoates. *Handbook of Sustainable Polymers, October*, 899–928. <https://doi.org/10.1201/b19600-25>
- [17]. Yu, J., & Chen, L. X. L. (2008). The greenhouse gas emissions and fossil energy requirement of bioplastics from cradle to gate of a biomass refinery. *Environmental Science and Technology*, 42(18), 6961–6966. <https://doi.org/10.1021/es7032235>
- [18]. Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
- [19]. 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. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>

- [20]. Yang, S.-T., El-Enshasy, H., & Thongchul, N. (2013). *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [21]. Monteiro de Souza, P., & de Oliveira e Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000400004>
- [22]. Bentsen, N. S., Felby, C., & Thorsen, B. J. (2014). Agricultural residue production and potentials for energy and materials services. *Progress in Energy and Combustion Science*, 40(1), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2013.09.003>
- [23]. Mohammed, N. I., Kabbashi, N., & Alade, A. (2018). Significance of Agricultural Residues in Sustainable Biofuel Development. *Agricultural Waste and Residues*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78374>
- [24]. Gobierno de España. Ministerio de Agricultura y Pesca, (2016). Distribución de la superficie y producción de arroz en España por Comunidades Autónomas. *Avances de Superficies y Producciones*, 28010.
- [25]. Agencia Extremeña de la Energía. (2010). *Los residuos de las industrias agrícolas*.
- [26]. Agencia Andaluza de la Energía. (2017). *La Biomasa en Andalucía*.
- [27]. Ugheoke, I. B., & Mamat, O. (2012). A critical assessment and new research directions of rice husk silica processing methods and properties. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6(3), 430–448.
- [28]. Ingle, A. P., Chandel, A. K., & da Silva, S. S. (2020). *Lignocellulosic Biorefining Technologies*. John Wiley & Sons Ltd.
- [29]. Nishimura, H., Kamiya, A., Nagata, T., Katahira, M., & Watanabe, T. (2018). Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24328-9>
- [30]. dos Santos, A. C., Ximenes, E., Kim, Y., & Ladisch, M. R. (2019). Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Trends in Biotechnology*, 37(5), 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.010>

- [31]. Verardi, A., De, I., Ricca, E., & Calabr, V. (2012). Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives. *Bioethanol*, *January*. <https://doi.org/10.5772/23987>
- [32]. Torget, R., & Teh-An, H. (1994). Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *45–46(1)*, 5–22. <https://doi.org/10.1007/BF02941784>
- [33]. Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2015). Alkaline treatment. *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00004-9>
- [34]. Khan, M. A. (2010). Hydrolysis of hemicellulose by commercial enzyme mixtures. *Lulea University of Technology*, 1–28. <https://doi.org/1402-1552> - ISRN: LTU-DUPP--10/040--SE
- [35]. Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., & Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, *18(2)*, 341–357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760>
- [36]. González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *29(1)*, 77–115.
- [37]. Tarazona Lizcano, N. (2019). *Characterization of phasin PhaF interactions in the model polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium, Pseudomonas putida KT2440* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- [38]. Munir, S., & Jamil, N. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *Journal of Basic Microbiology*, *58(3)*, 247–254. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700276>
- [39]. Sakai, K., Miyake, S., Iwama, K., Inoue, D., Soda, S., & Ike, M. (2015). Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA-accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*, *118(1)*, 255–266. <https://doi.org/10.1111/jam.12683>
- [40]. Lim, J. S., Abdul Manan, Z., Wan Alwi, S. R., & Hashim, H. (2012). A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16(5)*, 3084–3094. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.051>

- [41]. Kumari, D., & Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(May 2017), 877–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>
- [42]. Khandpur, P. (2012). Study on production, extraction and analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from bacterial isolates. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(1), 31–38. <https://doi.org/10.9790/3008-0113138>
- [43]. Narayanan, A., Kumar, V. A. S., & Ramana, K. V. (2014). Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus mycoides* DFC1 using rice husk hydrolyzate. *Waste and Biomass Valorization*, 5(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9213-3>
- [44]. Tanamool, V., & Soemphol, W. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by newly bacterial isolates using non-detoxified rice husk hydrolysate. *KKU Research Journal*, 21, 404–410. <https://doi.org/10.14456/kkurj.2016.41>
- [45]. Zhang, Y., Wang, L., Li, T., Shen, Y., & Luo, J. (2020). Acid soaking followed by steam flash-explosion pretreatment to enhance saccharification of rice husk for poly(3-hydroxybutyrate) production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.218>
- [46]. Wei, G. Y., Gao, W., Jin, I. H., Yoo, S. Y., Lee, J. H., Chung, C. H., & Lee, J. W. (2009). Pretreatment and saccharification of rice hulls for the production of fermentable sugars. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6), 828–834. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0029-8>
- [47]. Shahabazuddin, M., Sarat Chandra, T., Meena, S., Sukumaran, R. K., Shetty, N. P., & Mudliar, S. N. (2018). Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresource Technology*, 263, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.027>
- [48]. Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., & Chen, C. (2007). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(3), 276–290. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0026-3>
- [49]. Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>

- [50]. Cao, L., Chen, H., Tsang, D. C. W., Luo, G., Hao, S., Zhang, S., & Chen, J. (2018). Optimizing xylose production from pinewood sawdust through dilute-phosphoric-acid hydrolysis by response surface methodology. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 178). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.039>
- [51]. Lorenci Woiciechowski, A., Dalmas Neto, C. J., Porto de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D. P., Novak Sydney, A. C., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Zevallos Torres, L. A., & Soccol, C. R. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology*, *304*, 122848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>
- [52]. Patel, S. S. (2014). Production of Polyhydroxybutyrate using agro-industrial waste by *Psuedomonas aeruginosa*. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, *3*(2), 107–110. <http://www.ijisr.issr-journals.org/abstract.php?article=IJISR-14-109-04>
- [53]. Buhner, J., & Agblevor, F. A. (2004). Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, *119*(1), 13–30. <https://doi.org/10.1385/ABAB:119:1:13>
- [54]. Dinesh, G. H., Nguyen, D. D., Ravindran, B., Chang, S. W., Vo, D. V. N., Bach, Q. V., Tran, H. N., Basu, M. J., Mohanrasu, K., Murugan, R. S., Swetha, T. A., Sivapraksh, G., Selvaraj, A., & Arun, A. (2020). Simultaneous biohydrogen (H₂) and bioplastic (poly-β-hydroxybutyrate-PHB) productions under dark, photo, and subsequent dark and photo fermentation utilizing various wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(10), 5840–5853. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.036>
- [55]. Datar, R., Huang, J., Maness, P. C., Mohagheghi, A., Czernik, S., & Chornet, E. (2007). Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, *32*(8), 932–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.09.027>
- [56]. 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- [57]. Chen, W. H., Pen, B. L., Yu, C. T., & Hwang, W. S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *102*(3), 2916–2924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.052>

- [58]. Yu, C. T., Chen, W. H., Men, L. C., & Hwang, W. S. (2009). Microscopic structure features changes of rice straw treated by boiled acid solution. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.06.005>
- [59]. Gowda, V., & Shivakumar, S. (2014). Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 55–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100009>
- [60]. Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
- [61]. Ojha, N., & Das, N. (2018). A Statistical approach to optimize the production of Polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using Response Surface Methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(November), 2157–2170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.089>
- [62]. Heng, K. S., Hatti-Kaul, R., Adam, F., Fukui, T., & Sudesh, K. (2017). Conversion of rice husks to polyhydroxyalkanoates (PHA) via a three-step process: optimized alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, and biosynthesis by *Burkholderia cepacia* USM (JCM 15050). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(1), 100–108. <https://doi.org/10.1002/jctb.4993>
- [63]. Gao, X., Kumar, R., Demartini, J. D., Li, H., & Wyman, C. E. (2013). Application of high throughput pretreatment and co-hydrolysis system to thermochemical pretreatment. Part 1: Dilute acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3), 754–762. <https://doi.org/10.1002/bit.24751>
- [64]. Dagnino, E. P., Chamorro, E. R., Romano, S. D., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2013). Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.019>
- [65]. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- [66]. Mirmohamadsadeghi, S., & Karimi, K. (2020). Recovery of silica from rice straw and husk. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64321-6.00021-5>

[67]. Masood, F. (2017). Polyhydroxyalkanoates in the Food Packaging Industry. In *Nanotechnology Applications in Food: Flavor, Stability, Nutrition and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00008-X>

[68]. Sei Kwang Hahn, Yong Keun Chang, & Sang Yup Lee. (1995). Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 34–39.

[69]. Martínez, V., & García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. *Dirección General de Investigación y Desarrollo Armada Argentina*, September, 7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2415.9844>

[70]. Rajan, K., & Carrier, D. J. (2014). Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 62, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.013>

[71]. Orita, I., Iwazawa, R., Nakamura, S., & Fukui, T. (2012). Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.014>

[72]. Unión Europea. (2019). Documento de reflexión para una Europa sostenible de aquí a 2030.

Recuperado el 4 de julio de 2020, de: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3b096b37-300a-11e9-8d04-01aa75ed71a1/language-es>

[73]. Unión Europea. (2017). Bioplastics: Sustainable materials for building a strong and circular European bioeconomy. *Research EU*.

[74]. *For a sustainable and european value chain of PHA-based materials for high-volume consumer products*. (2020). Recuperado el 14 de julio de 2020, de CORDIS, European Commission: <https://cordis.europa.eu/project/id/887474/es>