

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD POTENCIAL DE EXTRACTOS
HEMICELULÓSICOS DE LA CASCARILLA DE ARROZ.**

Curso 2017/2018

Alumna: Andrea Almarche Fuster

Tutora: Amparo Chiralt Boix

Directora experimental: Raquel Requena Peris

2018, Valencia

ESTUDIO DE LA POTENCIAL BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS HEMICELULÓSICOS DE LA CASCARILLA DEL ARROZ

Valencia, de 2018

Alumna: Andrea Almarche Fuster

Tutora: Amparo Chiralt Boix

Cotutora experimental: Raquel Requena Peris

RESUMEN

La cascarilla de arroz es un subproducto agroalimentario cuya revalorización tiene gran interés en el contexto de la economía circular. Es un material lignocelulósico con una importante fracción de hemicelulosas formada por arabinoxilanos sustituidos cuya ruptura da lugar a xilooligómeros con aplicaciones alimentarias, médicas y farmacéuticas. En este sentido, se han estudiado diversas metodologías que permitan la extracción de dichos compuestos a partir de subproductos de la industria alimentaria como la extracción alcalina y la extracción con agua subcrítica. A diferencia del proceso alcalino, la extracción con agua subcrítica no solo es una tecnología sostenible medioambientalmente, sino que además mantiene la funcionalidad de las fracciones hemicelulósicas aisladas de la materia prima. En este contexto resulta interesante la valorización de hemicelulosas a partir de cascarilla de arroz mediante ambas tecnologías a fin de poder comprar su funcionalidad en términos de actividad antioxidante y poder antimicrobiano. Este estudio contempla la determinación de la potencial actividad antioxidante de los diferentes extractos, así como el estudio de su potencial actividad antimicrobiana frente a bacterias tanto Gram – como Gram +. Para la determinación de la actividad antioxidante se ha utilizado el método de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), lo cual permite comparar el poder antioxidante de ambos extractos con compuestos antioxidantes de referencia. En cuanto a la potencial actividad antimicrobiana de los extractos, se ha determinado la concentración mínima inhibitoria de ambos productos mediante el ensayo MTT que permite probar múltiples concentraciones diferentes al mismo tiempo de forma rápida y sencilla. De esta forma, se obtenido la información necesaria para su futura aplicación tanto en materiales de envasado de alimentos, como en la propia formulación de alimentos, ya que por sus propiedades activas permitirían prolongar su vida útil a la vez que se enriquecen en compuestos antioxidantes.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, Actividad Antioxidante, cascarilla de arroz, valorización, arabioxilanos, extracción subcrítica.

ABSTRACT

Rice Husk is an agro-food by-product whose valorization is of great interest in the context of the circular economy. It is a lignocellulosic material with an important fraction of hemicelluloses constituted by substituted arabinoxylans whose rupture, gives rise to Xilo-oligomers with alimentary, medical and pharmaceutical applications. In this sense, several methodologies have been studied for allowing the extraction of these compounds from food industry byproducts, such as alkaline extraction and subcritical water extraction. Unlike the alkaline process, the extraction with subcritical water is not only an environmentally sustainable technology, but also maintains the functionality of the hemicellulose fractions isolated from the raw material. In this context, the valorization of hemicelluloses from rice husks through both technologies is interesting to compare their effectiveness at maintaining the hemicellulose functionality in terms of the antioxidant activity and antimicrobial capacity. This study includes the determination of the potential antioxidant activity of the different extracts, as well as the study of their potential antimicrobial activity against both Gram (-) and Gram (+) bacteria. For the determination of the antioxidant activity the method of reduction of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidracilo (DPPH) was used, which allow for comparing the antioxidant capacity of both extracts with other known antioxidant compounds. As concerns the antimicrobial activity of the extracts, the minimum inhibitory concentration of both products was determined by means of the MTT test, which allows for testing multiple different concentrations at the same time, in a quick and easy manner. In this way, the information necessary for its future application was obtained both in food packaging materials, as well as in food formulation, due to that fact that their active properties would allow for extending food shelf life, while food are enriched in antioxidant compounds.

Key words: Antimicrobial activity, antioxidant activity, rice husk, valorization, arabinoxylans, subcritical extraction.

Quisiera agradecer este trabajo a los que han hecho que yo haya podido llegar hasta aquí y a los premios ACTA-CTA por otorgarme tal galardón.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA
- 1.2 VALORIZACIÓN DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA
 - 1.2.1 Valorización de subproductos de a industria de transformados vegetales
 - 1.2.2 Valorización de residuos de la pesca
 - 1.2.3 Valorización de residuos lácteos
 - 1.2.4 Valorización de residuos cárnicos
- 1.3 BIORREFINERÍA
 - 1.3.1 Biofuels
 - 1.3.2 Bioelectricidad
 - 1.3.3 Biopolímeros
 - 1.3.4 Ácidos Orgánicos
 - 1.3.5 Derivados de la fermentación en estado solido
 - 1.3.6 Productos farmacéuticos
 - 1.3.7 Alimentos y Piensos
 - 1.3.8 Hemicelulosas
- 1.4 FRACCIONAMIENTO DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS
- 1.5 ENVASES ACTIVOS

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1 MATERIALES
- 3.2 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES HEMICELULÓSICAS A PARTIR DE LA CASCARILLA DEL ARROZ
 - 3.2.1 Extracción secuencial con agua subcrítica
 - 3.2.2 Extracción alcalina
- 3.3 DETERMINACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE EL ENSAYO DPPH
- 3.4 DETERMINACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS FRENTE A BACTERIAS GRAM + Y GRAM –

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS HEMICELULÓSICOS
- 4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS HEMICELULÓSICOS

5. CONCLUSIÓN

6. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Sánchez Riaño, A.M. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5: 61-91.

Tabla 2. Ejemplos de procesos de fermentación que producen biobutanol a partir de desechos (Liguori y col., 2013).

Tabla 3. Ejemplos de procesos de fermentación que producen biohidrógeno a partir de desechos (Liguori y col., 2013).

Tabla 4. Ejemplos de procesos de fermentación que producen (biogás) metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) a partir de desechos (Liguori y col., 2013).

Tabla 5. Principales polímeros obtenidos a partir de biomasa.

Tabla 6. Ejemplos de procesos de fermentación para la producción de ácidos orgánicos. (Liguori y col., 2013).

Tabla 7. Volúmenes de la muestra obtenida con agua subcrítica.

Tabla 8. Volúmenes de la muestra alcalina.

Tabla 9. Valores de la absorbancia a tiempo inicial y transcurrida 1 hora (tiempo de reacción) y los correspondientes porcentajes de DPPH que quedan si reaccionar pasada 1 hora, para el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica.

Tabla 10. Valores de la absorbancia a tiempo inicial y transcurrida 1 hora (tiempo de reacción) y los correspondientes porcentajes de DPPH que quedan si reaccionar pasada 1 hora, para el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino.

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Volúmenes de residuos de la cadena de ministro de alimentos en diferentes partes del mundo (Lin y col., 2013).

Figura 2. Componentes presentes en los residuos agroalimentarios y sus principales aplicaciones (Lin y col., 2013).

Figura 3. Ejemplo de biorrefinería a partir de cascarilla de arroz (Barana y col., 2016).

Figura 4. La 'biorrefinería de olivos' con los procesos asociados de aguas residuales del molido de aceituna, subproductos, valorización y eliminación de residuos (Federici y col., 2009).

Figura 5. Diagrama de fase del agua (Toor y col., 2011).

Figura 6. Reducción del radical DPPH· en una solución alcohólica.

Figura 7. Ejemplo de la decoloración del DPPH· al reaccionar con el antioxidante.

Figura 8. Principio del ensayo MTT donde el reactivo de color amarillo es transformado en formazán de color purpura.

Figura 9. Esquema del diseño experimental para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos.

Figura 10. Cubetas para la recta de calibrado del DPPH.

Figura 11. Recta de calibrado del DPPH.

Figura 12. Representación de la absorbancia frente al tiempo para los diferentes ratios muestra:DPPH para el extracto obtenido con agua subcrítica.

Figura 13. Representación de la absorbancia frente al tiempo para los diferentes ratios muestra:DPPH para el extracto obtenido con tratamiento alcalino.

Figura 14. Porcentaje de DPPH remanente a tiempo estable frente el ratio muestra:DPPH para los extractos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica mostrando el parámetro EC_{50} .

Figura 15. Porcentaje de DPPH remanente a tiempo estable frente el ratio muestra:DPPH para los extractos obtenidos mediante tratamiento alcalino mostrando el parámetro EC_{50} .

Figura 16. Ejemplo del aspecto visual del resultado de un ensayo MTT para estudiar la actividad antimicrobiana de los extractos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Residuos de la industria agroalimentaria

La población mundial está creciendo a una velocidad exponencial y al mismo tiempo lo hace su necesidad de alimentos, medicamentos, vivienda, servicios básicos, energía, etc., y esto, se traduce a su vez en mayores requerimientos para la gestión de los residuos asociados (Lin y col., 2013). En la actualidad, la gestión de los residuos es un tema importante, especialmente en los países en vías de desarrollo como China o India, pero también en Europa. Los diferentes tipos de residuos se pueden clasificar en urbanos, industriales, agrícolas, sanitarios y sólidos en función de su origen. A su vez, los urbanos y los sólidos pueden subdividirse en vidrio, papel, plásticos, metales, materia orgánica y otros. Los desechos producidos a lo largo de la cadena de suministro de alimentos son un buen ejemplo de un tipo de residuo generado a gran escala a nivel mundial (**Figura 1**). Este tipo de residuos se está volviendo cada vez más problemático ya que en algunos casos puede representar más del 50% de los residuos totales producidos en los países, y el 60% de ellos pertenecen a materia orgánica (Lin y col., 2013). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación las principales causas de la generación de residuos de alimentos son el pudrimiento en la etapa de postcosecha, rechazos por falta de calidad, deterioro de los alimentos por malas prácticas de conservación y estrés en condiciones de almacenamiento, entre otras causas (Gustavsson y col., 2011), dando lugar a alrededor de $2,5 \cdot 10^8$ toneladas de residuos anuales (AWARENET, 2004).

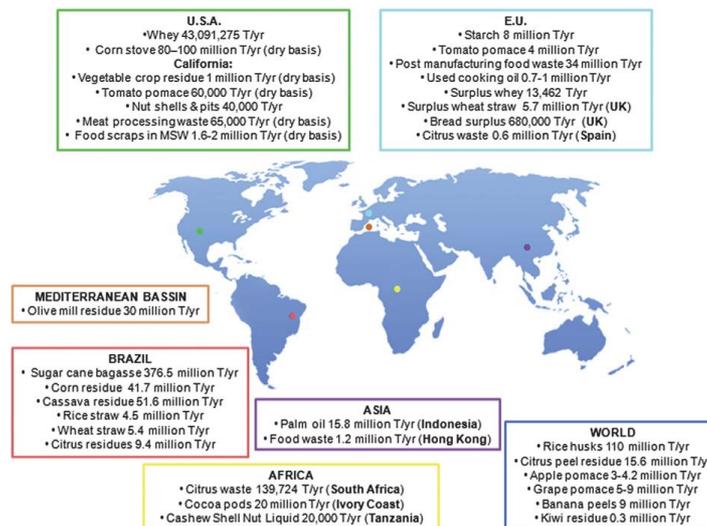


Figura 1. Volúmenes de residuos de la cadena de ministro de alimentos en diferentes partes del mundo (Lin y col., 2013).

Los residuos alimentarios son una opción importante como fuente de recursos cuyo aprovechamiento podría satisfacer en parte las necesidades mundiales de energía, materiales y alimentos, aunque en la actualidad muchos de estos residuos no son aprovechados. Las prácticas actuales de gestión de residuos procedentes de la industria agroalimentaria para su valorización incluyen alimentación animal, compostaje, incineración y vertido en vertedero. La alimentación animal es generalmente la vía más rentable, pero a veces está limitada por

cuestiones reglamentarias, así como por la naturaleza del producto generado en el proceso. El compostaje, es la práctica más popular y extendida, puesto que es ambientalmente aceptable ya que permite cerrar el ciclo de carbono, a la vez que reduce las necesidades de fertilizantes y de agua dulce. No obstante, esta práctica todavía no es rentable desde el punto de vista económico (Lin y col., 2013). En cuanto a la eliminación en vertederos, es una práctica costosa con un gran impacto ambiental, dadas las emisiones directas e indirectas de metano y dióxido de carbono (Tuck y col., 2012). En el pasado, los residuos se destinaban a alimentación animal y a obtención de compost, sin embargo, aunque se siguen usando para ese fin, la tecnificación de los cultivos y de la actividad agrícola, la aparición de maquinaria y el uso de agroquímicos y pesticidas, han hecho que la producción de alimentos se haya desbocado.

1.2. Valorización de los residuos de la industria agroalimentaria

Las necesidades actuales de nuestra sociedad en términos de competitividad económica, eficiencia y maximización de los recursos están fomentando el diseño y desarrollo de estrategias encaminadas al aprovechamiento de los residuos de alimentos, con el objetivo de obtener productos finales de alto valor añadido. En algunos casos se “reutiliza” un producto; es decir se emplea de nuevo para el mismo fin para el cual fue diseñado; en otros se “recicla” o transforma dentro del mismo proceso productivo u otro proceso, como compostaje o digestión anaerobia, y más recientemente se “valorizan”, lo que le permite obtener valor añadido mediante una pequeña transformación sin afectar la salud humana o el medioambiente (Moreno y Moral, 2011). En este sentido surge el término conocido como subproducto entendido como todo producto secundario obtenido en un determinado proceso y que puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto para otra puede constituir su materia prima, obteniendo así un producto principal. No obstante, a pesar de los claros beneficios, la utilización de residuos agroalimentarios actualmente representa un desafío debido a varios inconvenientes y limitaciones, tales como una composición heterogénea y variable (lípidos, carbohidratos, proteínas), contenido en agua alto y bajo valor calórico, lo que constituye un desafío para el desarrollo a gran escala de procesos industriales coherentes ya que se encuentran limitados tecnológicamente, además de tener un insuficiente apoyo legislativo y de infraestructuras (Lin y col., 2013).

La valorización es un concepto relativamente nuevo en el campo de la gestión de residuos industriales que promueve el principio de desarrollo sostenible. Como muestra la **Figura 2**, uno de los objetivos de la valorización de subproductos de procesamiento de alimentos es la recuperación de sustancias químicas finas y la producción de metabolitos con valor añadido través de procesos químicos y biotecnológicos (Federici y col., 2009; Lin y col., 2013). En general estos residuos están condicionados a la actividad industrial que los genera. Es de interés conocer la composición del residuo a valorizar para la adecuada selección de la tecnología para llevar a cabo el proceso de valorización, así como para determinar su aplicación más conveniente.

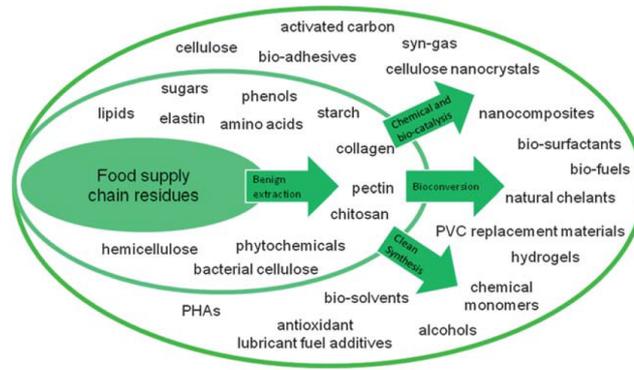


Figura 2. Componentes presentes en los residuos agroalimentarios y sus principales aplicaciones (Lin y col., 2013).

1.2.1. Valorización de subproductos de la industria de transformados vegetales

La industria de transformados vegetales es un sector muy amplio donde destacan las industrias dedicadas a la elaboración de zumos y concentrados de frutas, procesado de cereales (trigo, arroz, etc.), conserveras (alcachofas, melocotón, tomate, etc.), congelados, mermeladas, centrales hortofrutícolas, empresas de distribución, etc. El porcentaje de residuos generado es muy variable ya que está determinado por múltiples factores como el tipo de materia prima a procesar, la calidad de la materia prima (ej. frutos dañados, podridos, madurez excesiva o insuficiente), que a su vez dependerá de la climatología, variedad, sistema de recolección o la calidad deseable en el producto final, ya que la obtención de calidades óptimas de producto final requiere selecciones de materia prima más rigurosas que aumentan el porcentaje de residuos orgánicos y la tecnología de fabricación empleada.

Los residuos que merecen destacarse por su importancia cuantitativa y/o cualitativa son los procedentes de la fabricación del aceite de oliva (orujo, alpechines, alperujo), zumo, procesado de cereales como el arroz (medianos, salvado, cascarilla), de la extracción de aceites de semillas (cáscaras), elaboración de frutos secos, de la industria conservera y de la fabricación de cerveza y malta. Los residuos lignocelulósicos están compuestos básicamente por lignina, celulosa, hemicelulosas, pectina y almidón, en cantidades variables. La **Tabla 1** muestra la composición química principal de algunos subproductos de la industria de transformados vegetales (Sánchez Riaño, 2010). Es de vital importancia conocer la composición del residuo lignocelulósico ya que esta determinará cual será la aplicación más conveniente (textiles, materiales de envase, extracción de compuestos bioactivos, pulpa de papel, material de construcción, abonos, alimentos, etc.).

Tabla 1. Composición química de algunos de los subproductos más valorizados en base seca. (Sánchez Riaño, 2010).

Material lignocelulósico	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina
Cascarilla de arroz	39 26-36	18-21	23 18-25
Bagazo de caña	49	24	26
Desechos cítricos (Bagazo y Cáscara)	20 16	11 14	2 1
Subproductos de plátano (Cáscara de Banano)	13	15	14

Uno de los componentes con mayor valor añadido que puede ser obtenido a partir de este tipo de residuos es la fibra dietética. Entre otros componentes bioactivos que también pueden ser extraídos se encuentran los carotenoides, los fitoestrógenos, los antioxidantes naturales como los compuestos fenólicos y los compuestos funcionales. Los compuestos fenólicos y los flavonoides han atraído mucho la atención dado que son potentes antioxidantes e inhiben varias actividades fisiológicas tales como antiinflamatoria, antimicrobiana, antialérgica, anticarcinogénica y antihipertensiva. Otro grupo interesante de compuestos que se pueden obtener a partir de los residuos vegetales con los mono, di y oligosacáridos, así como los oligosacáridos no digeribles, actualmente considerados como prebióticos puesto que alcanzan el colon sin ser digeridos, donde son fermentados principalmente por bifidobacterias y bacterias ácido lácticas, produciendo así un efecto beneficioso para la salud (Federici y col., 2009).

Subproductos cítricos

La industria de zumo de naranja genera, aproximadamente, 1,6 toneladas de residuos por m³ de zumo producido. Por ejemplo, en la provincia de Valencia los residuos suponen aproximadamente 6163,270 T/año. Dada su amplia disponibilidad y composición rica en aceites esenciales, pigmentos, glucósidos, vitaminas, aminoácidos, sales minerales y carbohidratos, residuos resultantes de la elaboración de zumo son de gran interés para su valorización en productos de alto valor añadido. Los subproductos cítricos tienen multitud de posibilidades para su aprovechamiento tales como obtención de aceites esenciales, carotenoides, flavonoides, pectinas, pulpa para zumos reconstituidos y bebidas, fibra dietética, etc. Los aceites esenciales son el principal subproducto aromático de las fábricas de zumo de naranja y se encuentran en las glándulas que tienen en el flavedo. Su extracción se lleva a cabo tras el lavado de las naranjas en la recepción y antes del proceso de extracción del zumo. Existen varios métodos, pero todos se basan en romper las glándulas y arrastrar mediante agua el aceite esencial. Su uso principal es como potenciador de aromas de bebidas refrescantes, helados, galletas, golosinas y chicles, y para la elaboración de perfumes. Los carotenoides son pigmentos solubles en grasas y disolventes orgánicos. Se encuentran en el flavedo, por lo que pasan a los aceites esenciales extraídos de la corteza y en forma de dispersión en las vesículas, por lo que pasan al zumo. Sus principales usos son como potenciadores del color en zumos, helados, bebidas refrescantes, caramelos y yogures) y en la elaboración de fármacos dadas sus propiedades antioxidantes (Llorach y col., 2002). Flavonoides y limonoides también se pueden obtener a partir de

subproductos cítricos, los cuales pueden usarse como edulcorantes no calóricos para zumos, dulces dietéticos y dentífricos. Sus derivados oxidados se emplean como compuestos antihemorroidales, antioxidantes y estabilizantes de grasas o anti-trombogénicos (Hertog MGL y col., 1995; Middleton y col., 1994). Las pectinas representan el 30 % de la materia seca de la corteza de los cítricos y tienen multitud de aplicaciones tales como en la fabricación de gelatina, mermelada y confitura; estabilización de productos lácteos, principalmente cuando se mezcla el producto lácteo con zumos de frutas para evitar la precipitación de la caseína; espesante y emulsificante de salsas y aliños; formulación de alimentos bajos en calorías, para sustituir el efecto en boca de las grasas o en farmacia, para problemas gastrointestinales. También ha sido calificada como fibra dietética que disminuye el colesterol y ajusta el nivel de glucosa en sangre. La corteza de los cítricos y los residuos de las membranas que se obtienen en los extractores de zumo representan aproximadamente un 40-50% en peso. Una de las aplicaciones más antiguas de estos residuos es para alimentación de ganado. La piel presenta aproximadamente 65% de fibra dietética, la cual lleva asociados componentes activos como flavonoides y vitamina C y cuya principal aplicación es la formulación de alimentos funcionales (Larrauri, 1999). Además de la fermentación tradicional de las melazas para obtener alcohol o de los residuos para obtener biogás, existen otros productos que se pueden obtener por fermentación a partir de subproductos de cítricos como enzimas y compuestos bioactivos. Así, a partir de residuos de cítricos y lodos resultantes de su industrialización se ha obtenido un plaguicida para el control de plagas en plantaciones de melón mediante un proceso fermentativo *con la cepa Trichoderma harzianum T-78* (López y col., 2010)

Subproductos del arroz

En el proceso de transformación del arroz cáscara en arroz blanco se desperdicia gran parte del producto, en cantidad (aproximadamente 35% del peso inicial) y en calidad (vitaminas, proteínas, minerales, etc.). Los rendimientos obtenidos dependen de la variedad arroz, la humedad a la entrada al molino, la tecnología del molino y el grado de elaboración. Principalmente los subproductos resultantes de la transformación del arroz cáscara en arroz blanco son los medianos, el salvado y la cascarilla. La valorización de los medianos del arroz se destina principalmente a la alimentación animal. También tiene otras aplicaciones como la obtención de almidón ya que el endospermo de los cereales es muy rico en almidón. Este se emplea para obtener jarabes de glucosa, por hidrólisis del almidón, productos de panificación, bollería, confitería, bebidas refrescantes, productos lácteos, jarabes de fructosa empleados para alimentos dietéticos, etc. Otros usos de los medianos pueden ser la obtención etanol, en cervecería ya que actúan como coadyuvantes y estabilizantes de la cerveza, producción de arroz inflado y harina (Valencia y César, 1994). El salvado tiene un gran interés por su volumen de producción y su alto valor nutritivo (considerable contenido en grasas y proteínas). No se consume directamente por su elevado contenido en fibras y la inestabilidad de sus grasas. Su principal aplicación es la obtención de aceite, el cual se utiliza para la obtención de sustancias químicas (antiespumantes, antioxidantes, ésteres de sacarosa y monositol), refinado e hidrogenación para obtener margarinas, así como en cosmética y farmacia (Vargas y col., 2010).

La cascarilla de arroz es el subproducto mayoritario generado durante el procesado del arroz. A nivel mundial la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación reporta una producción de 607.000 toneladas (Méndez, 2005) de arroz en el año 2004. Teniendo en cuenta que la cascarilla representa en promedio el 15-20% del peso del grano (Ahumada y Rodríguez, 2006), esto supone un residuo de 134.000.000 Tm. Este subproducto se utiliza mayoritariamente como combustible en sistemas de cogeneración dada su composición química (26-39% celulosa, 18-21% hemicelulosa y 18-25% lignina) con buen rendimiento energético (3200 kcal/kg), además de desprender poco azufre (Valverde y col., 2007). A partir de las cenizas de combustión se puede obtener material refractario, cemento resistente a la corrosión, antideslizante para neumáticos, silicatos (filtros para la materia orgánica del agua), absorbentes en pastas jabonosas y dentífrico (poder abrasivo). En otras ocasiones la cascarilla de arroz se destina como material de cama para animales y se desecha en rellenos de tierra o simplemente se quema en los campos, contaminando así el aire y el suelo. Otra alternativa es la obtención de productos de hidrólisis como el furfural, un disolvente selectivo de hidrocarburos en el refinado del petróleo, y adherentes como la xilosa o derivados como el xilitol, sustitutivo del sorbitol como edulcorante y estabilizador de humedad. Un ejemplo de biorrefinería a partir de cascarilla de arroz sería es que se muestra en la **Figura 3**, donde a través de un proceso basado en lixiviación acida, tratamiento alcalino e hidrolisis con ácido sulfúrico se obtienen de forma secuencial lignina, hemicelulosas, silica y nanocristales de celulosa (Barana y col., 2016).

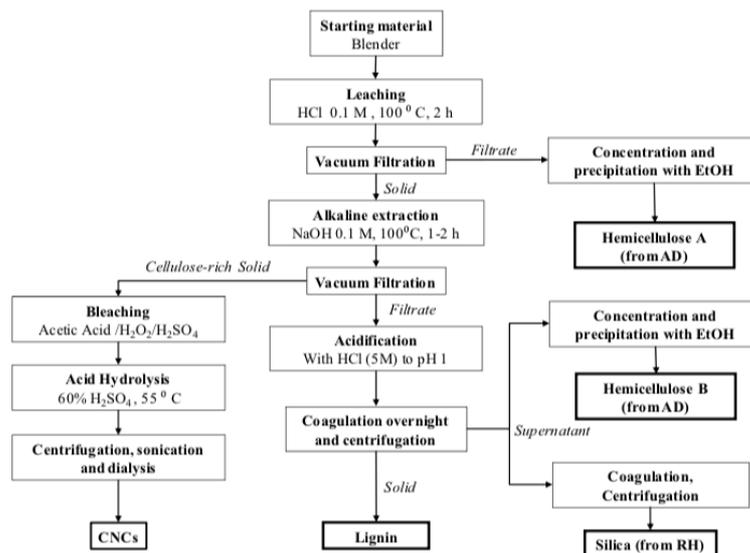


Figura 3. Ejemplo de biorrefinería a partir de cascarilla de arroz (Barana y col., 2016).

Subproductos del aceite de oliva

Los subproductos que se generan durante el proceso de extracción del aceite de oliva son el alpechín, los orujos y el alpeorujo. El principal aprovechamiento de los orujos es la extracción del aceite que todavía queda en esta pasta mediante el uso de disolventes, los cuales son posteriormente eliminados, obteniéndose así el aceite de orujo de oliva, perfectamente apto para el consumo (García, 2008). Del proceso de extracción del aceite de orujo resulta un residuo sólido conocido como orujillo u orujo agotado el cual se utiliza habitualmente como pienso para

el ganado, como fertilizante, para obtener compost (Sainz y col., 2000) y como combustible en sistemas de cogeneración (Ortega y col., 2004).

Tradicionalmente el alpechín se vertía a los cauces fluviales, generando grandes impactos sobre las aguas receptoras. Actualmente se procesan mediante diferentes tratamientos como concentración por evaporación, vertido sobre terrenos, tratamientos de depuración (coagulación y biológicos) y tratamientos fisicoquímicos (resonancia magnética y ultrafiltración). La melaza resultante del proceso de evaporación se utiliza para diferentes fines tales como compostaje, obtención de azúcares y antioxidantes. El alpeorujo, por otro lado, también es un subproducto de difícil manejo. Su vertido incontrolado puede provocar problemas como la coloración de las aguas, amenaza de la vida acuática, formación de una película que no deje pasar los rayos de sol, deterioro del suelo, fitotoxicidad, olores desagradables. Por todo ello se hace necesario también su tratamiento. De este subproducto se puede obtener también aceite de orujo de oliva, a partir de una nueva centrifugación o mediante su extracción química con disolventes. Después de la obtención de este aceite, el remanente del alpeorujo desengrasado se aprovecha usando técnicas de cogeneración energética o de compostaje. También puede ser utilizado para otras muchas aplicaciones, tales como alimento para ganado, producción de colorantes, antioxidantes como el hidroxitirosol, enzimas, pectinas, manitol, exopolisacárido de interés comercial en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, y obtención de bioplásticos a partir de fermentación microbiana (Federici y col., 2009; Usaquén, 2008).

La desodorización de los aceites vegetales es una operación que se lleva a cabo al final del proceso de refinado de aceites vegetales cuya finalidad es eliminar las sustancias que imparten sabores y olores indeseables a los mismos. Junto con las sustancias que producen aromas indeseables en el aceite (productos de oxidación como aldehídos, cetonas, etc.) se destilan, en parte, algunos componentes minoritarios del aceite, tales como ácidos grasos libres, tocoferoles, esteroides, escualeno, mono y diglicéridos, algo de triglicéridos, hidrocarburos pesados y otros componentes menores. Esta corriente de subproducto recibe el nombre de Destilado de Desodorización y comúnmente se vende con un bajo valor añadido, a industrias relacionadas. Sin embargo, las características de algunos de los componentes presentes sugieren la conveniencia de un tratamiento de purificación que permita separar los componentes de mayor valor añadido tales como los tocoferoles y esteroides (Carmona, 2016).

1.2.2. Valorización de residuos de la pesca

La explotación integral y sostenible de los recursos pesqueros es una necesidad puesto que solo el 50% de las capturas son destinadas para consumo humano. Así, la industria de la pesca descarta anualmente alrededor de 20 millones de toneladas en todo el mundo, lo que representa el 25% de las capturas, incluyendo especies no deseadas y residuos y subproductos de su procesado tales como vísceras, cabezas, colas, sangre y caparazones. Actualmente la mayoría de estos residuos son utilizados como alimento animal, fertilizantes, así como para la producción de adhesivos y aceite de pescado (Ferraro y col. 2010). Dependiendo de su composición el aceite de pescado puede ser comestible o no. Sus usos más habituales son la producción de jabón, glicerol, barnices, aceites industriales, fertilizantes y sustratos de fermentación, mientras que sus aplicaciones comestibles son básicamente la producción de margarina y manteca (AWARENET, 2004). No obstante, los residuos de la industria pesquera

también pueden ser valorizados a fin de obtener productos de alto valor añadido tales como ácidos grasos omega 3, hidroxapatita, taurina, creatinina, quitina, quitosano, ácido hialurónico, colágeno, gelatina, proteínas anticongelantes y enzimas. Entre las aplicaciones del colágeno se encuentra la producción de productos cosméticos, apósitos para heridas o como complementos alimenticios para la prevención y tratamientos de problemas osteoarticulares. La gelatina es una proteína coloidal soluble en agua que se obtiene por hidrólisis del colágeno, la cual se utiliza principalmente como emulsionante en la industria alimentaria, como agente encapsulante en la industria farmacéutica, así como complemento alimenticio o en la obtención de films comestibles y recubrimientos. Los ácidos grasos omega 3 se encuentran generalmente en pescados azules y en menor cantidad en los blancos, siendo los más representativos el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico. Se pueden utilizar como suplementación de alimentos con fines nutracéuticos, puesto que reducen los niveles de colesterol en sangre. El quitosano es un polisacárido que se obtiene de manera natural de la quitina proveniente del caparazón de ciertos crustáceos, el cual contribuye a mantener los niveles normales de colesterol por lo que se puede aplicar en medicina, tratamientos de aguas, cosmética y alimentación. También resulta muy interesante su uso para obtener envases biodegradables con propiedades antimicrobianas. Por su parte, la quitina ha demostrado poseer actividad antimicrobiana, inmunogénica y cicatrizante (Ferraro y col. 2010).

1.2.3. Valorización de residuos lácteos

La industria láctea es una parte importante de la industria alimentaria, con una gran contribución de residuos líquidos, los cuales pueden contener proteínas, sales, grasas y lactosa. El residuo que ha recibido considerable atención como fuente de productos de valor añadido es el suero de queso o lactosuero, la fracción líquida que se separa de la cuajada y cuya composición varía según la leche utilizada y el tipo de queso fabricado. Se estima que se producen aproximadamente 9 millones de toneladas de queso por año dentro de la UE y por tanto una producción anual de lactosuero de 50 millones de m³ (Kosseva, 2011). Esta fracción líquida, representa el 83% del volumen total de la leche tratada y su valorización presenta un gran interés por sus características ya que tiene un alto valor biológico y un bajo contenido en calorías. Existen distintas maneras de utilizar el lactosuero, pero dos de ellas son el secado deshidratándolo o desmineralización. La deshidratación del lactosuero, previa concentración, permite obtener un polvo con las mismas características que el líquido y que puede ser utilizado para charcutería, helados o pasteles, mezclándolo con otros ingredientes. Por otro lado, el desmineralizado permite reducir el contenido salino del lactosuero mediante nanofiltración, electrodiálisis o intercambio iónico, aumentando las posibilidades de utilización del mismo. Este tipo de lactosuero se destina mayoritariamente a la fabricación de leches maternizadas y otros productos dietéticos que requieren la presencia de lactosa y elevada calidad de lactoalbúmina y lactoglobulina, pero no toleran un contenido mineral elevado (Kosseva, 2011).

La leche es una mezcla de proteínas, lípidos y glúcidos en un medio acuoso y, aunque las proteínas representen una fracción muy pequeña, su valorización es muy importante. Principalmente existen dos grupos de proteínas, las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas forman complejos en la leche llamados micelas que están dispersos en la fase acuosa de la leche (Rebouillat y Ortega Requena 2015). Existen diferentes tipos de caseínas con diferentes propiedades y estructura, pero todas son muy importantes para la fabricación de

quesos, cremas batidas, licores de crema, cereales, carnes o como emulsificante en blanqueadores del café (Fox, 2001). Por otro lado, las proteínas del suero son utilizadas para alimentación, pero también para productos cosméticos y farmacéuticos. Para introducirlas en los alimentos se tienen que concentrar mediante filtración. Los concentrados de proteínas tienen un bajo nivel de grasa y colesterol, pero, en general, en comparación con las otras formas de proteína de suero, tienen niveles más altos de compuestos bioactivos y son muy utilizados para queso y yogur, helados, formulaciones dietéticas, barras energéticas de cereales, fórmulas infantiles, postres, productos horneados, coberturas, productos para untar bajos en grasa, bebidas y alimentos para deportistas y productos nutricionales geriátricos (Rebouillat y Ortega Requena 2015). También cabe destacar que, a partir del lactosuero, se pueden obtener algunos productos de fermentación como el ácido láctico y vitaminas como la B2 y B12. Además de proteínas, la leche también tiene una fracción de grasas que contiene fosfolípidos y aunque se encuentran en una cantidad muy baja, tienen un papel fundamental en la estabilización de glóbulos grasos. Los fosfolípidos tienen efectos positivos para los pacientes de Alzheimer, para la respuesta frente al estrés y para la protección frente a tóxicos y el desarrollo del cáncer (Rebouillat y Ortega Requena 2015). El sabor dulce de la leche lo aporta la lactosa, un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa, la cual se destina tanto a la industria farmacéutica como a alimentación.

1.2.5. Valorización de residuos cárnicos

El consumo de carne ha ido en aumento durante las últimas décadas, mientras que la demanda de productos derivados menos valiosos como la sangre, las vísceras y algunos músculos, ampliamente consumidos en el pasado, ha ido disminuyendo dado el mayor poder adquisitivo de la población. Así, en los mataderos se generan grandes cantidades de subproductos, entre los que destacan piel, huesos, vísceras, tejidos grasos, pies, cráneo, etc., que constituyen entre el 60-70% de la canal sacrificada, de los cuales casi el 40% son comestibles (Bhaskar y col., 2007). En este sentido la industria cárnica trata de encontrar nuevas soluciones de recuperación para estos desechos que podrían ser un riesgo serio tanto para el medio ambiente como para la salud humana. Desafortunadamente, a diferencia de los residuos vegetales, la recuperación de los subproductos de la industria cárnica está sujeta a severas limitaciones de higiene y salud. No obstante, Toldrá y col. (2012) reportaron que los residuos cárnicos y sus derivados podrían ser valorizados para alimentación humana, alimentación animal, así como en la industria química y biotecnológica. Así, pueden ser utilizados como mejoradores de sabor, ingredientes funcionales o aditivos nutricionales para alimentos de baja calidad proteica (Bhaskar y col., 2007). También se pueden obtener harinas de carne y sebos a partir de subproductos cárnicos, así como productos farmacéuticos como la pancreatina y la insulina.

Uno de los subproductos de mayor interés que se puede obtener de los residuos cárnicos es el colágeno, una proteína que se encuentra en el tejido conectivo fibroso y blanco. A partir de la hidrólisis controlada del colágeno se pueden obtener dos proteínas coloidales solubles en agua, la cola y la gelatina con multitud de aplicaciones en diferentes sectores. A diferencia de la cola, la gelatina se consigue a partir de materias primas frescas, bajo inspección sanitaria, lo que permite que el producto sea comestible. Así, mientras la gelatina se usa en la formulación de alimentos (salsas, helados, emulgentes), en clarificación de vinos, cerveza y vinagre, en

productos farmacéuticos, medios de cultivo, etc., la cola se usa como adhesivo en carpintería, marquetería, fosforería, texturización del papel, papel de lija, etc. (Restrepo, 2006).

La sangre es el principal responsable de la carga orgánica de los efluentes en el matadero dada su elevada demanda biológica de oxígeno y contenido en nitrógeno. De ahí, el interés en recoger la sangre por separado en los mataderos, pues además de disminuir la carga contaminante, permite su valorización. El aprovechamiento de la sangre se puede llevar a cabo separando el plasma de los corpúsculos añadiendo anticoagulantes y posterior centrifugación, obteniéndose un plasma que se puede utilizar como emulsificante para la elaboración de embutidos, en panadería o pastelería. Cuando el plasma se separa, la mayor parte de las proteínas pasan a la hemoglobina adoptando un color muy oscuro. Esta se va a utilizar en la fabricación de morcillas, embutidos y pasteles de carne. Además, el aprovechamiento de sangre también permite obtener albúmina sanguínea, que se utiliza como sustituto de la albúmina del huevo. La sangre desecada por atomización se utiliza como adhesivo, como estabilizante en la elaboración de bebidas, en emulsiones de hormigón y cerámica o como harina de sangre que es un producto que se utiliza en piensos de animales (Maldonado y Emerson, 2016).

1.3. Biorefinería

El principal desafío en el contexto de la valorización de subproductos de la industria alimentaria es integrar eficientemente el pretratamiento de la biomasa y la recuperación de químicos biogénicos fácilmente explotables mediante sucesivos procesos de bioconversión para obtener secuencialmente diferentes tipos de productos, desde productos químicos finos y farmacéuticos (que tienen un mayor valor de mercado) hasta productos químicos a granel y biocombustibles (que tienen un valor de mercado más bajo). Este proceso de aprovechamiento integral de los residuos para obtener energías renovables, necesarias en el contexto de agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y calentamiento global, a la vez que otros productos de valor añadido para las industrias de alimentos, farmacéuticas, etc., se ha denominado biorefinería (Federici y col., 2009; Liguori y col., 2013). Los protocolos de valorización intensificados junto con los bajos o nulos costos del material de partida y los beneficios ambientales asociados con su eliminación, deberían hacer que el concepto de biorrefinería aplicado a los residuos de la industria alimentaria sea rentable e industrialmente comercializable (Federici y col., 2009). Un ejemplo de biorefinería es el que se muestra en la **Figura 4** para los olivos donde cada uno de los subproductos generados se valorizan de forma integral mediante diferentes estrategias obteniéndose productos de alto valor añadido como antioxidantes, enzimas, biocombustibles, etc. (Federici y col., 2009). A continuación, se detallan algunos de los productos de mayor interés obtenidos mediante procesos de biorefinería a partir de subproductos de la industria alimentaria.

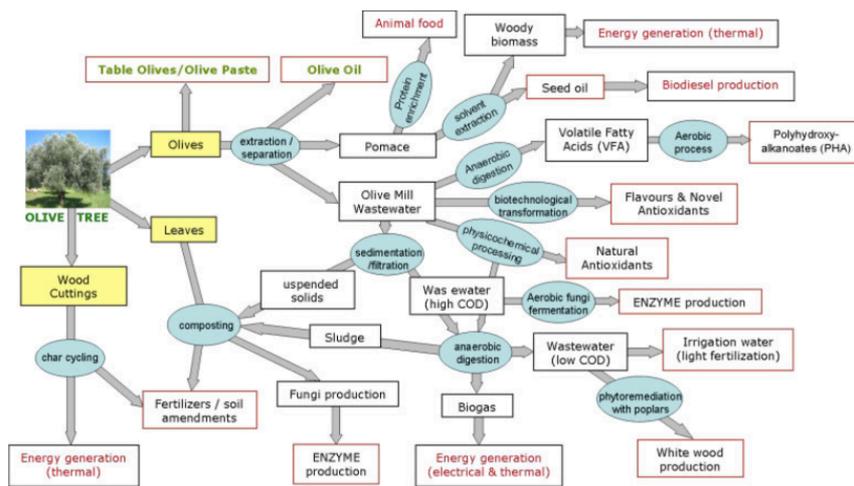


Figura 4. La 'biorrefinería de olivos' con los procesos asociados de aguas residuales del molido de aceituna, subproductos, valorización y eliminación de residuos (Federici y col., 2009).

1.3.1. Biofuel

Bioetanol

Los mayores productores de etanol en el mundo son los Estados Unidos, Brasil y China. En 2009, EEUU Produjo $40 \cdot 10^9$ L de bioetanol utilizando maíz como materia prima, mientras que el segundo mayor productor, Brasil, creó alrededor de $30 \cdot 10^9$ L de etanol usando caña de azúcar (Bhatia y col., 2012). La producción de bioetanol a partir de esta materia prima comestible plantea inquietudes acerca de la competencia con los suministros de alimentos y piensos. No obstante, la biomasa residual lignocelulósica no comestible constituye un sustrato alternativo sostenible para la producción de bioetanol, debido a su abundancia, distribución generalizada y su no competencia con el suministro de alimentos (Liguori y col., 2013). La obtención de bioetanol puede obtenerse por diversas técnicas, pero la hidrólisis enzimática mediante (hemi) celulasas es el método más utilizado (Taherzadeh y Keikhosro 2007). Sin embargo, todavía quedan muchos desafíos por enfrentar para mejorar la competitividad del proceso de producción de bioetanol celulósico, y más concretamente el coste de las enzimas utilizadas en el proceso (Liguori y col., 2013).

Biobutanol

El biobutanol se obtiene a través de la fermentación de azúcares llevada a cabo por microorganismos del género *Clostridium*. Durante el proceso de fermentación se obtienen mayoritariamente tres productos: acetona, butanol y etanol. Por esta razón, a este proceso se le denomina desde sus inicios fermentación ABE (Gottschalk 1986). El biobutanol representa una excelente materia prima en la industria del plástico y, lo que es más importante, un combustible de calidad superior al bioetanol, ya que es menos corrosivo, menos higroscópico y tolera mejor la contaminación del agua (Pfromm y col., 2010). El butanol puede ser producido a partir de diferentes tipos de residuos agroalimentarios, por gran variedad de microorganismos, siendo *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii* las cepas más comúnmente utilizadas (**Tabla 2**) (Durre 1998; Qureshi y col., 2006).

Tabla 2. Ejemplos de procesos de fermentación que producen biobutanol a partir de desechos (Adaptado de Liguori y col., 2013).

Organism	Muestra
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSM 13864	Melaza de caña
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P260	Fibra de maíz xilano
<i>Clostridium acetobutylicum</i> 2N	Melaza de remolacha azucarera
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Azúcares derivados del almidón
<i>Clostridium baijerinckii</i> ATCC 55025	Salvado de trigo
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Aceite de palma

Biohidrógeno

En los últimos años el hidrógeno se está convirtiendo en uno de los nuevos combustibles más favorables porque es limpio, reciclable y puede usarse en celdas de combustible para generar electricidad directamente (Das y Veziroğlu 2001). La producción fermentativa de hidrógeno resulta de la conversión fermentativa de un sustrato orgánico a biohidrógeno, que se produce por un grupo diverso de bacterias que utilizan sistemas de múltiples enzimas en tres pasos similares a la conversión anaeróbica. La **Tabla 3** resume algunos ejemplos de procesos de fermentación que producen biohidrógeno a partir de residuos de la industria agroalimentaria.

Tabla 3. Ejemplos de procesos de fermentación que producen biohidrógeno a partir de desechos (Adaptada de Liguori y col., 2013).

Organism	Muestra
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Cascos
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> (dark fermentation step) and <i>Rhodobacter capsulatus</i> (DSM1710) (photofermentation step)	Piel de patata al vapor hidrolizada y melaza
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	Aguas de desecho de la industria láctea
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	Aguas de desecho del tofu
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	Aguas de desecho de la fermentación del ácido láctico
<i>Rhodopseudomonas</i>	Aguas residuales y aguas de desecho
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Desechos sólidos municipales

Biogas

El biogás se produce por digestión anaeróbica o fermentación de materiales biodegradables, y comprende principalmente metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) y en algunas ocasiones pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno (H₂S), humedad y siloxanos (Schink 1997). Los residuos de la industria agroalimentaria son sustratos excelentes para la producción de biogás en tratamientos de digestión anaeróbica. La **Tabla 4** resume algunos ejemplos de procesos de fermentación que producen biogás a partir de desechos.

Tabla 4. Ejemplos de procesos de fermentación que producen (biogás) metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) a partir de desechos (Adaptada de Liguori y col., 2013).

Biosistema	Residuo
La biomasa de residuos de vino y cerveza	Estiércol de cerdo y desechos de pescado
Lodo activado tratado anaeróbicamente	Estiércol de ganado y desperdicio de comida
Lodos anaeróbicos derivados de biogás agrícola	Fracción orgánica de residuos sólidos municipales, lodo primario y lodo activado residual
Lodos anaeróbicos de un digestor de lodo de aguas residuales y / o estiércol de ganado	Lodos de aguas residuales y fracción orgánica de desechos sólidos municipales
Inóculo de semillas recolectado de una planta cercana de biogás basada en estiércol bovino de Khadi y Village Industries Las aguas residuales contienen sólidos orgánicos y bacterias metanogénicas	Residuos sólidos municipales y aguas residuales domésticas

1.3.2. Bioelectricidad

Las celdas de combustible microbianas (CCM) son una nueva estrategia en el tratamiento de desechos biológicos ya que permiten la conversión de biomasa en electricidad utilizando su ruta metabólica. Las CCM son dispositivos bioelectroquímicos híbridos que convierten directamente la energía depositada en enlaces químicos del sustrato en energía eléctrica a través de reacciones bioelectroquímicas mediadas por microorganismos. Entre las aplicaciones posibles para estas celdas se encuentra el tratamiento de efluentes con alto contenido de materia orgánica y la generación de corriente eléctrica en sedimentos marinos. Dado que esta tecnología se encuentra principalmente en su etapa de desarrollo experimental y piloto, las potencias obtenidas son aún bajas y no hay actualmente aplicaciones comerciales disponibles, aunque el gran desarrollo en los últimos años de investigación hace prever un futuro prometedor a medio plazo (Rabaey y Verstraete 2005).

1.3.3. Biopolímeros

Hace tiempo que se reconoce el potencial de los polímeros biodegradables y, en particular, los obtenidos a partir de recursos agrícolas. Los plásticos biodegradables fabricados a partir de recursos renovables pueden reducir el consumo de petróleo y disminuir los problemas de eliminación de residuos de plástico, ya que son biodegradables en el suelo, compost y ambientes marinos. Los denominados "agro-polímeros" se pueden utilizar en la industria alimentaria y el envasado, reemplazando los materiales plásticos convencionales. La **Tabla 5** muestra los principales polímeros obtenidos a partir de biomasa. Los polihidroxicanoatos son polímeros biodegradables producidos mediante fermentación microbiana a partir de biomasa (Ojumu y col., 2004; Leaf y Srienc 1998), mientras que el ácido poliláctico es un polímero biodegradable obtenido mediante la polimerización del ácido láctico el cual se obtiene mediante fermentación de la biomasa.

Tabla 5. Principales polímeros obtenidos a partir de biomasa.

Biopolímero	Biomasa de la que se extrae	Referencia
Almidón	Maíz	(Villada y col., 2006)
Quitosano	Exoesqueleto de crustáceos insectos, moluscos y hongos	(Centes y col., 2013)
Gelatina	Derivados de proteína	(Villada y col., 2006)
Colágeno	Derivados de proteína	(Villada y col., 2006)
Polihidroxicanoatos (PHAs)	Origen bacteriano y aceites vegetales	(Reddy y col., 2003); (Méndez y col., 2016)
Polihidroxicvalerato (PHV)	Origen bacteriano	(Villada y col., 2006)
Polihidroxicbutirato (PHB)	Caña de azúcar	(Larrahondo, 2005)
Ácido poliláctico (PLA)	Ácido láctico	(Sin, 2012)

1.3.4. Ácidos orgánicos

La bioconversión de la biomasa lignocelulósica podría contribuir significativamente a la producción de productos químicos orgánicos, puesto que el metabolismo bacteriano puede producir una amplia gama de ácidos orgánicos (Gottschalk, 1986). La **Tabla 6** resume algunos ejemplos de procesos de fermentación que producen ácidos orgánicos a partir de residuos lignocelulosicos.

Los ácidos orgánicos volátiles como el ácido acético, los ácidos propiónicos, el ácido oxálico y el ácido butírico se han obtenido de cáscaras de cereales (Jin y col., 2002, 2004, 2006), residuos de bagazo (Henrique y col., 2005), residuos alimenticios (Lim y col. 2008) y residuos de decorticaciones de hojas de sisal (Mshandete y col., 2008). Además, el ácido fórmico, el ácido levulínico, el ácido cítrico, el ácido valérico, el ácido caprónico y el ácido vainílico se han obtenido del bioprocesamiento de residuos lignocelulósicos (Olson 2001; Chaudhary y Sharma 2005; Mshandete y col., 2008; Ibrahim y col., 2008).

Tabla 6. Ejemplos de procesos de fermentación para la producción de ácidos orgánicos. (Adaptado de Liguori y col., 2013).

Organism	Muestra	Producto
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG18011	Desecho de cafetería	Ácido láctico
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	Hidrolizado de salvado de trigo	Ácido láctico
<i>Lactobacillus sp.</i>	Bagazo de cassava	Ácido láctico
<i>Lactobacillus sp.</i>	Madera blanda	Ácido láctico
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Derivados lignocelulósicos mezclados con azúcares	Ácido láctico
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hidrolizado de maíz	Ácido láctico
Ácido cítrico	Melaza, suero de leche, maíz Zea, desechos de naranja y vaina de carvanal	Ácido láctico

1.3.5. Derivados de fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre (Pandey 2003) y se caracteriza por un bajo consumo de energía, una alta productividad volumétrica, la obtención de productos de valor añadido, menos generación de desechos y baja represión catabólica (Hölker y col., 2004). Se han utilizado diferentes tipos de desechos con éxito como sustratos para la fermentación microbiana en estado sólido, para producir una gran variedad de productos, con un buen balance económico, tales como enzimas utilizadas en aplicaciones industriales. Así, Castilho y col. (2000) obtuvieron pectinasas mediante la fermentación sólida de residuos de soja y salvado de trigo utilizando una cepa de *Aspergillus niger*.

La producción de enzimas industrialmente relevantes, tales como las enzimas oxidativas (lactasas), peroxidasas de lignina y peroxidasas de manganeso (Hofrichter y col., 2010)), enzimas hidrolíticas (xilanasas (Bhat 2000), celulasas (Phitsuwan y col., 2013), proteasas (Anwar y Saleemuddin 1998) y lipasas (Nagarajan 2012)), atraen mucho interés debido a sus aplicaciones en diferentes campos industriales, como la industria de pulpa y papel, industria alimentaria, industria de alimentación animal, industria textil, industria de detergentes, farmacéutica, de cuero y de la seda. Además, las enzimas oxidativas representan biocatalizadores útiles para procesos de biorremediación, pudiendo degradar una gran variedad de compuestos tóxicos y recalcitrantes.

1.3.6. Productos farmacéuticos

El cultivo de hongos en residuos lignocelulósicos permite producir muchos productos de alto valor agregado con aplicaciones farmacéuticas, como hormonas, vitaminas y enzimas. En particular, se ha estudiado sobre el cultivo de *Lentinula edodes*, que permite convertir desechos de bajo valor biológico en productos de alto valor añadido con propiedades antiinflamatorias, antivirales y antibacterianas, compuestos con propiedades inmunomoduladoras, así como sustancias activas que disminuyen el colesterol (Israilides y Philippoussis 2003; Philippoussis y col., 2007; Zhang y col., 2007). Además, también se puede usar como adyuvante en algunas terapias contra el cáncer (Borchers y col., 1999), como anticoagulante (Subbarao y col., 1979), y también en pacientes con infecciones bacterianas y parasitarias (Jones, 1988).

También se han encontrado péptidos bioactivos derivados de subproductos de pescado que han mostrado diversas actividades biológicas, incluyendo actividades antihipertensivas y antioxidantes (Senevirathne y Kim 2012). La vainillina es uno de los productos que ha despertado gran interés (Walton y col., 2003) para la producción de medicamentos como la papaverina. (Zhang y col., 2007).

1.3.7. Alimentación animal

La bioconversión de desechos a través del cultivo de hongos representan un sistema innovador y alternativo que ofrece el potencial de obtener alimentos atractivos ricos en proteínas, que

complementan las fuentes de proteína convencionales. La utilización de desechos agrícolas, tales como pieles de tomate, cáscaras de tallos de maíz y mazorcas, permite obtener productos de alto valor agregado, que se utilizan como alimento para animales (Israilides y Henderson 1981). Setas comestibles tales como *Lentinus spp.*, *Lentinula spp.*, *Leontotis spp.*, *Pleurotus spp.*, *Agaricus spp.*, *Agrocybe spp.*, *Volvariella spp.*, Y *Grifola spp.*, capaces de crecer en una amplia gama de biomásas, incluidas las lignocelulósicas, y los desechos agroindustriales han sido ampliamente estudiados por su capacidad para fermentar los diferentes residuos de cultivos (paja de trigo, desechos sólidos de almazara, bambú madake, etc.) y para producir alimentos mejorados para los animales. Los efectos de los hongos sobre los residuos lignocelulósicos se centran en dos puntos: aumentan la digestibilidad del material lignocelulósico a través de sus actividades enzimáticas, pero también pueden usar los sustratos para aumentar el contenido de proteínas. Además, los residuos lignocelulósicos tratados con hongos no conllevan ningún riesgo para los animales (Howard y col., 2003), por lo que proporcionan una alternativa económicamente aceptable para la producción de alimentos de sabor y calidad superior que no necesitan aislamiento y purificación (Israilides y Philippoussis 2003; Philippoussis y col., 2007).

1.3.8. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son una clase heterogénea de polímeros, que pueden estar formados por pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa) y/o ácidos urónicos (ácidos α -D-glucurónico, α -D-4-O-metilgalactourónico y α -Dgalactourónico). Las hemicelulosas se clasifican según los monómeros que conforman la cadena principal del polímero, y eventualmente sus ramificaciones, en glucomananos, galactoglucomananos, galactomananos, arabinogalactanos, xilanos, arabinoxilanos, xiloglucanos y β -glucanos (Siota, 2014). Partiendo de materiales lignocelulósicos ricos en xilanos, la degradación de las cadenas de hemicelulosa mediante tratamientos hidrolíticos, ya sea en medios básicos o ácidos, o catalizados por enzimas conduce a xilooligosacáridos con aplicaciones alimentarias, médicas y farmacéuticas (Vázquez y col., 2001). Se pueden usar como alimentos dietéticos solubles debido a su bajo valor calórico y sus propiedades organolépticas aceptables. Además, actúan como prebióticos que promueven el crecimiento de bifidobacterias en el colon (Crittenden y Playne, 1996; Yuan y col., 2005), por lo que se consideran ingredientes potenciales para alimentos funcionales (Gibson, 2004). Algunos estudios señalan el efecto beneficioso de los xilooligosacáridos en la reducción del riesgo de cáncer de colon (Wollowski y col., 2001; Hsu y col., 2004). Además, los xilooligosacáridos pueden usarse como fuente de xilosa para la producción de xilitol, un edulcorante no calórico (Rivas y col., 2002). Los éteres y ésteres preparados a partir de xilano y xilooligosacáridos se han sintetizado y utilizado como compuestos para la obtención de películas biodegradables (Glasser y col., 1995), hidrogeles (Gabrielii y col., 2000; Lindblad y col., 2001), micro y nanopartículas (García y col., 2001).

Los arabinoxilanos son los polisacáridos hemicelulósicos más abundantes en los tejidos de gramíneas como trigo, centeno, cebada, arroz, maíz y sorgo. En los granos de cereales forman parte importante de las paredes celulares del endospermo amiláceo y del salvado. El contenido de los arabinoxilano oscila entre un 0,15% en el endospermo del arroz hasta un 13% en harinas de cebada y centeno. El contenido puede llegar al 30% en el caso del salvado de trigo (Siota, 2014). La función biológica de las hemicelulosas es la de contribuir al fortalecimiento de la pared

celular mediante su interacción con celulosa y lignina (Barana y col., 2016). Desde la década de 1980, los arabinoxilanos obtenidos a partir de cereales son de interés para los químicos, ya que se ha encontrado que tienen una influencia significativa en la calidad de la masa de pan (Courtin y Delcour, 1998; Li y col., 2013). Además, como resultado de su alta viscosidad y excelentes propiedades de retención de agua, los arabinoxilanos se han usado como agentes espesantes de alimentos y agentes estabilizantes (Carvajal-Millan y col., 2006; Lapierre, y col., 2001; Yadav, y col., 2008). Más recientemente, se informó que los arabinoxilanos poseen varias actividades biológicas, como la disminución del colesterol sérico, la modificación del nivel de azúcar en la sangre, la actividad antioxidante y la reducción de la respuesta glicémica postprandial y la mejora de la inmunidad, así como la capacidad de reducir el riesgo de enfermedades coronarias y de ayudar en el control del peso corporal (Benko y col., 2007; Lu y col., 2000; Lu y col., 2004; Swennen y col., 2006).

1.4. Fraccionamiento de materiales lignocelulósicos

El aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos puede llevarse a cabo sometiéndolos a etapas de fraccionamiento para obtener alguno o varios de sus principales constituyentes (celulosa, hemicelulosas y lignina) en corrientes separadas, de modo que pueda realizarse un procesamiento individualizado de los mismos. Los procesos de fraccionamiento de estos materiales hacen uso de las diferentes propiedades químicas que presentan sus componentes estructurales. La celulosa y las hemicelulosas son más difíciles de oxidar que la lignina, pero, a diferencia de ésta, son hidrolizables por ácidos. Las disoluciones alcalinas a temperaturas moderadas no afectan ni a la lignina ni a la celulosa, pero provocan la solubilización de las hemicelulosas (Siota, 2014).

En el fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos se busca que el proceso sea selectivo. Esto implica que la separación de un determinado componente se realice afectando lo menos posible a los demás. El componente de interés debe recuperarse con altos rendimientos, con las mínimas etapas de proceso, y siempre teniendo en cuenta la viabilidad económica (Siota, 2014).

La extracción alcalina es una técnica que se puede emplear para la separación de hemicelulosas. Generalmente se emplean disoluciones acuosas de hidróxido de sodio, potasio, litio, bario, calcio y/o hidróxido amónico, aunque las más utilizadas son las de hidróxido de sodio o potasio, ya que proporcionan mayores rendimientos. La extracción alcalina conduce al aislamiento de hemicelulosas desacetiladas (Siota, 2014).

La extracción de agua subcrítica (SWE) aparece como un método verde prometedor para el aislamiento de fracciones de hemicelulosa con funcionalidades moleculares conservadas y alto peso molecular. El uso de condiciones subcríticas (temperatura por debajo del punto crítico y presión lo suficientemente alta como para mantener el estado líquido) (**Figura 5**) cambia drásticamente las propiedades del agua, incluida la tensión superficial, densidad, la polaridad, la viscosidad y la difusión. La transferencia de masa durante el proceso de extracción se ve favorecida debido a la disminución de la viscosidad y al aumento de la difusividad. Así, el agua subcrítica ha demostrado ser efectiva para la extracción de diversos compuestos bioactivos y nutracéuticos, incluidos polisacáridos de plantas y matrices de alimentos. Además, el agua

subcrítica se ha utilizado con éxito para la extracción de hemicelulosas a partir de residuos de cereales (Ruthes y col., 2017).

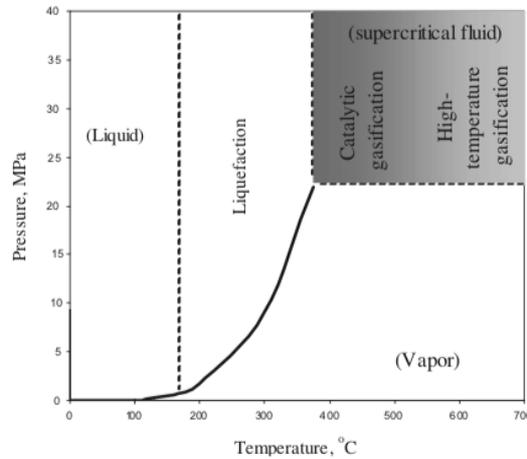


Figura 5. Diagrama de fase del agua (Toor y col., 2011)

1.5. Envases activos.

En la actualidad los envases tienen un rol muy importante en la conservación, protección y comercialización de los alimentos, es por ello que se han desarrollado nuevas tecnologías que puedan cubrir ciertas funciones que antes no se consideraban como parte del envase. Un ejemplo de ello son los envases activos, los cuales son capaces de interactuar con el producto envasado extendiendo su vida, manteniendo su calidad y mejorando su seguridad y atributos sensoriales. Los envases con agentes antimicrobianos y/o antioxidantes son un tipo de envase activo cuya funcionalidad específica es la reducción o inhibición del crecimiento microbiano y agentes oxidantes indeseables (Martinez y López, 2011). Estos se basan en el principio de liberar componentes activos a través del material del envase hasta llegar al alimento teniendo mayor efectividad que si se le incorporan estos agentes al producto, debido al control de la migración de los agentes hacia la superficie del alimento. La liberación controlada de estos agentes del envase a la superficie del alimento ha sido considerada como capaz de inhibir o reducir el crecimiento microbiano utilizando una cantidad mínima de agentes antimicrobianos o antioxidante en comparación con las cantidades necesarias que se utilizan si se incorporaran al alimento. Por lo tanto, el control de la migración de los agentes antimicrobianos y antioxidantes a través de los materiales del envase es la mejor manera de conferir la actividad antimicrobiana (Sun Lee y col., 2008).

Los materiales más utilizados para la elaboración de envases activos son los plásticos y laminados, ya que sus propiedades permiten la entrada y salida de los componentes del envase, además de que su proceso de elaboración ayuda en la incorporación de aditivos como agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc. (Marsh y Bugusu, 2007). No obstante, la creciente problemática medioambiental asociada a la producción de materiales plásticos ha impulsado el desarrollo de materiales a base de biopolímeros como los polihidroxicanoatos, almidón,

quitosano, gluten, proteína del suero, etc., los cuales se obtienen a partir de materiales biológicos y por tanto son totalmente biodegradables (Peelman y col., 2017).

La aplicación repetida de conservantes químicos a largo plazo da lugar a acumulación de residuos químicos a lo largo de la cadena alimentaria, desarrollo de resistencias microbianas y efectos adversos en la salud humana (Bialonska y col., 2010). Por lo tanto, las preferencias del consumidor han cambiado hacia conservantes más seguros y naturales, tales compuestos antimicrobianos naturales como los aceites esenciales, cuya actividad antimicrobiana ha sido demostrada en numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* (Fang y col., 2017). No obstante, estos compuestos tienen una aplicación limitada, dado su impacto sensorial sobre los alimentos envasados. En este sentido, varios polisacáridos de la pared celular de fuentes de biomasa como la almendra, pulpa de abeto, madera de haya, madera de *Eucalyptus globulus* y *Pinus pinaster*, salvado de trigo, hojas de *Fallopia* o mazorca de maíz han mostrado actividad antioxidante significativa, así como efectos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Requena, 2018).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue analizar la potencial bioactividad, antimicrobiana y antioxidante, de fracciones hemicelulósicas obtenidas a partir de cascarilla de arroz mediante dos procesos de extracción alternativos, la extracción alcalina y la extracción secuencial con agua subcrítica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

La cascarilla de arroz fue suministrada por Dacsa Group (Valencia, España). Previamente a su valorización, la cascarilla se secó a temperatura ambiente durante 1 semana y se sometió a un proceso de molienda en un molino Wiley Acm 82302 (Acma Technology Pvt. Ltd, Alemania), para reducir el tamaño de partícula ya que esto facilita los procesos de extracción a partir de materiales lignocelulósicos.

El hidróxido de sodio (NaOH), el metanol, el 2,2-difenil-1-piril-hidrazilo (DPPH) y el bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). En todos los casos se utilizó agua ultrapura (Milli-Q, Millipore, MA). Las membranas de diálisis Spectra/Por1 (3.5 kDa MWCO) se obtuvieron de SpectrumLabs (Breda, Países Bajos).

El tampón de fosfato (PBS), el caldo triptona de soja (TSB) y el agar triptona de soja (TSA) fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España). Las cepas liofilizadas de *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101) fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universitat de València, España), y almacenada a -25 ° C con 30% de glicerol.

3.2. Obtención de las fracciones hemicelulósicas a partir de cascarilla de arroz

3.2.1. Extracción secuencial con agua subcrítica

La extracción de hemicelulosas a partir de cascarilla de arroz con agua subcrítica se realizó mediante agua caliente a presión utilizando un Extractor de Solventes Acelerado (Dionex™ ASE™ 350) a 160 °C y pH 7 en base los mayores rendimientos de hemicelulosas reportados por (Ruthes y col. 2017) para el salvado de trigo. Las extracciones se realizaron utilizando 2 g de muestra molida en ciclos secuenciales de 5, 10, 15 y 30 minutos, obteniendo cuatro extractos (E-SWE5, E-SWE15, E-SWE30 y E-SWE60). Los extractos se liofilizaron en un liofilizador Bulk Tray Dryer 230V US (Kansas, Estados Unidos) durante 72 h. Se consideraron tres lotes diferentes de materia prima.

3.3.2. Extracción alcalina

El aislamiento de hemicelulosas a partir de cascarilla de arroz también se llevó a cabo mediante tratamiento alcalino con hidróxido de sodio (NaOH). Para ello, la cascarilla molida (4%) se trató tres veces con una solución de NaOH (4,5 p/v) a 80 °C durante 2 h, bajo agitación mecánica. Después de cada tratamiento, el material lignocelulósico se filtró y se lavó hasta la eliminación del producto químico. Los extractos alcalinos obtenidos después de cada tratamiento alcalino (E-A1, E-A2, E-A3) se dializaron durante 48 h, utilizando una membrana de 3,5 kDa, para eliminar el álcali. Finalmente se liofilizaron durante 72 h en un liofilizador Bulk Tray Dryer 230V US (Kansas, Estados Unidos). Se consideraron tres lotes diferentes de materia prima.

3.3. Determinación de la potencial actividad antioxidante de los extractos mediante el ensayo DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante por triplicado de los extractos hemicelulósicos a través del método basado en la reducción con 2,2-difenil-1-piril-hidrazilo (DPPH) siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams y col. (1995). Este método está basado en la reducción del radical DPPH· en una solución alcohólica por un antioxidante dador de hidrógeno (**Figura 6**). El DPPH ha sido ampliamente utilizado para evaluar la eficacia de eliminación de radicales libres de diferentes sustancias antioxidantes (Ozcelik y col. 2003). Este radical contiene un electrón desapareado el cual es responsable de la absorbancia a 515nm y también del intenso color morado. Cuando el DPPH acepta el electrón cedido por el compuesto antioxidante, el DPPH se decolora, lo cual puede ser cuantitativamente medido por los cambios en la absorbancia (Hasan y col. 2009), tal como muestra la **Figura 7**.

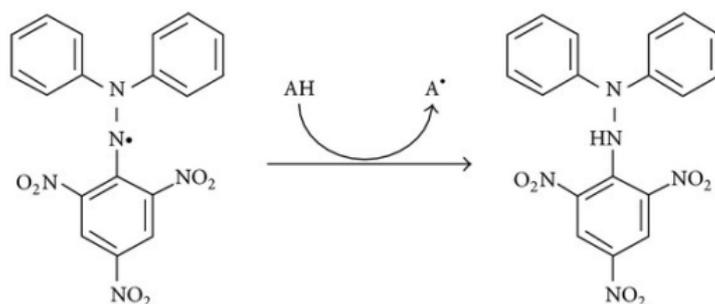


Figura 6. Reducción del radical DPPH• en una solución alcohólica



Figura 7. Ejemplo de la decoloración del DPPH• al reaccionar con el antioxidante.

En primer lugar, se prepararon curvas patrón de DPPH utilizando las siguientes disoluciones de radical DPPH: 0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM y 0,1 mM. El ensayo se realizó por duplicado y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515nm, para obtener la recta de calibrado y en consecuencia la ecuación que nos relaciona la absorbancia con la cantidad de DPPH disuelto. Para determinar el tiempo de reacción total del radical con las muestras, se hizo un estudio más exhaustivo sobre la capacidad antioxidante de los extractos, midiendo la absorbancia de la reacción cada 15 minutos hasta obtener un valor constante.

Ensayos previos revelaron que los extractos con mayor contenido en arabinosilanos fueron el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica después de 60 min, y, en segundo lugar, el extracto alcalino obtenido tras el tercer tratamiento alcalino. Dado que un mayor contenido en arabinosilanos se ha relacionado con una mayor bioactividad, las medidas de actividad antioxidante se llevaron a cabo únicamente con los extractos con mayores contenidos en arabinosilanos.

Los extractos se disolvieron en metanol y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 120 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. Para ello, se realizaron mediciones de soluciones con diferentes proporciones muestra:DPPH (**Tabla 7** y **Tabla 8**) con un espectrofotómetro (ThermoScientific, Evolution 201 UV visible Spectrophotometer), a una longitud de onda de 515nm y utilizando metanol como blanco. Se midió su absorbancia a tiempo inicial con metanol en las mismas concentraciones establecidas. Posteriormente, se midieron las muestras una vez completada la reacción. Las cubetas se taparon para evitar la evaporación

del metanol y porque además el reactivo DPPH es muy fotosensible. Estos valores se transformaron en concentración de DPPH, utilizando la curva de patrón de calibrado. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La concentración de DPPH remanente se calculó a través de la **ecuación 1**:

$$\text{DPPHrem} = \frac{[\text{DPPH}]_{t=0} - [\text{DPPH}]_{t=\text{estable}}}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

A partir de estos valores, se determinó el parámetro EC_{50} definido como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH hasta el 50% una vez alcanzado la estabilidad de la reacción. En consecuencia, un valor bajo de EC_{50} se relaciona con una actividad antioxidante más intensa de la muestra analizada.

Tabla 7. Volúmenes de muestra obtenida por extracción con agua subcritica (3,3 mg extracto/mL metanol) mezclados con diferentes volúmenes de DPPH (0,025 g/L, cuya absorbancia es de $0,70 \pm 0,02$).

$V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{DPPH}} (\mu\text{L})$
0	1000
25	975
50	950
75	925
100	900
125	875
150	850
175	825

Tabla 8. Volúmenes de muestra alcalina (33 mg extracto/mL metanol) mezclados con diferentes volúmenes de DPPH (0,025 g/L, cuya absorbancia es de $0,70 \pm 0,02$).

$V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{DPPH}} (\mu\text{L})$
0	1000
50	950
100	900
150	850
200	800
250	750
300	700

3.4. Determinación de la potencial actividad antimicrobiana de los extractos frente a bacterias Gram + y Gram - .

La actividad antimicrobiana de ambos extractos se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir del ensayo colorimétrico MTT utilizando una placa de 96 pocillos. El MTT es una sal de tetrazolio amarilla, que se reduce a formazán purpura por la actividad deshidrogenasa de las células viables (**Figura 8**).

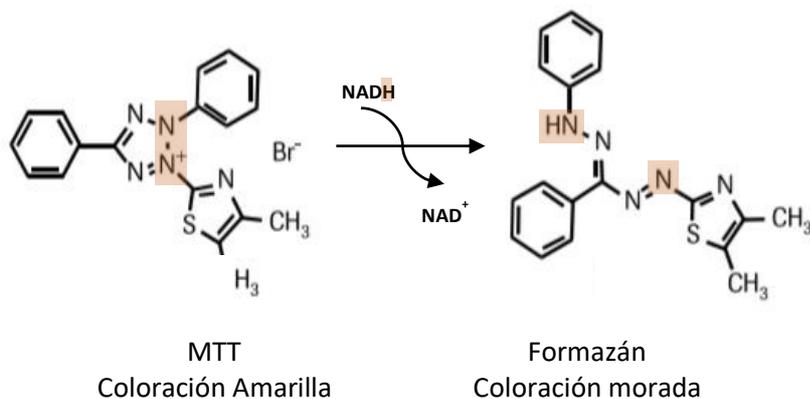


Figura 8. Principio del ensayo MTT donde el reactivo de color amarillo es transformando en formazán de color purpura.

Los cultivos de *L. innocua* (CECT 910) y *E. coli* (CECT 101) suplementados con glicerol al 30% se mantuvieron en TSB en congelación a -25 °C. Una vez descongelados, se transfirió una alícuota de cada uno de los cultivos a un tubo con 10 mL de TSB y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron nuevamente alícuotas de 10 µL de estos cultivos y se transfirieron a nuevos tubos de 10 mL de TSB, los cuales se incubaron de nuevo a 37 °C durante 24 horas. Así, se obtuvieron los cultivos de trabajo en fase de crecimiento exponencial, los cuales se diluyeron apropiadamente para obtener a una concentración de 10⁵ unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. De esta suspensión bacteriana se tomaron alícuotas de 100 µl que se depositaron en cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos (**Figura 9**). En paralelo, se prepararon disoluciones de diferente concentración de ambos extractos liofilizados (150 a 10 mg extracto/mL) utilizando TSB como disolvente y se colocaron alícuotas de 100 µl de cada dilución en su pocillo correspondiente. Por último, las placas se cubrieron con una alfombrilla selladora para evitar contaminaciones entre los pocillos contiguos. También se realizaron controles de esterilidad y controles de crecimiento con medio de cultivo no inoculado e inoculado, respectivamente, mientras que los pocillos externos se dejaron vacíos para evitar posibles pérdidas. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 10 µl del reactivo MTT reconstituido con PBS (5mg/ml) a cada pocillo y se incubaron de nuevo, en este caso durante 4h a 37°C. Pasado este tiempo, se procedió a la lectura visual de los resultados. Aquellos pocillos en los que se observa cambio de color de amarillo a purpura informan de la presencia de bacterias viables, puesto que han sido capaces de metabolizar el reactivo MTT en formazán el cual da una coloración purpura. De esta forma, los valores de MIC se determinaron como la concentración más baja de compuesto activo a la que no se observó color púrpura y por tanto crecimiento microbiano (Requena y col., 2018).

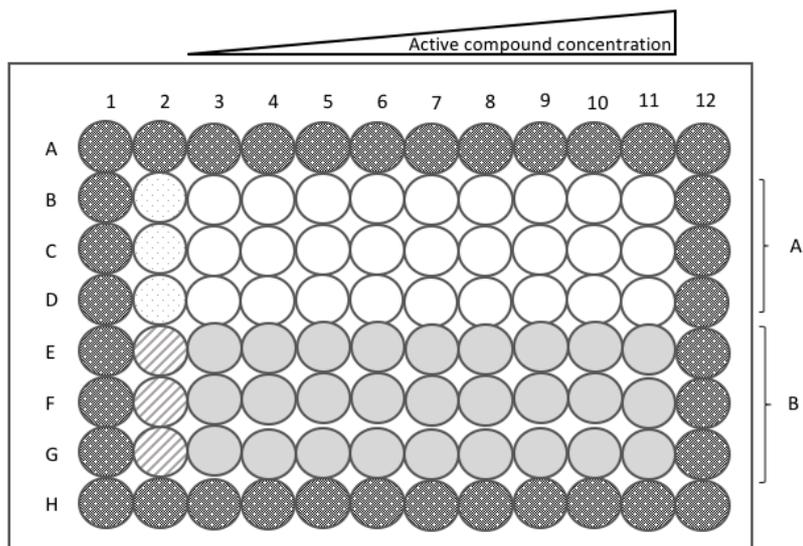


Figura 9. Esquema del diseño experimental para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los dos extractos (A: obtenido mediante extracción con agua subcrítica; B: obtenido mediante tratamiento alcalino) con 9 diluciones seriadas. ● pocillos vacíos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo; ○ pocillos con medio de cultivo, pero sin bacteria (controles de esterilidad); ○ pocillos con suspensión bacteriana pero sin extracto (controles de crecimiento).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antioxidante de los extractos hemicelulósicos

Obtención de la curva patrón

A partir de las diluciones de DPPH 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM, 0.08mM y 0,1mM (**Figura 10**), se obtuvo la curva de calibrado del DPPH, obteniéndose valores de absorbancia en el intervalo 0.1-1, a una longitud de onda de 515nm, tal y como se muestra en la **Figura 11**.



Figura 10. Cubetas para la recta de calibrado del DPPH.

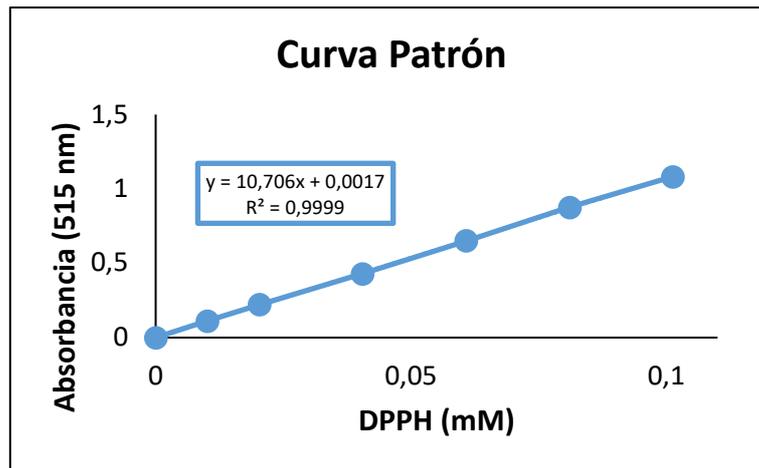


Figura 11. Recta de calibrado del DPPH.

Curvas de absorbancia para determinar el tiempo de reacción

La **Figura 12** muestra la variación de la absorbancia para los diferentes ratios muestra: DPPH en función del tiempo para el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica. Como se puede observar, la reacción se estabiliza transcurrida 1 hora desde que se le añade el reactivo DPPH a la muestra, ya que los valores de absorbancia se mantienen prácticamente constantes pasado este tiempo. Este aspecto es importante tenerlo en cuenta a la hora de determinar la actividad antioxidante, ya que dependiendo del tipo de antioxidante que se trate, el tiempo de reacción puede fluctuar entre unos pocos minutos a varias horas. Por tanto, para las muestras ensayadas se decidió tomar como tiempo estable de la reacción 1h.

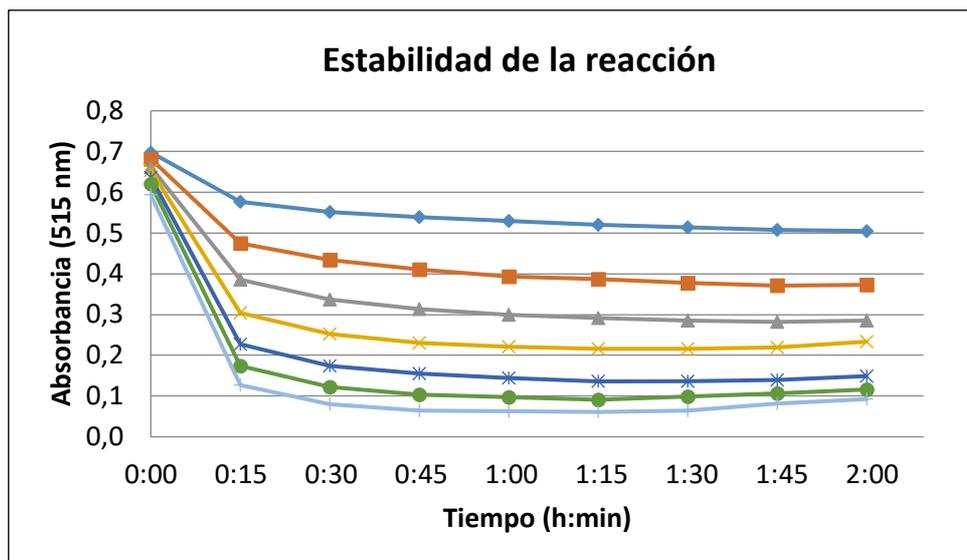


Figura 12. Representación de la absorbancia vs tiempo para los diferentes ratios muestra:DPPH para el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica.

Análogamente, la **Figura 13** muestra la variación de la absorbancia para los diferentes ratios muestra:DPPH en función del tiempo para el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino. En este caso, se puede observar que la reacción no se estabiliza hasta pasadas 5 h desde que se le añade el reactivo DPPH a la muestra. Este resultado ya adelanta que el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino tiene menor capacidad antioxidante que el obtenido mediante extracción con agua subcrítica.

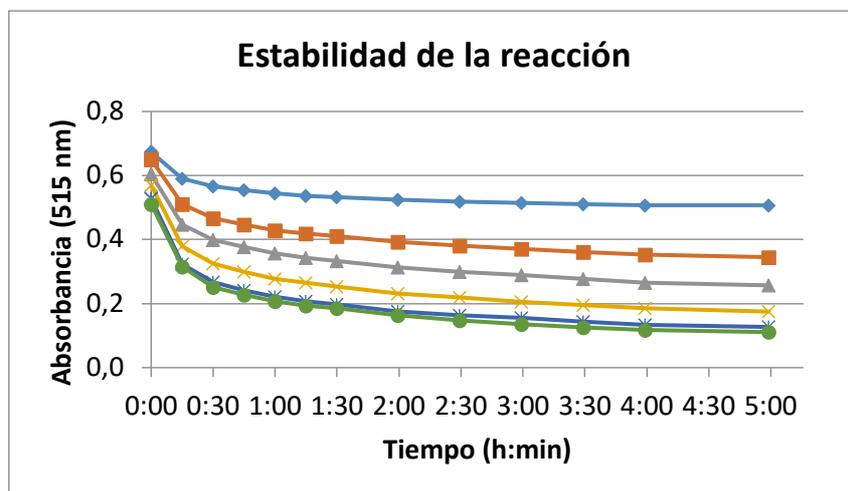


Figura 13. Representación de la absorbancia vs tiempo para los diferentes ratios muestra:DPPH para el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino.

Calculo del parámetro EC₅₀ para los extractos hemicelulósicos

A partir de la curva de calibrado ($y = 10,706x + 0,0017$), se calculó la cantidad de DPPH[•] que queda sin reaccionar cuando se utilizan diferentes ratios muestra:DPPH, tanto para los extractos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica (**Tabla 9**), como para los obtenidos mediante tratamiento alcalino (**Tabla 10**).

Tabla 9. Valores de absorbancia a tiempo inicial y transcurrida 1 hora (tiempo de reacción) y los correspondientes porcentajes de DPPH que quedan sin reaccionar pasada 1h, para el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica.

Masa extracto (mg)	DPPH (mg)	mg extracto/mg DPPH	A _{515nm} ; t=0	[DDPH] _{t=0}	A _{515nm} ; t=equilibrio	[DDPH] _{t=equilibrio}	%DPPH _{rem}
0	0,025	0	0,717	0,066	0,717	0,066	100,0
0,08	0,024	3,37	0,698	0,064	0,514	0,047	73,5
0,16	0,023	6,93	0,682	0,063	0,377	0,034	55,1
0,24	0,023	10,67	0,662	0,061	0,285	0,026	42,8
0,33	0,022	14,63	0,654	0,060	0,216	0,019	32,7
0,41	0,021	18,81	0,637	0,058	0,137	0,012	21,1
0,49	0,021	23,23	0,620	0,057	0,099	0,008	15,6
0,57	0,020	27,93	0,594	0,054	0,065	0,005	10,5

Tabla 10. Valores de absorbancia a tiempo inicial y transcurridas 5 h (tiempo de reacción) y los correspondientes porcentajes de DPPH que quedan sin reaccionar pasadas 5 h, para el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino.

Masa extracto (mg)	DPPH (mg)	mg extracto/mg DPPH	$A_{515nm}; t=0$	$[DDPH]_{t=0}$	$A_{515nm}; t=equilibrio$	$[DDPH]_{t=equilibrio}$	%DPPH _{rem}
0	0,025	0	0,709	0,065	0,709	0,065	100,0
1,65	0,024	69,00	0,673	0,062	0,529	0,048	78,5
3,31	0,022	145,67	0,650	0,060	0,362	0,033	55,5
4,97	0,021	231,36	0,604	0,055	0,277	0,025	45,6
6,63	0,020	327,76	0,570	0,052	0,192	0,017	33,3
8,29	0,018	437,02	0,528	0,048	0,142	0,012	26,5
9,95	0,017	561,88	0,511	0,047	0,105	0,009	20,1

La **Figura 14** y la **Figura 15** muestran los porcentaje de DPPH que quedan sin reaccionar (% DPPH remanente), para cada uno de los ratios muestra:DPPH estudiados para los extractos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica y mediante tratamiento alcalino, respectivamente. Los puntos de esta gráfica (%DPPH_{rem} vs mg extracto/mg DPPH), se ajustaron a un polinomio para poder calcular el parámetro EC₅₀, es decir, la relación mg extracto/mg DPPH necesaria para que se reduzca el 50% de DPPH inicial. Así, el extracto obtenido mediante extracción con agua subcrítica mostró un valor promedio de EC₅₀ de 9,65 mg extracto/mg DPPH, mientras que el extracto obtenido mediante tratamiento alcalino tuvo un valor de EC₅₀ de 169,7 mg extracto/mg DPPH, lo que implica una capacidad antioxidante 18 veces menor que la obtenida para el extracto hidrotérmico.

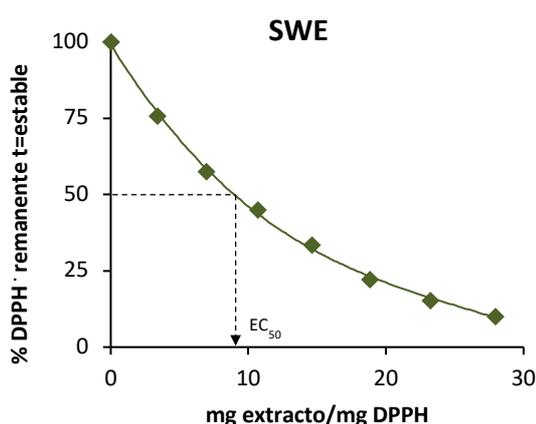


Figura 14. Porcentaje de DPPH remanente a tiempo estable vs el ratio muestra:DPPH para los extractos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica, mostrando el parámetro EC₅₀.

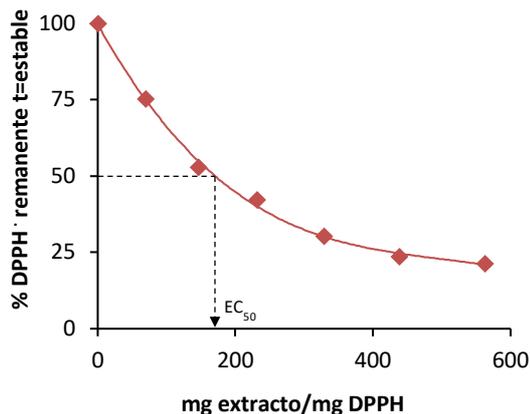


Figura 15. Porcentaje de DPPH remanente a tiempo estable vs el ratio muestra:DPPH para los extractos obtenidos mediante tratamiento alcalino, mostrando el parámetro EC_{50} .

Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de cascarilla de arroz, donde el contenido fenólico soluble era menor que la fracción esterificada a los polisacáridos de la pared celular (Butsat y col. 2009). Los compuestos fenólicos más abundantes en la cáscara de arroz son el ácido p-cumárico, seguido de ácido ferúlico, con valores de EC_{50} de 0.2 mg/mg DPPH y 20.8 mg/mg DPPH, respectivamente (Brand-Williams y col., 1995), y en mucha menor cantidad también se encuentran el ácido siríngico, vanillico y p-hidroxibenzoico (Butsat y col. 2009). Además, los extractos con ácidos fenólicos esterificados a las hemicelulosas mostraron actividades antioxidantes mayores que los extractos con ácidos fenólicos libres. Por lo tanto, es razonable obtener una actividad antioxidante significativamente menor cuando se utiliza la extracción con álcali, ya que se aplican condiciones de extracción muy severas que favorecen la eliminación de los sustituyentes fenólicos de los arabinosilanos (Ruthes y col., 2017).

4.2. Actividad antimicrobiana de los extractos hemicelulosicos

El ensayo MTT permitió estudiar de forma rápida y sencilla la potencial actividad antimicrobiana de los extractos, así como la CMI en el caso de aquellas muestras efectivas en el control del crecimiento microbiológico. La CMI fue la correspondiente al primer pocillo amarillo antes de observar el cambio de coloración a púrpura, ya que los pocillos amarillos representan concentraciones de activo a las cuales no hay células viables capaces de transformar el reactivo MTT en formazán de color púrpura (**Figura 16**). Así, los extractos obtenidos mediante extracción con agua subcrítica fueron antimicrobianos frente a *L. innocua* y *E. coli*, con CMIs de 95 ± 2 mg/mL y 55 ± 2 mg/mL, respectivamente. Por el contrario, los extractos obtenidos mediante tratamiento alcalino no fueron efectivos frente a ninguna de las dos bacterias, lo cual confirma el efecto negativo del tratamiento alcalino sobre la funcionalidad de las hemicelulosas (Ruthes y col., 2017; Zhou y coll., 2010).

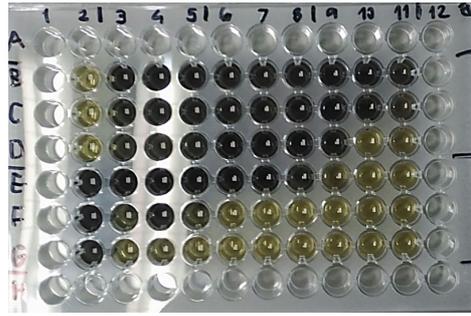


Figura 16. Ejemplo del aspecto visual del resultado de un ensayo MTT para estudiar la actividad antimicrobiana de los extractos, donde los pocillos amarillos representan diferentes concentraciones de los extractos a las cuales no hay células viables capaces de transformar el reactivo MTT en formazán de color púrpura.

5. CONCLUSIÓN

El proceso de extracción mediante agua subcrítica para la valorización de la cascarilla de arroz ha permitido obtener fracciones hemicelulósicas mejor conservadas y por tanto con mayor actividad antioxidante y antibacteriana, que las obtenidas mediante tratamientos alcalinos, las cuales pueden ser útiles como aditivos para el envasado de alimentos o para la formulación de alimentos con el fin de mejorar la calidad de los mismos y/o alargar su vida útil. Al mismo tiempo, el uso de esta técnica de valorización alternativa es un proceso más respetuoso con el medioambiente ya que evita el uso de soluciones alcalinas. Adicionalmente, los residuos resultantes del proceso de extracción podrían ser valorizados en un proceso de biorefinería integral, obteniéndose compuestos adicionales con alto valor añadido tales como lignina, sílice, y derivados de celulosa (fibras, nanofibras, nanocristales, etc.).

6. BIBLIOGRAFÍA

- AHUMADA, L.M. Y RODRÍGUEZ, P.J.E. (2006). Uso del SiO₂ obtenido de la cascarilla de arroz en la síntesis de silicatos de calcio. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 30 (117): 581-594
- ANWAR A. Y SALEEMUDDIN M. (1998). Alkaline proteases: a review. *Bioresour Technol*, 64:175–183
- AWARENET (2004). Handbook for the prevention and minimization of waste and valorization of by-products in European agro-food industries. Agro-food waste minimization and reduction network (AWARENET). Grow Programme, European Commission, 1–7
- BARANA, D., SALANTI, A., ORLANDI, M., ALI, D. S., Y ZOIA, L. (2016). Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*, 86, 31-39
- BENKO, Z., ANDERSSON, A., SZENGYEL, Z., GASPAR, M., RECZEY, K., Y STALBRAND, H. (2007). Heat extraction of corn fiber hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140:(1–12), 253–265

BHASKAR, N., MODI, V.K., GOVINDARAJU, K., RADHA, C., LALITHA, R.G., (2007). Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresour. Technol.*, 98, 388e394.

BHAT, M.K. (2000). Cellulase and their related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.*, 18:355–383

BHATIA L., JOHRI S., AHMAD R. (2012). An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agrowaste: a review. *AMB Express* 2:65–84

BIALONSKA, D., RAMMANO, P., KASIMSETTY, S.G., MUNTHA, K.R., GIBSON, G.R., Y FERREIRA, D. (2010). The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 175-182

BORCHERS, A.T., STERN, J.S., HACKMA, R.M., KEEN, C., GERSHWIN, M.E. (1999). Mushrooms, tumors and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med* 229(5):393–406

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., Y BERSET, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30

BUTSAT, S., WEERAPREEYAKUL, N., Y SIRIAMORNPNUN, S. (2009). Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4566-4571

CASTILHO L.R., MEDRONHO R. A. Y ALVES T LM. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustry residues with *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 71(1): 45-50

CARMONA CASTELLANO, M.D.L.Á. (2016). Revalorización de subproductos de la industria oleícola y aplicación de la espectroscopia Raman en la identificación de aceites.

CARVAJAL-MILLAN, E., GUILBERT, S., DOUBLIER, J.L., Y MICARD, V. (2006). Arabinoxylan/protein gels: structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*, 20, 53–61

CENTES, J.F.L., ZIMMER, L.A.M., NAVARRO, M.A., Y POSADAS, Á.A. (2007). Obtención Y Uso De Quitosano Para Tratamientos Dérmicos A Partir De Exoesqueleto De Camarón.

CHAUDHARY, N., SHARMA, C.B. (2005). Production of citric acid and single cell protein from agrowaste. *Nat Acad Sci Lett* 28(5/6):189–193

COURTIN, C.M., Y DELCOUR, J.A. (1998). Physicochemical and breadmaking characteristics of low molecular weight wheat derived arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4066

CRITTENDEN, R., Y PLAYNE, M. (1996). Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 353–361

DURRE, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:639–648

FANG, Z., ZHAO, Y., WARNER, R.D., Y JOHNSON, S.K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in food science and technology*, 61, 60-71

FEDERICI, F., FAVA, F., KALOGERAKIS, N., Y MANTZAVINOS, D. (2009). Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 895-900

FERRARO, V., CRUZ, I.B., JORGE, R.F., MALCATA, F.X., PINTADO, M.E., Y CASTRO, P.M. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International*, 43(9), 2221-2233

FOX, P.F. (2001). Milk Proteins as Food Ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 41-55

GABRIELI, I., GATENHOLM, P., GLASSER, W.G., JAIN, R.K., Y KENNE, L. (2000). Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 43, 367–374

GARCÍA BRENES, M.D. (2008). Un análisis de las Industrias de Refinación del Aceite de Oliva en Andalucía. *Grasas y aceites*, 59(4), 389-396

GARCIA, R., TOSHIYUKI, N., PRAXEDES, A., RAYN, F., MOURA, T., Y EGITO, S. (2001). Preparation of micro and nanoparticles from corncobs xylan. *Polymer Bulletin*, 46, 371–379

GIBSON, G. (2004). Fiber and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 25–31

GLASSER, W.G., JAIN, R.K., Y SJÖSTEDT, M.A. (1995). Thermoplastic pentosanrich polysaccharides from biomass. *United States Patent*, 5430142

GOTTSCHALK, G. (1986). Bacterial metabolism, 2nd edn. Springer, New York

GUSTAVSSON, J., CEDERBERG, C., SONESSON, U., VAN OTTERDIJK, R., MEYBECK, A. (2011). Global Food Losses and Food Waste. *Extend, Causes and Prevention, Food and Agriculture Organization of the United Nations*

HASAN, S.R., HOSSAIN, M.M., AKTER, R., JAMILA, M., MAZUMDER, M.E.H., Y RAHMAN, S. (2009). DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 875-79

HENRIQUE, M., BAUDEL, H.M., ZAROR, C., DE ABREU, C.A.M. (2005). Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Ind Crops Prod* 21(3):309–315

HERTOG, M.G.L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., y col., (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in seven countries study. *Arch Int Med* 155:381–386

HOFRICHTER M., ULLRICH R., PECYNA M.J., LIERS C., LUNDELL T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(3):871–897

HOWARD, R.L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E.L. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol* 2(12):602–619

HÖLKER U., HÖFER M., LENZ J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:175–186

HSU, C.K., LIAO, J.W., CHUNG, Y.C., HSIEH, C.P., Y CHAN, Y.C. (2004). Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *Journal of Nutrition*, 134(6), 1523–1528

IBRAHIM, M.N.M., NADIAH, M.Y.N., NORLIYANA, M.S., SIPAUT, C.S., SHUIB, S. (2008). Separation of vanillin from oil palm empty fruit bunch lignin. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 36(3):287–291

ISRAILIDES, C., PHILIPPOUSSIS, A. (2003). Bio-technologies of recycling agroindustrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. *Biotechnol Gen Eng Rev* 20:247– 259

JIN, F., ZHENG, J., ENOMOTO, H., MORIYA, T., SATO, N., HIGASHIJIMA, H. (2002). Hydrothermal process for increasing acetic acid yield from lignocellulosic wastes. *Chem Lett* 31(5):504

JIN, F., CAO, J., ZHOU, Z., MORIYA, T., ENOMOTO, H. (2004). Effect of lignin on acetic acid production in wet oxidation of lignocellulosic wastes. *Chem Lett* 33:910

JIN, F., ZHOU, Z., KISHITA, A., ENOMOTO, H. (2006). Hydrothermal conversion of biomass into acetic acid. *J Mater Sci* 41(5):1495–1500

JONES, K. (1988). Shiitake: a major medicinal mushroom. *Altern Complement Ther* 4:53–59

KOSSEVA, M.R., (2011). Management and processing of food wastes. In: *Moo-Young, M. (Ed.), Comprehensive Biotechnology, Environmental Biotechnology and Safety*, vol. 6. Elsevier

LAPIERRE, C., POLLET, B., RALET, M.C., Y SAULNIER, L. (2001). The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin–heteroxylan association. *Phytochemistry*, 57(5), 765–772

LARRAHONDO, J.E. (2005). La caña de azúcar como planta biofábrica, sus subproductos y coproductos

LARRAURI, J.A. (1999). New approaches in the preparation of high dietary fiber powders from fruit by-products. *Trends Food Sci Technol* 10:3-8

LEAF, T.A., SRIENC, F. (1998). Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnol Bioeng* 57(5):557–570

LLORACH, R., ESPIN, J.C., TOMAS-BARBERAN, F.A., FERRERES, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L) by-products as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem* 50:3458 – 3464

- LI, W., HU, H., WANG, Q., Y BRENNAN, C.S. (2013). Molecular features of wheat endosperm arabinoxylan inclusion in functional bread. *Foods*, 2(2), 225–237
- LIGUORI, R., AMORE, A., Y FARACO, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(14), 6129-6147
- LIM, S.J., KIM, B.J., JEONG, C.M., CHOI, J., AHN, Y.H., CHANG, H.N. (2008). Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresour Technol* 99(16):7866–7874
- LIN, C.S.K., PFALTZGRAFF, L.A., HERRERO-DAVILA, L., MUBOFU, E.B., ABDERRAHIM, S., CLARK, J.H., THANKAPPAN, S. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy and Environmental Science*, 6(2), 426-464
- LINDBLAD, MS., RANUCCI, E., Y ALBERTSSON, A. (2001). Biodegradable polymers from renewable sources. new hemicellulose-based hydrogels. *Macromolecular Rapid Communications*, 22, 962–967
- LÓPEZ-MONDEJAR, R., BERNAL-VICENTE, A., ROS, M., TITTARELLI, F., CANALI, S., INTRIGIOLO, F., PASCUAL, J.A. (2010). Utilisation of citrus compost-based growing media amended with *Trichoderma harzianum* T-78 in *Cucumis melo* L. seedling production. *Bioresource technology*, 101(10), 3718-3723
- LU, Z.X., WALKER, K.Z., MUIR, J.G., MASCARA, T., O'DEA, K. (2000). Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1123–1128
- LU, Z.X., WALKER, K.Z., MUIR, J.G., O'DEA, K. (2004). Arabinoxylan fiber improves metabolic control in people with type II diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(4), 621–628
- MALDONADO, N., Y EMERSON, J. (2016). Aprovechamiento de la sangre como subproducto del beneficio de animales de abasto
- MARSH, K. Y BUGUSU, B. (2007). Food packaging-Roles, Materials and Environmental Issues. *Journal of food science*. 72(3):39-55
- MARTINEZ-TENORIO, Y., Y LÓPEZ-MALO, V. (2011). Envases activos con agentes antimicrobianos su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 5(2), 1-12
- MIDDLETON, E., JRAND KANDASWAMI, C. (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, in *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*, ed. by Harborne JB. Chapman and Hall, London, pp. 619–652
- MÉNDEZ, P. (2005). ARROZ: estabilidad de los precios mundiales. Infoarroz. Informativo mensual, Diciembre.
- MÉNDEZ, D., CABEZA, I., MORENO, N., Y RIASCOS, C. (2016) modelamiento de la producción de biopolímero tipo PHA a partir de aceite vegetal empleando un modelo con parámetros variables.
- MORENO CASCO, JOAQUÍN, MORAL HERRERO, RAUL. (2011). Compostaje. Madrid - España: Ediciones Mundi - Prensa, págs. 9 - 301.
- MSHANDETE, A.M., BJÖRNSSON, L., KIVAISI, A.K., RUBINDAMAYUGI, M.S.T., MATTIASSON, B. (2008). Effect of aerobic pre-treatment on production of hydrolases and volatile fatty acids during anaerobic digestion of solid sisal leaf decortication residues. *Afric J Biochem Res* 2(5):111–119
- NAGARAJAN, S., (2012). New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Appl Biochem Biotechnol* 168(5):1163–1196
- OJUMU, T.V., YU, J., SOLOMON, B.O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African J Biotechnol* 3(1):18–24
- OLSON, E.S. (2001). Conversion of lignocellulosic material to chemicals and fuels. Report No. FC26-98FT40320-19. *National Energy Technology Lab, Pittsburgh*
- ORTEGA JURADO, A., PALOMAR CARNICERO, J.M., Y CRUZ PERAGÓN, F. (2004). Elaboración integral de las aceitunas con autogeneración de electricidad, comparada con el sistema actual de obtención del aceite de oliva virgen. *Grasas y aceites*

OZCELIK, B., LEE, J.H., MIN, D.B. (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68, 487–490

PANDEY, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:81–84

PEELMAN, N., RAGAERT, P., DE MEULENAER, B., ADONS, D., PEETERS, R., CARDON, L., Y DEVLIEGHERE, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 32(2), 128-141

PFROMM, P.H., AMANOR-BOADUB, V., NELSONC, R., VADLANID, P., MADL, R. (2010). Bio-butanol vs. bioethanol: a technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass Bioenergy* 34:515–524

PHILIPPOUSSIS, A., DIAMANTOPOULOU, P., ISRAILIDES, C. (2007). Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *Int Biodeterior Biodegrad* 59(3):216– 219

PHITSUWAN, P., LAOHAKUNJIT, N., KERDCHOECHUEN, O., KYU, K.L., RATANAKHANOKCHAI, K. (2013). Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiol (Praha)* 58(2):163–176

QURESHI, N., LI, X.L., HUGHES, S., SAHA, B.C., COTTA, M.A. (2006). Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Prog* 22:673–680

RABAEY, K., VERSTRAETE, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol* 23:291–298

REBOUILLAT, S., Y ORTEGA-REQUENA, S. (2015). Potential applications of milk fractions and valorization of dairy by-products: a review of the state-of-the-art available data, outlining the innovation potential from a bigger data standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6(03), 176

REDDY, C., GHAI, R., KALIA, V.C. (2003). Polyhydroxyalcanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87: 137-146

REQUENA, R. (2018). Multilayer biodegradable active films based on PHBV for food packaging (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València)

RESTREPO GALLEGO, M. (2006). Producción más limpia en la industria alimentaria

RIAÑO, A.M.S. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5)

RIVAS, B., DOMÍNGUEZ, J., DOMÍNGUEZ, H., Y PARAJÓ, J. (2002). Bioconversion of posthydrolysed autohydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corncobs. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 431–438

RUTHES, A.C., MARTÍNEZ-ABAD, A., TAN, H.T., BULONE, V., Y VILAPLANA, F. (2017). Sequential fractionation of feruloylated hemicelluloses and oligosaccharides from wheat bran using subcritical water and xylanolytic enzymes. *Green Chemistry*, 19(8), 1919-1931

SAINZ, H., BENÍTEZ, E., MELGAR, R., ÁLVAREZ, R., GÓMEZ, M., Y NOGALES, R. (2000). Biotransformación y valorización agrícola de subproductos del olivar-orujos secos y extractados mediante vermicompostaje. *Edafología*, 7(2), 103-111

SÁNCHEZ RIAÑO, A.M. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5)

SCHINK, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:262–280

SENEVIRATHNE, M., KIM, S.K. (2012) Utilization of seafood processing by- products: medicinal applications. *Adv Food Nutr Res* 65:495–512

SIOTA, S.R. (2014). *Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal* (Doctoral dissertation, Universida de de Vigo)

SIN, L.T. (2012). *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*. William Andrew.

SUBBARAO, K., KUCHIBHOTA, J., KACCAR, BV. (1979). Pyridoxal-5-phosphate. A new physiological inhibitor of blood coagulation. *Biochem Pharmacol* 28:531–534

SUN LEE, D., YAM, K.T., Y PIERGIOVANNI, L. (2008). Food packaging Science and Technology. *CRC Press. Boca Raton, EE. UU.* 650 p

- SWENNEN, K., COURTIN, C.M., Y DELCOUR, J.A. (2006). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6), 459–471
- TAHERZADEH, M.J., KEIKHOSRO, K. (2007). Enzyme based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2:707–738
- TOLDRÁ, F., ARISTOY, M.C., MORA, L., REIG, M. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Sci.* 92, 290e296
- TOOR, S. S., ROSENDAHL, L. A., HOFFMANN, J., PEDERSEN, T. H., NIELSEN, R. P., Y SØGAARD, E. G. (2014). Hydrothermal liquefaction of biomass. In *Application of hydrothermal reactions to biomass conversion* (pp. 189-217)
- TUCK, C.O., PEREZ, E., HORVATH, I.T., SHELDON R.A. Y POLIAKOFF M. (2012). *Science*, 337, 695–699
- USAQUÉN ALVARADO, S.M. *Aprovechamiento y valorización del alpeorajo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol* (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias)
- VALENCIA, M., Y CÉSAR, A. (1994). Evaluación de la Calidad del Arroz.
- VALVERDE, A., SARRIA, B., Y MONTEAGUDO, J.P. (2007). Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Scientia et Technica*, 1(37)
- VARGAS, E.M., AGUIRRE, M., PARRA, D.M., BOURDON, R.D., RODRIGUEZ, L., DURAN, L.C., Y ALVAREZ, D. (2010). Estabilización y usos potenciales del salvado de arroz Colombiano para su aprovechamiento industrial sin afectar su calidad nutricional y funcional
- VÁZQUEZ, M.J., ALONSO, J.L., DOMÍNGUEZ, H., PARAJO, J.C. (2001). Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol*, 11, 387-393
- VILLADA, H.S., ACOSTA, H., VELASCO, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*, vol. 12, no 2, p. 5-19
- WALTON, N.J., MAYER, M.J., NARBAD, A. (2003) Molecules of interest: vanillin. *Phytochemistry* 63:505–6515
- WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G., Y POOL-ZOBEL, B. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 451–455
- YADAV, M.P., PARRIS, N., JOHNSTON, D.B., Y HICKS, K.B. (2008). Fractionation, characterization, and study of the emulsifying properties of corn fiber gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4181–4187
- YUAN, X., WANG, J., Y YAO, H. (2005). Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *BiWdobacterium biWdum*. *Anaerobe*, 11, 225–229
- ZHANG, M., CUI, S.W., CHEUNG, P.C.K., WANG, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 18(1):4–19
- ZHOU, S., LIU, X., GUO, Y., WANG, Q., PENG, D., Y CAO, L. (2010). Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 784-789