

Obtención polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión

Obtaining polyhydroxyalkanoates (PHA) from lignocellulosic biomass: a review study

Marcelo Alexander-Guancha¹
 María Elena Realpe-Delgado²
 Jaqueline García-Celis³

¹Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: marceloguancha@misena.edu.co
 orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3483-0937>

²Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: merealped@sena.edu.co
 orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7956-0582>

³Servicio Nacional de Aprendizaje SENA (Colombia). Correo electrónico: jaqgarciac@sena.edu.co
 orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7936-6619>

Recibido: 10-05-2021 Aceptado: 22-11-2021

Cómo citar: Alexander-Guancha, Marcelo; Realpe-Delgado, María Elena; García-Celis, Jaqueline (2021). Obtención polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: un estudio de revisión. *Informador Técnico*, 86(1), 111 - 135.
<https://doi.org/10.23850/22565035.3692>

Resumen

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son considerados polímeros biodegradables que se obtienen por fermentación microbiana, a partir de diferentes sustratos principalmente azúcares, los cuales se sintetizan de diversas fuentes naturales. Una alternativa es la obtención a partir de biomasa lignocelulósica. Por lo anterior, este documento presenta una recopilación de investigaciones relacionadas con métodos utilizados para el pretratamiento, sacarificación, su posterior conversión a PHA y el proceso final de extracción y caracterización, aplicados para su identificación. En cuanto a los métodos de pretratamiento, se encontró que el proceso hidrotermal y la aplicación de ultrasonido (US) combinado con agentes químicos ácidos o alcalinos son los más utilizados para eliminar inhibidores, principalmente lignina y sus derivados. El pretratamiento hidrotermal se presenta como un método promisorio bajo el concepto de biorrefinería, debido a que se requieren tiempos cortos de tratamiento, y a la facilidad de recuperación de subproductos. En el proceso de sacarificación se evidenció que el método enzimático con celulasa combinada, en algunos casos con β -glucosidasa, es el más reportado. En relación con el proceso fermentativo, a partir de hidrolizados de residuos lignocelulósicos como paja de arroz, trigo, kenaf entre otros, la cepa *Ralstonia eutropha* es la más utilizada para la síntesis de poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Se encontró que las variables que más influyen en el rendimiento del proceso fermentativo son la relación C/N, concentración de la fuente del sustrato (concentración de hidrolizados), la oxigenación y la presencia de inhibidores, que son subproductos formados durante el proceso de pretratamiento de la biomasa.

Palabras clave: polihidroxialcanoatos; PHA; *Ralstonia eutropha*; sacarificación; fermentación; pretratamiento; azúcares.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are considered biodegradable polymers that are obtained by microbial fermentation from different substrates mainly sugars, which are obtained from various natural sources. An alternative for obtaining it comes from lignocelluloses biomass. Therefore, this paper presents a compilation of studies related to the methods used for pretreatment, saccharification, its subsequent conversion to PHA,

and the final extraction and characterization process applied for its identification. Regarding pretreatment methods, it was found that the hydrothermal process, and the application of ultrasound (US) combined with acidic or alkaline chemical agents are the most used to eliminate inhibitors, mainly lignin and its derivatives. Hydrothermal pretreatment is presented as a promising method under the concept of biorefinery, due to short treatment times and ease of by-product recovery. In the saccharification process, it was evidenced that the enzymatic method with cellulose, combined in some cases with β -glucosidase, is the most reported. Concerning to the fermentation process from hydrolyzed lignocellulosic residues such as rice straw, wheat, kenaf among others, the *Ralstonia eutropha* strain is the most used for the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB). It was found that the variables that most influence the performance of the fermentation process are the C/N ratio, concentration of the substrate source (concentration of hydrolysate), oxygenation, and the presence of inhibitors, which are byproducts formed during the biomass pretreatment process.

Keywords: polyhydroxyalkanoates; PHA, *Ralstonia eutropha*; saccharification; fermentation; pretreatment; sugars.

1. Introducción

Los plásticos se derivan del petróleo y están compuestos por cadenas de átomos de carbono con adiciones de nitrógeno (N), oxígeno (O) o azufre (S); se caracterizan por su amplia aplicabilidad, debido a la facilidad de fabricación y sus propiedades de flexibilidad, resistencia, bajo peso, impermeabilidad y bajo costo (Report European Bioplastic, 2017). Según el informe Plastic Market Size (2020), el mercado mundial del plástico para el 2019 fue de USD 450,88 mil millones, y se espera que alcance los USD 579,19 mil millones para el 2027. El uso principal está orientado hacia el sector de empaques y embalaje, automotriz, construcción, bienes de consumo, médico y farmacéutico, electricidad y electrónica, y textil. La industria de empaques tuvo la mayor demanda en el mercado para el año 2019, principalmente para el sector de alimentos y bebidas, seguido por el sector de la construcción.

Debido a la contaminación del medio ambiente, causada por el uso de polímeros de carácter no biodegradable, y la disminución de fuentes de gas natural y petróleo, se están buscando alternativas que permitan sustituir el uso de polímeros sintéticos por el de biodegradables, como el ácido poliláctico (PLA) y el polihidroxialcanoato (PHA) (Anjum *et al.*, 2016). Dichos polímeros, según García, Novoa, Franco e Higuera (2015) son considerados de origen microbiano y se pueden sintetizar a partir de fuentes naturales renovables (Saratale *et al.*, 2020).

El PHA es un biopolímero que destaca por su biodegradabilidad y compostabilidad, baja actividad con el agua, resistencia a la degradación hidrolítica y a la exposición a rayos UV, alto módulo de elasticidad y propiedades de barrera al agua. Estas características permiten una versatilidad en sus posibles aplicaciones. Por esta razón, se predice que la capacidad de producción de PHA aumentará de 2,1 millones de toneladas en 2019 a 2,4 millones de toneladas en 2022, lo que se convierte en una oportunidad para desarrollar procesos de investigación enfocados en la síntesis de PHA utilizando materias primas de alta disponibilidad y bajo costo, así como para la optimización de la producción (Saratale *et al.*, 2020).

Aunque el PHA cuenta con diversas propiedades y características que lo hacen un material ideal para desarrollar productos poliméricos de alto valor agregado, principalmente empaques y dispositivos médicos, existen limitaciones para su producción y comercialización a gran escala debido al alto costo de producción comparado con los materiales poliméricos convencionales. Según Raza, Abid y Banat (2018), dicho costo es de 5 a 19 veces más alto. Esta diferencia es causada principalmente por el tipo de fuente de carbono, las etapas de fermentación, extracción y purificación, y la productividad del proceso (Govil *et al.*, 2020; Raza *et al.*, 2018). Por lo anterior, para reducir las brechas de costo de producción, es necesario establecer procesos rentables con altos rendimientos de PHA. Dentro de las alternativas se encuentra la utilización de biomasa lignocelulósica que, según Govil *et al.* (2020) y Raza *et al.* (2018), reduciría hasta en un 50 % el costo total de producción.

Actualmente, los residuos de biomasa lignocelulósica, como bagazo de caña de azúcar y maíz, kenaf (*Hibiscus cannabinus*), paja de arroz, madera, trigo, entre otros, se han convertido en la principal alternativa para la síntesis de PHA (Liu; Zhang; An; Chen; Yang, 2015), además de considerarse como un recurso económicamente viable y ambientalmente sostenible para la producción a gran escala y de bajo costo, lo que lo hace competitivo con los derivados del petróleo (Yang; Tao; Wayman, 2018).

Según Kant, Gurav, Choi, Jung y Yang (2019), dentro de las desventajas de los materiales lignocelulósicos para la síntesis de PHA, está que se requieren pretratamientos (físicos, químicos o biológicos) para remover la lignina, y hacer que la celulosa y la hemicelulosa sean accesibles para el posterior proceso de sacarificación. Adicionalmente, durante el pretratamiento se generan subproductos como furfural, vainillina, hidroximetilfurfural (HMF) y acetato, los cuales tienen un efecto inhibidor durante la fermentación microbiana, principalmente para el crecimiento celular y la producción de PHA. Jonsson, Alriksson y Nilvebrant (2013) reportan diversos métodos para disminuir el efecto de los inhibidores después del pretratamiento, dentro de cuales están la desintoxicación de los hidrolizados mediante métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y/o biológicos, junto con la utilización de microorganismos modificados genéticamente con resistencia a inhibidores y mejoramiento del metabolismo celular para incrementar el rendimiento.

La utilización de biomasa lignocelulósica ha generado oportunidades de investigación en tres etapas del proceso: pretratamiento, fermentación y purificación del PHA. Dentro de las técnicas de pretratamiento más prometedoras están las que utilizan tecnología limpia, preferiblemente las que no requieren la adición y recuperación de productos químicos diferentes al agua o, en su defecto, utilicen bajas concentraciones de estos, para evitar la corrosión de los equipos, y que el proceso sea de fácil operación, económico, con producción de menos inhibidores y respetuoso con el medio ambiente, entre estos se encuentra el pretratamiento hidrotermal (Capolupo; Faraco, 2016; Ruiz; Rodríguez; Fernandes; Vicente; Teixeira, 2013).

A su vez, es importante, explorar los procesos de síntesis con fermentación continua, utilizando microorganismos termotolerantes de cepas puras o mixtas (Sabapathy *et al.*, 2020), donde las primeras presentan rendimientos de más del 90 %, pero requieren de condiciones especiales en cuanto a pureza de los nutrientes y ambientes asépticos para la fermentación, lo cual se ve reflejado en los costos y en la dificultad de escalado del proceso. Por el contrario, la utilización de cepas mixtas permite trabajar fermentaciones con diversos sustratos, con una variabilidad en composición de azúcares (Pakalapati; Chang; Show; Arumugasamy; Lan, 2018), lo cual sería una alternativa para escalar el proceso (Li; Wilkins, 2020). Finalmente, la tendencia actual es que el proceso de síntesis de PHA a partir de biomasa esté enfocado en el concepto de economía circular y de biorrefinería, cuyo objetivo principal es reducir las emisiones de CO₂ y la reconversión de residuos en productos que reingresan al ciclo de producción luego de su eliminación (Adeleye *et al.*, 2020).

En esta revisión, teniendo en cuenta la importancia actual que tienen los PHA como alternativa para la producción de biopolímeros, se discute sobre los trabajos de investigación de los últimos años relacionados con la obtención de PHA a partir de materiales lignocelulósicos, cuyo proceso incluye varias etapas, como el pretratamiento para el aislamiento de la celulosa, el proceso de sacarificación, seguido del proceso de fermentación y finalmente, los métodos de extracción y caracterización del PHA.

Dentro de los desafíos actuales para mejorar la eficiencia de su producción, los estudios demuestran que la utilización de residuos lignocelulósicos es una alternativa viable debido a su disponibilidad y bajo costo. Sin embargo, de acuerdo con el análisis realizado para la producción de PHA, las diversas investigaciones indican que el pretratamiento es determinante para el proceso de síntesis de PHA, debido al carácter recalcitrante de este material (Ganesh *et al.*, 2019; Saratale *et al.*, 2020). Por lo anterior, con este documento se pretende establecer cuáles son los pretratamientos utilizados que permiten aislar celulosa en menor tiempo, con la reducción de agentes químicos y la mínima formación de inhibidores. Adicionalmente, se busca reconocer los diferentes factores que influyen en el proceso de obtención de PHA, que van desde las condiciones de hidrólisis de los aislados de celulosa hasta la formación de los azúcares, del medio de cultivo y del tipo de microorganismo utilizado en la etapa de fermentación sobre el rendimiento de producción de PHA.

2. Metodología

Para la revisión de literatura relacionada con la producción de PHA a partir de materiales lignocelulósicos, se usó la base de datos de Scopus. Los términos de búsqueda fueron “*Production PHA and lignocellulosic*”, “*Production PHA and Ralstonia eutropha*”, “*Lignocellulosic pretreatment*” y “*Lignocellulosic saccharification*”, con los resultados se elaboró una matriz de información con el nombre del artículo, año de publicación y la revista o base de datos donde se encontraba publicado. Las principales bases de datos donde se encuentran las publicaciones que relacionan los temas son Science Direct, Springer Link, Wiley Online Library, SciELO y Web of Science.

Para consultar resultados de investigaciones a nivel nacional, se buscó en el repositorio de la Universidad Nacional de Colombia y de la Universidad de Antioquia. La ventana de búsqueda se definió para publicaciones de los últimos 10 años. Para el análisis de la información recolectada, se tuvieron en cuenta factores comunes de estudio por parte de los investigadores, como generalidades, producción y caracterización de los PHA, y métodos pretratamiento de materiales lignocelulósicos y de sacarificación. Se revisaron resúmenes de alrededor de 100 documentos entre artículos y tesis, de los cuales se seleccionaron 58.

2.1. Generalidades de los PHA

Los PHA pertenecen a la familia de poliésteres, los cuales están conformados por el ácido hidroxialcanoico (Rojas; Hoyos; Mosquera, 2016), y se sintetizan por acumulación intracelular en varios microorganismos (bacterias, arqueas y microalgas), como consecuencia del estrés ambiental y el desbalance de nutrientes, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P). Dependiendo del sustrato y el tipo de microorganismo, la acumulación intracelular puede alcanzar hasta el 90 % de rendimiento de PHA en peso seco (Acosta; Alcaraz; Cardona, 2018; González; Meza; González; Córdoba, 2013).

Los PHA se clasifican dependiendo del número de átomos de carbono: los de cadena corta están formados por 3 a 5 átomos de carbono (C); los de cadena media por 6 a 14; y los de cadena larga por 15 o más átomos de C (González *et al.*, 2013). Los PHA de cadena corta se clasifican en poli(3-hidroxibutirato) (PHB), poli(4-hidroxibutirato) (P4HB), poli(3-hidroxi valerato) (P3HV) y el heteropolímero conformado por poli(3-hidroxibutirato-copolímero-3-hidroxi valerato) (PHB-co-3HV). Los de cadena media comprenden poli(3-hidroxihexanoato) (P3HHx), poli(3-hidroxi octanoato) (P3HO) y heteropolímeros, como poli(3-hidroxihexanoato-copolímero-3-hidroxi octanoato) (P3HHx-co-3HO) (Kumar *et al.*, 2020). El tamaño de cadena tiene relación directa con la hidrofobicidad, el punto de fusión, la temperatura de transición vítrea y el grado de cristalización; donde el PHB es el más estudiado y caracterizado, debido a que tiene propiedades similares a las del polietileno y polipropileno.

Para la síntesis de PHB el microorganismo más utilizado es la bacteria *Ralstonia eutropha*, por su capacidad para almacenar hasta un 96 % del polímero en peso seco, utilizando fuentes de carbono provenientes de residuos agroindustriales. Esta bacteria, según la última clasificación taxonómica, se conoce también como *Cupriavidus necator* (Dey; Rangarajan, 2017; Madeiros-Garcia *et al.*, 2020). Investigaciones reportan que *R. eutropha* es capaz de metabolizar varios hidrolizados obtenidos a partir de fuentes lignocelulósicas, en cuya composición de azúcares se encuentran la glucosa y xilosa, principalmente (Ranganathan; Dutta; Moses; Anandharamakrishnan, 2020). Según Chanprateep *et al.* (2008) y Saratale *et al.* (2020), la cepa *R. eutropha* se ha utilizado para la producción de PHB a partir de biomasa residual de trigo, paja de arroz, bagazo de caña, residuos de papel y kenaf.

Dichas investigaciones se enfocan en evaluar la producción del polímero en la fase estacionaria bajo concentraciones limitadas de Nitrógeno (N), Fósforo (P), Magnesio (Mg) y Oxígeno (O) (Kerketta; Vasanth, 2019). Antes de la etapa de fermentación de los hidrolizados, la biomasa lignocelulósica debe pasar por las etapas de pretratamiento y sacarificación, de las cuales depende la calidad de los azúcares que se utilizan como

sustrato en la síntesis de PHA. Por lo tanto, es necesario establecer el método más eficiente de pretratamiento de la biomasa. A continuación, se discuten las técnicas utilizadas para este proceso.

2.2. Pretratamiento de materiales lignocelulósicos y sacarificación

El objetivo del pretratamiento en el material lignocelulósico es alterar o eliminar las estructuras químicas que inhiben el proceso de sacarificación, las cuales provienen principalmente de la lignina. Este proceso permite incrementar la velocidad de hidrólisis de las cadenas de celulosa y hemicelulosa, e incrementar los rendimientos en azúcares fermentables. Según Adeleye, *et al.* (2020) y Yu y Stahl (2008), un método de pretratamiento efectivo debe garantizar la alta conversión a azúcares fermentables, una mínima degradación de las cadenas de celulosa y hemicelulosa durante el proceso de pretratamiento, la reducción de la formación de subproductos que inhiben el proceso de hidrólisis y, finalmente, que el proceso sea de bajo costo.

Diversas metodologías se han utilizado para eliminar lignina de materiales lignocelulósicos con el propósito de mejorar la eficiencia de sacarificación, ya sea por hidrólisis ácida o enzimática, las más utilizadas son físicas (molienda, ultrasonido), químicas (ácidos y alcalinos), fisicoquímicas (explosión al vapor) y biológicas (Wu *et al.*, 2017). El pretratamiento fisicoquímico es la combinación más eficiente para eliminar lignina, dado que el rendimiento de sacarificación se incrementa de 4 a 10 veces; no obstante, entre las principales desventajas están la utilización de reactores costosos y de productos químicos agresivos como el ácido, el alto consumo de agua y energía, la formación de inhibidores y la limitación por impacto ambiental.

Por otro lado, se encuentra el pretratamiento microbiano considerado un proceso más sencillo y respetuoso con el medio ambiente; sin embargo, lleva mucho tiempo (de 15 a 40 días), lo que reduce la rentabilidad. De acuerdo con lo anterior, es necesario el desarrollo de técnicas de pretratamiento universales, rentables y sostenibles (simples o combinadas) bajo el modelo de biorrefinería, cuyo objetivo es el de aprovechar todos los componentes de la biomasa lignocelulósica para obtener productos de valor agregado utilizando procesos de transformación con un enfoque sostenible (de Bhowmick; Sarmah; Sen, 2018). Este consiste en la recuperación de productos químicos, enzimas y subproductos de la biomasa para su reutilización, conversión en productos valiosos y la reducción de la producción de desechos. Galbe y Wallberg (2019) y Vu *et al.* (2020), en sus estudios mencionan que una alternativa acorde con el concepto de la biorrefinería es la utilización del pretratamiento hidrotermal, que permite recuperar la mayor parte de los subproductos del material lignocelulósico después del tratamiento, además de reducir gradualmente el impacto en el medio ambiente.

2.3. Pretratamiento químico y combinado con US

Ganesh *et al.* (2019) realizaron pretratamiento químico de biomasa de kenaf utilizando carbonato de sodio (Na_2CO_3) y sulfito de sodio (Na_2SO_3) para obtener azúcares fermentables por hidrólisis enzimática, utilizando celulosa comercial de *Trichoderma reesei*. Dentro de los resultados se reporta que el tratamiento con Na_2CO_3 y Na_2SO_3 al 4 % (p/v) durante 3 h a 100 °C presenta mayor rendimiento de sacarificación (598,4 mg/g de kenaf), 65- % de deslignificación, rendimiento de hidrólisis del 74,8- %, rendimiento de glucosa del 74,8- % y una recuperación de biomasa entre el 50 % a 54 %. Los autores concluyen que los tratamientos con Na_2CO_3 y Na_2SO_3 presentan mayor rendimiento de sacarificación. Tratamientos químicos severos, con ácidos y álcalis fuertes, permiten una mayor sacarificación de la biomasa y una alta presencia de inhibidores que pueden afectar los procesos de fermentación microbiana en la producción de PHA. Por lo anterior, se recomienda utilizar métodos combinados.

Dattatraya *et al.* (2020) evaluaron el proceso de deslignificación de biomasa residual de trigo utilizando el método alcalino combinado con US para la posterior obtención de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática, y la producción de PHB utilizando la cepa *R. eutropha* (ATCC 17699). Para el proceso de eliminación de lignina se realizaron pretratamientos alcalinos, con hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de calcio (Ca

(OH)₂); con US y combinado (US+NaOH). Los autores reportan que las condiciones para un mayor rendimiento durante la hidrólisis enzimática fueron tratamiento combinado (US+NaOH) a una concentración del 2 % a 20 kHz, durante 60 min y 2,0 W/mL, a una temperatura 100 °C durante 30 min, con relación sólido-solvente del 10 % (p/V).

A estas condiciones se reporta una deslignificación del 70 %, un rendimiento de hidrólisis del 84,5 % y un rendimiento de glucosa y xilosa del 90 % y 65 %, respectivamente. Los autores recomiendan trabajar con concentraciones moderadas de NaOH, dado que cuando son severas se presenta una hidrólisis de la hemicelulosa y un incremento en la presencia de inhibidores procedentes de la lignina, lo cual afecta la eficiencia de la reacción enzimática. Adicionalmente, las concentraciones de NaOH para el pretratamiento se lograron disminuir al combinarlo con US, debido a que el proceso de cavitación permite generar turbulencias que afectan la estructura superficial de la biomasa y mejora la transferencia de masa; por consiguiente, se disminuyen los tiempos de pretratamiento y la accesibilidad de las enzimas al sustrato durante la etapa de hidrólisis enzimática.

Velmurugan y Muthukumar (2012) realizaron pretratamiento de bagazo de caña de azúcar (BCA) utilizando NaOH asistido por US. Evaluaron el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido, concentración de NaOH, temperatura y tiempo de sonicación. Encontraron que el máximo rendimiento en azúcares reductores obtenido fue de 96,27 %, utilizando un tamaño de partícula de 0,27 mm, relación sólido-líquido 1:25 y concentración de NaOH de 2,89 %, manteniendo la temperatura a 70 °C y un tiempo de sonicación de 47,42 min. Se evidencia que, al utilizar la técnica de US, se presenta una eliminación de lignina y un rendimiento de azúcares reductores de 82,32 % y 92,11 %, respectivamente, comparado con el pretratamiento utilizando autoclave, donde se obtuvo un porcentaje de 46,50 % y 72,00 %, respectivamente. Similares resultados reportan Wu *et al.* (2017), quienes evaluaron el proceso de pretratamiento alcalino con NaOH en paja de arroz asistido por US, y evidenciaron que el rendimiento de sacarificación por hidrólisis enzimática se incrementó, debido a la porosidad y a la modificación del área superficial de la paja de trigo, causada por el efecto del US.

2.4. Pretratamiento hidrotermal

El pretratamiento hidrotermal es un método fisicoquímico que utiliza agua a altas temperaturas, generalmente entre 150 °C y 300 °C, y presiones entre 0 a 60 bar, bajo estas condiciones se logra romper los enlaces de hidrógeno de las interacciones del complejo lignina, hemicelulosa y celulosa. Por lo anterior, es importante determinar las condiciones de presión y temperatura del proceso, dependiendo de la composición de la biomasa lignocelulósica, la temperatura de solubilización y degradación de sus componentes.

En el caso de la hemicelulosa y lignina, la solubilización se alcanza a 150 °C y 180 °C, respectivamente, y la degradación de la celulosa, por encima de 230 °C (Vu *et al.*, 2020). Adicionalmente, según Yang *et al.* (2018), este pretratamiento reduce los costos de operación, debido que se requieren concentraciones bajas de agentes químicos, se puede utilizar tamaños de partículas más grandes con mayores concentraciones de sólidos, en comparación con los pretratamientos convencionales, y se requiere tiempos de residencia cortos de 10 a 50 min (Ruiz *et al.*, 2020). Generalmente, según el tipo de biomasa, se requiere establecer las condiciones de temperatura, presión, tiempo de residencia, pH y relación sólido-líquido, que permitan eliminar la mayor cantidad de lignina (Yang *et al.*, 2018).

Según Jonsson *et al.* (2013), durante el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, independientemente del método aplicado, se forman inhibidores en mayor o menor concentración, los cuales se mantienen durante el proceso de hidrólisis. Por esta razón, es necesario buscar alternativas para desintoxicar el hidrolizado antes de la fermentación, con el fin de reducir su efecto sobre el metabolismo y el crecimiento del microorganismo, así como incrementar el rendimiento de producción del polímero. Este proceso requiere la aplicación de métodos químicos, biológicos o físicos, que consisten en extracción líquido-líquido, líquido-sólido, calentamiento y evaporación, y tratamientos con biocatalizadores microbianos y enzimáticos. Los autores reportan que el tratamiento alcalino con Ca (OH)₂ es el más eficaz, debido a su bajo costo y a una mayor remoción de inhibidores.

2.5. Hidrólisis enzimática

López, Acosta y Zambrano (2013) realizaron pretratamiento con ácido sulfúrico (H_2SO_4), NaOH y H_2O_2 en hojas y tallos de yuca por separado, y sacarificación por hidrólisis enzimática. Para el proceso de pretratamiento, se estudiaron dos tamaños de partícula, y diferentes concentraciones de químico y sustrato. El proceso de hidrólisis enzimática se realizó con la enzima *accellerase* 1.500 (complejo de celulasas). Se encontró que con el pretratamiento con NaOH se obtuvo la mayor concentración de azúcares totales (3,7 g/L), seguido del pretratamiento con H_2SO_4 (2,11 g/L) y con H_2O_2 (1,54 g/L). La digestibilidad de la celulosa se incrementó con el pretratamiento alcalino, debido a que la remoción de lignina es más efectiva y muestra menor solubilización de la hemicelulosa y celulosa, en contraste con el pretratamiento ácido o hidrotérmico. Igualmente, el tamaño de la partícula del sustrato influye en la liberación de azúcares durante la hidrólisis. Por otro lado, la concentración del agente químico evidenció una diferencia significativa, dado que, a mayor concentración, mayor remoción de lignina.

Annamalai y Sivakumar, (2016) obtuvieron azúcares fermentables a partir de salvado de trigo para la producción de PHB por hidrólisis enzimática. El pretratamiento se realizó en dos etapas: inicialmente el salvado de trigo se trató con NaOH al 1 %, en una relación 1:10, y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 30 min, para la eliminación de lignina. Para la hidrólisis enzimática se utilizaron las enzimas celulasa y β -glucosidasa, con una actividad de 185 FPU/mL y 518 CBU/mL, respectivamente. La incubación se realizó a 50 °C, 150 rpm durante 96 h para salvado trigo tratado con NaOH y sin tratar. Se obtuvo un porcentaje de hidrólisis de 83,75 %, una concentración total máxima de azúcares de 63 g/L a 72 h, y un rendimiento de azúcar de 629 mg/g salvado de trigo. Los mencionados autores reportan que la producción de azúcares fue cuatro veces mayor para el salvado de trigo tratado con NaOH en comparación con la muestra sin tratar. Similares resultados se obtuvieron según Saratale y Oh (2015), quienes realizaron pretratamiento alcalino utilizando NaOH, hidróxido de potasio (KOH) o hipoclorito de sodio (NaClO) en paja de arroz, para la posterior obtención de azúcares por hidrólisis enzimática utilizando celulasa comercial de *Trichoderma reesei*. El pretratamiento con NaOH al 2 % (p/V) a 121 °C por 30 min presentó un mayor rendimiento de azúcares reductores totales (703 mg/g de paja de arroz), con porcentaje de hidrólisis de 84,19 %.

En la Tabla 1 se describen resultados de algunas investigaciones relacionadas con la obtención de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica. De acuerdo con lo reportando en las investigaciones, el rendimiento de sacarificación depende de las condiciones del proceso de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, principalmente del tamaño de partícula, la relación sólido-líquido, agente químico, método físico aplicado y método de sacarificación. El tratamiento con US con NaOH y el hidrotérmico requieren tiempos menores a 60 min de pretratamiento, en comparación con el tratamiento con licor verde, que requiere de 3 h aproximadamente.

Adicionalmente, el hidrotérmico exige tiempos mucho más cortos (menos de 30 min), con la ventaja de que la concentración de azúcares en el hidrolizado final se triplica en comparación con la muestra sin tratar según el estudio reportado por Amaro; Barreto; Lopes; Eduardo; Vinícius (2019). En cuanto al proceso de sacarificación, se evidencia que el método de hidrólisis enzimática con celulasa es común para todos los estudios reportados. Finalmente, según Vu *et al.* (2020), las tecnologías de pretratamiento se seleccionan teniendo en cuenta el costo, la eficiencia del método, su nivel de desarrollo tecnológico y su impacto ambiental.

Los métodos químicos son los más utilizados, que incluyen los ácidos y los alcalinos, y se caracterizan por una alta eficiencia y nivel de desarrollo tecnológico; sin embargo, se consideran procesos costosos y poco amigables con el medio ambiente. Lo anterior se puede contrastar con el pretratamiento hidrotérmico, que es una alternativa y puede explorar, teniendo en cuenta que a pesar de que tiene un costo entre medio y alto, es eficiente y cuenta con un alto nivel de desarrollo tecnológico a escala piloto, con un reducido impacto ambiental.

Tabla 1. Métodos de deslignificación y sacarificación de biomasa vegetal.

Tipo de material y tamaño de partícula (tp)	Relación sólido-líquido	Agente y método de tratamiento	Método de sacarificación	Rendimiento de sacarificación	Referencia
Bagazo de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) 0,27 mm	1:25	<i>Ultrasonido:</i> 24 kHz Potencia 400 W Amplitud 100 % <i>Tratamiento alcalino:</i> NaOH 2,89 % T 70 °C (mantenida) tiempo de sonicación de 47,42 min	<i>Hidrólisis enzimática</i> Celulasa: 25 FPU/g de materia seca β-glucosidasa: 0,46-CBU/g de celulosa	Máxima concentración de azúcares reductores totales: 92,11 %	Velmurugan y Muthukumar (2012)
Paja de arroz 0,841 a 0,177 mm	1:20	<i>Ultrasonido:</i> 22 kHz tiempo encendido: 2 s tiempo apagado: 4 s Potencia: 300 W T 23 °C durante 60 min <i>Tratamiento alcalino con ultrasonido:</i> Concentración NaOH: 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % y 1,0 %	<i>Hidrólisis enzimática</i> Celulasa: 10000 UI/g	Máxima concentración de azúcares reductores: 2,91 g/L	Wu et al. (2017)
Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L.) 0,2 mm	1:10	<i>Pretratamiento con licor verde:</i> $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_3$ al 4 % (p/v) T 100 °C durante 3 h	<i>Hidrólisis enzimática</i> Celulasa de <i>Trichoderma reesei</i>	Rendimiento de sacarificación: 598,4 mg/g de kenaf Rendimiento de hidrólisis del 74,8 % Glucosa del 74,8 % Recuperación de biomasa: 50 % a 54 %	Ganesh et al. (2019)
Bagazo de caña de azúcar tp no reportado	1:3,94 y 1:10	Reactor discontinuo: 1,9 L <i>Hidrotermal</i> Relación sólido-agua T 183 °C Presión: 11,7 atm tiempo: 17 min <i>Tratamiento alcalino</i> NaOH 0,2 M Agitación: 2800 rpm durante 30 s	Enzimas Cellic HTec2® 15 % Cellic CTec2®) 85 % Actividad enzimática 264,29 FPU/mL. Celulasa: 10 FPU/g β-glucosidasa: 52,2 UI/g	Eliminación del 79 % de lignina con el pretratamiento combinado. Conversión enzimática Sin pretratamiento: 14,86 % Tratamiento hidrotermal: 34,55 ± 2,52 % Tratamiento hidrotermal combinado con NaOH: 46,82 ± 2,05 %	Amaro et al. (2019)

Tipo de material y tamaño de partícula (tp)	Relación sólido-líquido	Agente y método de tratamiento	Método de sacarificación	Rendimiento de sacarificación	Referencia
Biomasa de trigo 0,3-0,4 mm	10 % p/V	<i>Ultrasonido:</i> 20 kHz 2,0 W/mL durante 60 min <i>Tratamiento alcalino:</i> NaOH 2 % T 100 °C durante 30 min	<i>Hidrólisis enzimática</i> Celulasa de <i>Trichoderma reesei</i> , con actividad 30 FPU/g de WS	Rendimiento de Hidrólisis: 84,5 % Glucosa: 90 % Xilosa: 65 %	Dattatraya <i>et al.</i> (2020)
Bagazo de caña de azúcar tp no reportado	1:10 y 1:1	<i>Reactor discontinuo</i> Hidrotermal T 200 °C Presión: 15,8 atm tiempo: 10 min <i>Auto hidrólisis</i> T 200 °C Presión: 15,8 atm tiempo: 10 min	Enzimas Cellic CTec2 + xilanasa termoestable purificada Actividad enzimática 1000 UI/g	Con el método hidrotermal se obtuvo mayor concentración de azúcares en comparación del método de autohidrólisis	Kaur <i>et al.</i> (2020)
Paja de arroz: 2 a 3 cm	1:10	<i>Reactor de alta temperatura y presión térmico con glicerol</i> T 130 °C a 250 °C tiempo: 10, 20, 30 min <i>Hidrotermal</i> T 100, 130 a 210 °C Tiempo: 10, 20, 30 min <i>Pretratamiento alcalino</i> NaOH 0,5 % T 100 °C tiempo: 30 min	<i>Hidrólisis enzimática</i> cellic CTec2 10 FPU/g (Novozyme)	Pretratamiento con glicerol mayor rendimiento en azúcares reductores.	Gabhane, Kumar y Sarma (2020)

Fuente: elaboración propia.

2.6. Condiciones de fermentación y efectos de inhibición durante la síntesis de PHA

Según Adeleye *et al.* (2020), para la producción de PHA se deben tener en cuenta tres factores: la energía utilizada para la esterilización del equipo de fermentación, el rendimiento de producción de PHA en el sustrato y la eficiencia de la extracción del polímero luego de la fermentación. El PHA es un metabolito secundario, por lo que en el proceso de fermentación se requiere inicialmente inducir el crecimiento celular y en una segunda fase, la formación del polímero, en la que se requiere la limitación de nutrientes, principalmente de N, P y en algunos, O (Madeiros-Garcia *et al.*, 2020; Koller, 2018; Schmid; Raschbauer; Song; Bauer; Neureiter, 2021). Por lo anterior, el uso de bloques de reactores de tanque agitado interconectados es la alternativa más explorada para la síntesis del PHA (Ganesh *et al.*, 2019; Koller, 2018).

Annamalai y Sivakumar (2016) estudiaron el proceso de obtención de PHB variando la relación C/N (20:1, 20:2, 20:3, 20:4 y 20:5) y el efecto de la fuente de N sobre el rendimiento de producción, utilizando la cepa *R. eutropha* (NCIMB 11599). Utilizaron como fuentes de nitrógeno inorgánico y orgánico cloruro de amonio (NH_4Cl), nitrato de amonio (NH_4NO_3), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), extracto de levadura, extracto de carne, peptona y triptona, respectivamente. En cuanto a la fuente de nitrógeno, se encontró que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una relación de C/N 20:1, presentó el mayor crecimiento celular y la mayor acumulación de PHB, utilizando sustratos hidrolizados de salvado de trigo. Se encontró, adicionalmente, que el crecimiento celular fue constante hasta 60 h, y la acumulación máxima de PHB se alcanzó a las 48 h. Asimismo, más del 90 % de la glucosa fue metabolizada durante las primeras 36 h, en contraste con la xilosa que no fue metabolizada. Según Favaro, Basaglia y Casella (2019), este tipo de bacteria no puede metabolizar pentosas, la causa probable es la ausencia de enzimas necesarias para la degradación de estos azúcares;

Amini, Yousefi-Massumabad, Younesi, Abyar y Bahramifar (2020) obtuvieron PHB por fermentación, a partir de maltosa grado industrial y de aguas residuales de cervecería, utilizando como microorganismo la bacteria *Cupriavidus necator* (DSMZ 454). Para el proceso de síntesis, inicialmente se realizó una optimización modificando la relación C/N/P y la concentración de maltosa grado industrial, con el fin de establecer el máximo rendimiento en biomasa y productividad volumétrica de PHB. Se obtuvo un rendimiento máximo de PHB del 92 %, con una relación de C/N/P 100:2:10 y una concentración de maltosa de 40 g/L. Posteriormente, estos resultados se extrapolaron para obtener el polímero con aguas residuales de cervecería. La producción de biomasa y de PHB fue de 7,9 y 3,0 g/L. Se encontró que la relación de C/N/P es un factor que se debe establecer con el fin de incrementar la producción de PHB.

Según Li y Wilkins (2020), la limitación de nutrientes con base en N y P induce en la cepa bacteriana el incremento en la acumulación de PHA. Adicionalmente, la limitación de oxígeno disuelto durante la fermentación conlleva a la producción y acumulación de PHB. Por otro lado, según Hermann *et al.* (2013); Nath, Dixit, Bandiya, Chavda y Desai (2008) y Raposo *et al.* (2014), una concentración de oxígeno del 20 % en el medio fermentativo incrementó la producción de PHB. Una baja concentración de oxígeno disuelto promueve la síntesis de PHB; ya que se induce el metabolismo de consumo de azúcares de 5 carbonos. Por el contrario, valores altos promueven solo el crecimiento celular (Dey; Rangarajan, 2017).

Saratale y Oh (2015) sintetizaron PHB con la cepa *R. eutropha* (ATCC 17699), utilizando hidrolizados de paja de arroz. Inicialmente, determinaron las condiciones operativas del proceso de fermentación y encontraron que la máxima producción de PHB se alcanzó a una temperatura de 30 °C, en un rango de pH de 6 a 8 y a una velocidad de agitación de 200 rpm. Estos parámetros se utilizaron para la producción de PHB bajo dos condiciones de fermentación con y sin suplementos. Adicionalmente, compararon la producción de PHB, utilizando azúcares comerciales (glucosa, xilosa y arabinosa) con los hidrolizados de paja de trigo.

La *R. eutropha* produjo una mayor acumulación de biomasa y rendimiento de PHB con glucosa, 15,10 g/L y 0,53 g PHB/g de azúcar, respectivamente, en contraste con la xilosa, con 8,25 g/L y 0,19 g PHB/g de azúcar, y arabinosa, con 9,15 g/L y 0,16 g PHB/g de azúcar, respectivamente. Por otro lado, se evidencia que la *R. eutropha* presenta mayor rendimiento, al utilizar glucosa pura en comparación con los azúcares mixtos. Al parecer, la xilosa y arabinosa no son fuentes de carbono esenciales para el metabolismo de la cepa, lo que se confirmó en la fermentación realizada con la paja de arroz, dado que después de 36 horas de fermentación se identificó consumo completo de la glucosa sin la utilización de xilosa y arabinosa. En cuanto al uso de suplementos, se observó que el licor de maceración de maíz produjo la máxima acumulación de PHA (75,45 %) y producción de PHB (11,42 g/L), seguido del extracto de levadura, con 71,5 % y 10,26 g/L, respectivamente. Lo anterior se pudo explicar por el aporte de aminoácidos y péptidos presentes en el licor de maceración de maíz.

Kant *et al.* (2019) estudiaron la producción de PHA utilizando hidrolizados de cebada, *miscanthus* y pino, con la cepa *R. eutropha* (5119), donde evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural, vainillina y acetato) sobre el crecimiento celular y la producción de PHA. Encontraron

que la vainillina tiene efectos inhibidores para el crecimiento bacteriano y acumulación de PHA en todos los rangos de concentraciones trabajados por los investigadores (0,02 % a 0,1 % p/p). Por otro lado, la concentración de acetato, entre 0,2 % a 0,1 % p/p, favorece el crecimiento celular y la acumulación del PHA. Finalmente, el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) no tienen efectos significativos sobre la producción y acumulación de PHA hasta concentraciones de 0,02 % y 0,04 % p/p, respectivamente.

Adicionalmente, los autores reportaron que la producción máxima de biomasa y acumulación de PHA se obtuvo a una relación de glucosa: NH_4Cl :furfural:HMF:acetato de 1,5:0,05:0,005:0,005:0,25 % p/p, respectivamente. Se estableció que la acumulación de PHA está relacionada directamente con la fuente de N, puesto que, a altas concentraciones, se disminuye la acumulación de PHA.

Otro efecto reportado en diferentes estudios es el relacionado con la concentración de la fuente de carbono, ya que, a ciertas concentraciones, puede actuar como inhibidor. En estudios como el de Dey y Rangarajan (2017), quienes evaluaron el efecto inhibidor del sustrato para la producción de PHB, variando la concentración de la fuente de C (sacarosa) y N (NH_4SO_4), se encontró que a concentraciones de sacarosa por encima de 20 g/L, la tasa de crecimiento microbiano específico disminuyó. El mismo comportamiento se presentó con el NH_4SO_4 a concentraciones por encima de 2 g/L. Altas concentraciones de azúcar probablemente pueden provocar lisis celular (Dey; Rangarajan, 2017) y disminución del crecimiento o la inanición celular (Islam; de Wever; Volcke; Garcia-Gonzalez, 2014).

Así mismo, Dattatraya *et al.* (2020) reportaron que *R. eutropha* (ATCC 17699) presenta una asimilación de azúcar del 85 %, crecimiento bacteriano de 10,5 g/L, una concentración de PHB de 7,1 g/L y rendimiento de PHB de 0,417 g/g de azúcares reductores para hidrolizados de trigo pretratados con US y NaOH. Se reportó que *R. eutropha* puede metabolizar azúcares hasta una concentración de 30 g/L, con un crecimiento bacteriano y producción de PHB significativos. A concentraciones mayores de azúcares, se inhibe el crecimiento de la cepa, posiblemente por la presencia de azúcares de cinco carbonos o de inhibidores. Los mencionados autores sugieren que es importante establecer antes de la fermentación, métodos de desintoxicación de los hidrolizados para asegurar una mayor asimilación de los azúcares y lograr una mayor conversión en PHB.

Para la producción de PHA se requiere disminuir los costos de producción. Se han planteado algunas alternativas como la búsqueda de aditivos y suplementos sustitutos como fuente de nitrógeno o precursores, entre ellos el acetato. Dattatraya *et al.* (2020) estudiaron diferentes fuentes de nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) sobre la producción de PHB, y evidenciaron que el licor de maceración de maíz incrementó el consumo de azúcares (89 %), el crecimiento celular (11,45 g/L), la acumulación de PHA (74 %) y la concentración del PHB (7,85 g/L). También reportaron un posible efecto de inhibición en el crecimiento celular y la producción de PHB en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En cuanto a la utilización de acetato, los resultados demostraron que concentraciones hasta de 1 g/L incrementan el crecimiento celular y la acumulación de PHB, debido a que este precursor actúa como metabolito intermedio de la vía metabólica de producción de PHB.

Ganesh *et al.* (2019) obtuvieron PHB a partir de hidrolizados lignocelulósicos de kenaf utilizando la cepa *R. eutropha* (ATCC 17699). Para evaluar la producción de PHB realizaron una comparación de hidrolizados pretratados con $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_3$ y con $\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}_2$, que fueron tratados con $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_3$. Como resultado, se obtuvo mayor consumo de azúcar (88 %), mayor producción de biomasa y acumulación PHB, frente a los tratados con $\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}_2$. Adicionalmente, se investigó el efecto de producción de PHB por el aumento de la concentración de azúcares entre 20, 39 y 40 g/L frente al incremento de la concentración de hidrolizado, el aumento del crecimiento celular, la acumulación y el rendimiento de PHB. A concentraciones mayores de 40 g/L, se observó una disminución de la producción de PHB debido al efecto inhibidor en el proceso de metabolización que ejerce una mayor concentración de las azúcares de 5 carbonos (5C) (xilosa y arabinosa) sobre la bacteria y el incremento de la presencia de inhibidores de la fermentación.

Kerketta y Vasanth (2019) estudiaron variables de fermentación, como tiempo de incubación, temperatura, pH y tamaño del inóculo sobre la producción de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) utilizando *R. eutropha*. A las 48 h, se obtuvieron el mayor crecimiento y concentración de PHBV. De igual manera, los estudios indicaron que a pH 6 se obtiene el máximo crecimiento celular y producción de PHBV. Con pH superiores a 6, se redujo la acumulación del polímero, probablemente causada por la enzima degradante celular, la cual descompone la cadena de PHA. En cuanto al inóculo, encontraron que a una concentración del 5 % v/v, se produce la máxima cantidad de polímero y crecimiento celular. Por encima de esta concentración, se reduce la producción del polímero. Lo anterior se puede atribuir a que una alta población de bacterias conduce a una competencia entre ellas por la utilización de nutrientes y espacio.

Dey y Rangarajan (2017) estudiaron once factores para determinar cuáles eran los más significativos en la síntesis de PHB durante el proceso de fermentación utilizando la cepa *C. necator*. Los parámetros estudiados fueron concentración de sacarosa, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , solución de oligoelementos, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura, peptona, CaCl_2 , temperatura y velocidad de agitación. Se encontró que los factores más significativos en la producción de PHB fueron la concentración de peptona, extracto de levadura, metales traza y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estos nutrientes aportan biomoléculas (péptidos, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y oligoelementos) que influyen directamente en crecimiento celular, la velocidad de formación del producto y el rendimiento.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de trabajos de investigación relacionados con la obtención de PHA a partir de azúcares presentes en hidrolizados obtenidos de biomasa lignocelulósica. La tendencia que se observa en las investigaciones reportadas es la utilización de la bacteria *Ralstonia eutropha* para el proceso de fermentación.

Tabla 2. Condiciones de fermentación de hidrolizados lignocelulósicos para la producción de PHA.

Sustrato	Micorganismo utilizado	Variables de fermentación	Rendimiento	Referencia
Hidrolizados de paja de arroz	<i>Ralstonia eutropha</i> ATCC 17699 (<i>Cupriavidus necator</i>) Inoculo al 1 %	Reactor Erlenmeyer de 250 mL Volumen: 100 mL Fuente de carbono Hidrolizados de paja de arroz: 20 g/L ATR. Medio: mezcla de sales (g/L) NaH ₂ PO ₄ , 3,6 Na ₂ HPO ₄ , 2,84 K ₂ SO ₄ , 3,486 NaOH, 0,4 Extracto de levadura, 0,2 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,39 CaCl ₂ , 0,062 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,005 ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,024 MnSO ₄ ·H ₂ O, 0,024 FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0,15	Mayor rendimiento Rendimiento PHB (g/L): 11,42	Saratale y Oh (2015)
		Concentración de azúcares: 5, 10, 20 y 30 g/L pH: 4,0 a 11,0 Velocidad de agitación de 50 a 250 rpm. Tiempo incubación: 12 a 96 h T incubación 25 a 40 °C	Porcentaje acumulación: 75,45 % Condiciones: tiempo incubación 48 T 30 °C pH: 7,0 Velocidad agitación 200 rpm	
Hidrolizado de salvado de trigo	<i>Ralstonia eutropha</i> (NCIMB 11599) Inoculo al 1 %	Relación C/N: 20 Fuente de carbono: Hidrolizados de salvado de trigo (48 g/L) Fuente de N: (NH ₄) ₂ SO ₄ : 4,8 g/L Medio: KH ₂ PO ₄ (g/L): 2,4 Na ₂ HPO ₄ (g/L): 2,5 MgSO ₄ (g/L): 0,5 (NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂] (g/L): 0,1	Rendimiento PHB (g/L): 24,5	Annamalai y Sivakumar (2016)
		pH: 6,8 Velocidad de agitación: 150 rpm Tiempo: 72 h T 30 °C	Crecimiento celular (g/L): 14,82 Porcentaje acumulación: 62,5 % Concentración azúcares residuales: 0,319 g/g de azúcar	

Sustrato	Microrganismo utilizado	Variables de fermentación	Rendimiento	Referencia
Hidrolizados de residuos de kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L.)	<i>Ralstonia eutropha</i> (ATCC 17699) Inoculo: 5 %	Reactor: Erlenmeyer 500 mL	Máximo rendimiento a una concentración de hidrolizados de 30 g/L	Ganesh <i>et al.</i> (2019)
		Volumen: 100 mL		
		Fuente de carbono: Hidrolizados de residuos de trigo (g/L): 20, 30, 40	Contenido PHB: 81 %	
		Mezcla de sales según Saratale y Oh (2015)	Rendimiento PHB (g/L): 10,09	
		pH: 7,0	Porcentaje acumulación: 69,8 %	
		Velocidad de agitación: 200 rpm		
		Tiempo incubación: 36 h	Rendimiento de PHB (ATR): 0,488 g/g azúcar.	
		T 30 °C		
Hidrolizado de <i>Miscanthus</i> (MBH)	<i>Ralstonia eutropha</i> (5119) Inóculo: 0,1 %	Reactor: Erlenmeyer 500 mL	MBH Crecimiento celular (g/L): 4,6	Kant <i>et al.</i> (2019)
		Volumen: 200 mL	Porcentaje acumulación: 44 %	
		Fuente de carbono: Hidrolizados (MBH, BBH ó LBH): 1,5 %	BBH	
Hidrolizado de biomasa de cebada (BBH)		Medio de cultivo comercial M9: NH ₄ Cl (%): 0,043 Furfural (%): 0,004 HMF (%): 0,005 Acetato (%): 0,234	Crecimiento celular (g/L): 3,2 Porcentaje acumulación: 54 %	
		Velocidad de agitación: 200 rpm	PBH	
Hidrolizado de biomasa de pino (PBH)		Tiempo incubación 72 h	Crecimiento celular (g/L): 2,7	
		T 30 °C	Porcentaje acumulación: 63 %	

Sustrato	Micorganismo utilizado	Variables de fermentación	Rendimiento	Referencia
Hidrolizados de residuos de trigo	<i>Ralstonia eutropha</i> (ATCC 17699)	Reactor: Erlenmeyer 500 mL Fuente de carbono: Hidrolizados de residuos de trigo (g/L): 30	Rendimiento PHB (g/L): 7,85	Dattatraya <i>et al.</i> (2020)
		Fuente de nitrógeno: hidrolizados de licor de maíz Mezcla de sales según Saratale y Oh (2015) pH: 7,0 Velocidad de agitación: 200 rpm Tiempo incubación 36 h T 30 °C	Porcentaje acumulación: 74 % Rendimiento de PHB (ATR): 0,441 g/g azúcar	
Hidrolizados de cascarilla de maíz	<i>Bacillus megaterium</i> Ti3 Inoculo al 2 %	Reactor: Erlenmeyer de 250 mL Volumen: 100 mL Fuente de carbono: Hidrolizados lignocelulósicos: 10 g/L ATR.	Rendimiento PHA (g/L): 1	De Souza, Manasa y Shivakumar (2020)
		Medio deficiente en nitrógeno (g/L): MgSO ₄ : 0,2 NaCl: 0,5 Peptona: 2,5 Extracto de levadura: 2,5 pH: 7 Velocidad agitación: 120 rpm. Tiempo: 48 h T 30 °C.	Crecimiento celular (g/L): 1,73 Porcentaje acumulación: 57,8 %	

Fuente: elaboración propia.

2.7. Métodos de extracción y caracterización de PHA

Dentro de los aspectos importantes en la etapa de extracción del PHA está lograr la máxima recuperación del polímero y una pureza razonable con el uso de productos químicos económicos y con la menor generación de residuos peligrosos. Las operaciones de separación y purificación deben ser mínimas y de bajo costo (Heinrich; Madkour; Al-Ghamdi; Shabbaj; Steinbüchel, 2012). Se han propuesto distintos métodos para la extracción de PHA entre los cuales se encuentra la extracción con solventes orgánicos, flotación, digestión química y enzimática, por fluidos supercríticos y US (Shahid; Razzaq; Farooq; Nazli, 2021).

En cuanto a la extracción con solventes se utiliza generalmente cloroformo, etanol y hexano, logrando una alta remoción de impurezas y residuos del producto de la fermentación. Es un método altamente contaminante debido a la naturaleza y cantidad de las sustancias químicas utilizadas. En el método de flotación

se usa cloroformo, el cual presenta mínima degradación del polímero y es de menor costo por la baja utilización de agentes químicos. El método de digestión química utiliza NaClO o dodecilsulfato de sodio (SDS) combinado con cloroformo y etanol, es útil para la extracción de grandes volúmenes y se obtiene un PHA puro sin degradación.

En la digestión enzimática se usa SDS, EDTA con enzimas (alcalasa y lisozima), y presenta alta recuperación del polímero, pero el proceso es costoso y complejo. El método por fluidos supercríticos que utiliza CO₂ es un proceso de bajo costo con altos rendimientos, aunque se debe tener condiciones de presión alrededor de 350 bar para la extracción. Finalmente, con el método de ultrasonido se obtiene un polímero altamente puro. Sin embargo, el rendimiento de extracción es bajo debido a la relación concentración-celular solvente (Shahid *et al.*, 2021).

Kant *et al.* (2019) iniciaron centrifugando la muestra sólida, suspendiéndola en agua y secándola por liofilización. Finalmente, la extracción se realizó con cloroformo e hipoclorito de sodio al 30 % relación 1:1, dejando actuar por 2,5 h, luego se centrifugó nuevamente. Recuperaron la fase de cloroformo y el polímero se precipitó utilizando metanol al 80 %. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se caracterizó utilizando espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Isak *et al.* (2016) estudiaron un modelo de cuantificación de mezclas de PHA (puro y mixto) mediante FTIR. Utilizaron los resultados de los espectros para determinar la concentración de PHA en la muestra, basados en las alturas y las áreas de bandas de los grupos principales: carbonilo (C = O), amida (N-H), proteína (C-O-C y C-O); los resultados se compararon con los datos obtenidos por el método de cromatografía de gases.

Dey y Rangarajan (2017) realizaron la extracción de PHB utilizando el método surfactante dodecilsulfato sódico (SDS) e hipoclorito de sodio, considerado el método más eficiente y de menor costo. Obtuvieron un rendimiento de extracción del 71 % y una pureza de PHB del 98 %. Se han propuesto métodos alternativos como el reportado por Arikawa, Sato, Fujiki y Matsumoto (2017), quienes evaluaron la extracción de PHA utilizando US combinado con diferentes concentraciones de SDS. La pureza del PHA alcanza un 96 %, utilizando una concentración de SDS del 3,3 %. Según los resultados obtenidos, los autores afirman que este método puede ser aplicable a escala industrial, debido a que no se requiere centrifugación inicial ni utilización de solventes orgánicos, y se podría trabajar con células congeladas o secas suspendidas en agua, adaptadas a un sonicador. En la Tabla 3 se presentan los métodos de extracción y de caracterización de PHA utilizados en investigaciones.

Finalmente, es importante establecer como incrementar la eficiencia del proceso de extracción del PHA enfocadas en la reducción de costos, energía requerida e impacto ambiental. Adeleye *et al.* (2020) realizaron un análisis del impacto ambiental y el costo para la extracción de PHA luego de la fermentación, donde el tratamiento alcalino es el más favorable en cuanto costos, potencial de calentamiento global y uso de energía no renovable con 1,40 €/kg PHB, 2,4 kg CO₂-eq/kg PHB y 106 MJ/kg PHB, respectivamente; en comparación con el proceso de extracción utilizando solventes cuyos valores reportados para las mismas variables fueron 1,95 €/kg PHB, 4,30 kg CO₂-eq/kg PHB y 156 MJ/kg PHB. Sin embargo, los costos generales del proceso siguen siendo altos en comparación con los polímeros derivados del petróleo. Los bioplásticos son 2,5 a 7,5 veces más costosos que los principales plásticos tradicionales basados en petróleo. Es de destacar que hace unos años los bioplásticos eran entre 35 y 100 veces más caros que los equivalentes existentes basados en combustibles fósiles no renovables.

Tabla 3. Extracción y caracterización de PHA.

Tipo de polímero	Método de extracción	Método de caracterización	Resultados principales	Referencia
PHB	Extracción: Digestión: mezcla cloroformo e hipoclorito de sodio al 30 % en relación 1:1 v/v	Cristalinidad	Análisis TGA Td: 283,5 °C	Saratale y Oh (2015)
		Análisis termogravimétrico (TGA)	Análisis DSC Temperatura de transición vítrea (Tg): 10 °C Tm: 172 °C	
		Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Análisis FTIR Longitud de onda (cm ⁻¹): 2910-3300 vibración C H, 1721 estiramiento C = O, 1379 grupos CH ₃ , 1455 deformación	
	Precipitación: metanol al 80 %.	Análisis FTIR	asimétrica CH ₃ , 1120-1280 estiramiento C-O-C,	
		Análisis Raman	1043 estiramiento del -CO del grupo éster y	
		Microscopia SEM	3444 por los grupos OH adsorción de agua.	
		Espectroscopía de rayos X	Espectroscopía de rayos X C: 60,94 % O: 39,5 %	

Tipo de polímero	Método de extracción	Método de caracterización	Resultados principales	Referencia
P (3HB-co-3HV)	Extracción: Centrifugación inicial seguido con tratamiento de dodecilsulfato de sodio al 0,1 % (SDS)	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Análisis DSC Temperatura de transición (Tg): 2,6 °C T cristalización (Tc): 65,4 °C T _{m1} : 140,1 °C T _{m2} : 154,4 °C	Alsafadi y Al-Mashaqbeh (2017)
	Lisis celular utilizando vortex.	Análisis FTIR	Análisis FTIR Longitud de onda: 1730 estiramiento del grupo carbonilo (C = O) del éster, 2924 y 2858 enlaces de los grupos CH ₃ y CH ₂ respectivamente y 1450-1000 corresponde al estiramiento de C-O, C-C y C-O—C.	
	Incubación por 3 h a 25 °C. Centrifugación e incubación con hipoclorito de sodio al 3 % durante 30 min a 25 °C. Centrifugación final y lavado con agua y etanol. Adición 10 ml de cloroformo, se dejó evaporar y obtuvo una película.	Contenido de PHA y pureza por cromatografía de gases. Estándar: poli(ácido 3-hidroxibutírico-ácido co-3-hidroxivalérico) al 8 % en moles de Sigma-Aldrich Estándar interno: Ácido benzoico Columna: Agilent DB 23, 60m×0,25mm, 0,15µm.	Contenido de PHA y pureza por cromatografía de gases polímero compuesto por 6,5 % en moles de 3-hidroxivalarato (3HV).	
PHB	Extracción: Digestión mezcla cloroformo e hipoclorito de sodio al 30 % en relación 1:1 v/v	Cristalinidad	Cristalinidad picos a 2 θ = 13,4; 16,8; 22,4; 25,3 y 27,1	Ganesh <i>et al.</i> (2019)
		Análisis termogravimétrico (TGA)	Análisis TGA Temperatura de descomposición (Td): 292,89 °C	
	Precipitación: metanol al 80 %	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Análisis DSC Temperatura de fusión (Tm): 171,65 °C	

Tipo de polímero	Método de extracción	Método de caracterización	Resultados principales	Referencia
P(3HB-co-3HV)	Extracción: digestión mezcla cloroformo e hipoclorito de sodio al 30 % en relación 1:1 v/v	Análisis termogravimétrico (TGA)	Análisis TGA Td: 299,24 °C	Kant <i>et al.</i> (2019)
		Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Análisis DSC T _{m1} : 116,9 °C y T _{m2} : 175 °C	
	Precipitación: metanol al 80 %.	Análisis FTIR	Análisis FTIR Longitud de onda (cm ⁻¹): 3000 vibración C-H, 1720 el grupo C = O, 1000 y 1300 corresponde a C-O, de los enlaces éster y 3386 presencia del grupo -OH.	
PHB		Cristalinidad	Cristalinidad Picos a 2 θ = 13,3; 16,4; 22,4 y 25,4 y picos pequeños a 26,9 y 30,0°.	Saratale <i>et al.</i> (2020)
		Análisis termogravimétrico (TGA)	Análisis TGA Td: 291,5 °C	
		Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Análisis DSC Tm: 175,4 °C	
	Extracción: digestión mezcla cloroformo e hipoclorito de sodio al 30 % en relación 1:1 v/v	Análisis FTIR	Análisis FTIR Longitud de onda (cm ⁻¹): 3450 corresponde a la flexión del OH, 2974 y 2933 estiramiento de CH, pico agudo 1720 estiramiento C = O (carbonilo) y -COOR (éster), 1454 y 1379 estiramiento CH ₃ y CH ₂ , 1456 y 1378 flexión del enlace CH asimétrico y simétrico en CH ₂ 1378 para CH ₃ , las de 1277 a 1049 enlaces carbonilo (COC) y CO.	
	Precipitación: metanol al 80 %.		Análisis RMN Grupos funcionales presentes -CH ₃ , CH ₂ -CH-, del hidroxibutirato (HB), -CH ₂ - de la unidad HB, -CH ₃ de la unidad HB y el grupo éster (O-CH-) carbonilo (-C-) de HB.	

2.8. Determinación de biodegradabilidad

Los PHA se consideran materiales biodegradables debido a la hidrólisis del polímero por las enzimas PHA despolimerasas y las lipasas, que actúan en el centro quiral del monómero en la configuración R. Las mencionadas enzimas actúan intra y extracelularmente, permitiendo la degradación de PHA en ambientes con alta actividad microbiana. La forma de degradación inicia con el crecimiento de microorganismos en la superficie del polímero y la secreción de enzimas obteniendo al final oligómeros solubles en agua metabolizados por los microorganismos (Utsunomia; Ren; Zinn, 2020). Dentro de los factores que afectan la degradación de los PHA están el peso molecular, la estructura molecular y el contenido de la unidad del comonómero, la cristalinidad, la porosidad, el pH y la temperatura. Adicionalmente, la presencia de moléculas catalíticas, enzimas y sustancias alcalinas en el medio produce la degradación del polímero a través de un mecanismo de erosión de la superficie (Sultana; Khan, 2012).

Sultana y Khan (2012) estudiaron la degradación de polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), utilizando la norma ASTM F 1635-04a. Dentro de los resultados encontrados se reporta que el peso molecular disminuyó aproximadamente en un 47 % en 44 semanas. Igualmente, la cristalinidad aumentó aproximadamente en un 8 %, debido a la hidrólisis de la estructura amorfa, también se evidenció una pérdida de peso de aproximadamente 10 %, mayor en la estructura polimérica con mayor porosidad. Finalmente, se presentó una disminución alrededor de 40 % en las propiedades mecánicas después de 20 semanas a 20 °C.

3. Conclusiones

Los métodos hidrotermales y por ultrasonido son alternativas prometedoras para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica debido a la reducción de tiempo de proceso, facilidad de operación y reducción de la formación de productos inhibidores.

Es importante resaltar que las distintas investigaciones realizadas indican que la biomasa lignocelulósica es una alternativa para la síntesis de PHA, teniendo en cuenta la cantidad y diversidad disponible en los diferentes sectores de la economía.

En los resultados obtenidos en las investigaciones a escala laboratorio, se puede evidenciar que en el proceso de sacarificación se alcanzan rendimientos de hidrólisis por encima del 70 % hasta un máximo del 92 %, y durante la fermentación, un porcentaje de acumulación de PHA desde el 44 % hasta el 74 %. Por lo tanto, se hace necesario continuar estos estudios a mayor escala, para evaluar las variables nutricionales, fuentes alternativas y los métodos de obtención versus costos.

Referencias

- Acosta, Alejandro; Alcaraz, Wilman; Cardona, Mariana (2018). Sugarcane molasses and vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Revista Dyna*, 85(206), 220-225.
<https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.68279>
- Adeleye, Aderemi; Kenneth, Chuks; Christian, Obieze; Oluwabunmi, Oluwakemi; Oludare, Osigbeminiyi; Toluwalope, Emmanuel; Louis, Hitler (2020). Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry*, 96(marzo), 174-193.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>

- Alsafadi, Diya; Al-Mashaqbeh, Othman (2017). A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34, 47-53.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.003>
- Amaro, Gustavo; Barreto, Elisa; Lopes, Rogelio; Eduardo, Bruno; Vinícius, Leandro (2019). Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. *Bioresource Technology*, 292(agosto), 121963.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121963>
- Amini, Malihe; Yousefi-Massumabad, Hassan; Younesi, Habibollah; Abyar, Hajar; Bahramifar, Nader (2020). Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103588>
- Anjum, Anbreen; Zuber, Mohammad; Zia, Khalid; Noreen, Aqdas; Anjum, Muhammad; Tabasum, Shazia (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Annamalai, Neelamegam; Sivakumar, Nallusamy (2016). Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*, 237, 13-17.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.001>
- Arikawa, Hisashi; Sato, Shunsuke; Fujiki, Tetsuya; Matsumoto, Keiji (2017). Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 250-254.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.003>
- Capolupo, Laura; Faraco, Vicenza (2016). Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9451-9467.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7884-y>
- Chanprateep, Suchada; Katakura, Yoshio; Visetkoop, Sirirat; Shimizu, Hiroshi; Kulpreecha, Songsri; Shioya, Suteaki (2008). Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1205-1215.
<https://doi.org/10.1007/s10295-008-0427-5>
- Dattatraya, Ganesh; Ganesh, Rijuta; Varjani, Sunita; Cho, Si-Kyung; Ghodake, Gajanan; Kadam, Avinash; Mulla, Sikandar; Naresh, Ram; Kim, Dong-Su; Seung, Han (2020). Development of ultrasound aided chemical pretreatment methods to enrich saccharification of wheat waste biomass for polyhydroxybutyrate production and its characterization. *Industrial Crops & Products*, 150, 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112425>
- De Bhowmick, Goldy; Sarmah, Ajit; Sen, Ramkrishna (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*, 247, 1144-1154.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>
- De Souza, Larissa; Manasa, Y.; Shivakumar, Srividya (2020). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Bioconversion of lignocellulosic substrates for the production of polyhydroxyalkanoates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28(julio), 101754.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101754>

- Dey, Pinaki; Rangarajan, Vivek (2017). Improved fed-batch production of high-purity PHB (poly-3 hydroxy butyrate) by *Cupriavidus necator* (MTCC 1472) from sucrose-based cheap substrates under response surface- optimized conditions. *3 Biotech*, 310(7), 1-14.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0948-6>
- Favaro, Lorenzo; Basaglia, Marina; Casella, Sergio (2019). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), 208-227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>
- Gabhane, Jagdish; Kumar, Sachin; Sarma, A. K. (2020). Effect of glycerol thermal and hydrothermal pretreatments on lignin degradation and enzymatic hydrolysis in paddy straw. *Renewable Energy*, 154, 1304-1313.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.035>
- Galbe, Mats; Wallberg, Ola (2019). Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12(294), 1-26.
<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>
- Ganesh, Rijuta; Dattatraya, Ganesh; Kyung, SI; Su, Dong; Ghodake, Gajanan; Kadam, Avinash; Kumar, Gopalakrishnan; Naresh, Ram (2019). Pretreatment of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L .) biomass feedstock for polyhydroxybutyrate (PHB) production and characterization. *Bioresource Technology*, 282, 75-80.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.083>
- García, L.; Novoa, J.; Franco, A.; Higueta, L. (2015). Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. *Revista QUID*, 25, 69-78.
- González, Y.; Meza, J.; González, O.; Córdoba, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115.
- Govil, Tanvi; Wang, Jia; Samanta, Dipayan; David, Aditi;Tripathi, Abhilash; Rauniyar, Shailabh; Salem, David; Sani, Rajesh (2020). Lignocellulosic feedstock: A review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics. *Journal of Cleaner Production*, 270, 1-19.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122521>
- Heinrich, Daniel; Madkour, Mohamed; Al-Ghamdi, Mansour; Shabbaj, Ibraheem; Steinbüchel, Alexander (2012). Large scale extraction of poly (3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2(59), 1-6.
<https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-59>
- Hermann, Carmen; Koller, Martin; Muhr, Alexander; Fasl, Hubert; Stelzer, Franz; Braunegg, Gerhart (2013). Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products. *Hindawi*, 2013, 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2013/129268>
- Isak, I.; Patel, M.; Riddell, M.; West, M.; Bowers, T.; Wijeyekoon, S.; Lloyd, J. (2016). Quantification of polyhydroxyalkanoates in mixed and pure cultures biomass by Fourier transform infrared spectroscopy : comparison of different approaches. *Letters in Applied Microbiology*, 63(2), 139-146.
<https://doi.org/10.1111/lam.12605>
- Islam, Salatul; de Wever, Heileen; Volcke, Eveline; Garcia-Gonzalez, Linsey (2014). A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry*, 49(3), 365-373.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004>
- Jonsson, Leif; Alriksson, Björn; Nilvebrant, Nils-Olof (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(16), 1-10.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

- Kant, Shashi; Gurav, Ranjit; Choi, Tae-Rim; Jung, Hye-Rim; Yang, Yun-Hun (2019). Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresource Technology*, 271, 306-315.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.122>
- Kaur, Kamalpreet; Espirito, Melissa; Pellegrini, Vanessa; de Azevedo, Eduardo; Guimaraes, Francisco; Polikarpov, Igor (2020). Biomass and Bioenergy Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 139, 105639.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105639>
- Kerketta, Ankush; Vasanth, D. (2019). Madhuca indica flower extract as cheaper carbon source for production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 87, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.013>
- Koller, Martin (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(20), 1-30.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Kumar, Manish; Rathour, Rashmi; Singh, Rashmi; Sun, Yaquing; Pandey, Ashok; Gnansounou, Edgard; Lin, Kun-Yi; Tsang, Daniel; Shekhar, Indu (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, 1-20.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>
- Li, Mengxing; Wilkins, Mark (2020). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production : Feedstocks , strains and process developments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 691-703.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>
- Liu, C.; Zhang, L.; An, J.; Chen, B.; Yang, H. (2015). Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 1558, 9-15.
<https://doi.org/10.1111/lam.12511>
- López, L.; Acosta, A.; Zambrano, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Facultad Ingeniería Universidad de Antioquia*, 69, 317-326.
- Madeiros-Garcia, João; Distant, Franceso; Storti, Giuseppe; Moscatelli, Davide; Morbidelli, Massimo; Sponchioni, Mattia (2020). Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances*, 42, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107582>
- Nath, A.; Dixit, M.; Bandiya, A.; Chavda, S.; Desai, A. J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. 99. *Bioresource Technology*, 99(13), 5749-5755.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017>
- Pakalapati, Harshini; Chang, Chi-Kai; Show, Pau; Arumugasamy, Senthil; Lan, John (2018). Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 282-292.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>
- Plastic Market Size (2020). *Plastics Polymers & Resins*.
<https://www.fortunebusinessinsights.com/plastics-market-102176>

- Ranganathan, Saranya; Dutta, Sayantani; Moses, J. A.; Anandharamakrishnan, C. (2020). Utilization of food waste streams for the production of biopolymers. *Heliyon*, 6(9), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04891>
- Raposo, Rodrigo; Cesário, Teresa; Almeida, Catarina; van Keulen, Frederik; Ferreira, Bruno; de Fonseca, Manuela R. (2014). Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*, 31(1), 104-113.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.004>
- Raza, Zulfiqar; Abid, Sharjeel; Banat, Ibrahim (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 45-56.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Report European Bioplastic (2017). *Bioplastic market data 2017*.
http://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/2017/Report_Bioplastics_Market_Data_2017.pdf
- Rojas, E.; Hoyos, J.; Mosquera, S. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología en el Sector Agropecuário y Agroindustrial*, 14(1), 19-26.
- Ruiz, Héctor; Rodríguez, Rosa; Fernandes, Bruno; Vicente, António; Teixeira, José (2013). Hydrothermal processing , as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35-51.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Ruiz, Héctor; Conrad, Marc; Sun, Shao-Ni; Sánchez, Arturo; Rocha, George; Romaní, Aloia; Castro, Eulogio; Torres, Ana; ... Meyer, Anne (2020). Engineering aspects of hydrothermal pretreatment : From batch to continuous operation , scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 299, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>
- Sabapathy, Poorna; Devaraj, Sabarinathan; Meixner, Katharina; Anburajan, Parthiban; Kathirvel, Preethi; Ravikumar, Yuvaraj; Zayed, Hossain; Qi, Xianghui (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production - A review. *Bioresource Technology*, 306, 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- Saratale, Ganesh; Oh, Min-Kyu (2015). Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 627-635.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.034>
- Saratale, Ganesh; Saratale, Rijuta; Varjani, Sunita; Cho, Si-Kyung; Ghodake, Gajanan; Kadam, Avinash; Mulla, Sikandar; ...Shin, Han (2020). Development of ultrasound aided chemical pretreatment methods to enrich saccharification of wheat waste biomass for polyhydroxybutyrate production and its characterization. *Industrial Crops and Products*, 150, 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112425>
- Schmid, Maximilian; Raschbauer, Michaela; Song, Hyunjeong ; Bauer, Cornelia; Neureiter, Markus (2021). Effects of nutrient and oxygen limitation, salinity and type of salt on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Bacillus megaterium* uyuni S29 with sucrose as a carbon source. *New Biotechnology*, 61, 137-144.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.012>

- Shahid, Salma; Razzaq, Sadia; Farooq, Robina; Nazli, Zill-i-Huma (2021). Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 297-321.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.187>
- Sultana, Naznin; Khan, Tareef (2012). In vitro degradation of PHBV scaffolds and nHA/PHBV composite scaffolds containing hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-12.
<https://doi.org/10.1155/2012/190950>
- Utsunomia, Camila; Ren, Qun; Zinn, Manfred (2020). Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(257), 1-20.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00257>
- Velmurugan, Rajendran; Muthukumar, Karuppan (2012). Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: Optimization through response surface methodology. *Bioresource Technology*, 112, 293-299.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.168>
- Vu, Hang; Nguyen, Luong; Vu, Mihn; Johir, Abu; McLaughlan, Robert; Nghiem, Long (2020). A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks. *Science of the Total Environment*, 743, 1-16.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140630>
- Wu, Han; Dai, Xiao; Zhou, Si-Li; Gan, Yu-Yan; Xiong, Zi-Yao; Qin, Yuan-Hang; Ma, Jiayu; ...Wang, Cun-Wen (2017). Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. *Bioresource Technology*, 241, 70-74.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.090>
- Yang, Bin; Tao, Ling; Wayman, Charles (2018). Strengths, challenges, and opportunities for hydrothermal pretreatment in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12, 125-138.
<https://doi.org/10.1002/bbb.1825>
- Yu, Jian; Stahl, Heiko (2008). Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(17), 8042-8048.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.071>