

# **Producción de polihidroxicanoatos a partir de suero lácteo y otras fuentes de carbono usando cultivos microbianos mixtos**

**BORJA LAGOA COSTA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
Internacional

---

Programa de doctorado de Biotecnología Avanzada

A Coruña, 2021

Dirigido por:

María del Carmen Veiga Barbazán

Christian Kennes



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**



# Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biotecnología Avanzada

Autor:

❖ Borja Lagoa Costa

Directores:

❖ Dra. María Del Carmen Veiga Barbazán

❖ Dr. Christian Kennes

---

---

Producción de polihidroxicanoatos a partir de suero lácteo y otras fuentes de carbono usando cultivos microbianos mixtos



Doctoral Thesis

Advanced Biotechnology PhD program

Author:

❖ Borja Lagoa Costa

Supervisors:

❖ Prof. María Del Carmen Veiga Barbazán

❖ Prof. Christian Kennes

---

Polyhydroxyalkanoate production from cheese whey and other carbon sources using mixed microbial cultures





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Departamento de Química Física e Ingeniería Química I**

Facultad de Ciencias

Campus de A Zapateira s/n

15071, A Coruña

España

**María del Carmen Veiga Barbazán y Christian Kennes**, catedráticos de universidad del Departamento de Química Física e Ingeniería Química I de la Universidad de A Coruña,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado “**Producción de polihidroxicanoatos a partir de suero lácteo y otras fuentes de carbono usando cultivos microbianos mixtos**” ha sido realizado por **Borja Lagoa Costa** en el Departamento de Química Física e Ingeniería Química I y que, como Directores del mismo, autorizan su presentación para optar al grado de **Doctor Internacional**.

Y, para que así conste, expiden y firman la presente en A Coruña, 2021

María del Carmen Veiga Barbazán

Christian Kennes





**A mi familia**



# Agradecimientos

---

---

Ahora que asoma el final, echo la vista atrás y me doy cuenta de que llegar hasta aquí no habría sido posible sin el apoyo recibido. Por eso, antes de iniciar la redacción de esta tesis, me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que lo habéis hecho posible. Sois tantos, sinónimo de lo bien acompañado que he estado, que espero no dejarme a nadie atrás...

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, María del Carmen Veiga Barbazán y Christian Kennes, la oportunidad que me habéis dado de formar parte del grupo de Ingeniería Ambiental. Me habéis abierto las puertas de vuestro laboratorio y me habéis permitido continuar con mi formación investigadora, una de mis pasiones. Gracias. A M<sup>a</sup> Carmen me gustaría agradecerle también la confianza que siempre ha depositado en mí. A Christian, su contribución en la redacción de los artículos científicos. Como todo el mundo sabe, hoy en día no es nada sencillo poder hacer un doctorado y, menos, si no se dispone de la financiación adecuada. Por eso, no me gustaría olvidarme de agradecer a ambos el que hayan apostado por mí como una de las personas adecuadas para llevar a cabo los proyectos de investigación que fueron adjudicados al grupo, brindándome un soporte económico esencial sin el cual habría sido imposible empezar siquiera esta etapa de mi vida. Espero haber estado a la altura.

En segundo lugar, a mis compañeros de laboratorio. Ruth, Ana, Kübra, Marta, Haris, María, Gael, Rolando, Nuria, Pau, Samayita, Humberto, Büşra, Carla, Raúl, Anxela, Yaxue. Sin lugar a dudas, la fermentación acidogénica y la producción de PHA ha sido mucho más divertida a vuestro lado. Gracias por enseñarme en mis inicios; por todos los consejos recibidos; por el apoyo emocional cuando, tras error y error, venía otro error; por las alegrías; por no dejarme caer en la frustración; y por los buenos y los malos momentos que hemos vivido juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio. Por cierto, Rock FM es la mejor emisora para poner en la radio, con diferencia.

No me quiero olvidar de todas y cada una de las estudiantes de grado y máster con las que tuve el placer de compartir vuestro trabajo final. Nuria, Cristina, María, Isabel y Marta. Si he podido transmitir un poco de mi pasión por la investigación me doy por satisfecho. Yo he aprendido mucho de todas vosotras.

También quería agradecer a Sergio, del área de microbiología, e Iria, de GIBE, por su predisposición a ayudar siempre que hiciese falta, pero también por los momentos de desconexión (tan necesarios) fuera del laboratorio.

A Jose y Jaime, del servicio técnico. Fuisteis esenciales para mí, no sólo por la labor técnica, sino por el buen ambiente que generabais nada más entrar por la puerta del laboratorio. Qué habría sido de mí sin vosotros. Cuántas reparaciones de agitadores que me han dado la vida. Y las que todavía os quedan...

A Carlos, por estar siempre dispuesto a preparar cualquier disolución que me hiciese falta, aún haciéndolo venir a posta de otro laboratorio.

A María y Arturo, personas muy queridas del personal de la universidad. Gracias por ser siempre tan atentos conmigo.

Al profesor Tom P. Curtis y al Dr. Ben Allen, de la Newcastle University. Gracias a vuestra ayuda he podido aprender algo que era totalmente desconocido para mí y, además, con la gran fortuna de haber publicado los resultados en revistas científicas.

A mis amigos Luís e Igor, por escucharme y, sobre todo, por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista.

Como no podía ser de otra forma, tenía que terminar con vosotros. A mi familia, por ser mi faro. Mamá, Papá, David, Mónica, Eli. Sólo vosotros sabéis lo difícil que ha sido este camino. Juntos hemos reído, llorado, ilusionado, frustrado, alegrado, motivado, errado, preocupado, sorprendido, decepcionado, enfadado o divertido. Gracias por haberme apoyado cuando las cosas no iban bien, por darme ánimo y energía cuando las fuerzas flaqueaban, por apoyarme en esta etapa de mi vida que no todo el mundo fue capaz de comprender, por defenderme ante los “a ver cuando dejas de estudiar y te pones a trabajar de una vez, que ya tienes una edad”, por escucharme cuando la decepción y la frustración me desbordaban, por soportar las malas caras y las malas contestaciones de esta última etapa, por el esfuerzo sobrehumano para entender

mis experimentos en el laboratorio, por la saturación mental de cuando os hablaba de los reactores... Pero, sobre todo, gracias por hacerme ser quien soy.

**Gracias**



# Resumen

---

El modelo de vida consumista, lineal y poco sostenible llevado a cabo por el ser humano durante el siglo XX y los primeros compases del siglo XXI, ha provocado una situación de desequilibrio ambiental que está poniendo en serio peligro la sostenibilidad del planeta. Sin embargo, la sociedad está cada vez más concienciada sobre esta situación y opta por un modelo de vida más circular que ayude a la gestión de los recursos naturales. Se trata de romper con la cadena Producir – Consumir – Desechar. El modelo propuesto por la economía circular de reutilizar los “desechos” como materia prima de nuevos productos, junto con una reducción del consumo, se prevé como parte de la solución. Sin embargo, la sociedad poco puede hacer si las grandes organizaciones, tanto públicas como privadas, no tienen voluntad de cambio.

Las grandes organizaciones son las que tienen una mayor responsabilidad sobre la situación medioambiental del planeta, pero las menos interesadas en un desarrollo más sostenible, ya sea por falta de herramientas o por un aspecto meramente económico. La presente tesis trata de poner fin a ambas premisas, al promover una integración de un proceso de valorización de residuos como una etapa más dentro de la cadena de producción en un sector tan importante en Galicia como es el sector lácteo. La finalidad es desarrollar un modelo de economía circular en este sector.

Galicia es, de lejos, la comunidad autónoma con mayor producción de leche de origen vacuno en España y, por lo tanto, de una gran variedad de derivados lácteos. Es por ello que el suero lácteo es un subproducto muy abundante en nuestra autonomía, pero que de por sí contiene una alta carga contaminante que debe de ser contrarrestada. Por suerte, la biotecnología permite transformar el suero lácteo en polihidroxicanoatos, polímeros de origen microbiano con propiedades muy similares a las de algunos plásticos convencionales, pero con la cualidad de ser biodegradables.

En el devenir de este proyecto de tesis se trató de optimizar el proceso de producción de polihidroxicanoatos usando suero lácteo como sustrato y cultivos

microbianos mixtos como inóculo. En paralelo, se diseñó un nuevo experimento con la finalidad de producir conjuntamente dos compuestos de alto valor añadido, como son los bioalcoholes y los biopolímeros. Para ello, un sustrato gaseoso como fuente de carbono fue valorizado en un proceso de dos etapas diseñado por vez primera aquí.

#### **PALABRAS CLAVE**

Polihidroxicanoatos, Ácidos grasos volátiles, Fermentación acidogénica, Cultivos microbianos mixtos, Suero lácteo, Valorización, Biopolímeros, Bioprocesos.



# Resumo

---

---

O modelo de vida consumista, lineal e pouco sustentable levado a cabo polo ser humano durante o século XX e os primeiros compases do século XXI, provocou unha situación de desequilibrio ambiental que está a poñer en serio perigo a sustentabilidade do planeta. Con todo, a sociedade estase a concienciar cada vez máis sobre esta situación e opta por un modelo de vida moito máis circular que axude á xestión dos recursos naturais. Trátase de romper coa cadea Producir – Consumir – Refugar. O modelo que propón a economía circular de reutilizar os “refugallos” como materia prima para novos produtos, xunto cunha redución do excesivo consumo, prevese como parte da solución. Con todo, a sociedade pouco pode facer se as grandes organizacións, tanto públicas como privadas, non teñen vontade de cambio.

As grandes organizacións son as que teñen unha maior responsabilidade sobre a situación ambiental do planeta, pero as menos interesadas nun desenvolvemento máis sustentable xa sexa por falta de ferramentas ou por un aspecto meramente económico. A presente tese trata de poñer fin a ambas dúas premisas ao promover unha integración dun proceso de valorización de residuos como unha etapa máis na cadea de produción dun sector tan importante en Galicia como é o sector lácteo. A finalidade é desenvolver un modelo de economía circular neste sector.

Galicia é, de lonxe, a comunidade autónoma con maior produción de leite de orixe vacúa en España e, polo tanto, dunha gran variedade de derivados lácteos. É por iso que, o soro lácteo é un subproduto moi abundante na nosa autonomía, pero que de seu contén unha alta carga contaminante que hai que contrarrestar. Por sorte, a biotecnoloxía permite transformar o soro lácteo en polihidroxicanoatos, polímeros de orixe microbiano con propiedades moi similares ás dalgúns plásticos convencionais, pero coa calidade de ser biodegradables.

No devir deste proxecto de tese, tratouse de optimizar o proceso de produción de polihidroxicanoatos empregando soro de leite como sustrato e cultivos microbianos mixtos como inóculo. En paralelo, diseñouse un novo experimento coa

finalidade de producir conxuntamente dous compostos de alto valor engadido como son os bioalcohois e os biopolímeros. Para iso, empregouse un sustrato gaseoso como fonte de carbono que foi valorizado nun proceso de dúas etapas deseñado aquí por vez primeira.

#### **PALABRAS CHAVE**

Polihidroxicanoatos, Ácidos grosos volátiles, Fermentación acidoxénica, Cultivos microbianos mixtos, Soro de leite, Valorización, Biopolímeros, Bioprocesos.

# Summary

---

---

The consumerist human way of living has been linear and unsustainable since the XX century. This fact has led the Earth to a worrisome environmental imbalance. However, society is currently increasing its concern about this critical environmental situation and choosing for a more circular economy in order to mitigate the environmental impact. It is about breaking with the Produce – Consume – Discard chain. The circular economy proposes the reuse of “waste” as raw material for the development of new products. Together with a reduction in the consumerist behaviour of the human population, they can offer a partial solution to this environmental imbalance issue. However, society can do little if large organizations, either public or private, have no will to change.

Large organizations have the greatest responsibility for the Earth’s environmental situation. However, they are the least interested in a more sustainable development, whether for lack of tools or for a purely economic aspect. This doctoral thesis aimed the integration of waste valorization processes on the production chain in order to implement a circular economy model in an important industry in Galicia as the dairy industry.

Galicia is, by far, the Spanish region with the highest dairy production from bovine origin and, therefore, a great variety of dairy products. Therefore, cheese whey becomes a very abundant by-product in our community, but with a high polluting effect due to its high organic load. This pollutant condition must be counteracted. Fortunately, biotechnology allows the transformation of cheese whey into polyhydroxyalkanoates, a microbial derived polymer with very similar properties to those of some conventional plastics, but with biodegradable condition.

During this doctoral thesis, the optimization of the polyhydroxyalkanoates production process was studied using cheese whey as substrate and mixed microbial cultures as inoculum. In parallel, a new experiment design was performed in order to integrate the production of bioalcohols and biopolymers. With this goal,

a gaseous carbon source was valorised in a two-stage process, designed here for the first time.

## **KEYWORDS**

Polyhydroxyalkanoates, Volatile fatty acids, Acidogenic fermentation, Mixed microbial cultures, Cheese whey, Valorization, Biopolymers, Bioprocesses

# Tabla de contenidos

---

---

<b>Resumen</b>	I
Palabras clave	II
<b>Resumo</b>	III
Palabras chave	IV
<b>Summary</b>	V
Keywords	VI
<b>Capítulo 1 - Introducción</b>	1
<b>1.1 Economía circular y plásticos convencionales</b>	3
<b>1.2 Economía circular y bioplásticos</b>	10
<b>1.3 Economía circular y PHA</b>	14
1.3.1 Aplicaciones de los PHA	15
1.3.2 Estructura de los PHA	16
1.3.3 Síntesis de los PHA	18
1.3.4 Producción de PHA	21
1.3.4.1 Producción de PHA a partir de los MMC	22
1.3.4.1.1 <i>Etapas 1: Fermentación acidogénica</i>	24
1.3.4.1.2 <i>Etapas 2: Selección de cepas con gran capacidad para acumular PHA</i>	27
1.3.4.1.3 <i>Etapas 3: Maximización en la producción de PHA</i>	32
<b>1.4 Economía circular y suero lácteo</b>	34
<b>1.5 Objetivos y organización de la tesis</b>	36
<b>1.6 Bibliografía</b>	38
<b>1.7 Referencias web</b>	47

<b>Capítulo 2 – Material y métodos</b>	49
<b>2.1 Resumen</b>	49
<b>2.2 Equipamiento experimental</b>	51
2.2.1 Sustratos	51
2.2.1.1 Suero lácteo	51
2.2.1.2 Agua residual de la industria cervecera	52
2.2.1.3 Efluentes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis	52
2.2.2 Reactores	53
2.2.2.1 Reactor anaerobio discontinuo secuencial	54
2.2.2.1.1 <i>Inóculo</i>	54
2.2.2.1.2 <i>Sustrato</i>	54
2.2.2.1.3 <i>Diseño</i>	54
2.2.2.2 Reactor anaerobio de lecho de lodos en flujo ascendente	57
2.2.2.2.1 <i>Inóculo</i>	57
2.2.2.2.2 <i>Sustrato</i>	57
2.2.2.2.3 <i>Diseño</i>	58
2.2.2.3 Reactor aerobio discontinuo secuencial	59
2.2.2.3.1 <i>Inóculo</i>	59
2.2.2.3.2 <i>Sustrato</i>	60
2.2.2.3.3 <i>Diseño</i>	60
2.2.2.4 Reactor aerobio para ensayos <i>fed-batch</i>	63
2.2.2.4.1 <i>Inóculo</i>	63
2.2.2.4.2 <i>Sustrato</i>	63
2.2.2.4.3 <i>Diseño</i>	63
<b>2.3 Técnicas analíticas</b>	65
2.3.1 Determinación de la demanda química de oxígeno	65
2.3.2 Determinación del contenido de amonio disuelto	65
2.3.3 Determinación del contenido de fosfato disuelto	65
2.3.4 Determinación del contenido de sólidos en suspensión	66
2.3.5 Determinación de compuestos solubles en agua	66
2.3.6 Determinación del contenido proteico	67
2.3.7 Determinación del contenido de polihidroxicanoatos	67

2.3.8	Análisis de las comunidades microbianas	69
2.3.8.1	Análisis metagenómicos	69
2.3.8.1.1	<i>Extracción de ADN</i>	69
2.3.8.1.2	<i>Secuenciación</i>	70
2.3.8.1.3	<i>Análisis bioinformático</i>	70
2.3.8.2	Análisis por DGGE	71
2.3.8.2.1	<i>Extracción del ADN</i>	71
2.3.8.2.2	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	71
2.3.8.2.3	<i>Precipitación de ADN</i>	72
2.3.8.2.4	<i>DGGE</i>	72
2.3.8.2.5	<i>Re-amplificación de las bandas</i>	73
2.3.8.2.6	<i>Secuenciación y análisis bioinformático</i>	73
<b>2.4</b>	<b>Otras técnicas</b>	<b>74</b>
2.4.1	Extracción del biopolímero	74
<b>2.5</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>75</b>

<b>Capítulo 3 - Fermentación del suero lácteo para la producción de ácidos grasos volátiles en un reactor anaerobio discontinuo secuencial</b>	<b>79</b>
<b>3.1 Resumen</b>	<b>79</b>
<b>3.2 Introducción</b>	<b>81</b>
<b>3.3 Material y métodos</b>	<b>83</b>
3.3.1 Diseño experimental	83
3.3.2 Sustrato y configuración del reactor	85
3.3.3 Análisis metagenómicos	87
3.3.4 Métodos analíticos	88
3.3.5 Cálculos	88
<b>3.4 Resultados y discusión</b>	<b>89</b>
3.4.1 Influencia del TRS sobre la fermentación acidogénica	89
3.4.1.1 Experimentos a corto plazo	97
3.4.2 Influencia del TRH sobre la fermentación acidogénica	100

3.4.2.1	Experimentos a corto plazo	104
3.4.3	Influencia de la VCO sobre la fermentación acidogénica	107
3.4.4	Análisis de la comunidad microbiana	111
<b>3.5</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>120</b>
<b>3.6</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>120</b>

## **Capítulo 4 - Selección de microorganismos con gran capacidad para acumular polihidroxicanoatos usando suero lácteo fermentado como sustrato**

<b>4.1</b>	<b>Resumen</b>	<b>127</b>
<b>4.2</b>	<b>Introducción</b>	<b>129</b>
<b>4.3</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>131</b>
4.3.1	Diseño experimental	131
4.3.1.1	Selección de cepas con gran capacidad para acumular PHA	133
4.3.1.2	Ensayos <i>fed-batch</i> para la producción de PHA	136
4.3.2	Análisis de las comunidades microbianas	136
4.3.3	Métodos analíticos	137
4.3.4	Cálculos	137
<b>4.4</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>138</b>
4.4.1	Selección de cepas con capacidad de acumular PHA	138
4.4.2	Producción máxima de PHA	153
4.4.3	Caracterización de la comunidad microbiana	154
<b>4.5</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>159</b>
<b>4.6</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>159</b>

## **Capítulo 5 - Relación entre la composición de la alimentación, las dinámicas microbianas y la eficiencia del proceso de acidogénesis en la producción de polihidroxicanoatos**

<b>5.1</b>	<b>Resumen</b>	<b>166</b>
------------	----------------	------------



<b>5.2</b>	<b>Introducción</b>	168
<b>5.3</b>	<b>Material y métodos</b>	170
5.3.1	Diseño experimental	170
5.3.2	Primera etapa: fermentación acidogénica	173
5.3.2.1	Sustratos	173
5.3.2.2	Configuración del reactor	173
5.3.3	Segunda etapa: producción de PHA	174
5.3.3.1	Configuración del reactor <i>fed-batch</i>	174
5.3.3.2	Extracción del biopolímero	175
5.3.4	Análisis metagenómicos	175
5.3.5	Métodos analíticos	176
5.3.6	Cálculos	177
<b>5.4</b>	<b>Resultados y discusión</b>	177
5.4.1	Influencia de la composición de la alimentación sobre la comunidad microbiana	178
5.4.1.1	Aspectos generales en la composición de la comunidad microbiana	178
5.4.1.2	Dinámicas poblacionales en la comunidad microbiana	181
5.4.1.3	Correlación entre comunidad microbiana y acidogénesis	190
5.4.2	Influencia de la composición de la alimentación sobre la producción de PHA	198
<b>5.5</b>	<b>Conclusiones</b>	203
<b>5.6</b>	<b>Bibliografía</b>	203
<b>5.7</b>	<b>Referencias web</b>	210

## **Capítulo 6 - Producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros a partir del gas de síntesis**

<b>6.1</b>	<b>Resumen</b>	212
<b>6.2</b>	<b>Introducción</b>	214
<b>6.3</b>	<b>Material y métodos</b>	216
6.3.1	Diseño experimental	216

6.3.2	Producción de PHA a partir del gas de síntesis	218
6.3.2.1	Obtención de los efluentes del gas de síntesis	218
6.3.2.2	Caracterización de los efluentes	218
6.3.2.3	Obtención de un MMC con capacidad para acumular PHA	220
6.3.2.4	Producción de PHA con los efluentes del gas de síntesis	221
6.3.3	Análisis de las comunidades microbianas	221
6.3.4	Métodos analíticos	222
6.3.5	Cálculos	222
<b>6.4</b>	<b>Resultados y Discusión</b>	<b>223</b>
6.4.1	Composición de la comunidad microbiana basal	223
6.4.2	Producción de PHA a partir del gas de síntesis	226
<b>6.5</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>237</b>
<b>6.6</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>238</b>
	<b>Conclusiones finales</b>	<b>244</b>
	<b>Final conclusions</b>	<b>246</b>

# Índice de figuras

---

---

<b>Figura 1.1.</b> Diseño de la economía lineal	3
<b>Figura 1.2.</b> Diseño de la economía circular	4
<b>Figura 1.3.</b> El plástico en un modelo económico lineal	7
<b>Figura 1.4.</b> Amenaza de los MPs y NPs sobre los diferentes organismos marinos	8
<b>Figura 1.5.</b> El plástico en un modelo de economía circular	9
<b>Figura 1.6.</b> Clasificación de los bioplásticos	10
<b>Figura 1.7.</b> Propiedades, usos y biodegradabilidad de los bioplásticos	13
<b>Figura 1.8.</b> Estructura general de los PHA	17
<b>Figura 1.9.</b> Rutas metabólicas para la síntesis de PHA	20
<b>Figura 1.10.</b> Proceso de 3 etapas para la producción de PHA a partir de MMC	23
<b>Figura 1.11.</b> Proceso de digestión anaerobia	24
<b>Figura 1.12.</b> Estrategia AN/AE	29
<b>Figura 1.13.</b> Estrategia ADF	32
<b>Figura 1.14.</b> Recuperación y/o reutilización del suero lácteo	36
<b>Figura 2.1.</b> Diseño del AnSBR	55
<b>Figura 2.2.</b> Ciclo del AnSBR con sus 4 fases	56
<b>Figura 2.3.</b> Diseño del UASBR	59
<b>Figura 2.4.</b> Diseño del reactor SBR	61
<b>Figura 2.5.</b> Ciclo del SBR con sus 4 fases	62
<b>Figura 2.6.</b> Diseño del reactor tipo <i>fed-batch</i>	64
<b>Figura 2.7.</b> Polimerización del biopolímero	75
<b>Figura 3.1.</b> Diseño experimental	84
<b>Figura 3.2.</b> Perfil de AGV obtenido en cada uno de los tres TRS	95
<b>Figura 3.3.</b> Distribución de los AGV en función de la relación F/M para cada uno de los tres TRS	96

<b>Figura 3.4.</b> Evolución de la lactosa, ácido láctico y AGV para el TRS	99
<b>Figura 3.5.</b> Perfil de AGV obtenido en cada uno de los tres TRH	102
<b>Figura 3.6.</b> Distribución de los AGV en función de la relación F/M para cada uno de los tres TRH	103
<b>Figura 3.7.</b> Evolución de la lactosa, ácido láctico y AGV para el TRH	106
<b>Figura 3.8.</b> Perfil de AGV obtenido en cada una de las tres VCO	109
<b>Figura 3.9.</b> Distribución de los AGV en función de la relación F/M para cada una de las tres VCO	110
<b>Figura 3.10.</b> Abundancia relativa a nivel filo	113
<b>Figura 3.11.</b> Abundancia relativa a nivel género	118
<b>Figura 4.1.</b> Diseño experimental	132
<b>Figura 4.2.</b> Ciclo del SBR	140
<b>Figura 4.3.</b> Variación en la relación F/F	142
<b>Figura 4.4.</b> Evolución en la $-q_s$ y la $q_{PHA}$	145
<b>Figura 4.5.</b> Evolución en el $Y_{X/S}$ y el $Y_{PHA/S}$	150
<b>Figura 4.6.</b> Composición monomérica del polímero	152
<b>Figura 4.7.</b> Acumulación máxima de PHA en los ensayos <i>fed-batch</i>	154
<b>Figura 4.8.</b> Patrón de migración en la DGGE.	155
<b>Figura 5.1.</b> Diseño experimental	172
<b>Figura 5.2.</b> Cálculos de diversidad alfa	180
<b>Figura 5.3.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA)	181
<b>Figura 5.4.</b> Abundancia relativa a nivel filo	184
<b>Figura 5.5.</b> Mapa de calor representando los 20 géneros más abundantes	188
<b>Figura 5.6.</b> Análisis de taxones diferenciales	189
<b>Figura 5.7.</b> Representación gráfica del perfil de AGV	194
<b>Figura 5.8.</b> Inversión en las producciones de ácido acético y ácido butírico	195
<b>Figura 5.9.</b> Ensayos <i>fed-batch</i> para la producción de PHA	201

<b>Figura 6.1.</b> Diseño experimental	217
<b>Figura 6.2.</b> Patrón de migración de la DGGE	224
<b>Figura 6.3.</b> Evolución del OD, los AGV y los alcoholes durante los ensayos <i>fed-batch</i>	231
<b>Figura 6.4.</b> Evolución de la velocidad de consumo de los AGV y de los alcoholes	233
<b>Figura 6.5.</b> Evolución del PHA	235



# Índice de tablas

---

---

<b>Tabla 1.1.</b> Comparación de las propiedades fisicoquímicas de los PHA con la de algunos de los plásticos convencionales más comunes	15
<b>Tabla 2.1.</b> Características de los efluentes provenientes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis.	53
<b>Tabla 2.2.</b> Gradientes desnaturalizantes	73
<b>Tabla 3.1.</b> Resumen de las condiciones operacionales del AnSBR según experimento	87
<b>Tabla 3.2.</b> Resultados de la operación del AnSBR para cada uno de los tres TRS	92
<b>Tabla 3.3.</b> Comparación de diferentes trabajos de investigación en la producción de AGV a partir de suero lácteo o sustratos similares.	93
<b>Tabla 3.4.</b> Velocidades de consumo y producción durante un ciclo batch del AnSBR para los TRS de 10 y 15 días	97
<b>Tabla 3.5.</b> Resultados de la operación del AnSBR para cada uno de los tres TRH	101
<b>Tabla 3.6.</b> Velocidades de consumo y producción durante un ciclo batch del AnSBR para los TRH de 3 y 1 día	105
<b>Tabla 3.7.</b> Resultados de la operación del AnSBR para cada una de las tres VCO	108
<b>Tabla 4.1.</b> Resumen de las condiciones operacionales del SBR para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA.	135
<b>Tabla 4.2.</b> Análisis de ICP-MS	151
<b>Tabla 5.1.</b> Resumen de las condiciones operacionales del UASBR en las diferentes fases de la fermentación acidogénica	174
<b>Tabla 5.2.</b> Resumen de los resultados principales en los análisis bioinformáticos	179
<b>Tabla 5.3.</b> Poblaciones bacterianas, función y metabolismo.	192
<b>Tabla 5.4.</b> Resultados principales de la operación del UASBR a lo largo de las distintas fases de la fermentación acidogénica	197
<b>Tabla 5.5.</b> Resultados principales en los ensayos <i>fed-batch</i>	200

<b>Tabla 6.1.</b> Principales características de los 3 efluentes provenientes de la fermentación del gas de síntesis	219
<b>Tabla 6.2.</b> Resultados principales en los ensayos <i>fed-batch</i>	237



## Abreviaturas

---

---

<b>ADF</b>	Alimentación dinámica aerobia ( <i>Aerobic dynamic feeding</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>AN/AE</b>	Aerobio/Anaerobio
<b>AnMBR</b>	Biorreactor anaerobio de membrana ( <i>Anaerobic membrane bioreactor</i> )
<b>AnSBR</b>	Reactor anaerobio discontinuo secuencial ( <i>Anaerobic sequencing batch reactor</i> )
<b>AOB</b>	Bacterias oxidantes de amonio ( <i>Ammonia oxidizing bacteria</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>C/N</b>	Relación carbono/nitrógeno
<b>C/N/P</b>	Relación carbono/nitrógeno/fósforo
<b>C/P</b>	Relación carbono/fósforo
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>CSTR</b>	Reactor continuo de tanque agitado ( <i>Continuous stirred tank reactor</i> )
<b>DA</b>	Digestión anaerobia
<b>DAD</b>	Detector en red de diodos ( <i>Diode array detector</i> )
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante ( <i>Denaturant gradient gel electrophoresis</i> )
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de aguas residuales
<b>F/F</b>	Relación <i>feast/famine</i> ( <i>Feast/famine ratio</i> )
<b>F/M</b>	Relación alimentación/microorganismo ( <i>Feed to microorganism ratio</i> )
<b>FID</b>	Detector de ionización en llama ( <i>Flame ionization detector</i> )
<b>GAOs</b>	Organismos acumuladores de glucógeno ( <i>Glycogen accumulating organisms</i> )
<b>HB</b>	Hidroxibutirato

<b>HHx</b>	Hidroxihexanoato
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
<b>HV</b>	Hidroxivalerato
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente ( <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
<b>LAB</b>	Bacterias acidolácticas ( <i>Lactic acid bacteria</i> )
<b>MM</b>	Marcador molecular
<b>MMC</b>	Cultivos microbianos mixtos ( <i>Mixed microbial cultures</i> )
<b>MPs</b>	Microplásticos
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NCBI</b>	Centro nacional para la información biotecnológica ( <i>National center for biotechnological information</i> )
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NOB</b>	Bacterias oxidantes de nitrito ( <i>Nitrite oxidizing bacteria</i> )
<b>NPs</b>	Nanoplásticos
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>OTUs</b>	Unidades operacionales taxonómicas ( <i>Operational taxonomic units</i> )
<b>PA</b>	Porcentaje de acidificación
<b>PAOs</b>	Organismos acumuladores de polifosfatos ( <i>Polyphosphate accumulating organisms</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBAT</b>	Poli (butilén adipato-co-tereftalato)
<b>PBBR</b>	Reactor de lecho empacado ( <i>Packed bed bioreactor</i> )
<b>PCoA</b>	Análisis de coordenadas principales ( <i>Principal coordinates analysis</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PE</b>	Polietileno
<b>PET</b>	Tereftalato de polietileno ( <i>Polyethylene terephthalate</i> )
<b>PHA</b>	Polihidroxialcanoato
<b>PHB</b>	Polihidroxibutirato
<b>PHBHHx</b>	Poli (3-hidroxibutirato co 3-hidrohexanoato)

<b>PHBV</b>	Poli (3-hidroxi butirato co 3-hidroxi valerato)
<b>PHV</b>	Polihidroxi valerato
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico ( <i>Poly lactic acid</i> )
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Fosfato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>RID</b>	Detector del índice de refracción ( <i>Refractive index detector</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBR</b>	Reactor discontinuo secuencial ( <i>Sequencing batch reactor</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SST</b>	Sólidos en suspensión totales
<b>SSV</b>	Sólidos en suspensión volátiles
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TRH</b>	Tiempo de retención hidráulico
<b>TRS</b>	Tiempo de retención de sólidos
<b>UASBR</b>	Reactor anaerobio de lecho de lodos en flujo ascendente ( <i>Up-flow anaerobic sludge blanket reactor</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VCO</b>	Velocidad de carga orgánica
<b>vvm</b>	Volumen de gas por volumen de reactor y minuto
<b>X</b>	Biomasa activa



## Parámetros cinéticos y estequiométricos

---

---

$-q_{Alc}$	Velocidad de consumo de los alcoholes
$-q_{AGV}$	Velocidad de consumo de los AGV
$-q_s$	Velocidad de consumo del sustrato
$q_{HORG}$	Velocidad de producción de los ácidos orgánicos
$q_{PHA}$	Velocidad de producción de PHA
$q_{PHB}$	Velocidad de producción de PHB
$q_{PHV}$	Velocidad de producción de PHV
$Y_{AGV/S}$	Rendimiento de acidificación
$Y_{PHA/S}$	Rendimiento de acumulación
$Y_{X/S}$	Rendimiento de crecimiento



# Capítulo 1

---

---

## Introducción

La materia ni se crea ni se destruye, sólo se transforma (Ley de conservación de la materia). Mijail Lomonosov (1748) & Antoine Lavoisier (1785).





## 1.1 ECONOMÍA CIRCULAR Y PLÁSTICOS CONVENCIONALES

Vivimos en un mundo consumista dominado por un modelo económico que se basa en una cadena de producción lineal y unidireccional (Figura 1.1). En base a este modelo, nuestra sociedad produce, consume y desecha a un ritmo desorbitado. Todo comienza con la explotación de los recursos naturales para la obtención de las materias primas (etapa de extracción). Una vez extraídas, las materias primas sufren un proceso de transformación para dar lugar a los productos de interés en su forma final (etapa de producción). La sociedad hará uso de los productos un periodo de tiempo determinado (etapa de consumo). Finalmente, se deshace de ellos cuando su vida útil llega a su fin (etapa de desecho).



Figura 1.1. Diseño de la economía lineal (imagen obtenida de <https://etsididesign.com>).

Sin embargo, este es un modelo utópico, pues los recursos que el planeta nos ofrece no son infinitos. Esto supone que un sistema lineal como este no es sostenible ni en el tiempo ni con el medio ambiente. Mantener un modelo unidireccional en el tiempo tiene efectos negativos en ambos extremos de la cadena: por un lado se provoca un agotamiento de los recursos naturales y, por el otro, se produce una acumulación de residuos en el último eslabón de la cadena. Debido a que este modelo lleva rigiendo la economía mundial mucho tiempo, los efectos negativos ya son muy visibles. Se calcula que los recursos naturales disponibles para la Unión Europea en este último año 2019, se agotaron en apenas 4 meses, el 10 de Mayo. En sólo 4 meses, los países

pertenecientes a la Unión Europea han consumido todos los recursos naturales que el planeta ofrece para todo un año, lo que supone un estilo de vida que requiere de 3 planetas para poder abarcar toda la demanda (WWF & Global Footprint Network, 2019). Además, un consumo excesivo repercute negativamente en la generación de residuos, ya que sólo la Unión Europea fue capaz de producir 2538 millones de toneladas de residuos en el año 2016 (Eurostat, 2019).

Una de las alternativas que se postulan en contraposición a este modelo lineal y unidireccional es un modelo circular. La economía circular pretende dar solución a los puntos débiles del modelo lineal y disminuir la cantidad de recursos naturales empleados para la producción de nuevos productos. Para ello, el modelo propone la reutilización/reciclado de productos cuya vida útil ha llegado a su fin (Figura 1.2). Con ello se pretende reducir la explotación del medio natural para la obtención de materias primas, a la par que mejorar la gestión de los residuos que se generan al final del proceso. Con esta finalidad, se aprobó en el año 2015 el Plan de Acción de Economía Circular de la Unión Europea (European Comission, 2015).



Figura 1.2. Diseño de la economía circular (imagen obtenida de <https://etsididesign.com>).

Los plásticos convencionales, derivados de los hidrocarburos, se han convertido en indispensables en nuestro día a día y su demanda se ha multiplicado a medida que se han descubierto nuevas aplicaciones. El plástico es un polímero muy maleable cuando se funde, ligero, con una gran resistencia a un amplio rango de temperaturas y muy resistente a la degradación tanto química como lumínica, lo que lo convierten en un producto muy persistente (Andrady & Neal, 2009). Si, además, se le suma que es un material muy fácil y barato de producir, la combinación roza la perfección. Tal es la demanda de plástico a día de hoy que se ha alzado con el tercer puesto en el ranking de aplicaciones que más recursos fósiles consumen. Aproximadamente, el 6% de todo el petróleo, carbón y gas natural se destina a la producción de diferentes materiales plásticos. Sólo el transporte (45%) y la energía (42%) superan al plástico en el uso de recursos fósiles (PlasticsEurope, 2017). Además, se estima que para el año 2050 este porcentaje ascienda al 20% si se mantiene la misma demanda (UNEP, 2018). Lo cierto es que, a día de hoy, los plásticos son omnipresentes. El envasado (39,9%), la construcción (19,8%), la automoción (9,9%), la electricidad y electrónica (6,2%), el hogar (4,1%) o la agricultura (3,4%) son algunas de las aplicaciones a las que más plástico se destina en la actualidad (PlasticsEurope, 2019). La versatilidad que le confieren sus propiedades, hace que la producción mundial de este material no haga más que crecer, alcanzando la nada insignificante cifra de 380 millones de toneladas en el año 2015 (Geyer *et al.*, 2017).

A pesar de sus múltiples aplicaciones y de que ha contribuido enormemente a la mejora en la calidad de vida de las personas, el plástico define a la perfección un modelo de producción lineal, provocando un desequilibrio entre el principio y el final de la cadena de producción, lo que repercute negativamente en el medio ambiente (Figura 1.3). En primer lugar, la inmensa mayoría de la materia prima que se utiliza para producir plástico deriva de recursos fósiles “vírgenes” que, por un lado, no son renovables y, por el otro, se están agotando. Además, durante todo el proceso de síntesis de estos materiales, se liberan grandes cantidades de gases de efecto invernadero a la atmósfera, que contribuyen al cambio climático. En segundo lugar, la gran demanda de plástico conlleva una importante generación de residuos, hecho que se magnifica cuando la mayoría de los plásticos son de un solo uso. La gestión de los residuos plásticos es una tarea un tanto ardua. Al tratarse de un

material no biodegradable, las opciones para la correcta gestión de los residuos plásticos se basan en su reciclaje, pero no todo el plástico puede ser reciclado. Sólo se pueden refundir y reciclar como tal los considerados termoplásticos. Fuera de esta categoría se agrupan todavía una gran variedad de plásticos termoestables para los que la posibilidad de reciclaje queda totalmente excluida. Incluso, de los plásticos que sí pueden ser reciclados, es importante valorar la pérdida de calidad que sufren estos materiales durante el proceso de reciclaje, lo que limita el número de veces que pueden ser reciclados. Aún con todo ello, sólo el 14% del total de los residuos plásticos sigue este camino, según datos recogidos por Ellen McArthur Foundation (2017). La ruta alternativa al reciclaje es la incineración. Sin embargo, este proceso no sólo libera grandes cantidades de gases de efecto invernadero a la atmósfera, sino que también libera múltiples compuestos tóxicos con repercusiones negativas tanto a nivel medioambiental como en la salud de los seres vivos. Aún a pesar de todas las contraprestaciones de esta alternativa, sólo un 14% de los residuos plásticos acaba en las plantas de incineración (Figura 1.3). Entonces, ¿qué ocurre con más de la mitad de los residuos plásticos que se generan en todo el mundo? A consecuencia de este modelo lineal, de un uso indiscriminado del plástico y de una pésima gestión por parte del ser humano, más de la mitad de los residuos plásticos generados a nivel mundial acaban en vertederos o en el medio ambiente. Desgraciadamente, ésta es la vía más recurrida y la que presenta un mayor impacto a nivel medioambiental. Las propiedades que encumbran al plástico como un material prácticamente indestructible lo dotan, a la vez, de una excesiva durabilidad aún incluso cuando su vida útil ya ha terminado. Esto provoca que, una vez liberado, pueda permanecer en el medio ambiente durante cientos de años, contribuyendo a su contaminación. En la actualidad, cada vez es más habitual escuchar hablar de contaminación en el entorno natural por acumulación de plástico y, en última instancia, todo acaba en el océano.

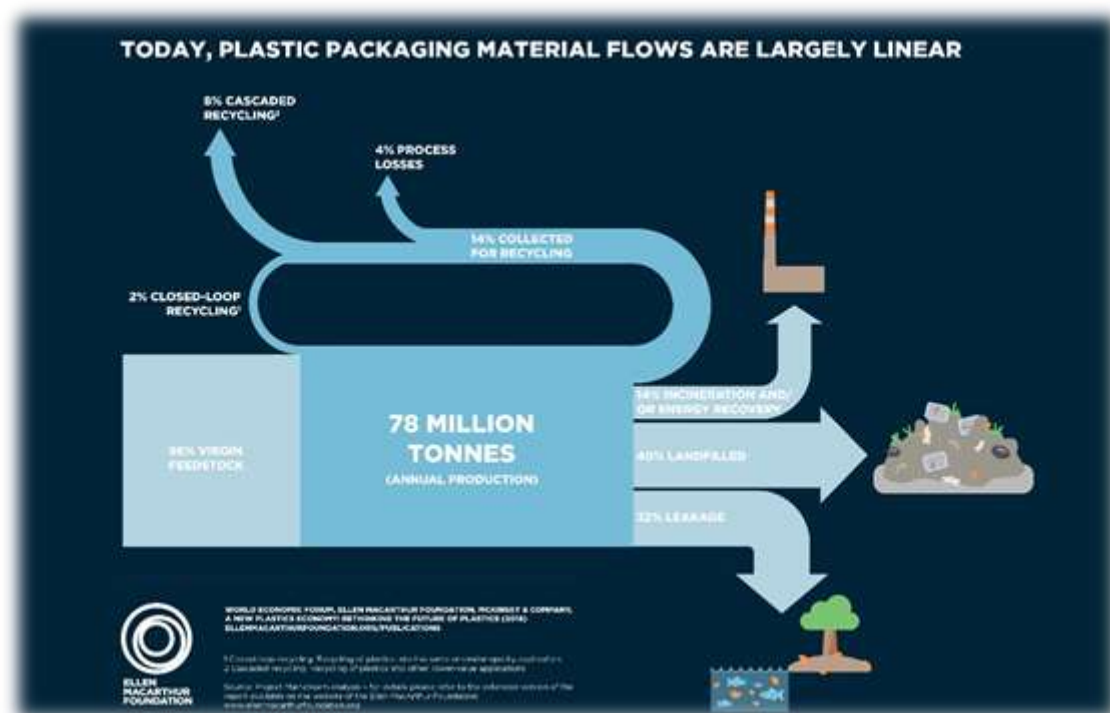


Figura 1.3. El plástico en un modelo económico lineal (imagen obtenida de Ellen Macarthur Foundation, 2017).

Existe una gran preocupación por la alta cantidad de basura plástica que se acumula en el mar. De ésta, la inmensa mayoría tiene su origen en tierra firme, con un 80%, mientras que el 20% restante deriva de las actividades marinas, principalmente la pesca (Mattsson *et al.*, 2015). Según las estimaciones realizadas por Jambeck *et al.* (2015), el caudal de entrada de plásticos al medio marino oscilaba entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas en el año 2010, y se preveía que esa cantidad aumentase en torno a un orden de magnitud para el año 2025. Esto hace que, a día de hoy, 5,25 billones de partículas plásticas contaminen el ecosistema marino, según los datos más actuales (Eriksen *et al.*, 2014).

La preocupación actual que existe por la contaminación de los ecosistemas marinos debido a la presencia de diferente basura plástica (macroplásticos, microplásticos (MPs) y nanoplásticos (NPs)) no es trivial y viene avalada por diferentes estudios de carácter científico que advierten acerca de los posibles efectos adversos que ejercen estas partículas sobre los organismos vivos. En primer lugar, se puede hablar de un efecto directo sobre especies marinas de diferentes niveles tróficos (Figura 1.4). Por

ingestión, dichas partículas pueden permanecer bien en el sistema digestivo o bien migrar hacia otros órganos pues, una de las propiedades de partículas tan pequeñas como los MPs y los NPs, es que pueden atravesar barreras naturales (Ribeiro *et al.*, 2019). Una vez dentro del organismo, provocan alteraciones a nivel metabólico, reproductor, de supervivencia, etc. (Cole *et al.*, 2015; Sussarello *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019). A través de la dieta, las pequeñas partículas de plástico también pueden llegar a organismos de un nivel trófico más alto (Figura 1.4). Esto afecta también a seres humanos en donde, recientemente, se ha demostrado la presencia de MPs en su interior (Schwabl *et al.*, 2019). Existe un segundo aspecto, quizá menos conocido por la sociedad, pero que también preocupa a la comunidad científica. Debido a su gran relación superficie/volumen, a su gran cantidad de poros superficiales y a sus características hidrófobas, muchos contaminantes pueden ser sorbidos por los diferentes plásticos que contaminan los océanos. Finalmente, estos plásticos actúan como vectores de toxicidad para la salud de los seres vivos (Alvim *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2020).

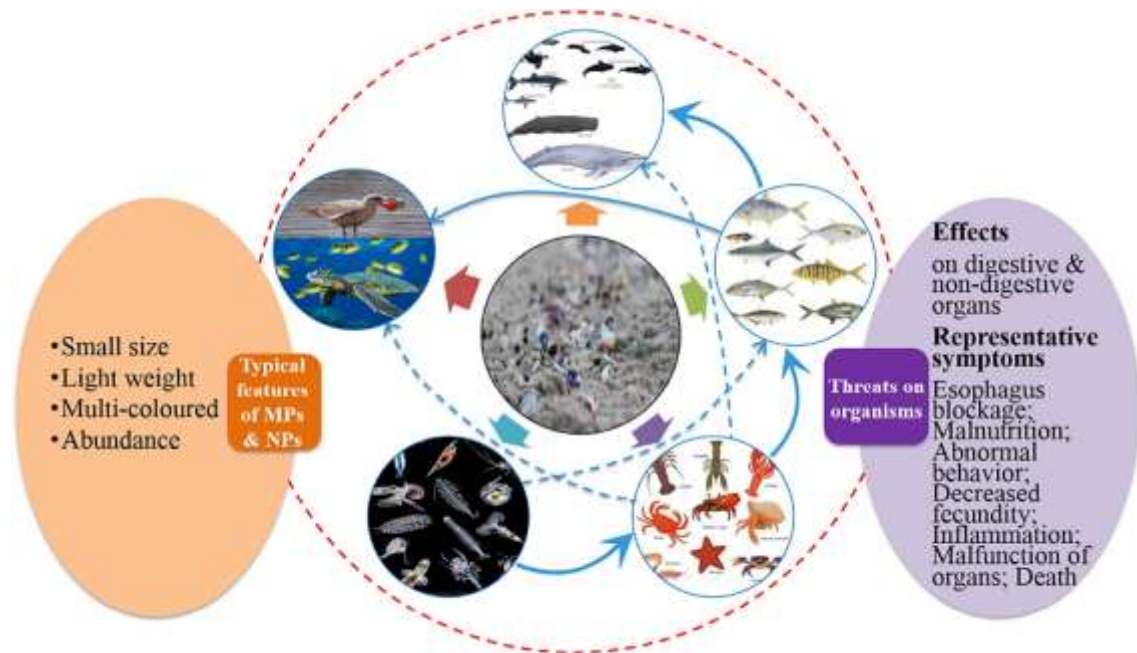


Figura 1.4. Amenaza de los MPs y NPs sobre los diferentes organismos marinos (imagen obtenida de Peng *et al.* (2020)).

En resumen, el plástico convencional, derivado de los hidrocarburos, es un arma de doble filo. Por un lado, presenta una serie de propiedades fisicoquímicas que lo hacen ideal para una infinidad de aplicaciones. Por otro lado, sigue un modelo de producción lineal que genera un fuerte desequilibrio ambiental, el cual se acentúa con el uso indiscriminado y la mala gestión de residuos que realiza el ser humano, provocando muchos daños colaterales en el entorno natural. Es imperativo, pues, adaptar su sistema de producción a un modelo de economía circular que permita a la sociedad aprovechar sus innumerables ventajas y aplicaciones sin generar un impacto tan fuerte sobre el medio ambiente. Para alcanzar estos objetivos, habría que promover una reestructuración completa del modelo lineal, empezando por la materia prima. El abandono de los recursos fósiles (no reciclables) en favor de los recursos renovables (si reciclables) se prevé crucial para poder disminuir el impacto ambiental, ya que dotaría al modelo de la circularidad necesaria (Figura 1.5).

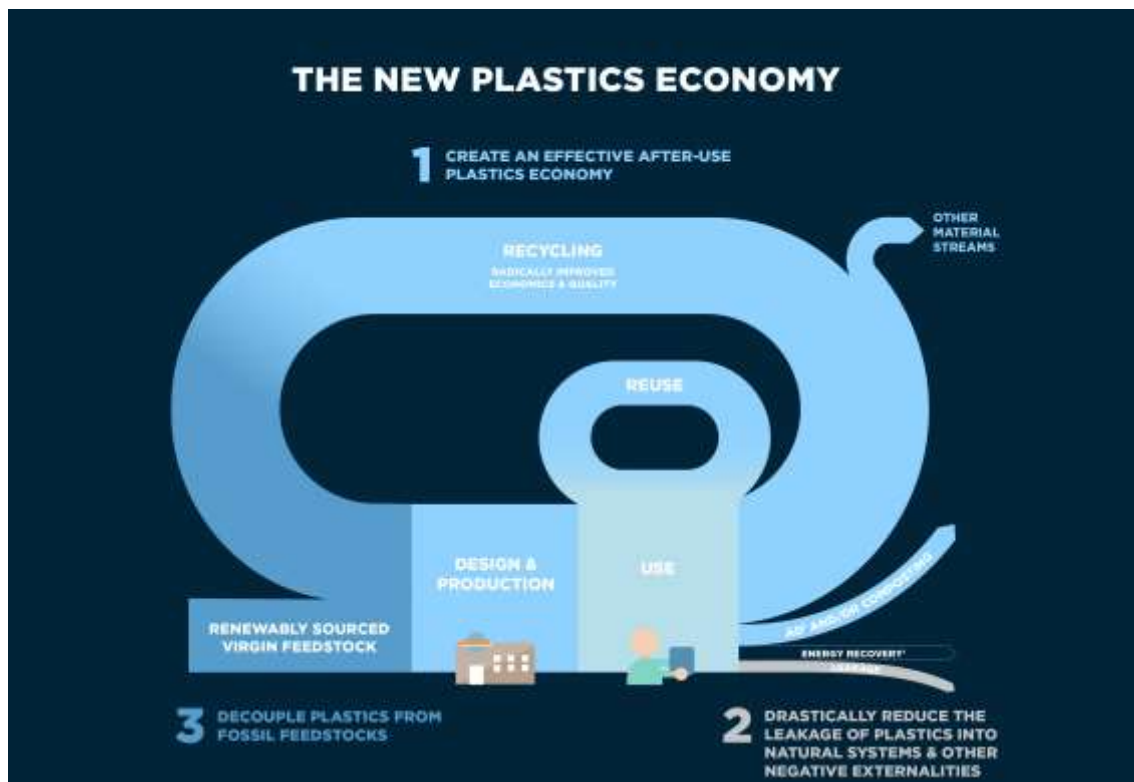


Figura 1.5. El plástico en un modelo de economía circular (imagen obtenida de Ellen MacArthur Foundation, 2017).

## 1.2 ECONOMÍA CIRCULAR Y BIOPLÁSTICOS

La implantación de un modelo de economía circular en la industria del plástico requiere de la búsqueda de un material que compatibilice unas buenas propiedades fisicoquímicas junto con un impacto ambiental bajo. Dicha búsqueda podría estar llegando a su fin gracias al desarrollo de los bioplásticos. El portal web European Bioplastics (2019) define los bioplásticos como aquellos polímeros que derivan total o parcialmente de recursos renovables, que son biodegradables o que poseen ambas características. Sin embargo, bajo esta definición también se agrupan polímeros que no son 100% biodegradables (bioPET, por ejemplo) o que están total o parcialmente compuestos por materias primas no renovables (PBAT, por ejemplo) (Figura 1.6). En base a esta definición, el término bioplástico puede llevar a la confusión, pues el adjetivo “bio” no siempre es sinónimo de biodegradabilidad o de base biológica, aunque para el desarrollo de un modelo de economía circular sí que lo ha de ser.

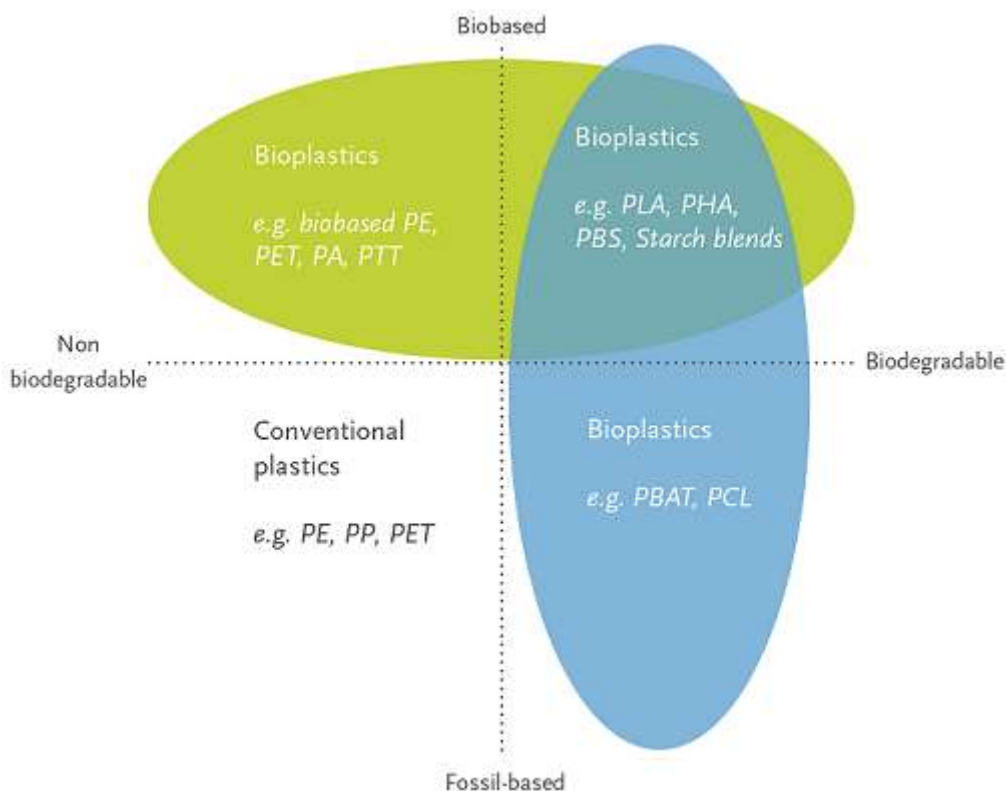


Figura 1.6. Clasificación de los bioplásticos en función de su origen y biodegradabilidad (imagen obtenida de [www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)).



La biodegradación es un proceso químico que implica actividad bacteriana y por la que determinados materiales, los biopolímeros en nuestro caso, se transforman en sustancias naturales como agua, CO<sub>2</sub> o compost. Esta característica favorece la gestión de sus residuos, pues se reduce el impacto ambiental generado por su acumulación en el medio ambiente. A la vez, promueve la circularidad del modelo, pues una vez finalizada su vida útil, las materias primas vuelven a estar disponibles en el entorno natural. La biodegradación consiste en tres etapas sucesivas: la etapa inicial consiste en la biodeterioración o modificación de las propiedades mecánicas, físicas o químicas del biopolímero por acción de los microorganismos; en la segunda etapa ocurre la biofragmentación o conversión de los polímeros en monómeros por la acción bacteriana; en la etapa final, el carbono de dichos monómeros es asimilado por los microorganismos como fuente de carbono, energía o nutrientes y convertido posteriormente en CO<sub>2</sub>, agua o biomasa (Lucas *et al.*, 2008). La biodegradabilidad de algunos bioplásticos ya ha sido testada en distintos ambientes como son el suelo, el compost o los ecosistemas acuáticos, aunque la tasa de degradación se ve afectada por determinadas condiciones del medio (Emadian *et al.*, 2017).

Al categorizar un producto como “de base biológica” se está garantizando que las materias primas usadas en su fabricación provienen de recursos renovables. Esto permite a los bioplásticos de base biológica no ser dependientes de recursos no renovables como los recursos fósiles. Además, la producción de polímeros a partir de materias primas renovables reduce las emisiones de gases de efecto invernadero en comparación a las de los plásticos convencionales. En otras palabras, se reduce la huella de carbono asociada al proceso de producción (Kikuchi *et al.*, 2017).

A pesar de que los biopolímeros que reúnen ambas características suponen la piedra angular para la implantación de un modelo de economía circular en la industria del plástico, el mercado actual de estos bioplásticos representa escasamente el 0,5% de la producción mundial, lo que supone una cantidad que apenas llega a 1,17 millones de toneladas (European Bioplastics, 2019). La baja productividad se debe a que, en la actualidad, el precio de los bioplásticos no es tan competitivo como el precio de los plásticos convencionales (Karan *et al.*, 2019). Sin embargo, el mercado de los bioplásticos está al alza y se espera que para el año 2024 la producción mundial de bioplásticos ascienda de 1,17 a 1,33 millones de toneladas. De entre los bioplásticos

biodegradables de base biológica, los que tienen un mayor potencial de futuro son: (1) los polímeros naturales como la celulosa o el almidón (Shogren *et al.*, 2019), (2) los polímeros sintéticos basados en monómeros naturales como el ácido poliláctico (PLA) (Payne *et al.*, 2019) o (3) los polímeros que derivan de las fermentaciones microbianas como los polihidroxicanoatos (PHA) (Raza *et al.*, 2018) (Figura 1.7). De entre todos ellos, los PHA destacan como una de las opciones de futuro de mayor viabilidad. La capacidad de los PHA para modificar sus propiedades fisicoquímicas en función de su composición monomérica, hace que se asemejen a una amplia gama de plásticos convencionales (Anjum *et al.*, 2016). Esto convierte a los PHA en uno de los más firmes candidatos a reemplazar los plásticos convencionales, augurándoles un gran potencial de crecimiento. Tanto es así que se considera a los PHA como el mayor exponente del aumento global en el uso de bioplásticos que se espera para el año 2024 (European Bioplastics, 2019).

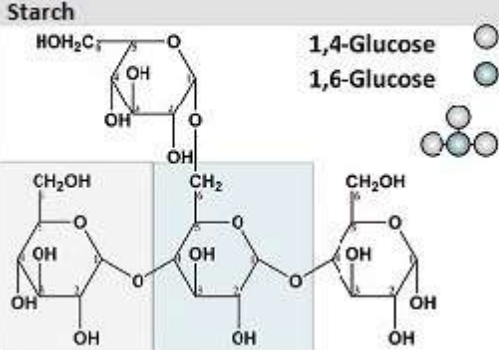

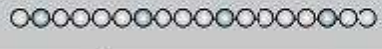

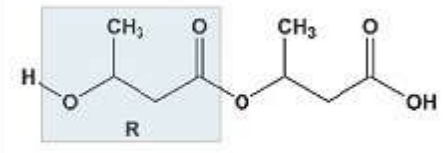
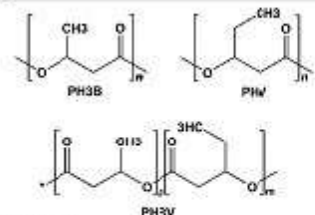
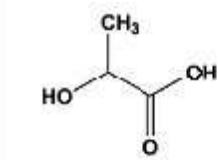
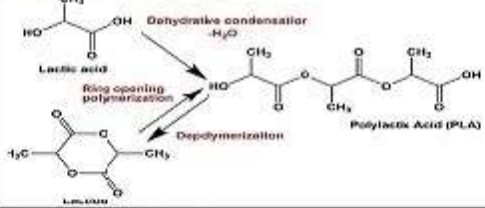
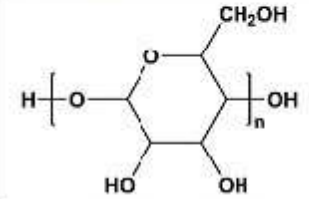
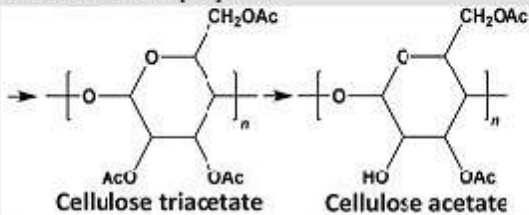
Natural monomer & polymer	Polymer processing	Property summary	
<b>Starch</b> 	<b>Starch-based polymer</b> <b>Hydrolyzed Starch</b>  <b>Bioplastic polymer</b>  <b>Bioplastic plasticizer crosslinkers</b> 	<b>Properties</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Thermoplastic</li> <li>✓ Gas barrier</li> <li>✗ UV resistant</li> <li>✓ Biocompatible</li> <li>✗ Thermostable</li> <li>✓ Elastic</li> <li>✓ Rigid</li> <li>✗ Hydrophobic</li> </ul>	<b>Uses</b> Packaging Food trays Trash bags Flower pots  <b>Degradable</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ In water</li> <li>✓ In soil</li> <li>✓ Ind. ccmpost</li> </ul>
<b>Polyhydroxyalkanoates</b> 	<b>PHA, PHB, PHV</b> 	<b>Properties</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Thermoplastic</li> <li>✓ Gas Barrier</li> <li>✓ UV resistant</li> <li>✓ Biocompatible</li> <li>✗ Thermostable</li> <li>✓ Elastic</li> <li>✓ Rigid</li> <li>Hydrophobic</li> </ul>	<b>Uses</b> Packaging Adhesives Fibers Med. Implants  <b>Degradable</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ In water</li> <li>✓ In soil</li> <li>✓ Ind. ccmpost</li> </ul>
<b>Lactic acid</b> 	<b>Poly(lactic Acid) (PLA)</b> 	<b>Properties</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Thermoplastic</li> <li>✓ Gas Barrier</li> <li>✓ UV resistant</li> <li>✓ Biocompatible</li> <li>✗ Thermostable</li> <li>✓ Elastic</li> <li>✓ Rigid</li> <li>Hydrophobic</li> </ul>	<b>Uses</b> Packaging Textiles Med. Implants Films  <b>Degradable</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✗ In water</li> <li>✓ In soil</li> <li>✓ Ind. ccmpost</li> </ul>
<b>Cellulose</b> 	<b>Cellulose-based polymer</b> 	<b>Properties</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Thermoplastic</li> <li>✗ Gas Barrier</li> <li>✗ UV resistant</li> <li>✓ Biocompatible</li> <li>Thermostable</li> <li>✗ Elastic</li> <li>✓ Rigid</li> <li>✗ Hydrophobic</li> </ul>	<b>Uses</b> Wound dress Textiles Air Filters Coatings  <b>Degradable</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ In water</li> <li>✓ In soil</li> <li>✓ Ind. ccmpost</li> </ul>

Figura 1.7. Propiedades, usos y biodegradabilidad de los bioplásticos. Imagen obtenida de Karan *et al.* (2019).

### 1.3 ECONOMÍA CIRCULAR Y PHA

Los PHA están considerados polímeros termoplásticos de origen biológico. Son producidos por multitud de microorganismos como reserva de carbono y energía en condiciones de exceso de carbono, pero en ausencia de algún otro nutriente esencial como nitrógeno, fósforo u oxígeno (Anjum *et al.*, 2016). Fueron descubiertos por Lemoigne (1926) como gránulos citoplasmáticos en la bacteria *Bacillus megaterium*. Gracias al desarrollo de la biotecnología, estos gránulos pueden ser producidos en masa para emplearse como alternativa a los plásticos convencionales derivados de los hidrocarburos. Varios son los motivos por los que los PHA se han convertido en uno de los más firmes candidatos a reemplazar gran parte de los plásticos sintéticos en un futuro no muy lejano. En primer lugar, son polímeros biodegradables, lo que reduce el impacto ambiental asociado a su posible acumulación en el medio natural. En segundo lugar, evaluaciones del ciclo de vida y huella de carbono, demuestran una reducción de emisiones de gases de efecto invernadero durante su producción si se comparan con el polipropileno (PP) o el polietileno (PE), dos de los plásticos convencionales más usados (Harding *et al.*, 2007; Kim & Dale, 2008). Finalmente, existe una gran variedad de PHA que dará lugar a una amplia gama de polímeros, cada uno de ellos con unas propiedades fisicoquímicas muy diferentes. Esto hace posible obtener un tipo de PHA para una gran variedad de plásticos convencionales, tal y como se detalla en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de los PHA con la de algunos de los plásticos convencionales más comunes (Muhammadi *et al.*, 2015).

<i>Samples</i>	<i>Tm</i> (°C)	<i>Tg</i> (°C)	<i>Tensile strength</i> (Mpa)	<i>Elongation at break</i> (%)
<i>PHB</i>	177	4	43	5
<i>P(3HB-co-20% 3HV)</i>	145	-1	20	50
<i>P(3HB-co-16% 4HB)</i>	150	-7	26	444
<i>P(3HB-co-15% 3HHx)</i>	115	-	23	760
<i>P(HB-co-10% HV)</i>	150	-	25	20
<i>P(HB-co-20% HV)</i>	135	-	20	100
<i>P(HB-co-10% HHx)</i>	127	-1	21	400
<i>P(HB-co-17% HHx)</i>	120	-2	20	850
<i>Polypropylene</i>	170	-	34	400
<i>Polystyrene</i>	110	-	50	-
<i>Polyethylene</i>	130	-10	-	500
<i>HDPE</i>	135	-	29	-
<i>LDPE</i>	130	-30	10	620
<i>PET</i>	262	-	56	7300

*Note: Tm: melting temperature; Tg: glass-transition temperature; HB: 3-hydroxybutyrate; HV: 3-hydroxyvalerate; HHx: 3-hydroxyhexanoate; LDPE: low-density polyethylene; HDPE: high-density polyethylene; PET: poly(ethyleneterephthalate).*

### 1.3.1 APLICACIONES DE LOS PHA

En base a sus propiedades, varios son los campos de acción en los que se valora positivamente la aparición de los PHA como nuevo biomaterial. El envasado es la aplicación que más plástico convencional consume en la actualidad, siendo la gran mayoría de un solo uso, lo que favorece su acumulación en el medio ambiente, con todos los perjuicios que ello conlleva. La biodegradabilidad confiere a los PHA una ventaja adaptativa frente a los plásticos convencionales, ya que minimiza el impacto medioambiental asociado a este hecho. Esto posiciona a los PHA como la alternativa

sostenible nº 1 dentro de la industria del *packaging*, con especial atención hacia el envasado de alimentos (Chen, 2009; Tang *et al.*, 2012; Khosravi-Darani & Bucci, 2015; Wang *et al.*, 2016).

A pesar de que la producción de plásticos biodegradables para el envasado está considerada la principal aplicación para los PHA, su uso en el campo de la medicina está emergiendo con mucha fuerza. Debido a su naturaleza biocompatible y baja respuesta inflamatoria, los PHA se pueden emplear en regeneración de tejidos e implantes médicos (Raza *et al.*, 2018). La biodegradabilidad y la biocompatibilidad también hacen de los PHA un material muy interesante en el campo farmacéutico. La encapsulación de medicamentos para realizar una liberación controlada de sus principios activos es una de las aplicaciones en las que se ha valorado la introducción de los PHA (Koller, 2018). Pero las aplicaciones médicas no terminan ahí. También se ha demostrado que los PHA pueden suponer una buena superficie sobre la que crecer células dentro del campo de la ingeniería tisular (Porter *et al.*, 2013).

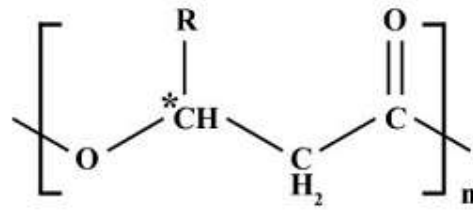
Existe un tercer campo de acción en donde los PHA podrían tener una aplicación potencial, la agricultura. Dentro de este campo, los PHA podrían emplearse, por ejemplo, como un agente controlador de plagas. Al integrar insecticidas en el propio PHA, se podría conseguir una liberación controlada de los mismos al medio, a medida que el polímero es degradado por el insecto en cuestión (Philip *et al.*, 2007).

Finalmente, con el objetivo de incrementar su cuota de mercado, los PHA también pueden ser combinados con otros biopolímeros (ácido poliláctico, amilosa, dextrano u otros polisacáridos, entre otros) o con otros polímeros derivados de los recursos fósiles (nylon, óxido de polietileno o acetato de polivinilo, entre otros), para crear un material híbrido (Philip *et al.*, 2007).

---

### 1.3.2 ESTRUCTURA DE LOS PHA

Una molécula típica de PHA está constituido por entre 600 – 35000 monómeros de un (R)-hidroxialcanoato (Tan *et al.*, 2014). Cada monómero tiene una cadena lateral R que puede contener diferentes grupos alquilo que darán lugar a diferentes tipos de PHA (Figura 1.8).



Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C <sub>4</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C <sub>6</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C <sub>8</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C <sub>9</sub>	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C <sub>10</sub>	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C <sub>11</sub>	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C <sub>12</sub>	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C <sub>13</sub>	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C <sub>14</sub>	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C <sub>15</sub>	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C <sub>16</sub>	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Figura 1.8. Estructura general de los PHA (imagen obtenida de Tan *et al.* (2014)).

En función del número de carbonos que los componen, los PHA se pueden clasificar en PHA de cadena corta (hasta 5 átomos de carbono), de cadena media (entre 5 y 14 átomos de carbono) o de cadena larga (más de 14 átomos de carbono) (Raza *et al.*, 2018). En la presente investigación, el foco se pondrá sobre los primeros. Así, 2 son los principales polímeros de cadena corta que las bacterias son capaces de sintetizar. El polihidroxi butirato (PHB) es el polímero más habitual. Tiene un elevado grado de cristalinidad (55 – 80%) y forma finos cristales con una temperatura de fusión de aproximadamente 175° C, lo que lo hace muy similar al PP. Sin embargo, la principal causa por la que el PHB no termina de sustituir al PP es su fragilidad (Winnacker, 2019). Por su parte, el polihidroxi valerato (PHV) es menos frecuente pero no menos importante. La introducción de monómeros de hidroxivalerato (HV) en el PHB dará lugar al copolímero poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV). Al añadir

monómeros de HV se contrarrestará, en parte, la fragilidad del homopolímero PHB, volviéndolo más resistente y flexible (Reis *et al.*, 2011). Por ello, el copolímero PHBV es mucho más interesante desde un punto de vista comercial, pues al compararlo al homopolímero se mejoran significativamente sus propiedades fisicoquímicas.

---

### 1.3.3 SÍNTESIS DE LOS PHA

Se han identificado como microorganismos productores de PHA alrededor de 300 tipos microbianos entre los que se incluyen, principalmente, especies del dominio *Bacteria* (Anjum *et al.*, 2016), aunque también se ha observado a alguna especie del dominio *Archaea* con la capacidad de acumular PHA en su interior (Yin *et al.*, 2015). La formación de PHA es un recurso metabólico que algunas especies emplean como mecanismo de supervivencia, tal y como se ha mencionado anteriormente. Cuando las condiciones del medio son favorables, el metabolismo bacteriano está dirigido hacia las funciones básicas de mantenimiento y crecimiento celular. En estos casos, la fuente de carbono entra en el ciclo de Krebs y se generan grandes cantidades de Coenzima A, las cuales inhiben la síntesis de PHA. Cuando las condiciones del medio son desfavorables y la presencia de algún nutriente se vuelve limitante, las funciones celulares cambian y los procesos de mantenimiento y crecimiento celular son reemplazados por la síntesis de PHA. Según Tan *et al.* (2014), la causa principal de este cambio es que se reducen los niveles de Coenzima A en el interior celular y se permite la activación de la ruta biosintética asociada a los PHA. Además, Reis *et al.* (2011) también hacen mención al papel que juega el agente reductor NADH sobre la activación de las rutas metabólicas para la síntesis de PHA. Según el citado trabajo, en condiciones no limitantes para el crecimiento y mantenimiento celular, el NADH producido es consumido durante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, cuando las condiciones se vuelven limitantes esta última ruta no se lleva a cabo y el NADH se acumula en el interior celular, provocando la inhibición de las enzimas que regulan el ciclo de Krebs y todo el carbono se redirige hacia la síntesis de PHA.

En la actualidad, tres son las rutas metabólicas que se conocen para la síntesis de PHA. La primera ruta es la más conocida de todas y donde la molécula acetyl-CoA es el epicentro (Figura 1.9). Esta es la ruta que se utiliza para la síntesis de los PHA de cadena corta, PHB y PHV, centro de atención de la presente investigación. Partiendo



de azúcares como fuente de carbono, éstos se transforman en acetyl-CoA vía Entner-Doudoroff. La síntesis de los PHA por esta ruta biosintética consiste en un total de 3 etapas que se inicia con la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA por la acción de la enzima  $\beta$ -cetotiolasa (PhaA). Se obtiene así la molécula acetoacetyl-CoA. Esta segunda molécula se reduce a 3-hydroxybutyryl-CoA en una reacción catalizada por la enzima Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB). Por último, la enzima PHA sintase (PhaC) cataliza la polimerización de las moléculas 3-hydroxybutyryl-CoA en PHB (Reis *et al.*, 2011; Anjum *et al.*, 2016). Cuando los ácidos grasos volátiles (AGV) se utilizan como fuente de carbono para la síntesis de PHA, también siguen la misma ruta metabólica (Figura 1.9). La incorporación de los AGV al interior de los microorganismos puede ser directa desde el medio o previa transformación de ácidos grasos de cadena larga a través de los procesos de  $\beta$ -oxidación. El ácido acético sigue a la perfección la ruta de 3 etapas que se ha descrito anteriormente. Sin embargo, alguna modificación se puede encontrar para el resto de los AGV. El ácido propiónico es transformado en propionyl-CoA. Junto a una molécula de acetyl-CoA, el propionyl-CoA es transformado en 3-hydroxyvaleryl-CoA, último precursor del monómero HV. Además, tanto el ácido butírico como el ácido valérico son directamente transformados en 3-hydroxybutyryl-CoA y 3-hydroxyvaleryl-CoA, precursores últimos de los monómeros HB y HV, respectivamente (Reis *et al.*, 2011).

La segunda ruta metabólica es capaz de producir precursores de PHA a partir de la biosíntesis de ácidos grasos (Figura 1.9). Los intermediarios 3-hydroxyacyl de la ruta biosintética de los ácidos grasos se pueden convertir de su forma de proteína portadora de acilos a su forma CoA gracias a la acción de la enzima acyl-ACP-CoA transacylase. El 3-hydroxyacyl-CoA sería el precursor último de los PHA (Anjum *et al.*, 2016).

Por último, existe una tercera ruta metabólica con capacidad de generar precursores de PHA (Figura 1.9). En este último caso, los alcanos se pueden oxidar a su alcanato correspondiente el cual, a su vez, puede ser activado a su correspondiente molécula acyl-CoA, precursora de la síntesis de los PHA (Reis *et al.*, 2011).

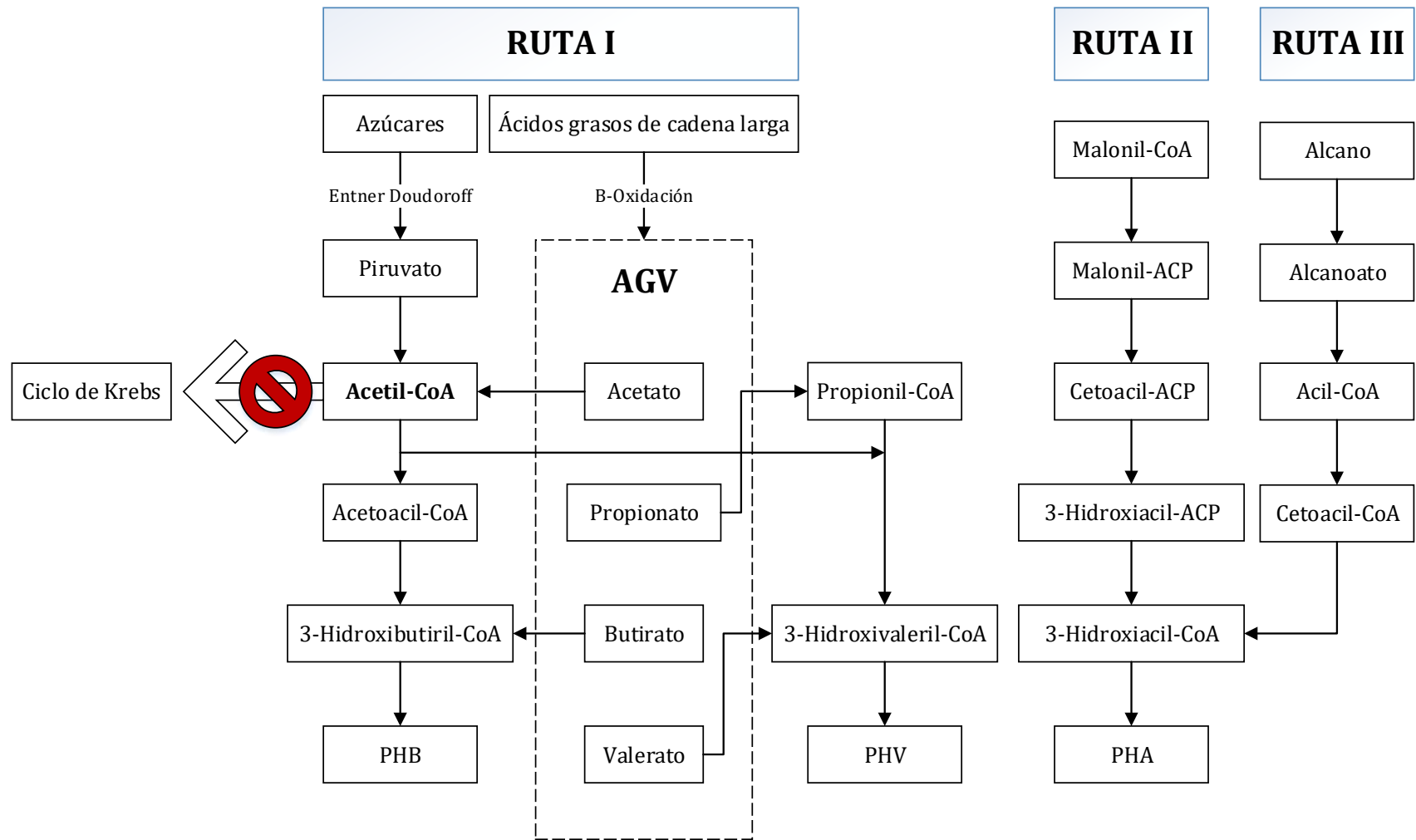


Figura 1.9. Rutas metabólicas para la síntesis de PHA. Imagen adaptada de Reis *et al.* (2011) y Anjum *et al.* (2016).

---

#### 1.3.4 PRODUCCIÓN DE PHA

Hoy en día, la producción de PHA a escala industrial se lleva a cabo, principalmente, por cultivos puros. Estos cultivos pueden estar formados bien por microorganismos naturales, bien por microorganismos recombinantes cuyo genoma se ha modificado genéticamente. Con independencia de cuál sea la elección, el uso de cultivos puros permite alcanzar altas densidades celulares y altos porcentajes de PHA intracelular, lo que va a maximizar la producción de PHA (Chen, 2009). Sin embargo, el uso de los microorganismos recombinantes ofrece la posibilidad de acumular porcentajes más elevados de PHA con respecto a los microorganismos naturales, lo que los convierte en una opción mucho más interesante desde un punto de vista productivo. De hecho, este porcentaje puede llegar a alcanzar >90% del peso seco de la célula en forma de PHA (Li *et al.*, 2016). A pesar de la gran productividad que se alcanza con los cultivos puros, toda moneda tiene dos caras. El elevado coste de producción que conlleva el uso de los cultivos puros supone una losa importante para la viabilidad de esta tecnología. Dos son las principales causas: la necesidad de condiciones estériles y la alta pureza de los sustratos. La esterilidad es básica en fermentaciones llevadas a cabo por cultivos puros. Con el fin de evitar posibles contaminaciones que afecten tanto al rendimiento futuro del proceso como al producto final, se esteriliza todo el material a usar. Pero el hecho de mantener la esterilidad durante todo el proceso supone un elevado gasto a nivel energético. Por otro lado, el uso de sustratos de una alta pureza también conlleva un coste elevado, pudiendo llegar a suponer el 45% del total de los costes de producción (Kourmentza *et al.*, 2017). Para contrarrestar parte del coste asociado al sustrato, se ha valorado la posibilidad de utilizar otras fuentes de carbono más económicas como aguas residuales o subproductos industriales. Sin embargo, los resultados de estos experimentos muestran que el porcentaje de PHA alcanzado es muy inferior a los resultados cuando se emplean los sustratos puros (Hermann-Krauss *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2016; Domingos *et al.*, 2018). Además, una de las contraindicaciones al uso de este tipo de sustratos en los cultivos puros es que las bacterias pueden llegar a sufrir un efecto de inhibición por la presencia de algún compuesto tóxico (Martinez *et al.*, 2015; Alsafadi & Al-Masaqbeh, 2017).

Una alternativa a los cultivos puros son los cultivos microbianos mixtos (MMC). Los MMC están compuestos por distintas poblaciones bacterianas dentro de una misma

comunidad microbiana y que operan sistemas biológicos abiertos (Reis *et al.*, 2011). Varios son los motivos que hacen que los MMC estén adquiriendo una gran repercusión en los últimos años. El hecho de trabajar en sistemas abiertos hace que los MMC no requieran condiciones de esterilidad, lo que permite disminuir el coste de producción asociado al gasto energético. Además, los MMC son sistemas mucho más robustos que los cultivos puros. Dicha robustez les permite soportar mejor la posible presencia de determinados compuestos tóxicos en el sustrato. Esto da lugar a que se puedan utilizar aguas residuales o subproductos industriales como fuente de carbono económica. Sin embargo, no todo son aspectos positivos. Por un lado, los MMC no tienen la capacidad de alcanzar tan altas densidades celulares como ocurre con los cultivos puros. Además, la capacidad de un MMC para acumular PHA en su interior tampoco llega a la altura de lo que puede lograr un cultivo puro. Sí que es cierto que, a día de hoy, los procesos con MMC se han optimizado hasta el punto de alcanzar porcentajes intracelulares bastante elevados. Sin ir más lejos, Johnson *et al.* (2009) alcanzaron un 89% del peso seco celular en forma de PHA. Sin embargo, los rendimientos se reducen cuando se quiere escalar el proceso (Tamis *et al.*, 2014).

A pesar de que a escala industrial los rendimientos del proceso bajan, la tecnología de los MMC tiene un gran potencial de futuro pues conjuga a la perfección con un modelo de economía circular. Los MMC promueven la reutilización de un residuo o subproducto industrial como materia prima para la producción de PHA, principio básico que rige el modelo de economía circular. Además, la huella de carbono asociada a esta tecnología es inferior a la de los cultivos puros, pues se consigue un ahorro energético importante. Es por ello que la presente investigación se centra en la producción de PHA de cadena corta a través del uso de los MMC.

---

#### 1.3.4.1 Producción de PHA a partir de los MMC

La metodología para producir PHA a través de MMC se basa en el principio natural de selección y competencia que existe entre los microorganismos que presentan la habilidad para acumular PHA y los microorganismos que no tienen dicha habilidad (Mannina *et al.*, 2020). El proceso cuenta con 3 etapas bien definidas, tal y como se representa en la Figura 1.10.

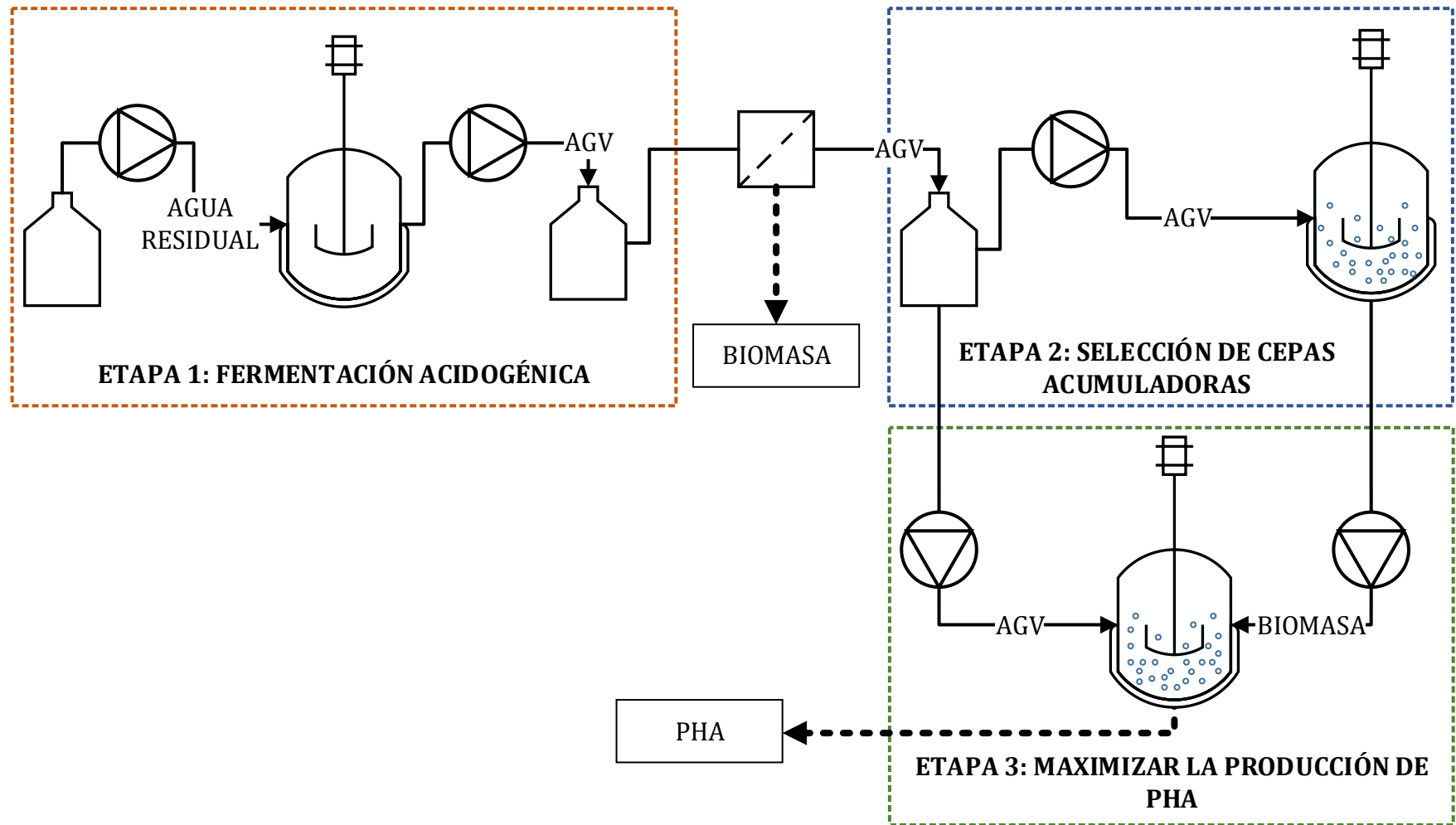


Figura 1.10. Proceso de 3 etapas para la producción de PHA a partir de MMC. Imagen adaptada de Albuquerque *et al.* (2007).

### 1.3.4.1.1 Etapa 1: Fermentación acidogénica

Durante la primera etapa, el sustrato, que consiste en un agua residual/subproducto industrial formado por materia orgánica compleja es transformado en AGV, siempre y cuando su contenido en estos ácidos grasos de cadena corta sea bajo. Estos AGV actuarán como precursores de los PHA en la segunda etapa del proceso, tal y como se observa en la Figura 1.10. La etapa de fermentación acidogénica (o acidogénesis) es un proceso totalmente anaerobio que se encuadra dentro de un proceso mucho más amplio como es el de la digestión anaerobia (DA). La DA consta de 4 reacciones que se van sucediendo consecutivamente la una a la otra y que están catalizadas por consorcios microbianos muy específicos (Angelidaki *et al.*, 2011). Estas 4 fases son la hidrólisis, la acidogénesis, la acetogénesis y la metanogénesis (Figura 1.11). Además, en cada una de estas fases se puede obtener una serie de productos de un alto interés biotecnológico (Dahiya *et al.*, 2018).

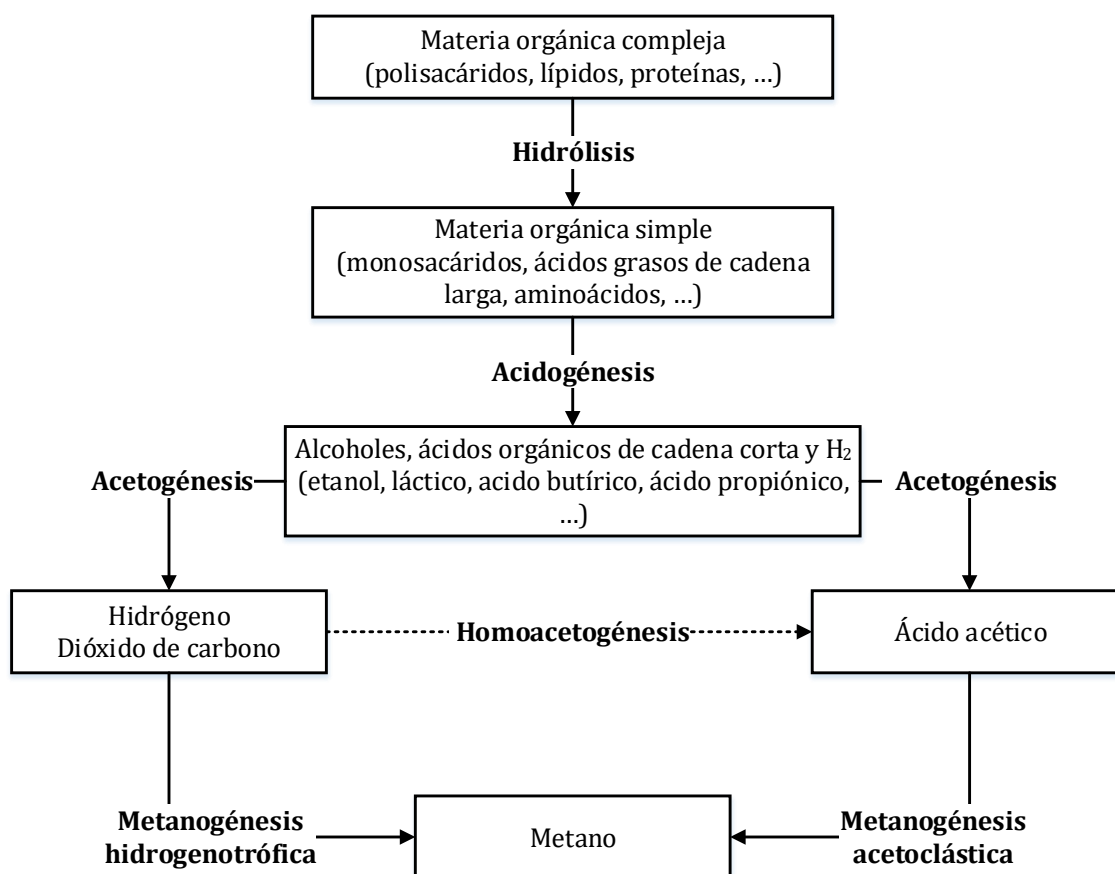


Figura 1.11. Proceso de digestión anaerobia. Imagen adaptada de Angelidaki *et al.* (2011).

Los microorganismos específicos de la etapa de hidrólisis, las bacterias hidrolíticas, son las encargadas de transformar la materia orgánica más compleja (polisacáridos, lípidos o proteínas, entre otros) en sus monómeros más simples (Figura 1.11). En la siguiente reacción, intervienen las bacterias acidogénicas que son las encargadas de convertir los monómeros simples (monosacáridos, ácidos grasos de cadena larga o aminoácidos, entre otros) en compuestos todavía más sencillos como los alcoholes o los ácidos orgánicos de cadena corta (ácido láctico, butírico, propiónico o valérico). Esta conversión es la que se conoce como fermentación acidogénica (Figura 1.11) y es el principal punto de interés para la síntesis de PHA vía MMC. Otro producto que también se origina durante la acidogénesis y que presenta un alto interés desde un punto de vista biotecnológico es el biohidrógeno. El proceso por el que se forma este biogás se denomina fermentación oscura (o *dark fermentation*). Durante la tercera reacción de la DA tiene lugar la acetogénesis, por la cual las bacterias acetogénicas producen ácido acético, uno de los sustratos más interesantes para la producción de PHA usando MMC (Días *et al.*, 2006). Finalmente, en el último eslabón de la cascada de reacciones de la DA se sitúa la metanogénesis. Se conoce como metanogénesis al proceso por el que las bacterias metanogénicas se encargan de producir metano a partir de los productos finales obtenidos en la etapa anterior (Figura 1.11). Las rutas para la formación de metano son dos. En primer lugar, las bacterias metanogénicas acetoclásticas son capaces de transformar el ácido acético en metano. Durante este proceso se libera también CO<sub>2</sub>. En segundo lugar, existe una ruta alternativa para la formación de metano por la que las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas son capaces de reducir el CO<sub>2</sub>.

Siendo conscientes de que la DA es un proceso secuencial en el que la fermentación acidogénica se sitúa en un punto intermedio, el éxito en la producción de AGV radica en el aislamiento de las dos (o tres) primeras reacciones del proceso y, a la vez, en interrumpir la metanogénesis. Para ello, es crucial la operación de los biorreactores en condiciones óptimas que permitan el desarrollo de una comunidad microbiana principalmente acidogénica e inhiban, en la medida de lo posible, el crecimiento de las poblaciones metanógenas. El pH quizá sea el parámetro más importante a la hora de establecer una buena selección en microorganismos con capacidad de producir AGV. En términos generales, la producción de AGV se ve inhibida a pH muy ácidos

(por debajo de 3) o muy alcalinos (por encima de 12), aunque la elección de su valor va a depender, en gran medida, del tipo de residuo empleado. Así, valores alcalinos de pH son más recomendados para la acidificación de lodos activos, pues favorecen la hidrólisis de la biomasa (Liu *et al.*, 2012; Jie *et al.*, 2014). Mientras, valores de pH ácidos son más recomendados para la acidificación de aguas residuales (Bengtsson *et al.*, 2008). Finalmente, el rango de pH 6 – 8 no es el más recomendado, ya que es el óptimo para el desarrollo de las poblaciones productoras de metano (Angelidaki *et al.*, 2011) aunque, tal y como se mencionó anteriormente, es algo que dependerá del sustrato utilizado. Jiang *et al.* (2013), por ejemplo, observaron que la producción de AGV a partir de residuos orgánicos era más efectiva a valores de pH entre 6 y 7. Otro factor clave en la producción de AGV es la temperatura. Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento óptima y alterar dicho valor puede promover cambios en la composición de la comunidad microbiana que afecten a la producción final de AGV. En la actualidad, ya se ha estudiado un amplio rango de temperaturas que van de condiciones psicrófilas (4° C) a condiciones hipertermófilas (80° C) (Lee *et al.*, 2014a). En general, la producción de AGV aumenta con la temperatura (Yuan *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013), aunque el hecho de trabajar a condiciones termófilas e hipertermófilas eleva los requerimientos energéticos necesarios para mantener dicho ambiente. Es por ello que el rango mesófilo (20 – 50° C) se considera el idóneo. El tiempo de retención, tanto hidráulico (TRH) como de sólidos (TRS), es otro de los factores que más influye en la producción de AGV. En principio, la aplicación de un TRH más grande favorece el proceso de acidogénesis, ya que los microorganismos tienen más tiempo para transformar los compuestos orgánicos del sustrato en AGV. Sin embargo, el alargar demasiado el TRH puede llevar a la producción de estos AGV hacia una fase de meseta (Fang & Yu, 2000). Por lo tanto, la aplicación de un TRH u otro dependerá de la facilidad del sustrato para ser biodegradado. En el caso del TRS ocurre lo contrario, un tiempo de retención más corto beneficiará la producción de AGV, ya que previene la aparición de poblaciones metanogénicas cuyos miembros presentan tasas de crecimiento más lentas. A pesar de que estos parámetros son los más importantes, hay otros parámetros que también tienen su influencia sobre la producción de AGV y que no han sido mencionados. Velocidad de carga orgánica (VCO), relación carbono nitrógeno (C/N) o disponibilidad de nutrientes, son algunos de ellos.



En resumen, para maximizar la producción de AGV es imprescindible aplicar unas condiciones operacionales que hagan prevalecer la fermentación acidogénica sobre los otros procesos que componen la DA. Al controlar estas condiciones a la vez que se selecciona una buena configuración de reactor, hace que muchos sustratos tengan un gran potencial para producir AGV. De hecho, muchos son ya los sustratos que han sido testados eficazmente para producir AGV: las melazas (Albuquerque *et al.*, 2010; Duque *et al.*, 2014), el suero lácteo (Domingos *et al.*, 2017; Calero *et al.*, 2018), las aguas residuales papeleras (Jiang *et al.*, 2012), las aguas residuales de la producción de aceite de palma y de aceite de oliva (Campanari *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014b), los lodos activos (Yu *et al.*, 2018; Iglesias-Iglesias *et al.*, 2019) o los residuos de la industria conservera (Bermúdez-Penabad *et al.*, 2017), entre otros.

#### *1.3.4.1.2 Etapa 2: Selección de cepas con gran capacidad para acumular PHA*

Esta segunda etapa tiene por objetivo seleccionar un MMC que presente, de manera estable, una gran capacidad para acumular PHA en su interior. Para ello se aplica un proceso de competencia natural en el que, por un lado, se favorece el desarrollo de cepas con capacidad de acumular PHA y, por el otro, se promueve la eliminación de cepas con baja o nula capacidad de acumular PHA. Dentro del proceso global de 3 etapas, se puede considerar a esta segunda etapa como el punto crítico del proceso, pues una buena selección maximizará la cantidad de biopolímero acumulado en el interior celular pero, una selección deficiente, hará que el proceso final sea mucho menos rentable.

Dos son las principales estrategias para introducir dicha competencia en el medio. En la primera estrategia se aplica una disponibilidad de un aceptor de electrones de manera intermitente. Mientras, en la segunda estrategia se aplica una disponibilidad intermitente de una fuente de carbono. En general, la intermitencia de componentes esenciales para el mantenimiento y el crecimiento celular (aceptor de electrones o fuente de carbono) generará una situación de estrés para la célula, la cual redirigirá su metabolismo hacia la síntesis de PHA (Mannina *et al.*, 2020). Con independencia de cuál sea la estrategia seleccionada para llevar a cabo el proceso de selección, los precursores para la síntesis de PHA mediante MMC van a ser los AGV que se han obtenido durante la fermentación acidogénica. Esto implica que los MMC utilizan la

primera ruta metabólica (Ruta I) de las descritas en el apartado [1.3.3](#) para la síntesis de los PHA.

### **Estrategia anaerobia/aerobia**

Se denomina estrategia anaerobia/aerobia (AN/AE) a la competencia que se genera al alternar la ausencia/presencia de un aceptor de electrones, el oxígeno. Durante la estrategia AN/AE se alternan procesos anaerobios con procesos aerobios. Durante la anaerobiosis, los microorganismos acumulan los AGV en forma de PHA debido a la total ausencia de un aceptor de electrones. Justo después de la anaerobiosis, se suministra aire a los microorganismos, que lo aprovechan para consumir el PHA acumulado y realizar las funciones de mantenimiento y crecimiento celular (Serafim *et al.*, 2008). Dos son los principales grupos de bacterias capaces de acumular PHA mediante esta estrategia: los organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) y los organismos acumuladores de glucógeno (GAO). El metabolismo entre ambos grupos de bacterias es muy similar. Durante la anaerobiosis, los AGV son acumulados en el interior celular en forma de PHA mientras que, simultáneamente a la acumulación, se consume glucógeno, un segundo polímero que actúa como fuente de energía (Serafim *et al.*, 2008). Durante la fase aerobia, ambos grupos microbianos utilizan las reservas de PHA para las funciones de mantenimiento y crecimiento celular, así como para la recuperación de las reservas de glucógeno (Serafim *et al.*, 2008). Sin embargo, existe una diferencia crucial entre el metabolismo de ambos grupos bacterianos. Mientras los GAO obtienen la energía para la acumulación de PHA exclusivamente de la degradación del glucógeno, los PAO emplean, en paralelo, una segunda fuente de energía al liberar fosfato al medio (Serafim *et al.*, 2008). Un esquema general de la estrategia de selección AN/AE, tanto para los PAO como para los GAO, se encuentra representada en la Figura 1.12.

Los porcentajes de PHA intracelular alcanzados al aplicar la estrategia AN/AE son muy bajos y, generalmente, no superan el 20% del peso celular en forma de PHA (Kourmentza *et al.*, 2017). Contrariamente, la estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF), de la que se hablará en el siguiente apartado, es capaz de superar con creces estos porcentajes de acumulación, siendo uno de los motivos por los que la estrategia AN/AE se ha visto prácticamente desplazada. Una mayor investigación

que mejore los porcentajes de acumulación podría dar impulso a esta estrategia, pues los costes del proceso son inferiores a los de la estrategia ADF ya que se ahorra parte del gasto energético asociado a la aireación.

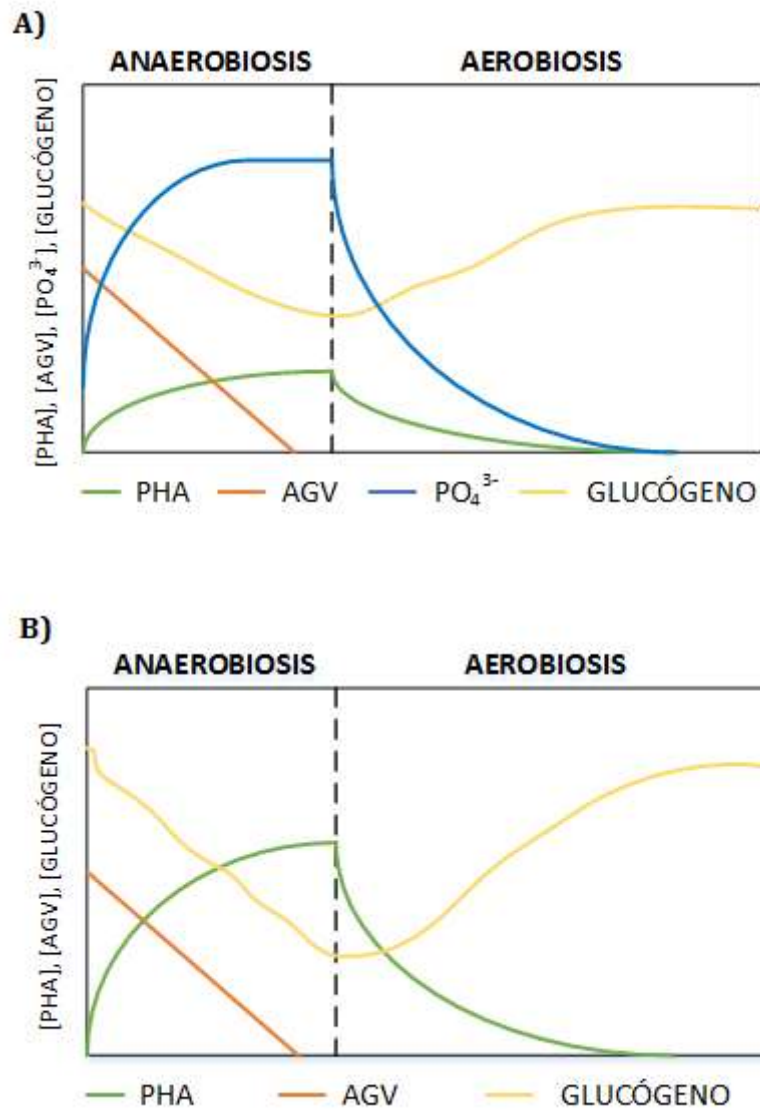


Figura 1.12. Estrategia AN/AE para la selección de microorganismos acumuladores de PHA. (A) PAO y (B) GAO.

## **Estrategia de alimentación dinámica aerobia**

Se denomina estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF) a la competencia que se promueve entre los distintos microorganismos al alternar la presencia (*feast*) y ausencia (*famine*) de una fuente de carbono, los AGV. Es un proceso totalmente aerobio. Durante la fase de *feast*, los microorganismos que tienen la capacidad para acumular PHA dirigen el carbono suministrado hacia este fin. Por el contrario, los microorganismos que carecen de esta capacidad utilizan el carbono para llevar a cabo otras funciones celulares. Es, durante la fase de *famine*, donde se produce la selección propiamente dicha. Los microorganismos con la capacidad de acumular PHA disponen de una ventaja adaptativa frente a aquellos microorganismos que no la tienen, esto es, son capaces de sobrevivir al periodo en el que la fuente de carbono no está disponible en el medio (Serafim *et al.*, 2008). Para ello, los microorganismos consumen las reservas de carbono en forma de PHA que habían sido acumuladas en la fase *feast* para realizar las funciones de mantenimiento y crecimiento celular.

Cuanto más corta sea la fase de *feast* y más larga sea la fase de *famine*, los procesos de selección serán mucho más intensos sobre la comunidad microbiana. De hecho, para ejercer una presión selectiva adecuada, la relación *feast/famine* (F/F) ha de ser igual o inferior a un valor de 0,25, según las observaciones realizadas por Dionisi *et al.* (2006). Las sucesivas alternancias entre fases *feast* y *famine*, hará que el número de bacterias sin capacidad de acumular PHA se minimice y que sean las poblaciones con capacidad de acumular PHA las que dominen la comunidad microbiana. Además, desde un punto de vista metabólico, alternar fases de *feast* con fases de *famine* hará que los componentes celulares destinados al crecimiento, tales como ARN y enzimas se reduzcan, redirigiéndose el metabolismo celular hacia la síntesis de PHA, que es la respuesta metabólica más rápida al requerir menos energía (Serafim *et al.*, 2008). Un esquema general de la estrategia ADF con las fases de *feast* y *famine* se muestra en la Figura 1.13.

A parte de la presencia/ausencia de una fuente de carbono, la presencia/ausencia de una serie de nutrientes esenciales durante la estrategia ADF es fundamental para definir una buena selección. Estos nutrientes son el nitrógeno y el fósforo. A pesar de que se ha conseguido seleccionar cepas acumuladoras de PHA de manera eficaz

tanto con exceso como con limitación de nutrientes (Serafim *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2014), los distintos trabajos de investigación van encaminados hacia una mejor selección cuando los nutrientes están disponibles para los microorganismos en la fase de *famine*. Durante esta fase, los microorganismos consumen el PHA que ha sido acumulado como reserva durante la fase de *feast* para realizar las funciones básicas de mantenimiento y crecimiento celular. Sin embargo, dicho consumo no se produce si hay limitación de uno o de ambos nutrientes. Por ejemplo, Johnson *et al.* (2010b) observaron que cuanto más baja fuese la relación C/N, más eficaz era la selección de cepas acumuladoras de PHA. De igual manera, Korkakaki *et al.* (2017) observaron que cuanto más alto fuese la relación carbono/fosfato (C/P), menos eficaz era la selección de cepas acumuladoras de PHA.

La selección bajo la estrategia ADF ha permitido maximizar el porcentaje de PHA acumulado en el interior celular en comparación a la estrategia AN/AE, tal y como se ha comentado anteriormente. Así, la máxima acumulación alcanzada a día de hoy se corresponde con el 89% del peso celular en forma de PHA, resultado obtenido por Johnson *et al.* (2009). Esta acumulación está al nivel de lo que se alcanza hoy en día en los cultivos puros, aunque para dicho experimento se simuló un agua residual como sustrato. Al emplear aguas residuales reales los resultados no han demostrado unos porcentajes de acumulación tan elevados, de momento. Los mejores resultados fueron obtenidos por Jiang *et al.* (2012) y por Albuquerque *et al.* (2010) con un 77 y un 74,6%, respectivamente. Al igual que ocurre en la fermentación acidogénica, las condiciones operacionales también son un factor muy importante a tener en cuenta durante la etapa de selección de cepas con capacidad para acumular PHA. Varios son los parámetros de operación que ya han sido estudiados para tratar de optimizar la selección y maximizar el porcentaje final de PHA. El pH (Montiel-Jarillo *et al.*, 2017), la temperatura (Ben *et al.*, 2016), la VCO (Albuquerque *et al.*, 2010) o el TRS (Johnson *et al.*, 2010b) son algunos de ellos. Además, a parte del estudio que supone aplicar unas condiciones u otras para la selección de las cepas acumuladoras de PHA, también se han aplicado algunas variantes a la estrategia ADF. Entre ellas destaca la decantación después de la fase de *feast* (Korkakaki *et al.*, 2016) o el desacoplamiento carbono/nitrógeno (Lorini *et al.*, 2020).

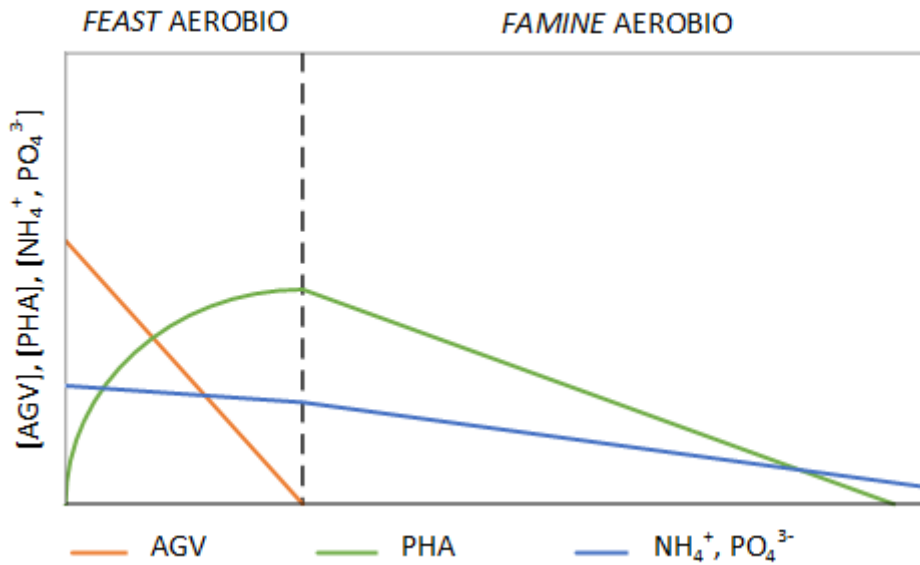


Figura 1.13. Estrategia ADF para la selección de microorganismos acumuladores de PHA.

#### 1.3.4.1.3 Etapa 3: Maximización en la producción de PHA

Una vez seleccionado un MMC con una gran capacidad de acumular PHA, la tercera etapa busca maximizar la acumulación del biopolímero en el interior de las células. Para ello, se diseñan ensayos *fed-batch* en los que parte de la biomasa seleccionada en la etapa anterior mediante la estrategia ADF es expuesta a una continua fase de *feast* en condiciones totalmente aerobias (Mannina *et al.*, 2020). Al contrario de lo que ocurre en la etapa de selección, en donde la presencia de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo es necesaria para compaginar acumulación y crecimiento, está demostrado que la presencia de nutrientes durante la etapa de producción limita el contenido final de PHA (Johnson *et al.*, 2010a; Montiel-Jarillo *et al.*, 2017). Además, uno de los parámetros más importantes a la hora de diseñar los ensayos *fed-batch* es la concentración de la alimentación introducida al interior del reactor, pues una concentración excesivamente elevada podría dar lugar a la inhibición del proceso de acumulación (Serafim *et al.*, 2004). Con la finalidad de evitar estos problemas de inhibición, varias han sido las estrategias de alimentación que se han propuesto para el diseño de estos experimentos. De entre todas ellas, dos han sido las estrategias de mayor éxito, la estrategia de alimentación por pulsos y la estrategia de alimentación en continuo.

### **Estrategia de alimentación por pulsos**

Durante la estrategia de alimentación por pulsos, el sustrato se suministra en lotes (o pulsos) sucesivos al interior del reactor a una concentración determinada. Cada uno de los pulsos se suministra al interior del reactor cuando el pulso anterior llega a su fin, el cual viene determinado por un indicador. En este caso, el indicador es el oxígeno disuelto (OD). Cuando el primer pulso es suministrado al medio, los microorganismos empiezan a consumir el sustrato. Paralelamente al consumo del sustrato se produce el consumo de un aceptor de electrones, en este caso el oxígeno. Esto supone que los niveles de OD en el medio alcancen su mínimo. En el preciso instante en el que el sustrato del primer pulso es consumido, los microorganismos dejan de necesitar el oxígeno y, en consecuencia, el OD vuelve a subir. Este ascenso en los niveles de OD marca el final del pulso y la posibilidad de añadir uno nuevo. A medida que los pulsos se van sucediendo, los microorganismos requieren, cada vez, menos oxígeno. Esto hecho es indicativo de la saturación a la que está sometida la biomasa e indica el final del experimento. Muchos son los trabajos que han optado por elegir esta estrategia como vía para maximizar el contenido de PHA intracelular: Duque *et al.* (2014), Palmeiro-Sánchez *et al.* (2016), Colombo *et al.* (2017), Oliveira *et al.* (2018) o Fra-Vázquez *et al.* (2019), entre otros.

### **Estrategia de alimentación en continuo**

Esta estrategia se diferencia de la anterior en que en ningún momento el sustrato es totalmente consumido y los microorganismos siempre tienen una fuente de carbono disponible en el medio. Al comenzar el experimento, la biomasa se alimenta con un pulso de sustrato a una concentración determinada. A partir de este punto, la fuente de carbono es suministrada de manera continua en función de otro indicador, el pH. El fundamento de esta estrategia se basa en el hecho de que el valor de pH aumenta a medida que los microorganismos consumen los AGV del medio. Como medida para controlar la excesiva alcalinidad que se pueda generar en el medio, se añade una disolución ácida que contiene AGV. La disolución de AGV tiene una doble función y actúa a la vez como sustrato y como controladora del valor de pH. A lo largo de esta estrategia, los niveles de OD descienden al principio del experimento con la adición del primer pulso y se mantienen bajos hasta que, gradualmente, suben cuando la

biomasa llega a su punto de saturación, indicando el final del experimento. Otros muchos han sido los trabajos de investigación que también han optado por el uso de esta estrategia: Johnson *et al.* (2009), Johnson *et al.* (2010a), Marang *et al.* (2013) o Korkakaki *et al.* (2017), entre otros.

#### **1.4 ECONOMÍA CIRCULAR Y SUERO LÁCTEO**

La industria láctea es una de las industrias agroalimentarias más importantes a nivel mundial. Los productos lácteos en todas sus formas (leche, yogur, mantequilla, queso, etc.), son alimentos con una gran importancia dentro de la dieta humana. Con independencia de cuál sea el producto final, la producción de derivados lácteos lleva asociado la generación de efluentes con un claro carácter contaminante, el cuál debe ser contrarrestado. Todos los efluentes de carácter lácteo se caracterizan por poseer elevadas cargas orgánicas que están asociadas, principalmente, a la presencia de carbohidratos y proteínas como la lactosa o la caseína, aunque también hay otros componentes que contribuyen a su carácter contaminante como son las grasas, los sólidos en suspensión o la presencia de determinados nutrientes como nitrógeno o fósforo (Prazeres *et al.*, 2012). De entre los distintos efluentes que se generan dentro de la industria láctea, son aquellos asociados a la formación del queso los que tienen una mayor carga contaminante. Durante la producción del queso se generan 3 tipos de efluentes que presentan distintas cargas contaminantes: el suero lácteo, el suero lácteo secundario y las aguas residuales del suero lácteo (Carvalho *et al.*, 2013). De entre todos ellos, es el suero lácteo el que representa la opción más contaminante (Zotta *et al.*, 2020).

Se estima que la producción mundial de suero lácteo asciende a 180 – 190 millones de toneladas al año (Baldasso *et al.*, 2011). De todas ellas, 40 millones se producen exclusivamente en la Unión Europea (Mollea *et al.*, 2013). A nivel estatal, y siempre según los datos que se recogen en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018), la producción de suero lácteo ascendió a 2,2 millones de toneladas en este último año. Sin embargo, sólo el 50% del suero lácteo que es producido anualmente se aprovecha (Mollea *et al.*, 2013).



Los procesos convencionales para el aprovechamiento del suero lácteo sólo se basan en la recuperación de determinados componentes a título individual como la lactosa, las proteínas, las grasas, los minerales o las vitaminas. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas del suero lácteo, entre ellas su alta biodegradabilidad, lo convierten en una opción ideal para ser bioconvertido en múltiples productos de alto interés biotecnológico (Siso, 1996). El desarrollo de procesos alternativos que promuevan este tipo de transformaciones, no sólo elevaría el porcentaje de suero lácteo que es recuperado, sino que también supondría un impulso en el desarrollo de un modelo mucho más sostenible en la gestión de residuos de la propia industria quesera. Hoy en día, entre dichos procesos cobran especial atención los procesos de valorización a través de fermentaciones microbianas. Gracias a estos procesos de bioconversión, el suero lácteo podría ser transformado en una amplia gama de nuevos productos con un alto valor comercial, tales como los ácidos orgánicos (Plessas *et al.*, 2008), las bacteriocinas (Sabo *et al.*, 2019), las proteínas celulares (Yadav *et al.*, 2014), los exopolisacáridos (Antunes *et al.*, 2015) o las enzimas (De León-Rodríguez *et al.*, 2006) (Figura 1.14).

Además, la alta biodegradabilidad por la que se caracteriza el suero lácteo también lo convierte en una muy buena opción para ser biotransformado en PHA siguiendo el proceso de 3 etapas diseñado para el uso de MMC. De hecho, muchos estudios ya han demostrado la viabilidad de este proceso (Duque *et al.*, 2014; Colombo *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017; Domingos *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2019). Tanto las proteínas como la lactosa que conforman el suero lácteo pueden ser fácilmente biodegradados a AGV, principales precursores de los PHA, siguiendo un proceso de fermentación acidogénica. Posteriormente, los AGV se pueden utilizar como fuente de carbono tanto para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA como para su posterior producción en masa mediante ensayos *fed-batch*.

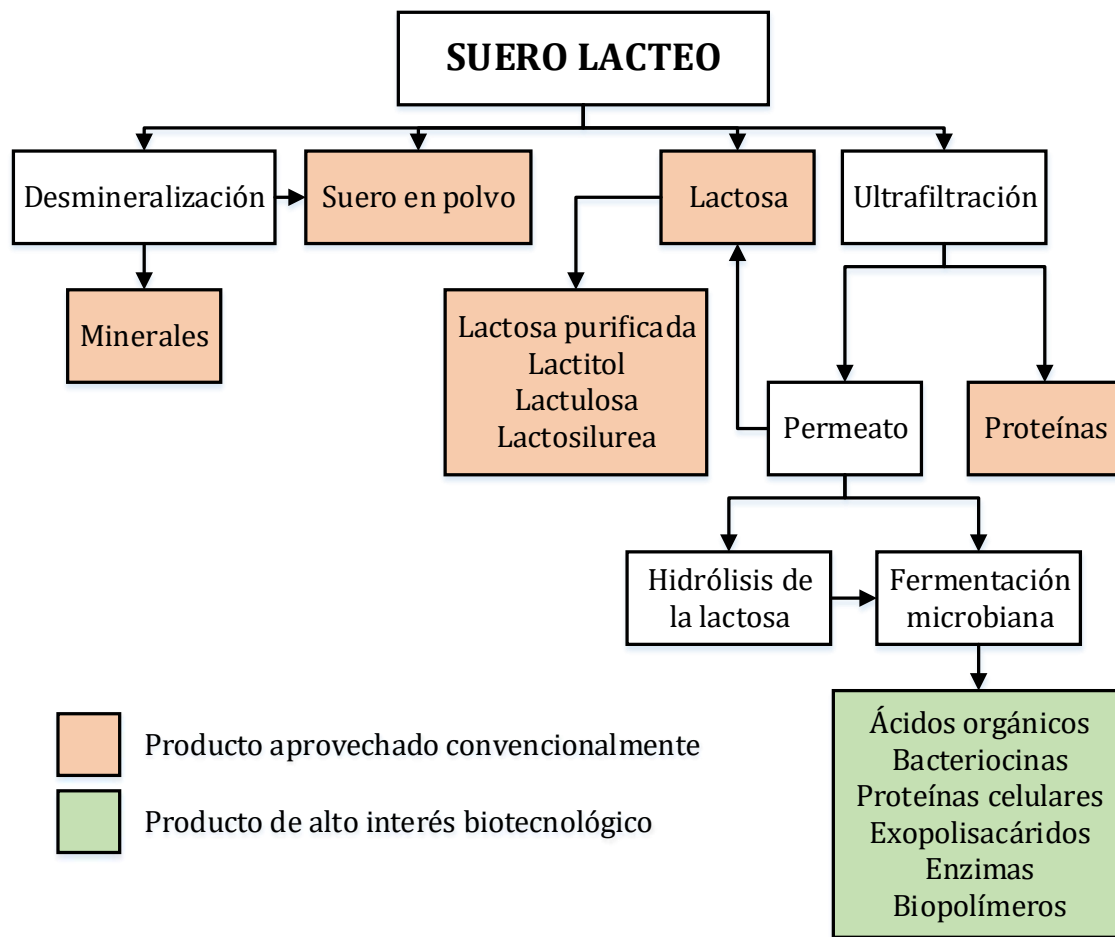


Figura 1.14. Recuperación y/o reutilización del suero lácteo y sus componentes. Imagen adaptada de Mollea *et al.* (2013).

## 1.5 OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La problemática actual que rodea a los plásticos convencionales derivados de los hidrocarburos acucia al ser humano a la búsqueda de una alternativa mucho más sostenible con el medio ambiente. Los polímeros biodegradables obtenidos de recursos renovables se postulan como la piedra angular para la sustitución del modelo lineal que rige la producción de los plásticos sintéticos en pos de un modelo circular, que vaya de la mano de las nuevas políticas aplicadas por la Unión Europea. Los PHA se sitúan a la cabeza de los biopolímeros con mayor potencial de futuro, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, lo que los hace ser muy similares a algunos de los plásticos convencionales. Además, su producción mediante la tecnología de los MMC permite que se adapten mejor a un modelo de economía circular, pues se

pueden emplear subproductos industriales como fuentes de carbono baratas en lo que se conoce como procesos de valorización. Un subproducto industrial idóneo e infravalorado para estos procesos de valorización es el suero lácteo, que además es muy abundante en Galicia. En base a todos los antecedentes expuestos, el principal objetivo de la presente tesis doctoral consistió en la optimización del proceso de producción de PHA empleando el suero lácteo como sustrato. Para ello se empleó la tecnología de los MMC siguiendo el modelo de 3 etapas definido anteriormente. En paralelo, se diseñó un nuevo proceso de dos etapas para la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros.

Con este fin, la tesis se ha dividido en cuatro capítulos experimentales. El [Capítulo 3](#) expone una aproximación al proceso de fermentación acidogénica. En él, se trata de optimizar la producción de AGV utilizando suero lácteo como sustrato. En concreto, se recopilan los resultados de promover cambios en 3 parámetros esenciales en la operación del reactor biológico: el TRS, el TRH y la VCO. Para completar el capítulo, se hace un análisis de las poblaciones bacterianas que dominan la comunidad y, así, comprender mejor los procesos que gobiernan en el medio. El [Capítulo 4](#) se enfoca hacia las etapas 2 y 3 del modelo de 3 etapas que se representa en la Figura 1.10, la selección de cepas acumuladoras y la producción de PHA. En el transcurso de este capítulo se registra la evolución que sufre un MMC en su capacidad de acumular PHA desde que es inoculado hasta que se enriquece. Se promueven una serie de cambios en determinados parámetros operacionales a través de los cuales se pretende dirigir la selección de microorganismos hacia aquellos que tienen una mejor capacidad de acumular PHA. Para registrar dicha evolución, la investigación se completa con el análisis de las principales poblaciones que dominan la comunidad microbiana. En el [Capítulo 5](#) se contempla el efecto que tiene un cambio gradual en la composición de la alimentación sobre las dinámicas microbianas en un proceso de acidogénesis para la producción de AGV. Para ello, se diseña un proceso de codigestión entre el suero lácteo y el agua residual de la industria cervecera en el que este segundo aumenta progresivamente su porcentaje en el medio respecto al suero lácteo. Con este diseño, se pretende el estudio de las dinámicas poblacionales, pero también se promueven ensayos para la producción de PHA para determinar cómo el perfil de AGV afecta no solo a la acumulación final de PHA, sino también a la distribución monomérica final

de los biopolímeros. Finalmente, en el [Capítulo 6](#) se diseña una nueva estrategia de 2 etapas para llevar a cabo la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros.

## 1.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Albuquerque, M.G.E., Torres, C.A.V., Reis, M.A.M., 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Res.* 44, 3419 – 3433.
- 2 Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130, 411 – 421.
- 3 Alsafadi, D., Al-Mashaqbeh, O., 2017. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *N. Biotechnol.* 34, 47 – 53.
- 4 Alvim, C.B., Mendoza-Roca, J.A., Bes-Piá, A., 2020. Wastewater treatment plant as microplastics release source – quantification and identification techniques. *J. Environ. Manag.* 255, 109739.
- 5 Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 1977 – 1984.
- 6 Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2011. Biomethanation and its potential. *Methods Enzymol.* 494, 327 – 351.
- 7 Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161 – 174.
- 8 Antunes, S., Freitas, F., Alves, V.D., Grandfils, C., Reis, M.A.M., 2015. Conversion of cheese whey into a fucose- and glucuronic acid-rich extracellular polysaccharide by *Enterobacter* A47. *J. Biotechnol.* 210, 1 – 7.
- 9 Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I. C., 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381 – 386.

- 10 Ben, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2016. Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2817 – 2826.
- 11 Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochem. Eng. J.* 40, 492 – 499.
- 12 Bermúdez-Penabad N., Kennes C., Veiga M.C., 2017. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. *Waste Manag.* 68, 96 – 102.
- 13 Calero, R.R., Lagoa-Costa, B., Fernandez-Feal, M.M.C., Kennes, C., Veiga, M.C., 2018. Volatile fatty acids production from cheese whey: influence of pH, solid retention time and organic loading rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 1742 – 1747.
- 14 Campanari, S., Silva, F.A., Bertin, L., Villano, M., Majone, M., 2014. Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater. *Int. J. Biol. Macromol.* 71, 34 – 41.
- 15 Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Tot. Environ.* 445 – 446, 385 – 396.
- 16 Chen, G., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2434 – 2446.
- 17 Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Galloway, T.S., 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1130 – 1137.
- 18 Colombo, B., Calvo, M.V., Sciarria, T.P., Scaglia, B., Kizito, S.S., D'Imporzano, G., Adani, F., 2019. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes. *Waste Manag.* 95, 22 – 31.
- 19 Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T.P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., Adani, F., 2017. Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of

- municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnol. Biofuels* 10, 201.
- 20 Colombo, B., Sciarria, T.P., Reis, M., Scaglia, B., Adani, F., 2016. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresour. Technol.* 218, 692 – 699.
- 21 Cruz, M.V., Freitas, F., Paiva, A., Mano, F., Dionísio, M., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2016. Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *N. Biotechnol.* 33, 206 – 215.
- 22 Dahiya, S., Kumar, A.N., Sravan, J.S., Chatterjee, S., Sarkar, O., Mohan, S.V., 2018. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* 248, 2 – 12.
- 23 De León-Rodríguez, A., Rivera-Pastrana, D., Medina-Rivero, E., Flores-Flores, J.L., Estrada-Baltazar, A., Ordoñez-Acevedo, L.G., Barba de la Rosa, A.P., 2006. Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. *Biomol. Eng.* 23, 299 – 305.
- 24 Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6, 885 – 906.
- 25 Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., Beccari, M., 2006. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotech. Bioeng.* 93, 76 – 88.
- 26 Domingos, J.M.B., Martinez, G.A., Scoma, A., Fraraccio, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., Reis, M.A.M., Fava, F., Bertin, L., 2017. Effect of operational parameters in the continuous anaerobic fermentation of cheese whey on titers, yields, productivities, and microbial community structures. *Sustainable Chem. Eng.* 5, 1400 – 1407.
- 27 Domingos, J.M.B., Puccio, S., Martinez, G.A., Amaral, N., Reis, M.A.M., Bandini, S., Fava, F., Bertin, L., 2018. Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chem. Eng. J.* 336, 47 – 53.

- 28 Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* 31, 276 – 288.
- 29 Emadian, S.M., Onay, T.T., Demirel, B., 2017. Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Manag.* 59, 526 – 536.
- 30 Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borrorro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS ONE* 9, 111913.
- 31 Fang, H.H.P., Yu, H.Q., 2000. Effect of HRT on mesophilic acidogenesis of dairy wastewater. *J. Environ. Eng.* 126, 1145 – 1148.
- 32 Fra-Vázquez, A., Santorio, S., Palmeiro-Sánchez, T., del Río, A.V., Mosquera-Corral, A., 2019. PHA accumulation of a mixed microbial culture co-exists with ammonia partial nitrification. *Chem. Eng. J.* 360, 1255 – 1261.
- 33 Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, 1700782.
- 34 Harding, K.G., Dennis, J.S., von Blottnitz, H., Harrison, S.T.L., 2007. Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *J. Biotechnol.* 130, 57 – 66.
- 35 Hermann-Krauss, C., Koller, M., Muhr, A., Fasl, H., Stelzer, F., Braunegg, G., 2013. Archaeal Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. *Archaea* 2013, 129268.
- 36 Iglesias-Iglesias, R., Campanaro, S., Treu, L., Kennes, C., Veiga, M.C., 2019. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. *Bioresour. Technol.* 291, 121817.
- 37 Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Sci.* 347, 768 – 771.

- 38 Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., Li, M., 2013. Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 143, 525 – 530.
- 39 Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517 – 5530.
- 40 Jie, W., Peng, Y., Ren, N., Li, B., 2014. Volatile fatty acids (VFAs) accumulation and microbial community structure of excess sludge (ES) at different pHs. *Bioresour. Technol.* 152, 124 – 129.
- 41 Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. 2009. *Biomacromol.* 10, 670 – 676.
- 42 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010a. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *J. Biotechnol.* 147, 73 – 79.
- 43 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010b. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Res.* 44, 2141 – 2152.
- 44 Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., Hankamer, B., 2019. Green bioplastics as part of a circular bioeconomy. *Trends Plant Sci.* 24, 237 – 249.
- 45 Khosravi-Darani, K., Bucci, D.Z., 2015. Application of poly(hydroxyalkanoate) in food packaging: improvements by nanotechnology. *Chem. Biochem. Eng.* 29, 275 – 285.
- 46 Kikuchi, Y., Oshita, Y., Mayumi, K., Hirao, M., 2017. Greenhouse gas emissions and socioeconomic effects of biomass-derived products based on structural path and life cycle analyses: A case study of polyethylene and polypropylene in Japan. *J. Clean. Prod.* 167, 289 – 305.
- 47 Kim, S., Dale, B.E., 2008. Energy and greenhouse gas profiles of polyhydroxybutyrates derived from corn grain: a life cycle perspective. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7690 – 7695.
- 48 Koller, M., 2018. Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Mol.* 23, 362 – 382.



- 49 Korkakaki, E., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2016. Survival of the fastest: Selective removal of the side population for enhanced PHA production in a mixed substrate enrichment. *Bioresour. Technol.* 216, 1022 – 1029.
- 50 Korkakaki, E., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2017. Impact of phosphate limitation on PHA production in a feast-famine process. *Water Res.* 126, 472 – 480.
- 51 Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioeng.* 4, 55 – 98.
- 52 Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014a. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* 235, 83 – 99.
- 53 Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014b. Influence of temperature on the bioconversion of palm oil mill effluent into volatile fatty acids as precursor to the production of polyhydroxyalkanoates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1038 – 1043.
- 54 Lemoigne, M., 1926. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8, 770 – 782.
- 55 Li, T., Ye, J., Shen, R., Zong, Y., Zhao, Y., Lou, C., Chen, G., 2016. Semirational approach for ultrahigh poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Escherichia coli* by combining one-step library construction and high-throughput screening. *Synth. Bio.* 5, 1308 – 1317.
- 56 Liu, H., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., Yu, H., 2012. Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. *Water Res.* 46, 799 – 807.
- 57 Lorini, L., di Re, F., Majone, M., Valentino, M., 2020. High rate selection of PHA accumulating mixed cultures in sequencing batch reactors with uncoupled carbon and nitrogen feeding. *N. Biotechnol.* 56, 140 – 148.
- 58 Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., Nava-Saucedo, J., 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* 73, 429 – 442.

- 59 Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M.E., 2020. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 297, 122478.
- 60 Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2013. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresour. Technol.* 142, 232 – 239.
- 61 Martinez, G.A., Bertin, L., Scoma, A., Rebecchi, S., Braunegg, G., Fava, F., 2015. Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biochem. Eng. J.* 97, 92 – 100.
- 62 Mattsson, K., Hansson, L.A., Cedervall, T., 2015. Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci.: Proces. Impacts* 17, 1712 – 1721.
- 63 Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., 2013. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. *IntechOpen* 549 – 588.
- 64 Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M.E., 2017. Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations. *Sci. Tot. Environ.* 583, 300 – 307.
- 65 Muhammadi, Shabina, Afzal, M., Hameed, S., 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem. Lett. Rev.* 8, 56 – 77.
- 66 Oliveira, C.S.S., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A., 2017. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *N. Biotechnol.* 37, 69 – 79.
- 67 Oliveira, C.S.S., Silva, M.O.D., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2018. Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. *Appl. Sci.* 8, 1817 – 1833.
- 68 Palmeiro-Sánchez, T., Fra-Vázquez, A., Rey-Martínez, N., Campos, J.L., 2016. Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture. *J. Hazard. Mater.* 306, 332 – 339.
- 69 Payne, J., McKeown, P., Jones, M.D., 2019. A circular economy approach to plastic waste. *Polym. Degrad. Stab.* 165, 170 – 181.

- 70 Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C.Q., Yu, H., Ge, C., 2020. Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats – A review. *Sci. Tot. Environ.* 698, 134254.
- 71 Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I., 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 233 – 247.
- 72 Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M., 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresour. Technol.* 99, 5951 – 5955.
- 73 Porter, M.M., Lee, S., Tanadchangsang, N., Jaremko, M.J., Yu, J., Meyers, M., McKittrick, J., 2013. Porous hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites fabricated by a novel method via centrifugation. *Mech. Biol. Syst. Mater.* 5, 63 – 71.
- 74 Prazeres, R.A., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *J. Env. Manag.* 110, 48 – 68.
- 75 Raza, Z.A., Abid, S., Banat, I.M., 2018. Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 126, 45 – 56.
- 76 Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., Majone, M., 2011. Mixed culture processes for polyhydroxyalkanoate production from agro-industrial surplus/wastes as feedstocks, in: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, B. V., The Netherlands, pp. 669 – 683.
- 77 Ribeiro, F., O'Brien, J.W., Galloway, T., Thomas, K.V., 2019. Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. *Trends Anal. Chem.* 111, 139 – 147.
- 78 Sabo, S.S., Converti, A., Ichiwaki, S., Oliveira, R.P.S., 2019. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *J. Dairy Sci.* 102, 87 – 99.
- 79 Schwabl, P., Koppel, S., Konigshofer, P., Bucsecs, T., Trauner, M., Reiberger, T., Liebmann, B., 2019. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Ann. Intern. Med.* 171, 453 – 457.

- 80 Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2008. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 81, 615 – 628.
- 81 Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145 – 160.
- 82 Shogren, R., Wood, D., Orts, W., Glenn, G., 2019. Plant-based materials and transitioning to a circular economy. *Sustain. Prod. Consum.* 19, 194 – 215.
- 83 Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour. Technol.* 57, 1 – 11.
- 84 Sussarello, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lamber, C., Fabloux, C., Pernet, M.E.J., Le Goic, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *PNAS* 113, 2430 – 2435.
- 85 Tamis, J., Luzkov, K., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2014. Enrichment of *Plasticicumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *J. Biotechnol.* 192, 161 – 169.
- 86 Tan, G.A., Chen, C., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J., 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polym.* 6, 706 – 754.
- 87 Tang, X.Z., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K.P., 2012. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 426 – 442.
- 88 Wang, S., Chen, W., Xiang, H., Yang, J., Zhou, Z., Zhu, M., 2016. Modification and potential application of short-chain-length polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polym.* 8, 273 – 301.
- 89 Winnacker, M., 2019. Polyhydroxyalkanoates: recent advances in their synthesis and applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 121, 1900101.
- 90 Yadav, J.S.S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1017 – 1029.

- 91 Yin, J., Chen, J., Wu, Q., Chen, G., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 33, 1433 – 1442.
- 92 Yin, L., Liu, H., Cui, H., Chen, B., Li, L., Wu, F., 2019. Impacts of polystyrene microplastics on the behaviour and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *J. Hazard. Mater.* 380, 120861.
- 93 Yu, L., Zhang, W., Liu, H., Wang, G., Liu, H., 2018. Evaluation of volatile fatty acids production and dewaterability of waste activated sludge with different thermo-chemical pretreatments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 129, 170 – 178.
- 94 Yuan, Q., Sparling, R., Oleszkiewicz, J.A., 2011. VFA generation from waste activated sludge: Effect of temperature and mixing. *Chemosphere* 82, 603 – 607.
- 95 Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., Gullo, M., 2020. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2749 – 2764.

## 1.7 REFERENCIAS WEB

- 1 Ellen Macarthur Foundation, 2017. The new plastics economy: rethinking the future of plastics and catalysing action. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics-catalysing-action>
- 2 European Bioplastics, 2019. <https://www.european-bioplastics.org/>
- 3 European Commission, 2015. Closing the loop: commission adopts ambitious new circular economy package to boost competitiveness, create jobs and generate sustainable growth. [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP\\_15\\_6203](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_15_6203)
- 4 Eurostat, 2019. Waste statistics. [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste\\_statistics#Total\\_waste\\_generation](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics#Total_waste_generation)
- 5 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018. Producción anual y destinos de la leche en las industrias lácteas. [https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro\\_b\\_2018\\_tcm30-512515.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro_b_2018_tcm30-512515.pdf)

- 6 PlasticsEurope and European Association of Plastics Recycling (EPRO), 2017. Plastics – the facts 2017. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/274-plastics-facts-2017>
- 7 PlasticsEurope and European Association of Plastics Recycling (EPRO), 2019. Plastics – the facts 2019. <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>
- 8 United Nations Environment Programme, 2018. The state of plastics: world environment day outlook 2018. <http://hdl.handle.net/20.500.11822/25513>
- 9 World Wildlife Found and Global Footprint Network, 2019. European Union overshoot day report. <https://www.footprintnetwork.org/content/uploads/2019/05/WWF-GFN-EU-Overshoot-Day-report.pdf>

# Capítulo 2

---

---

## Material y métodos

### 2.1 RESUMEN

En el presente capítulo se define todo el equipamiento experimental utilizado a lo largo de la investigación en donde se incluyen los diferentes sustratos y reactores. A mayores se definen las técnicas analíticas empleadas para la determinación de todos los parámetros de interés.





## 2.2 EQUIPAMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.2.1 SUSTRATOS

A lo largo de la presente investigación se emplearon, principalmente, tres sustratos diferentes. En primer lugar, se utilizó un subproducto industrial proveniente de la industria quesera como el suero lácteo ([Capítulos 3 y 5](#)). En segundo lugar, se utilizó otro subproducto industrial, en este caso, proveniente del sector cervecero como el agua residual de la industria cervecera ([Capítulo 5](#)). Finalmente, para los ensayos en los que se investigó la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros, se usó como sustrato varios de los efluentes provenientes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis ([Capítulo 6](#)).

#### 2.2.1.1 Suero lácteo

El suero lácteo fue suministrado por una empresa gallega dedicada a la producción de quesos. Este efluente se caracterizó por un alto contenido en materia orgánica fácilmente biodegradable. Las propiedades fisicoquímicas de los diferentes lotes se caracterizaron por mantener una gran homogeneidad a lo largo del tiempo. Además, la empresa suministradora sometió al suero lácteo a procesos de ultrafiltración para el propio aprovechamiento de las proteínas. Esto hizo disminuir la fracción proteica del suero lácteo y aumentar la fracción de azúcares. Su demanda química de oxígeno (DQO) soluble osciló en torno a 54 – 56 g DQO L<sup>-1</sup>, de la cual el 90% se correspondió con la lactosa. El otro 10% de la carga orgánica se completó, por una parte, con la presencia de una pequeña fracción proteica que quedó a pesar de los procesos de ultrafiltración y, por la otra, con la presencia de determinados ácidos orgánicos como el ácido láctico o el ácido acético. El contenido amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) disponible para el crecimiento bacteriano provino de dos fuentes principales: (1) una pequeña cantidad de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disuelta en el medio que varió entre 10 – 80 mg L<sup>-1</sup> en función de los lotes y (2) el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> asociado a las proteínas. Finalmente, el contenido en fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) tuvo concentraciones algo más elevadas, con un valor de aproximadamente 300 mg L<sup>-1</sup>.

---

### 2.2.1.2 Agua residual de la industria cervecera

El agua residual de la industria cervecera fue suministrada por otra empresa gallega, en este caso del sector cervecero y, al igual que en el caso del suero lácteo, la materia orgánica se caracterizó por su fácil biodegradabilidad. Los diferentes lotes también presentaron una gran homogeneidad aunque, con respecto al suero lácteo descrito anteriormente, el agua residual de la industria cervecera presentó una DQO soluble mucho más baja. Su concentración varió en torno a un valor de 4,8 g DQO L<sup>-1</sup>. El 71% de la DQO se correspondió con la presencia de etanol, su fuente principal de carbono, mientras que el 29% restante estuvo distribuido entre varios ácidos grasos volátiles (AGV), incluyendo el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico. Otra de las características de este subproducto industrial fue su bajo contenido en nutrientes, en torno a 1 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 8 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

---

### 2.2.1.3 Efluentes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis

El sustrato para la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros provino de la fermentación anaerobia del gas de síntesis que se realizó en el propio laboratorio. En concreto, fueron tres los efluentes que se utilizaron, cada uno proveniente de una fermentación diferente (Abubackar *et al.*, 2015; Fernández-Naveira *et al.*, 2017; Arslan *et al.*, 2019). Cada una de las fermentaciones se caracterizó por haber sido catalizada por una cepa diferente del género *Clostridium* (Tabla 2.1). En cuanto a sus características fisicoquímicas, todos los efluentes presentaron una carga orgánica fácilmente biodegradable. La principal fuente de carbono estuvo compuesta por una mezcla variable de alcoholes y AGV, aunque hubo un pequeño porcentaje de la DQO que se correspondió con otros compuestos que no han sido identificados (Tabla 2.1). Además, cada uno de los efluentes tuvo una composición variable en el contenido de sus nutrientes. Debido a que las características fisicoquímicas de los tres efluentes fueron diferentes entre sí, su composición se resumió en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Características de cada uno de los efluentes provenientes de las fermentaciones anaerobias del gas de síntesis.

	<i>Efluente 1</i>	<i>Efluente 2</i>	<i>Efluente 3</i>
<i>Cepa</i>	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. carboxidivorans</i>	<i>C. aceticum</i>
<i>DQO (g L<sup>-1</sup>)</i>	13,43	11,73	12,48
<i>% AGV<sup>1</sup></i>	23,43	73,46	72,10
<i>% Alcoholes<sup>2</sup></i>	61,65	12,76	7,12
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</i>	37,69	387,00	0
<i>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</i>	368,15	40,00	1701
<i>Relación C/N</i>	356	30	∞
<i>Relación C/P</i>	36,49	293	7,34
<i>pH</i>	5,35	4,75	7,90

## 2.2.2 REACTORES

Cuatro tipos de reactores distintos se han utilizado en la presente investigación. De entre ellos, 2 de los reactores llevaron a cabo procesos anaerobios mientras que, los otros 2, llevaron a cabo procesos aerobios. Los cuatro tipos de reactores diferentes fueron:

- Reactor anaerobio discontinuo secuencial (AnSBR) ([Capítulo 3](#)).
- Reactor anaerobio de lecho de lodos en flujo ascendente (UASBR) ([Capítulo 5](#)).
- Reactor aerobio discontinuo secuencial (SBR) ([Capítulo 4](#)).
- Reactor aerobio para ensayos *fed-batch* ([Capítulo 4](#), [5](#) y [6](#)).

<sup>1</sup> Porcentaje de la DQO soluble que se correspondió con los AGV.

<sup>2</sup> Porcentaje de la DQO soluble que se correspondió con los alcoholes.

---

### 2.2.2.1 Reactor anaerobio discontinuo secuencial

El AnSBR se utilizó para llevar a cabo un proceso de fermentación acidogénica con producción final de AGV.

#### 2.2.2.1.1 Inóculo

El reactor fue inoculado con un cultivo microbiano mixto (MMC) procedente de otro AnSBR que, en ese preciso momento, también estaba trabajando en la producción de AGV (Calero *et al.*, 2017).

#### 2.2.2.1.2 Sustrato

El sustrato utilizado para alimentar la biomasa del AnSBR fue el suero lácteo. La alimentación se preparó semanalmente, en garrafas de vidrio (Pyrex) con 10 L de capacidad. Debido a su elevada carga orgánica, hubo que ajustar la concentración de la alimentación, diluyendo el suero lácteo con agua destilada. Una vez ajustada la carga orgánica, la alimentación fue autoclavada durante 10 minutos a 121° C y 1 bar de presión con la finalidad de evitar problemas de degradación y/o fermentación.

Debido a las bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  del suero lácteo y a que no hubo adición externa de ningún tipo de nutriente, el reactor trabajó siempre en condiciones N-limitantes. En cambio, los niveles de  $\text{PO}_4^{3-}$  del suero lácteo fueron algo más elevados, tal y como se mencionó en el apartado [2.2.1.1](#), lo que supuso que el reactor tuviese una concentración lo suficientemente elevada como para no trabajar en condiciones P-limitantes.

#### 2.2.2.1.3 Diseño

El reactor estuvo formado por una cuba y una tapa de vidrio (Afora) que permitieron un volumen de trabajo de 2 L (Figura 2.1). A su vez, la presencia de una camisa permitió la circulación de agua proveniente de un baño termostatzado (P-Selecta) para mantener la temperatura siempre estable. La temperatura se fijó en 30° C con independencia de cualquier otro parámetro operacional, con lo que se favoreció el desarrollo de una población mesófila. Una sonda de pH (Hamilton Easyferm Plus 325) ayudó a controlar la acidez del medio. Se estableció un valor de referencia para el pH de 5. Con el fin de regular el pH, la sonda hizo una medida en continuo de su

valor y cuando, debido a los procesos naturales de acidificación, este valor caía hasta 4,95 se activaba una bomba peristáltica de bajo caudal (Ismatec) que añadía NaOH 2 M hasta recuperar el valor de referencia. Se usó un agitador mecánico (Heidolph) para mantener el reactor en condiciones homogéneas y favorecer una buena mezcla entre el sustrato y los microorganismos. La agitación establecida no fue demasiado elevada, en torno a 80 rpm a lo largo de todo el trabajo de investigación.



Figura 2.1. Diseño del AnSBR para el tratamiento anaerobio del suero lácteo con producción final de AGV. De izquierda a derecha: alimentación en garrafa de 10 L; bombas peristálticas de alimentación (abajo), vaciado (en medio) y control de pH (arriba); cuba y tapa del reactor con agitador mecánico y sonda de pH.

La operación del AnSBR se programó para que trabajase de manera cíclica en lotes o *batch*. A lo largo de la investigación se trabajó con ciclos de 12 horas de duración (2 ciclos al día) y ciclos de 24 horas de duración (1 ciclo al día). Con independencia de la duración, cada ciclo estuvo compuesto por cuatro fases distintas que se fueron sucediendo la una a la otra (Figura 2.2). El ciclo se inició con la fase de alimentación

(5 min), en la que parte del sustrato fue introducido al interior del reactor a través de una bomba peristáltica de alto caudal (Dinko). Una vez suministrado el sustrato, tuvo lugar la fase de reacción. Ésta fue la fase principal en la que se llevó a cabo el proceso de transformación del sustrato en los productos de interés, los AGV. Esta fase tuvo una duración de 660 min para los ciclos de 12 horas y 1380 min para los ciclos de 24 horas. Al finalizar la fase de reacción tuvo lugar la fase de decantación (50 min), en la que se paró la agitación para favorecer la decantación de la biomasa en el fondo del reactor. Finalmente, una vez transcurrido el periodo de decantación, tuvo lugar la fase de vaciado (5 min) por la que se quitó del interior del reactor un volumen de sobrenadante gracias a una segunda bomba peristáltica de alto caudal (Dinko). El efluente, fermentado y rico en AGV, fue almacenado a 4° C para futuros experimentos. Una vez vaciado parte del volumen del reactor, el ciclo se volvió a iniciar con una nueva fase de alimentación (Figura 2.2).

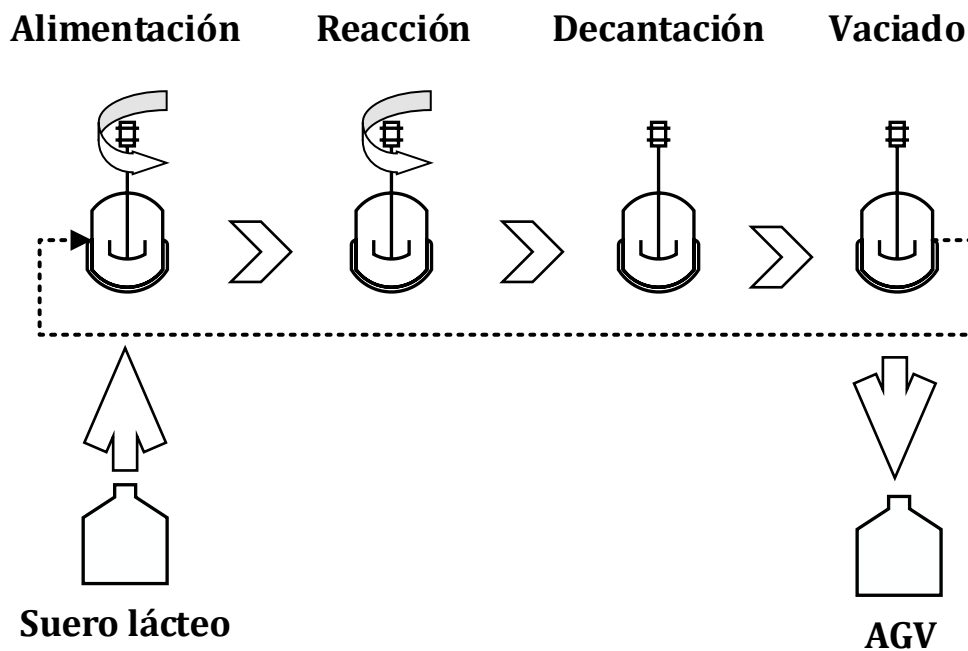


Figura 2.2. Ciclo del AnSBR con cada una de sus 4 fases.

A lo largo de toda la investigación, los periodos de alimentación, vaciado y agitación fueron controlados automáticamente por temporizadores. Un cuarto temporizador, además, permitió activar/desactivar la sonda de pH para evitar la adición de NaOH 2 M durante las fases de decantación y de vaciado. Finalmente, para controlar el tiempo de retención de sólidos (TRS) y, por lo tanto, la concentración de biomasa en el interior del reactor, se realizó una purga manual del contenido del AnSBR durante la fase de reacción.

---

### 2.2.2.2 Reactor anaerobio de lecho de lodos en flujo ascendente

El UASBR también se usó para llevar a cabo un proceso de fermentación acidogénica con producción final de AGV.

#### 2.2.2.2.1 Inóculo

El UASBR se inoculó, en este caso, con un MMC que procedía de un reactor anaerobio en donde la biomasa estaba enriquecida en poblaciones con capacidad de producir AGV a partir de suero lácteo (Lagoa-Costa *et al.*, 2020).

#### 2.2.2.2.2 Sustrato

La biomasa del UASBR se alimentó, de manera simultánea, con dos sustratos, en un proceso de codigestión. Los dos sustratos fueron el suero lácteo y el agua residual de la industria cervecera. La alimentación se preparó de una manera muy similar a la descrita anteriormente para el AnSBR. En función del experimento a desarrollar, se hizo la mezcla adecuada de suero lácteo y agua residual de la industria cervecera en una garrafa de vidrio (Pyrex) con capacidad para 10 L. Una vez ajustada la carga orgánica deseada, la alimentación se autoclavó durante 10 minutos a 121° C y 1 bar de presión para evitar procesos de degradación y/o fermentación.

Debido a la baja concentración de  $\text{NH}_4^+$  de los 2 sustratos, el UASBR trabajó siempre en condiciones N-limitantes, ya que ningún nutriente se añadió de manera externa. Sin embargo, al igual de lo ocurrido con el AnSBR, la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  disuelto en el suero lácteo fue lo suficientemente alta como para que el reactor no trabajase en condiciones P-limitantes.

### 2.2.2.2.3 Diseño

El reactor, cilíndrico y de vidrio (Afora), tuvo unas dimensiones de 63 cm de alto por 7 cm de diámetro interno, lo que permitió un volumen de trabajo de 1,1 L (Figura 2.3). Igualmente a lo ocurrido con el AnSBR, la presencia de una camisa en el UASBR permitió la circulación de agua procedente de un baño termostático (P-Selecta) para mantener siempre una temperatura constante. La temperatura se fijó en 30° C con independencia de cualquier otro parámetro operacional, con lo que se favoreció el desarrollo de una población mesófila. El control de la acidez del medio se hizo de la misma manera que en el caso del AnSBR. Una sonda (Hamilton Easyferm Plus 225) se introdujo en el interior del reactor e hizo una medida en continuo del pH. El valor de referencia del pH se estableció en 5 durante toda la investigación. Cuando, debido a los procesos naturales de acidificación, la acidez del medio aumentaba hasta un valor de 4,95, se activaba una bomba peristáltica (Watson Marlow) para introducir NaOH 2 M en el interior del reactor. En el momento en el que se recuperaba el valor de referencia (5), la bomba se desactivaba para evitar una excesiva alcalinidad en el medio. El diseño del reactor también incluyó una recirculación de su contenido. Esta recirculación fue posible gracias a la acción de una bomba peristáltica de alto caudal (Dinko) que sacó parte del líquido de la zona media/alta del reactor y lo reintrodujo por la parte inferior, generando así un flujo ascendente (Figura 2.3).

La entrada de la alimentación al interior del UASBR se produjo gracias a una bomba peristáltica de bajo caudal (Ismatec), la cual introdujo el sustrato a un flujo muy bajo. El volumen de sustrato introducido fue de 550 mL al día, lo que supuso que la tasa de renovación del volumen total del reactor fuese de dos días. En otras palabras, se estableció un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 2 días. La alimentación fue introducida por la zona inferior del reactor y, en simultáneo, se produjo el vaciado del efluente fermentado por la zona superior. El mecanismo de vaciado consistió en un simple proceso de desborde a medida que la alimentación se iba introduciendo al interior del reactor. Debido a sus buenas características de sedimentación, se formó un lecho de biomasa que impidió su lavado. Para mantener el TRS estable, el UASBR se purgó manualmente.



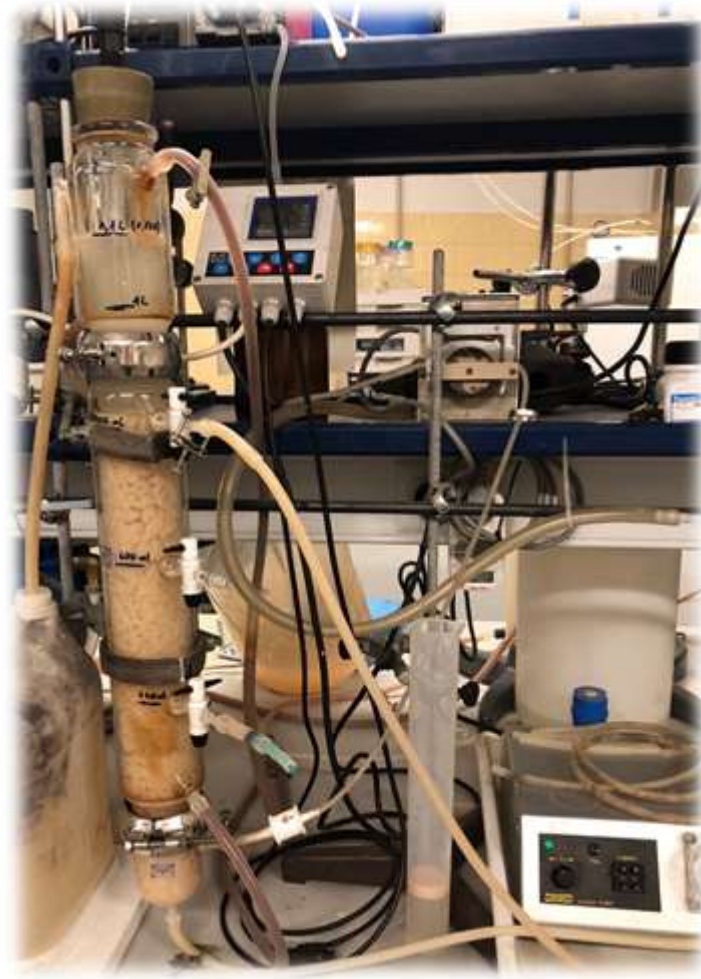


Figura 2.3. Diseño del UASBR para el tratamiento anaerobio conjunto del suero lácteo y agua residual cervecera con la finalidad de producir AGV. De izquierda a derecha: garrafa para la recogida del efluente (parte inferior izquierda); reactor de vidrio con la sonda de pH en su parte superior; bomba peristáltica para la alimentación (encima de la probeta); bomba peristáltica de recirculación (parte inferior derecha).

---

### 2.2.2.3 Reactor aerobio discontinuo secuencial

Se empleó el SBR para llevar a cabo el enriquecimiento de un MMC en poblaciones bacterianas con capacidad de acumular polihidroxicanoatos (PHA) en un proceso totalmente aerobio.

#### 2.2.2.3.1 Inóculo

El SBR fue inoculado con una mezcla de varios lodos activos provenientes de diferentes estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) locales.

#### *2.2.2.3.2 Sustrato*

El sustrato fue el efluente rico en AGV proveniente de la fermentación acidogénica del suero lácteo que se produjo durante la operación del AnSBR (Lagoa-Costa et al., 2020). Sin embargo, este efluente tuvo una carga orgánica más elevada de lo que era necesario, por lo que tuvo que ser diluido con agua de grifo. Se utilizaron garrafas de plástico de 10 L para preparar la alimentación. Una vez fue preparada, ésta se conservó en la nevera a 4° C para evitar posibles problemas de degradación. A parte de una fuente de carbono, en el caso del enriquecimiento de cepas acumuladoras de PHA también fue necesario suministrar una fuente externa de nutrientes (nitrógeno, fósforo y magnesio), ya que el suero lácteo careció de ellos y son esenciales para una buena selección de bacterias con capacidad de acumular PHA. Para ello, se preparó una segunda alimentación en otra garrafa de plástico de 10 L de capacidad, en la que se disolvió la cantidad adecuada de cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), potasio di-hidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) en agua. Además, también se añadió en la garrafa la concentración necesaria de tiourea (como agente inhibidor de las poblaciones nitrificantes) y hierro (como micronutriente).

#### *2.2.2.3.3 Diseño*

El reactor consistió en una cuba de vidrio (Afora) y una tapa de plástico (Figura 2.4). Permitió un volumen de trabajo de 2 L y, al igual que en el caso del AnSBR y del UASBR, presentó una camisa externa que facilitó la circulación del agua para mantener una temperatura constante. Se desarrolló una comunidad microbiana mesófila al establecer una temperatura de trabajo de 30° C. En este caso, se controló tanto la acidez como la alcalinidad del medio. Para ello, una sonda de pH (Hamilton Easyferm Plus 225) hizo una medida en continuo de este valor, el cual osciló siempre entre 8 – 8,5. Dos bombas peristálticas (Watson Marlow) fueron las encargadas de añadir NaOH y HCl 1 M para controlar los valores en ese rango. El aire introducido al interior del reactor fue generado en un compresor de aire instalado en el propio laboratorio (Puska) y una línea de gas lo condujo hasta las proximidades del reactor. Una electroválvula permitió abrir y cerrar el paso de aire hacia el reactor según interés y un rotámetro (Brooks) permitió controlar el caudal de aire que, finalmente, fue burbujeado al interior del reactor gracias a un difusor. Una segunda sonda

(Hamilton Visiform DO 225) registró los valores de oxígeno disuelto (OD) en el interior del reactor. Para promover una buena transferencia del oxígeno hacia las células, el caudal de aire se estableció en 1 unidad de volumen de aire por volumen de reactor y minuto (vvm). Además, para colaborar con la transferencia del oxígeno hacia las células, se utilizó un agitador mecánico (Heidolph) a una velocidad elevada (500 rpm) con la finalidad de distribuir el oxígeno por todo el reactor.



Figura 2.4. Diseño del reactor SBR aerobio para la selección de cepas acumuladoras de PHA. De izquierda a derecha: bombas peristálticas de sustrato (abajo), nutrientes (en medio) y vaciado (arriba); cuba con agitador mecánico, sonda de pH y sonda de OD; bombas peristálticas para el control de la acidez (abajo) y de la alcalinidad (arriba).

La operación del SBR se diseñó siguiendo una estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF) para la selección de cepas acumuladoras de PHA. Para ello, el reactor trabajó de manera cíclica en lotes o *batch*. Se establecieron dos ciclos diarios de 12 horas de duración en los que se fueron alternando 4 fases diferentes: alimentación (5 min), reacción (680 min), decantación (30 min) y vaciado (5 min) (Figura 2.5). La alimentación se introdujo al interior del reactor por medio de 2 bombas peristálticas (Dinko), una de ellas introdujo la fuente de carbono y la otra introdujo la fuente de nutrientes (Figura 2.4). Durante la fase de reacción se alternaron las fases de *feast* y

de *famine* que promovieron los procesos de competencia natural entre las bacterias con y sin capacidad de acumular PHA en su interior (apartado [1.3.4.1.2](#)). Al final de la etapa *famine*, se cerró el aporte de aire y se detuvo la agitación para inducir la decantación de la biomasa, la cual se depositó en el fondo del reactor. Por último, se utilizó una tercera bomba peristáltica de alto caudal (Dinko) para vaciar parte del volumen del reactor en la etapa de vaciado (Figura 2.4). El ciclo se volvió a iniciar con una nueva fase de alimentación (Figura 2.5).

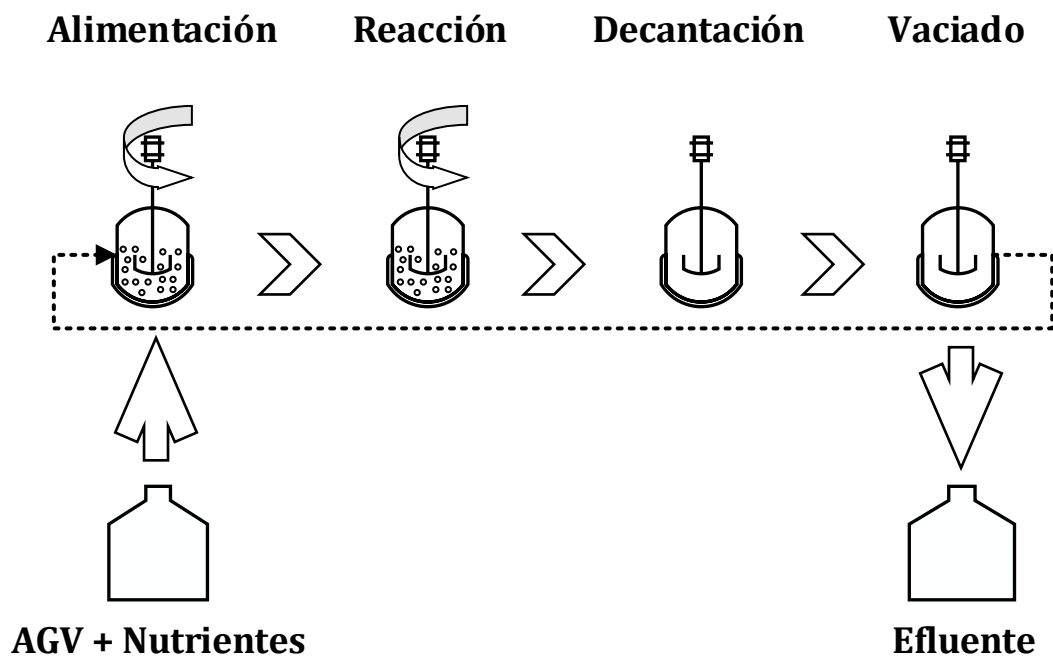


Figura 2.5. Ciclo del SBR con cada una de sus 4 fases.

A lo largo de toda la investigación, los procesos de alimentación, vaciado, aireación y agitación estuvieron controlados automáticamente por temporizadores. Un cuarto temporizador se programó para desconectar la sonda de pH durante los periodos de no agitación y evitar, así, la adición de NaOH y/o HCl 1 M cuando el reactor no estaba en mezcla completa. A diferencia del AnSBR y del UASBR, la purga para controlar el TRS se programó automáticamente.

---

#### 2.2.2.4 Reactor aerobio para ensayos *fed-batch*

Los experimentos en los que se evaluó la capacidad máxima de los microorganismos del MMC para acumular PHA, se llevaron a cabo en un segundo reactor aerobio por medio de una serie de experimentos de alimentación en discontinuo o *fed-batch*.

##### 2.2.2.4.1 Inóculo

Para realizar los ensayos tipo *fed-batch*, el reactor se inoculó con un MMC que había sido previamente enriquecido en cepas con capacidad de acumular PHA. A lo largo de toda la investigación se utilizaron varios MMC diferentes. Para inocular el reactor, se recogió un determinado volumen del correspondiente SBR de enriquecimiento y se introdujo en el interior del reactor para, posteriormente, ser alimentado según la estrategia de alimentación en discontinuo.

##### 2.2.2.4.2 Sustrato

De igual manera que se han utilizado varios MMC como inóculo para los ensayos *fed-batch*, también se han utilizado varios sustratos como fuente de carbono. Todos ellos se han caracterizado por su alta disponibilidad en AGV: el efluente fermentado de la fermentación acidogénica del suero lácteo, el efluente fermentado de la codigestión entre suero lácteo y agua residual de la industria cervecera y los diferentes efluentes de las fermentaciones anaerobias del gas de síntesis.

##### 2.2.2.4.3 Diseño

El reactor consistió en una cuba de vidrio (Afora) y una tapa de plástico (Figura 2.6). Tuvo una capacidad para un volumen de trabajo de 2 L y, al igual que en el resto de los casos, una camisa externa permitió la circulación de agua a 30° C proveniente de un baño termostático (P-Selecta). Las condiciones de operación fueron las mismas en las que se enriqueció el correspondiente MMC. Una sonda de pH (Hamilton Easyferm Plus 225) hizo una medición en continuo de este valor y gracias a 2 bombas peristálticas de bajo caudal (Watson Marlow) se controló tanto la acidez como la alcalinidad en el medio al introducir NaOH y HCl 1 M. También se usó una segunda sonda (Hamilton Visiferm DO 225) para registrar la variación en los niveles de OD durante los ensayos *fed-batch*. El aire necesario para los microorganismos se generó en un compresor y se burbujeó al interior del reactor por un difusor. El flujo



de aire se adecuó a 1 vvm gracias a un rotámetro (Brooks). Finalmente, un agitador mecánico (Heidolph) contribuyó a distribuir el oxígeno por todo el reactor con el fin de favorecer su transferencia hacia las células, así como para favorecer también una buena mezcla entre el sustrato y los microorganismos.

Tal y como se mencionó con anterioridad, los ensayos para determinar la capacidad máxima de acumular PHA se diseñaron siguiendo una alimentación en discontinuo o *fed-batch* y por pulsos, similar a lo descrito por Valentino *et al.* (2015). Cada pulso se introdujo al interior del reactor cuando los microorganismos consumían todo el sustrato del pulso anterior, hecho que vino determinado por los valores de OD en el medio, tal y como se describió en el apartado [1.3.4.1.3](#). El final del experimento vino marcado por la saturación de la biomasa, hecho que se reflejó en que el OD del medio apenas bajó al introducir los nuevos pulsos de alimentación.



Figura 2.6. Diseño del reactor tipo *fed-batch* para maximizar la acumulación de PHA. De izquierda a derecha: bombas peristálticas para el control de la acidez (abajo) y alcalinidad (arriba) (parte inferior izquierda); reactor con las sondas de pH y OD y el agitador

## 2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

Para cuantificar la materia orgánica presente en las muestras se siguió el método de la DQO descrito en los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). Según este método, se valora la cantidad de oxígeno necesario para oxidar toda la materia orgánica de las muestras. Las muestras se sometieron a una digestión en exceso de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) como agente oxidante, sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ) como agente catalizador de la reacción de oxidación y sulfato de mercurio ( $HgSO_4$ ) para evitar interferencias con el ion cloruro. La digestión se hizo en un termobloque (P-Selecta) a  $150^\circ C$  durante 2 horas y el exceso de  $K_2Cr_2O_7$  fue valorado con sulfato amónico ferroso ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ). La ferroína se utilizó como indicador. Al conocerse el exceso de  $K_2Cr_2O_7$  se pudo calcular, por retroceso, la cantidad de  $K_2Cr_2O_7$  empleado y, finalmente, la cantidad de oxígeno necesaria para la oxidación de la materia orgánica.

### 2.3.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMONIO DISUELTO

La determinación del  $NH_4^+$  disuelto se hizo por el método del fenol, muy similar al método automatizado del fenol descrito en los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). Se trató de un método colorimétrico basado en la reacción del fenol y el hipoclorito sódico con el  $NH_4^+$  en condiciones alcalinas para formar el azul de indofenol. La intensidad del color azul de las muestras fue proporcional al contenido de  $NH_4^+$ . Se utilizó un espectrofotómetro (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 635 nm para realizar la medida colorimétrica. Finalmente, la cuantificación de las muestras se hizo mediante una recta de calibrado utilizando una disolución de cloruro amónico ( $NH_4Cl$ ) como estándar.

### 2.3.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFATO DISUELTO

Para la determinación del  $PO_4^{3-}$  disuelto se siguió el método del cloruro de estaño descrito en los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). Se trató de un método colorimétrico, basado en la reacción del  $PO_4^{3-}$  con el molibdato amónico para dar lugar al ácido molibdofosfórico. Este ácido fue reducido con la adición de cloruro de estaño ( $SnCl_2$ ) para dar lugar al azul de molibdeno. La

intensidad del color azul de la muestra fue directamente proporcional al contenido de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Se utilizó un espectrofotómetro (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 690 nm para realizar la medida colorimétrica. Finalmente, la cuantificación de las muestras se realizó con una recta de calibrado, utilizando una disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como estándar.

---

#### 2.3.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

Para determinar los sólidos en suspensión totales (SST) y los sólidos en suspensión volátiles (SSV) se siguió lo establecido en los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). El procedimiento se inició con la calcinación de los filtros de fibra de vidrio en una mufla (Obersal) a  $550^\circ\text{C}$ . Una vez fríos, los filtros se pesaron para obtener el peso inicial ( $P_0$ ). Una vez obtenido el peso inicial, los filtros se pusieron en la placa filtrante y se filtró un volumen de muestra conocido ( $V$ ). Los filtros, con los sólidos totales en su superficie, se secaron a  $105^\circ\text{C}$  en una estufa (P-Selecta) durante 1 hora y, una vez fríos, se volvieron a pesar ( $P_1$ ). El cálculo de los SST se hizo siguiendo la ecuación 2.1:

$$\text{SST} = \frac{P_1(\text{g}) - P_0(\text{g})}{V(\text{L})} \quad (2.1)$$

Después de haber obtenido el  $P_1$ , los filtros se volvieron a meter en la mufla durante media hora a  $550^\circ\text{C}$  con la finalidad de determinar los SSV. Una vez calcinados los sólidos, se volvieron a pesar los filtros ( $P_2$ ). El cálculo de los SSV se hizo siguiendo la ecuación 2.2:

$$\text{SSV} = \frac{P_1(\text{g}) - P_2(\text{g})}{V(\text{L})} \quad (2.2)$$

---

#### 2.3.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS SOLUBLES EN AGUA

Los principales compuestos de interés solubles en agua a lo largo de la presente investigación fueron la lactosa, los alcoholes y los ácidos orgánicos de cadena corta. La determinación de estos compuestos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo fue un cromatógrafo HP Serie 1260 Infinity II (Agilent) en el que se acopló una columna de intercambio iónico Hi-Plex H (Agilent) con su correspondiente pre-columna, ambas especializadas en la separación de ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes. La fase móvil ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 0,05 M y con un flujo



de 0,8 mL min<sup>-1</sup>) fue la encargada de, en primer lugar, dirigir los compuestos por la columna en donde se separaron y, en segundo lugar, dirigirlos hacia los detectores. Para la detección se usaron dos detectores diferentes: un detector en red de diodos (DAD) que midió en el rango UV del espectro electromagnético con una longitud de onda de 210 nm y un detector por índice de refracción (RID). La temperatura de la columna fue ajustada a 45° C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL.

A lo largo de la presente investigación también se utilizó un segundo equipo HPLC. En este caso, el equipo fue un cromatógrafo HP Serie 1100 (Agilent) acoplado a otra columna de intercambio iónico, una C – 610 (Supelco) con su correspondiente pre-columna. La fase móvil fue ácido fosfórico al 0,1% con un flujo de trabajo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección fue de 10 µL. La detección en este segundo equipo se realizó de la misma manera que para el primer equipo: con un detector DAD y otro RID. La temperatura de trabajo de la columna fue de 30° C.

Independientemente del cromatógrafo empleado, los diferentes compuestos fueron identificados por sus respectivos tiempos de retención y la cuantificación se realizó con una recta de calibrado usando compuestos sintéticos como estándares de cada uno de los compuestos de interés. La recta de calibrado abarcó el rango 0 – 3000 mg L<sup>-1</sup>.

---

### 2.3.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO

El contenido proteico del suero lácteo no fue monitorizado durante los procesos de fermentación acidogénica, pero sí que se determinó el contenido proteico de cada uno de los lotes que se usaron a lo largo de toda la investigación. Para ello se usó el método colorimétrico de Bradford que consistió en la unión del colorante azul de Comassie con las proteínas de la muestra. El agregado colorante-proteína adquirió una coloración azulada que permitió su determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm. A mayor intensidad de color azul, mayor concentración de la proteína en la muestra. Las absorbancias se contrastaron con una recta patrón de albumina de suero bovino como estándar para determinar la concentración final de proteína en las muestras. El rango de la recta patrón abarcó 0 – 1 g L<sup>-1</sup>.

---

### 2.3.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

El contenido intracelular de PHA fue determinado por cromatografía de gases (CG). El procedimiento fue muy similar al descrito por Braunegg *et al.* (1978) y Comeau *et al.* (1988), acoplado las posteriores modificaciones realizadas por Satoh *et al.* (1992).

El proceso completo constó de tres fases principales: digestión, extracción y análisis vía CG. Las muestras de biomasa fueron liofilizadas durante, al menos, 24 horas para eliminar todo el agua. Para liberar el biopolímero del interior celular, fue necesaria una rotura íntegra de todas las estructuras celulares, y es por ello que se procedió a hacer una digestión ácida de las muestras. Los *pellets* de biomasa se introdujeron en tubos de vidrio (Pyrex) de 10 mL y la digestión se realizó en un termobloque (Velp Scientifica) a 100° C durante 3,5 horas. Para la digestión de los *pellets* se usaron dos disoluciones: 1 mL de una disolución de metanol acidificado al 20% con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1 mL de una disolución de cloroformo con una concentración conocida de un patrón interno (n-heptadecano). La adición del metanol acidificado permitió la metilación de todos los monómeros, tanto hidroxibutirato (HB) como hidroxivalerato (HV) y su posterior detección por CG. Una vez finalizada la digestión, se dejaron enfriar todas las muestras. Una vez frías, se les añadió 1 mL de agua destilada con la finalidad de hacer una extracción líquido – líquido. Las muestras se agitaron en vórtex durante 1 minuto y la fase acuosa se separó de la fase orgánica. De ambas, se recogió la fase orgánica que fue en la que se encontraban los monómeros metilados, tanto HB como HV, y se depositó en un vial de CG para su posterior análisis. Por último, las muestras se analizaron vía CG usando un cromatógrafo de gases Focus GC (Thermo) acoplado a un detector de ionización en llama (FID). Las condiciones de análisis así como las rampas de temperatura fueron las mismas descritas por Lagoa-Costa *et al.* (2017). Se usó una columna SPB – 1 (Supelco) de 30 m de longitud y 0,25 mm de grosor para separar los compuestos. Un inyector automático fue el que introdujo 1 µL de cada una de las muestras en el inyector, el cual había sido previamente calentado a 220° C. El método de trabajo fue en *split* con un flujo de 30 mL min<sup>-1</sup>. Una vez los compuestos recorrieron la columna, éstos se detectaron en un FID que previamente había sido calentado a 250° C. Las rampas de temperatura fueron tres. Durante la primera rampa, el horno pasó de su temperatura inicial (40° C) a una temperatura de 50° C, a un ritmo de 30° C min<sup>-1</sup>. Después de 1 minuto, se introdujo una segunda

rampa en la que la temperatura aumentó de 50° C a 160° C a un ritmo de 8° C min<sup>-1</sup>. Inmediatamente después, se introdujo una tercera y última rampa que aumentó la temperatura hasta los 220° C a una velocidad de 30° C min<sup>-1</sup>. El helio fue el gas portador y el aire comprimido, el hidrógeno y el nitrógeno se usaron en la detección.

La cuantificación del PHA intracelular se hizo a través de una recta de calibrado, utilizando un copolímero sintético de poli 3-HB-co-3-HV (PHBV) como estándar. La proporción del copolímero fue del 88 – 12% para los respectivos monómeros HB y HV. Se hizo una solución madre a una concentración aproximada de 7 g PHBV L<sup>-1</sup> y, a partir de dicha solución, se hicieron los diferentes estándares en concentraciones crecientes. El proceso de análisis de los estándares fue exactamente el mismo que se ha descrito anteriormente: en primer lugar se metilaron los monómeros HB y HV en una digestión ácida, luego se extrajo la fase orgánica de la fase acuosa y, por último, se analizaron las muestras vía CG. Tanto para las muestras como para los estándares, la cuantificación se hizo mediante el método de patrones externos con corrección de un patrón interno (n-heptadecano). La recta de calibrado se obtuvo al correlacionar las áreas de cada uno de los monómeros con respecto a las áreas del patrón interno.

---

### 2.3.8 ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

A lo largo de la presente investigación se analizaron las comunidades microbianas de los diferentes reactores con los que se ha trabajado. La finalidad de estos análisis fue la de determinar las poblaciones bacterianas más abundantes en una condición operacional determinada. Esto, además, permitió hacer un estudio de las dinámicas poblacionales al cambiar de una condición operacional a otra. Se usaron dos técnicas analíticas: los análisis metagenómicos utilizando la plataforma Illumina MiSeq y los análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).

---

#### 2.3.8.1 Análisis metagenómicos

La metagenómica es una disciplina que permite la identificación en bruto de todas las especies bacterianas presentes en una muestra ambiental. Para la realización de los análisis metagenómicos sólo fue necesaria la extracción del ADN genómico de cada una de las muestras.

##### 2.3.8.1.1 Extracción de ADN

El ADN de cada muestra se extrajo utilizando el método del fenol y del cloroformo. Este método constó de 3 etapas: extracción, limpieza y precipitación. En una primera etapa, las muestras fueron tratadas con lisozima, proteinasa K y varios detergentes como el dodecil sulfato sódico (SDS) con la finalidad de romper todas las estructuras celulares y liberar así el ADN al medio. En una segunda etapa, el ADN se separó del resto de componentes celulares con fenol y cloroformo siguiendo el método descrito por Massana *et al.* (1997). Finalmente, el ADN se precipitó con acetato amónico, 2 – propanol y etanol. Una vez evaporado el etanol, el ADN fue diluido en 30 µL de agua de grado molecular (Sigma Aldrich).

Para poder secuenciar las muestras fue necesario cumplir unos requisitos mínimos de calidad y cantidad de ADN. Para su determinación se utilizaron 2 métodos. En un primer método, Nanodrop, se ofreció la calidad del ADN gracias a los ratios 260/280 y 260/230. A través de un segundo método, Qubit, se ofreció la cantidad de ADN de doble cadena de cada muestra. En el caso de que la calidad y/o cantidad de ADN no fuese la adecuada, se volvería a repetir el proceso de extracción.

#### 2.3.8.1.2 *Secuenciación*

Una vez extraído una cantidad adecuada de ADN de buena calidad, las muestras se enviaron a secuenciar a una empresa externa especializada en estos procesos. La empresa seleccionada fue MacroGen (Corea). Se optó por hacer una secuenciación de las regiones hipervariables V3 – V4 del gen 16S rRNA empleando la plataforma Illumina MiSeq 2x300 pares de bases (pb).

#### 2.3.8.1.3 *Análisis bioinformático*

Los resultados de la secuenciación se recibieron en archivos con extensión *fastaq* y se analizaron con el software libre R (versión 3.5.1). Para el análisis bioinformático se utilizaron varios paquetes del proyecto *Bioconductor* para el análisis de muestras genómicas. Se siguió un flujo de trabajo diseñado por Callahan *et al.* (2016b) usando el paquete *dada2* (versión 1.8.0) (Callahan *et al.*, 2016a). El flujo de trabajo se inició analizando la calidad de todas las secuencias *forward* y *reverse*, para luego, cortar la secuencia en el punto donde perdía calidad. En el siguiente paso, se ensamblaron las secuencias *forward* con sus respectivas secuencias *reverse* para obtener la secuencia completa. Esta secuencia única dio lugar a las unidades operacionales taxonómicas

(OTUs). Sin embargo, antes de asignar la taxonomía a cada OTU, hubo que realizar un último proceso de filtrado para la eliminación de posibles quimeras. Al finalizar este último proceso, a cada OTU se le asignó una taxonomía usando la base de datos del gen 16S rRNA de Silva.

El flujo de trabajo con *dada2* terminó con la asignación taxonómica, pero el análisis bioinformático continuó. Se empleó un segundo paquete del proyecto *Bioconductor*, *phyloseq* (versión 1.24) (McMurdie & Holmes, 2013) que fue útil para la obtención de las curvas de rarefacción, las diversidades alfa y beta y las abundancias relativas de cada OTU. Además, el paquete *ggplot2* (versión 3.2.1) permitió la representación gráfica de los citados análisis. Por último, se determinaron los taxones diferenciales usando un cuarto y último paquete del proyecto *Bioconductor*, *DESeq2* (Love *et al.*, 2014).

---

#### 2.3.8.2 Análisis por DGGE

Los análisis de poblaciones bacterianas por DGGE fueron muy útiles en los reactores en los que se llevó a cabo el enriquecimiento de cepas acumuladoras de PHA, pues esta técnica no hace una cobertura tan profunda de la comunidad microbiana como en el caso de los análisis metagenómicos, sino que sólo permite la identificación de las poblaciones más abundantes. La base del proceso fue la misma que en el trabajo diseñado por Muyzer *et al.* (1993) con la introducción de algunas modificaciones. El fundamento de esta técnica consiste en la separación diferencial de fragmentos de ADN en un gel de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturizantes (urea y formamida). La desnaturalización afecta de manera distinta a uno u otro fragmento de ADN en función de su secuencia, por lo que cada banda en el gel se corresponde con una secuencia única.

##### 2.3.8.2.1 Extracción del ADN

El proceso de extracción de ADN fue exactamente el mismo que se ha detallado con anterioridad para los análisis metagenómicos (apartado [2.3.8.1.1](#)). La calidad y la cantidad del ADN también se determinaron por los métodos de NanoDrop y Qubit.

##### 2.3.8.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa



continuación, se le introdujo al gel una tercera capa sin gradiente desnaturalizante (0%) para crear los pocillos de carga de las muestras. Una vez solidificado el gel, éste se introdujo en la cubeta D-Code para detección de mutaciones (Bio-Rad). La cubeta se llenó con tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) al 1%. Se cargaron las muestras y se dejaron migrar durante 16 horas a una temperatura de 60° C y un voltaje de 55 V, siguiendo las mismas condiciones aplicadas por Valentino *et al.* (2014). En uno de los pocillos también se introdujo un marcador molecular de 1000 pb. Al terminar el proceso de migración, el gel se tiñó con SYBR Green I en tampón TAE 1X durante media hora y la visualización del gel se realizó en un transiluminador UV (Bio-Rad). Cada una de las bandas detectadas se separó con un bisturí y se introdujo en tubos eppendorf con 50 µL de agua ultrapura (Sigma Aldrich). El ADN se dejó difundir del gel al agua durante, al menos, 2 noches.

Tabla 2.2. Gradientes desnaturalizantes para la DGGE en función de la urea y la formamida.

	0%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
<i>TAE 50X (mL)</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Poliacrilamida (mL)</i>	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>Formamida (mL)</i>	0	8	12	16	20	24	28	32
<i>Urea (g)</i>	0	8,4	12,6	16,8	21	25,2	29,4	33,6
<i>Agua MiliQ (mL)</i>	Hasta 100 mL							

#### 2.3.8.2.5 Re-amplificación de las bandas

Con la finalidad de aumentar la cantidad de ADN de cada amplicón separado en el gel de poliacrilamida, éstos fueron sometidos a una re-amplificación por PCR usando los mismos *primers* que en la primera PCR del proceso, a excepción de que, en este caso, el *primer forward* se diseñó sin la cola GC. La secuencia de los *primers* fue: 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3' (F-357) y 5'- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (R-907). El ciclo empleado para esta segunda PCR fue el mismo que se describió anteriormente.

#### 2.3.8.2.6 Secuenciación y análisis bioinformático

Una vez amplificada la cantidad de ADN, las muestras se enviaron a secuenciar a dos empresas externas especializadas en análisis de este estilo (STAB VIDA y BioArray). Los resultados de secuenciación se analizaron con los *softwares* Chromas y UGENE, a partir de los cuales se obtuvo la secuencia consenso. Finalmente, la secuencia fue introducida en la base de datos del NCBI para determinar la identidad de cada uno de los microorganismos.

## 2.4 OTRAS TÉCNICAS

### 2.4.1 EXTRACCIÓN DEL BIOPOLÍMERO

Con el objetivo de determinar sus características fisicoquímicas, se extrajo el biopolímero acumulado en el interior de las células después de cada uno de los ensayos *fed-batch*, siguiendo el método descrito por Duque *et al.* (2014). Una vez finalizado el ensayo *fed-batch*, se inactivó la biomasa añadiendo HCl 3 M hasta bajar el pH del medio a un valor aproximado de 3. Posteriormente, se recolectó toda la biomasa del interior del reactor, se lavó con acetona y se centrifugó. Los *pellets* de biomasa se congelaron y liofilizaron para, posteriormente, diluirlos en cloroformo a una relación de 40 mL de cloroformo por cada gramo de biomasa. La biomasa se dejó disolver en el cloroformo a temperatura ambiente durante, al menos, 3 días con la finalidad de extraer los monómeros del interior celular. Finalmente la solución de cloroformo se filtró para eliminar los sólidos no disueltos y el biopolímero se formó por evaporación del cloroformo (Figura 2.7).





Figura 2.7. Polimerización del biopolímero PHBV después del proceso de extracción.

## 2.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2015. Ethanol and acetic acid production from carbon monoxide in a *Clostridium* strain in batch and continuous gas-fed bioreactors. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 1029 – 1043.
- 2 APHA-AWWA-WPCF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- 3 Arslan, K., Bayar, B., Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2019. Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high concentrations of ethanol from syngas. *Bioresour. Technol.* 292, 121941.
- 4 Braunnegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29 – 37.

- 5 Calero, R., Iglesias-Iglesias, R., Kennes, C., Veiga, M.C., 2017. Organic loading rate effect on the acidogenesis of cheese whey: a comparison between UASB and SBR reactors. *Environ. Tech.* 39, 3046 – 3054.
- 6 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016a. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581 – 583.
- 7 Callahan, B.J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2016b. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5, 1492.
- 8 Comeau, Y., Hall, K.J., Oldham, W.K., 1988. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2325 – 2327.
- 9 Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* 31, 276 – 288.
- 10 Fernández-Naveira, Á., Veiga, M.C., Kennes, C., 2017. Effect of pH control on the anaerobic H-B-E fermentation of syngas in bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 1178 – 1185.
- 11 Lagoa-Costa, B., Abubackar, H.N., Fernández-Romasanta, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2017. Integrated bioconversion of syngas into bioethanol and biopolymers. *Bioresour. Technol.* 239, 244 – 249.
- 12 Lagoa-Costa, B., Kennes, C., Veiga, M.C., 2020. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.*
- 13 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.
- 14 Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., DeLong, E.F., 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 50 – 56.
- 15 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8.

- 16 Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695 – 700.
- 17 Sass, A.M., Sass, H., Coolen, M.J.L., Cypionka, H., Overmann, J., 2001. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5392 – 5402.
- 18 Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T., 1992. Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes. *Water Sci. Technol.* 29, 933 – 949.
- 19 Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., Majone, M., 2014. Feed frequency in a sequencing batch reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *N. Biotechnol.* 31, 264 – 275.
- 20 Valentino, F., Karabegovic, L., Majone, M., Morgan-Sagastume, F., Werker, A., 2015. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Res.* 77, 49 – 63.



# Capítulo 3

---

---

## Fermentación del suero lácteo para la producción de ácidos grasos volátiles en un reactor anaerobio discontinuo secuencial

### 3.1 RESUMEN

La fermentación acidogénica para la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) es un proceso que está ganando mucha importancia en la actualidad. El objetivo de la presente investigación fue la optimización de la producción de AGV a través de un proceso de conversión biológica del suero lácteo, utilizando un reactor discontinuo secuencial (AnSBR). Para ello, se evaluó el efecto del tiempo de retención de sólidos (TRS), el tiempo de retención hidráulico (TRH) y la velocidad de carga orgánica (VCO) sobre el proceso de fermentación acidogénica. Además, se complementó este estudio con análisis metagenómicos del 16S rRNA para determinar las poblaciones bacterianas más abundantes dentro de la comunidad microbiana. Los resultados mostraron que al subir el TRS y bajar el TRH, se consiguió una mejora en la eficacia del proceso. El porcentaje de acidificación (PA) pasó del 73 al 83% al subir el TRS de 5 a 15 días. De igual manera, el PA aumentó de un 79 a un 83% al bajar el TRH de 3 a 1 día. El rendimiento de acidificación ( $Y_{AGV/S}$ ) también siguió la misma tendencia. Pasó de un 0,78 a un 0,87 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> al subir el TRS de 5 a 15 días y de un 0,86 a un 0,90 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> al bajar el TRH de 3 a 1 día. Con respecto a la VCO, se observó un descenso generalizado en el PA al subir la VCO de 6 a 10 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, pues los valores cayeron de un 75 a un 64 – 68%. Sin embargo, no se observó tal descenso con respecto al  $Y_{AGV/S}$ , el cual se mantuvo en torno a 0,80 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> independientemente de la VCO aplicada. La comunidad microbiana estuvo dominada por bacterias productoras de ácido láctico cuando se estableció el TRS más corto (5 días), aunque éstas fueron desplazadas al subir el TRS a 10 y 15 días. De entre las principales poblaciones bacterianas que desplazaron a

las bacterias acidolácticas, se encontró *Megasphaera*, una bacteria fermentadora de ácido butírico.

## 3.2 INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos volátiles (AGV) están considerados productos intermedios dentro del proceso de digestión anaerobia (DA), abarcando compuestos orgánicos de entre 2 y hasta 6 átomos de carbono. Bajo esta definición, se engloban los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico y caproico. Hoy en día, los AGV se encuentran entre las moléculas orgánicas más demandadas, ya que de ellos se pueden obtener una amplia gama de productos de naturaleza muy diversa. Biopolímeros, biodiesel, hidrógeno, metano, productos farmacéuticos o productos químicos son algunos de ellos (Lee *et al.*, 2014a; Lagoa-Costa *et al.*, 2017; Atasoy *et al.*, 2018). Sin embargo, la producción industrial de estos AGV se lleva a cabo por procesos estrictamente químicos a día de hoy, usando combustibles fósiles como principal materia prima (Eggeman & Verser, 2005). La condición de recurso no renovable, así como el carácter contaminante y la corta esperanza de vida de estos recursos fósiles, hacen que la sostenibilidad de los procesos químicos esté siendo cuestionada y, por ello, el desarrollo de alternativas más sostenibles con el medio ambiente empieza a ser muy demandada (Singhania *et al.*, 2013).

Bajo este contexto, es fácil de entender por qué la producción de AGV a través de procesos de fermentación acidogénica está ganando cada vez más interés como una ruta alternativa muy interesante. Sin embargo, todavía hay varios frentes abiertos para hacer de esta alternativa una realidad. Por ejemplo, la etapa de recogida y purificación del producto final (o *downstream*) es la que supone un mayor desafío (Bhatia & Yang, 2017). Según Li *et al.* (2016), sólo el 60% de los costes de producción se corresponden con los procesos de purificación y, ahora mismo, la tecnología no se ha desarrollado lo suficiente como para poder competir con los procesos químicos desde un punto de vista económico. Al contrario de lo que ocurre con la etapa de *downstream*, la etapa de fermentación sí que puede ser llevada a cabo de manera simple y eficaz, ya sea mediante cultivos puros o cultivos mixtos. De entre las ventajas de usar los cultivos puros se encuentra la obtención del AGV deseado al seleccionar una cepa bacteriana específica y la obtención de procesos más eficaces y con rendimientos más altos durante los procesos de fermentación. El uso de los cultivos microbianos mixtos (MMC) ha sido propuesto en contraposición al uso de los cultivos puros con la finalidad de mantener un proceso global más económico.

Los MMC no necesitan de condiciones estériles, lo que supone un ahorro importante desde un punto de vista energético. Además, tampoco necesitan sustratos sintéticos como fuente de carbono, sino que se pueden usar diferentes residuos como sustrato, lo que provoca una reducción en el precio final del proceso. El estilo de vida actual del ser humano, ha provocado que la producción mundial de residuos aumente año tras año. La valorización de estos residuos mediante el uso de la tecnología de los MMC se considera una alternativa muy prometedora. Tanto es así que, a día de hoy, una amplia variedad de residuos ya se ha valorizado de manera eficaz como fuente potencial de AGV. La mayoría de estos residuos pertenecen al sector agroindustrial como las melazas (Albuquerque *et al.*, 2007), las aguas residuales de la industria papelera (Jiang *et al.*, 2012), las aguas residuales de la industria del aceite (Lee *et al.*, 2014b) o residuos de la industria conservera (Bermúdez-Penabad *et al.*, 2017). Pero, por ejemplo, también se ha valorado la posibilidad de valorizar lodos activos para su bioconversión a AGV (Iglesias-Iglesias *et al.*, 2019).

El suero lácteo es uno de los residuos que más contaminan dentro del sector lácteo debido, principalmente, a su elevada carga orgánica. Sin embargo, más del 90% de la carga orgánica de la que está compuesto es fácilmente biodegradable. Proteínas, azúcares y grasas son sus componentes principales. Esto hace del suero lácteo un residuo con un gran potencial para ser utilizado en un amplio rango de bioprocesos y convertido en diferentes productos de alto interés biotecnológico, entre ellos los AGV (Prazeres *et al.*, 2012). Galicia, situada al noroeste de España es, de lejos, la comunidad autónoma con la mayor producción de leche de origen vacuno de todo el territorio español. Tanto es así que, sólo en Galicia, se produce casi la mitad de la producción anual del estado, con aproximadamente 3 millones de toneladas de leche (FEGA, 2018). Prazeres *et al.* (2012) aseguraron que para la producción de 1 Kg de queso, eran necesarios 10 Kg de leche, quedando de remanente 9 Kg de suero lácteo. En base a estas estimaciones, es fácil suponer que, en Galicia, la producción de suero lácteo es elevada.

Existe una amplia variedad de trabajos científicos que hablan sobre los procesos de fermentación del suero lácteo y, de hecho, su potencial para su bioconversión a AGV ya ha sido más que confirmado (Silva *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2016; Domingos *et al.*, 2017; Jankowska *et al.*, 2017; Calero *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayor parte de



estos trabajos abordan el proceso de acidogénesis desde configuraciones de reactor totalmente diferentes, lo que dificulta su comparación. La eficacia de los reactores anaerobios discontinuos secuenciales (AnSBR) tanto para producir AGV como para producir biohidrógeno ya ha sido demostrada (Goud *et al.*, 2017; Yarimtepe *et al.*, 2017; Calero *et al.*, 2018; Lovato *et al.*, 2018). La selección de un AnSBR durante la presente investigación como la configuración apropiada para la producción de AGV estuvo basada en 3 de sus ventajas con respecto a otros reactores: (1) permite una mezcla completa entre sustrato y microorganismo; (2) permite una buena retención de biomasa sin usar ningún mecanismo de inmovilización; y (3) permite desacoplar el tiempo de retención de sólidos (TRS) del tiempo de retención hidráulico (TRH) (Mace & Mata-Álvarez, 2002). Hoy en día, además, los científicos se están dando cuenta de la importancia de analizar las comunidades microbianas para obtener un conocimiento más profundo de los bioprocesos. Bajo este contexto, la tecnología de secuenciación de ADN de segunda generación se ha convertido en una herramienta muy útil y ya se está aplicando en múltiples procesos de DA (Fuentes *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019).

Por todas estas razones, la presente investigación tuvo como objetivo la producción de AGV a partir de suero lácteo en un AnSBR. Con el fin de optimizar la producción final de AGV se ha procedido a realizar cambios en algunos de los parámetros más importantes a la hora de operar el reactor como son el TRS, el TRH y la velocidad de carga orgánica (VCO). Además, al estudio se le han acoplado análisis metagenómicos con la finalidad de obtener una mayor comprensión de las dinámicas poblacionales al cambiar de una condición operacional a otra.

### **3.3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Como la finalidad última de los AGV que se van a producir durante la fermentación acidogénica va a ser la síntesis de polihidroxicanoatos, el diseño experimental está encuadrado dentro del proceso de 3 etapas diseñado por Albuquerque *et al.* (2007) para la síntesis de estos biopolímeros, tal y como se representa en la Figura 3.1.

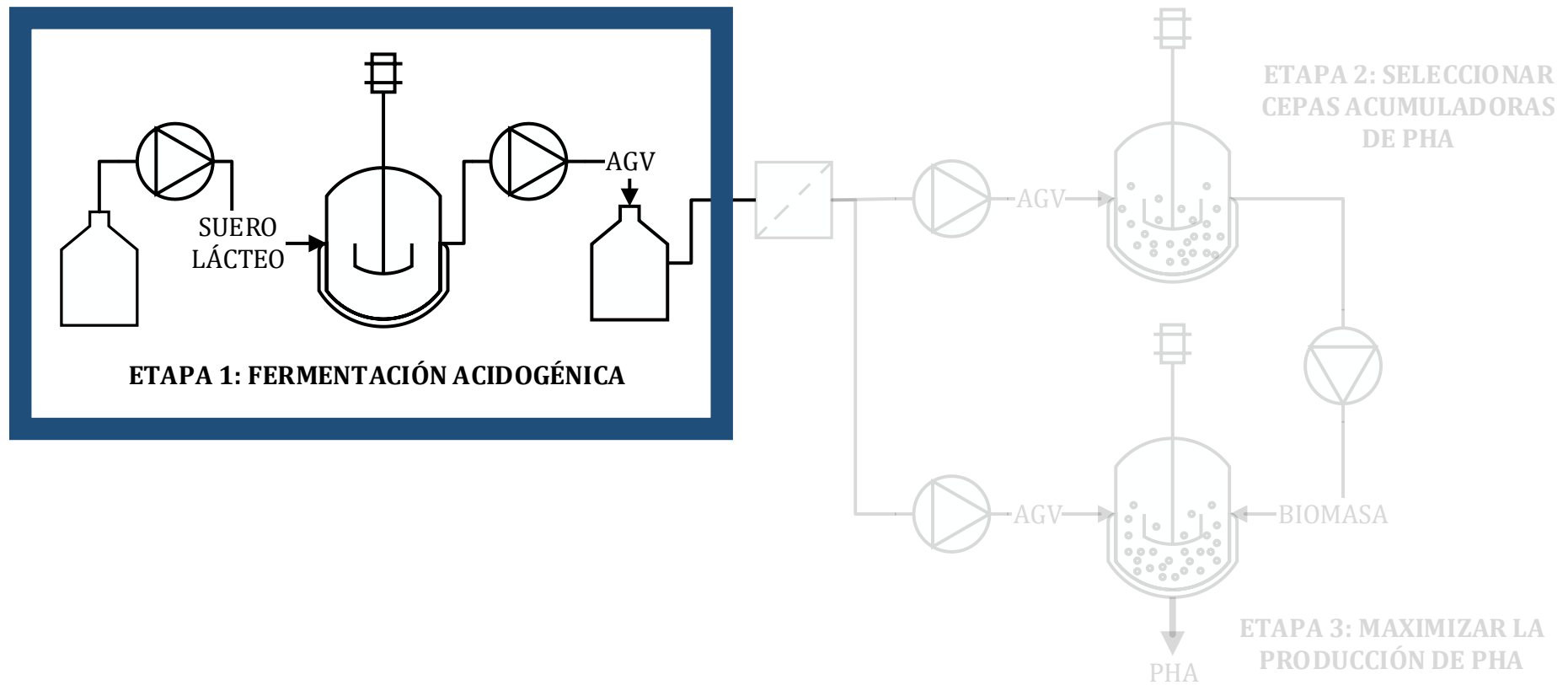


Figura 3.1. Diseño experimental para la producción de AGV a partir del suero lácteo. El proceso de fermentación acidogénica estuvo encuadrado dentro del proceso de tres etapas para la síntesis de polihidroxicanoatos. En concreto, fue la primera de las tres etapas (recuadro azul).

---

### 3.3.2 SUSTRATO Y CONFIGURACIÓN DEL REACTOR

Todos los experimentos fueron diseñados usando suero lácteo proporcionado por una empresa láctea gallega. El suero lácteo fue ultrafiltrado por la propia empresa para el aprovechamiento de las proteínas, lo que hizo aumentar la fracción total de azúcares. Cada vez que se recibieron los lotes de suero lácteo en el laboratorio, el procedimiento fue siempre el mismo: en primer lugar se realizó una caracterización completa del suero lácteo para, en segundo lugar, almacenarlo a 4° C con fines de mantenimiento. La demanda química de oxígeno (DQO) del suero lácteo se mantuvo siempre estable, con oscilaciones mínimas de entre 54 – 56 g DQO soluble L<sup>-1</sup>. La lactosa fue el componente principal del suero lácteo con cerca del 90% del total de la carga orgánica. También se detectó la presencia de ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético. A pesar de haber sido ultrafiltrado, una pequeña fracción proteica también fue detectada. Estos tres compuestos supusieron el 10% restante de la carga orgánica. La proteína también supuso el mayor aporte de nitrógeno del suero lácteo, pues el contenido amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) disuelto fue muy bajo, entre 10 – 80 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup>. Debido al ultrafiltrado y a la poca disponibilidad de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disuelto, el reactor trabajó en condiciones N-limitantes. Además, la concentración en fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) fue de 300 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup>. Ningún nutriente fue añadido de manera externa.

El AnSBR, con un volumen de trabajo de 2 L, se inoculó con un MMC proveniente de otro reactor acidogénico (Calero *et al.*, 2017). Un baño calentado a 30° C permitió la circulación del agua por la camisa del reactor para mantener la temperatura estable en condiciones mesófilas. Un agitador mecánico mantuvo el reactor en condiciones homogéneas (80 rpm). El reactor se diseñó para trabajar de manera cíclica. Cada ciclo incluyó 4 fases diferentes: alimentación, reacción, decantación y vaciado. Una sonda de pH hizo una medida en continuo de su valor. El pH se mantuvo siempre en un valor de 5,00. Para ello, una bomba peristáltica introdujo NaOH 2M al interior del reactor cuando, debido a los procesos naturales de acidificación, el pH bajaba hasta un valor de 4,95. En el momento en que el valor de pH recuperaba su valor original (5), la bomba peristáltica se apagaba. Durante las primeras semanas de operación, el reactor trabajó a VCO más bajas con el fin de reaclimatar la biomasa a los procesos de acidificación. Cuando se observó que toda la lactosa era consumida y los ácidos

orgánicos eran los únicos productos de la fermentación en el efluente, la VCO se fue subiendo progresivamente hasta alcanzar los valores de trabajo.

A lo largo de toda la investigación se evaluó la influencia de tres parámetros sobre los procesos de fermentación acidogénica: el TRS, el TRH y la VCO. En la Tabla 3.1 se resumen las condiciones operacionales para cada uno de los 3 experimentos. En el primer experimento, se evaluó la influencia del TRS sobre la eficacia del proceso de acidificación. Para ello, la VCO se mantuvo constante a 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y se fijó un TRH de 2 días, lo que supuso que la carga orgánica del reactor se estableciese en 12 g DQO L<sup>-1</sup>. El estudio del TRS incluyó 3 tiempos de retención diferentes: 5, 10 y 15 días (Tabla 3.1). Para mantener estable el TRS se realizó una purga diaria no sólo en base a la concentración de biomasa del interior del reactor, sino también en base a la concentración de biomasa perdida por el efluente. El volumen de purga se ajustó en función del TRS preestablecido. El modo de operación incluyó 2 ciclos diarios de 12 horas de duración cada uno. En el segundo experimento, se evaluó el efecto del TRH sobre la eficacia del proceso de acidificación. La VCO se mantuvo constante a 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y se estableció un TRS de 15 días. De igual manera al caso anterior, para mantener estable el TRS el reactor se purgó diariamente. En este caso, la condición variable fue el TRH, el cual se cambió de 2 a 3 y de 3 a 1 día (Tabla 3.1). Con motivo de mantener constante la VCO pero cambiar el TRH, se ajustó la carga orgánica en base a la ecuación 3.1:

$$\text{Carga Orgánica} = \text{VCO} \times \text{TRH} \quad (3.1)$$

Consecuentemente, la carga orgánica de entrada fue de 12, 18 y 6 g DQO L<sup>-1</sup> para los TRH de 2, 3 y 1 día, respectivamente (Tabla 3.1). El modo de operación también incluyó 2 ciclos al día de 12 horas de duración. Finalmente, en un tercer experimento se evaluó la influencia de aumentar la VCO sobre el proceso de acidificación. En este caso, el TRH se mantuvo constante en 2 días y el TRS se fijó en 10 días. La VCO fue la condición variable al pasar de 6 a 10 y de 10 a 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.1). La carga orgánica también se vio afectada por la ecuación 3.1 y la concentración de entrada del suero lácteo fue de 12, 20 y 16 g DQO L<sup>-1</sup> para las VCO de 6, 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. La singularidad de este experimento estuvo en el número de ciclos

que se establecieron en el reactor, pues se pasó de 2 ciclos diarios de 12 horas de duración cada uno a 1 ciclo diario de 24 horas de duración (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Condiciones operacionales para cada uno de los 3 experimentos realizados en el AnSBR: efecto del TRS, efecto del TRH y efecto de la VCO.

	<i>Efecto del TRS</i>	<i>Efecto del TRH</i>	<i>Efecto de la VCO</i>
<i>TRS (d)</i>	<b>5 - 10 - 15</b>	15	10
<i>TRH (d)</i>	2	<b>2 - 3 - 1</b>	2
<i>VCO (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	6	6	<b>6 - 10 - 8</b>
<i>Carga Orgánica (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	12	<b>12 - 18 - 6</b>	<b>12 - 20 - 16</b>
<i>pH</i>	5	5	5
<i>T<sup>a</sup> (° C)</i>	30	30	30
<i>Nº de ciclos</i>	2	2	<b>1</b>
<i>Duración ciclos (h)</i>	12	12	<b>24</b>

### 3.3.3 ANÁLISIS METAGENÓMICOS

La comunidad microbiana desarrollada en el interior del AnSBR para cada una de las 3 condiciones del TRS (5, 10 y 15 días) fue objeto de estudio mediante análisis metagenómicos. Las muestras se recogieron por duplicado para cada una de las 3 condiciones y la toma de muestra se realizó cuando el reactor alcanzó el estado estacionario. Después de recoger cada una de las muestras de biomasa, se extrajo el ADN genómico usando el método del fenol y del cloroformo. La calidad y la cantidad del ADN extraído fueron determinadas por Nanodrop y Qubit, respectivamente. Una vez confirmadas la buena calidad y cantidad de las muestras, una empresa externa especializada en análisis de este tipo (Macrogen) procedió a su secuenciación. Se usó la plataforma Illumina MiSeq para la secuenciación de las regiones hipervariables V3 - V4 del gen 16S rRNA. Las lecturas sin procesar han sido enviadas a la base de datos del NCBI bajo el bioproyecto denominado PRJNA597212 y con números de acceso SAMN13669742, SAMN13669743 y SAMN13669744.

Los resultados finales del proceso de secuenciación fueron enviados en archivos de extensión *fastaq*. El conjunto de archivos *fastaq* contenía todas las lecturas en bruto en su interior. Éstas fueron procesadas usando el software libre R (versión 3.5.1) y siguiendo el flujo de trabajo diseñado por Callahan *et al.* (2016b) con los paquetes *dada2* (versión 1.8.0) (Callahan *et al.*, 2016a) y *phyloseq* (versión 1.24) (McMurdie & Holmes, 2013). Finalmente, el paquete *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) también se usó para determinar los taxones diferenciales. Los umbrales para este último análisis se establecieron usando el método de Benjamini y Hochberg (BH) para controlar los falsos positivos con un valor de significancia  $< 0,01$ .

---

### 3.3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Las muestras del reactor se analizaron dos veces a la semana. Los análisis incluyeron la caracterización de la entrada (influyente) y de la salida (efluente) del reactor para determinar los sólidos en suspensión totales (SST), sólidos en suspensión volátiles (SSV) y DQO soluble, siguiendo el método estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). Tanto los SST como los SSV también se usaron para medir la concentración de biomasa del interior del reactor. Otros análisis del influyente y del efluente incluyeron la determinación de los niveles de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y productos solubles en agua. Para determinar la concentración tanto de  $\text{NH}_4^+$  como de  $\text{PO}_4^{3-}$  se utilizaron sendos métodos colorimétricos a 635 y 690 nm, respectivamente. Para determinar la concentración de los productos solubles en agua (lactosa, ácido láctico y AGV), se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La evolución de la proteína no se monitorizó a lo largo de la investigación, pero el contenido proteico del suero lácteo sí que fue determinado para la caracterización de los lotes. Para ello, se usó el método colorimétrico de Bradford, usando albúmina de suero bovino como estándar para la recta de calibrado. La determinación fue colorimétrica a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro.

---

### 3.3.5 CÁLCULOS

El porcentaje de acidificación (PA) fue calculado como la producción neta de ácidos orgánicos (en unidades DQO) dividido por el valor experimental de la DQO soluble introducida al reactor, siguiendo la ecuación 3.2:

$$PA (\%) = \frac{Horg_{\text{efl}} (\text{g DQO L}^{-1}) - Horg_{\text{inf}} (\text{g DQO L}^{-1})}{DQO_{S_{\text{inf}}} (\text{g DQO L}^{-1})} \times 100 \quad (3.2)$$

El rendimiento de acidificación ( $Y_{AGV/S}$ ) fue calculado de manera muy similar al PA como la producción neta de ácidos orgánicos en base a la lactosa consumida (ambos referidos a unidades DQO) (ecuación 3.3):

$$Y_{AGV/S} = \frac{Horg_{\text{efl}} (\text{g DQO L}^{-1}) - Horg_{\text{inf}} (\text{g DQO L}^{-1})}{Lactosa_{\text{inf}} (\text{g DQO L}^{-1}) - Lactosa_{\text{efl}} (\text{g DQO L}^{-1})} \quad (3.3)$$

La productividad se define como la producción neta diaria de ácidos orgánicos y se calculó dividiendo los ácidos orgánicos producidos (en unidades DQO) por el TRH. La velocidad de consumo del sustrato ( $-q_s$ ) se calculó como la regresión lineal entre la concentración del sustrato consumido y el tiempo necesario para dicho consumo en función de la concentración de biomasa dentro del reactor para ese determinado periodo de tiempo. De igual manera, se calculó la velocidad de producción de los ácidos orgánicos ( $q_{\text{HORG}}$ ) como la regresión lineal entre la concentración de ácidos producidos y el tiempo necesario para su producción en función, también, de la concentración de biomasa presente dentro del reactor en ese determinado periodo de tiempo.

### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registró la evolución del AnSBR para la producción de AGV a partir de suero lácteo durante un largo periodo de tiempo en el cual se fueron cambiando parámetros operacionales como el TRS (5, 10 y 15 días), el TRH (2, 3 y 1 día) y la VCO (6, 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). El PA, el  $Y_{AGV/S}$  o el perfil de AGV fueron monitorizados para evaluar la eficiencia del proceso de acidificación. Además, se compaginó esta monitorización a largo plazo con análisis metagenómicos para determinar tanto la composición de la comunidad microbiana como las dinámicas poblacionales cuando el TRS se fue subiendo de manera progresiva de 5 a 10 y de 10 a 15 días.

#### 3.4.1 INFLUENCIA DEL TRS SOBRE LA FERMENTACIÓN ACIDOGÉNICA

Se estudió la influencia de 5, 10 y 15 días de TRS durante aproximadamente 225 días con la finalidad de evaluar su efecto sobre la eficacia del proceso de acidificación. Todos los resultados de la operación del AnSBR se resumieron en la Tabla 3.2. En base a ellos, se pudo observar que el TRS tuvo una gran influencia sobre dos de los parámetros más importantes a la hora de definir la eficacia del proceso: el PA y el  $Y_{AGV/S}$ . El periodo en el que el reactor operó con el TRS más largo (15 días), fue registrado como la condición más eficiente, con una acidificación media del  $83 (\pm 4) \%$ . Por el contrario, cuando se establecieron los TRS más bajos, la acidificación media cayó a un  $75 (\pm 3) \%$  para un TRS de 10 días y un  $73 (\pm 5) \%$  para un TRS de 5 días (Tabla 3.2). Se puede concluir, pues, que alargar el TRS supuso una mejora en el PA. Exactamente la misma tendencia se pudo observar con respecto al  $Y_{AGV/S}$ . Cuando el reactor operó al TRS más largo (15 días), los microorganismos fueron capaces de dirigir una mayor cantidad de lactosa hacia la producción de AGV, con un valor medio de  $0,87 (\pm 0,04) \text{ g DQO-AGV g DQO-Lactosa}^{-1}$ . Cuando el reactor operó con los TRS de 10 y 5 días, los valores en el  $Y_{AGV/S}$  se redujeron a 0,78 y 0,76 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 3.2). Estos resultados parecen ir de la mano de aquellos obtenidos por Yuan *et al.* (2009) y Chen *et al.* (2018) quienes observaron una mejora similar en la producción de AGV cuanto más largo fuese el TRS durante la acidificación de lodos activos.

A pesar de las variaciones observadas en función del TRS, se puede decir que todos los valores de PA y  $Y_{AGV/S}$  obtenidos en la presente investigación fueron, en general, bastante buenos, especialmente si se comparan con otros estudios de acidificación en los que también se usó suero lácteo como sustrato (Tabla 3.3). Así, si se toma como referencia el valor de  $0,87 (\pm 0,04) \text{ g DQO-AGV g DQO-Lactosa}^{-1}$  alcanzado a un TRS de 15 días, se pudo observar que el rendimiento de acidificación estuvo al mismo nivel de aquellos obtenidos por Bengtsson *et al.* (2008) y Domingos *et al.* (2017) usando un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) y un reactor de lecho empacado (PBBR), respectivamente (Tabla 3.3). Además, el resultado de la presente investigación supuso una mejora con respecto a la operación de otro CSTR, con un rendimiento máximo de  $0,68 \text{ g DQO-AGV g DQO-Lactosa}^{-1}$  (Gouveia *et al.*, 2016) y de un reactor anaerobio de membrana (AnMBR), con un rendimiento máximo de  $0,74 \text{ g DQO-AGV g DQO-Lactosa}^{-1}$  (Duque *et al.*, 2014). Sin embargo, en estos dos últimos



casos la VCO fue superior (Tabla 3.3), hecho que está demostrado que tiende a disminuir los rendimientos en la producción de AGV (Calero *et al.*, 2018). En base a estos resultados obtenidos, se pudo concluir que el AnSBR fue una configuración tan válida para la producción de AGV como cualquier otra configuración. Además, si se comparan estos resultados con otras investigaciones en las que también se usó la misma configuración AnSBR, los resultados en términos de acidificación fueron muy positivos, con valores más altos que aquellos alcanzados por Tamis *et al.* (2015) y Calero *et al.* (2017) (Tabla 3.3).

El valor experimental de la productividad estuvo en todo momento alrededor de los 4,5 g DQO-AGV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> pero, al igual que para el PA y el Y<sub>AGV/S</sub>, también se observó una tendencia al alza conforme el TRS se fue haciendo más grande (Tabla 3.2). Sin embargo, la productividad es un parámetro que se ve influenciado por la VCO. Así, es posible conseguir valores de productividad más altos aplicando una VCO más alta, aún a pesar de que el rendimiento del proceso sea inferior. Por ejemplo, Duque *et al.* (2014) obtuvieron una productividad de 10,44 g DQO-AGV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con 0,74 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> de rendimiento de acidificación.

Tabla 3.2. Resultados de la operación del reactor AnSBR en los tres TRS diferentes (5, 10 y 15 días). Se representaron los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar.

	<i>TRS de 5 d</i>	<i>TRS de 10 d</i>	<i>TRS de 15 d</i>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	51	41	40
<i>Carga orgánica (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	11,90 (± 0,53)	12,06 (± 0,44)	11,54 (± 0,35)
<i>TRH (d)</i>	2	2	2
<i>VCO (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	6,01 (± 0,32)	6,03 (± 0,22)	5,77 (± 0,17)
<i>Biomasa (g SSV L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></i>	4,19 (± 0,39)	5,36 (± 0,52)	7,38 (± 0,66)
<i>Relación F/M (g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></i>	1,46 (± 0,14)	1,13 (± 0,09)	0,81 (± 0,04)
<i>AGV totales (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	9,72 (± 0,66)	9,44(± 0,40)	10,23 (± 0,34)
<i>Ácido acético (%)</i>	37,39 (± 2,95)	25,83 (± 3,36)	35,71 (± 3,43)
<i>Ácido propiónico (%)</i>	20,34 (± 3,69)	7,52 (± 1,46)	10,99 (± 1,42)
<i>Ácido butírico (%)</i>	22,13 (± 4,35)	59,62 (± 2,71)	48,40 (± 4,10)
<i>Ácido valérico (%)</i>	4,11 (± 2,24)	5,46 (± 2,20)	4,90 (± 1,32)
<i>Ácido láctico (%)</i>	16,03 (± 7,37)	1,57 (± 1,86)	0,00
<i>PA (%)<sup>3</sup></i>	73 (± 5)	75 (± 3)	83 (± 4)
<i>Y<sub>AGV/S</sub> (g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>)<sup>4</sup></i>	0,78 (± 0,05)	0,78 (± 0,03)	0,87 (± 0,04)
<i>Productividad (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	4,45 (± 0,29)	4,51 (± 0,20)	4,54 (± 0,48)

<sup>1</sup> Concentración de biomasa en el interior del AnSBR.

<sup>2</sup> Relación entre alimentación y microorganismo.

<sup>3</sup> Porcentaje de acidificación.

<sup>4</sup> Rendimiento de acidificación.

Tabla 3.3. Comparación de diferentes trabajos de investigación en la producción de AGV a partir de suero lácteo o sustratos similares.

Reactor	Sustrato <sup>1</sup>	pH	Temperatura (° C)	TRH (d)	TRS (d)	VCO (g DQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Perfil AGV <sup>2</sup>	Y <sub>AGV/s</sub> (g DQO g DQO <sup>-1</sup> )	Referencia
AnSBR	SL	5	30	2	15	6	Bu > Ac	0,87	Este estudio
AnSBR	SL	5	30	1	15	6	Bu > Ac	0,90	Este estudio
AnSBR	SL	5	30	2	10	10	Bu > Ac	0,80	Este estudio
PBBR	SL	6	37	6	∞	4,2	Hex > Bu	0,85 <sup>3</sup>	Domingos <i>et al.</i> (2017)
CSTR	SL	6	37	2	2	2,2	Pr > Ac	0,87	Bengtsson <i>et al.</i> (2008)
AnSBR	SL	5	30	2	6	6,5	Bu > Ac	0,75	Calero <i>et al.</i> (2017)
AnMBR	SL	6	37	1	3	13,5	Ac	0,74	Duque <i>et al.</i> (2014)
CSTR	SL	6	30	1	1	15,9	Lac > Ac	0,68	Gouveia <i>et al.</i> (2016)
PBBR	SL	6	37	6	∞	4,2	Hex > Oct	0,68	Domingos <i>et al.</i> (2018)
AnSBR	Glucosa	4,5	30	0,16	1 - 2,5	60	Bu > Ac	0,66	Tamis <i>et al.</i> (2015)
AnMBR	Glucosa	7	22	0,33	∞	1,65	Ac > Pr	0,48	Kahn <i>et al.</i> (2019)

<sup>1</sup> SL: suero lácteo.

<sup>2</sup> Ac: ácido acético; Bu: ácido butírico; Hex: ácido hexanoico; Lac: ácido láctico; Oct: ácido octanoico; Pr: ácido propiónico.

<sup>3</sup> En Cmmol Cmmol<sup>-1</sup>.

En términos generales, y si atendemos a los productos de fermentación obtenidos en el efluente del AnSBR, fue posible afirmar que la acidogénesis dominó de manera global todo el proceso, con independencia del TRS establecido, pues los AGV fueron los metabolitos principales (Figura 3.2). Así, los ácidos acético, propiónico y butírico fueron los AGV de mayor abundancia, mientras que sólo se detectaron pequeñas cantidades de ácido valérico en el medio, siguiendo las observaciones realizadas por Bengtsson *et al.* (2008). Analizando más en detalle el perfil de AGV, llamó la atención la elevada concentración tanto de ácido láctico como de ácido propiónico a un TRS de 5 días (Figura 3.2). La detección del ácido láctico como producto de fermentación fue un claro indicador de la presencia de bacterias acidolácticas (LAB). Sin embargo, el ácido láctico sufrió una evolución muy marcada a lo largo de toda la investigación, estuvo muy presente a un TRS de 5 días, pero fue parcial y totalmente consumido a los TRS de 10 y 15 días, respectivamente (Figura 3.2). En paralelo a la evolución del ácido láctico fue la evolución del ácido propiónico: su producción fue mayor cuanto mayor fue la producción de ácido láctico (Figura 3.2). Una situación similar también fue observada por Duque *et al.* (2014), quienes registraron picos de producción del ácido propiónico cuando el ácido láctico era detectado. En resumen, a un TRS de 5 días no hubo ningún producto de fermentación mayoritario y la distribución final de los AGV estuvo compartida por una amplia variedad de ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico y láctico). Sin embargo, cuando se estableció un TRS de 10 días, la fermentación butírica se convirtió, de lejos, en el proceso predominante y, el ácido butírico, en el producto de fermentación mayoritario, con cerca del 60% del total de los AGV (Figura 3.2). Finalmente, cuando se estableció un TRS de 15 días, el ácido butírico siguió siendo el producto mayoritario, aunque se observó una reducción en su concentración con respecto a la condición anterior. Además, hubo un aumento en la producción de ácido acético (Figura 3.2). Por último, la producción de ácido valérico fue la más baja de todos los AGV y permaneció invariable a lo largo de todo el experimento, con valores muy similares (Tabla 3.2; Figura 3.2).

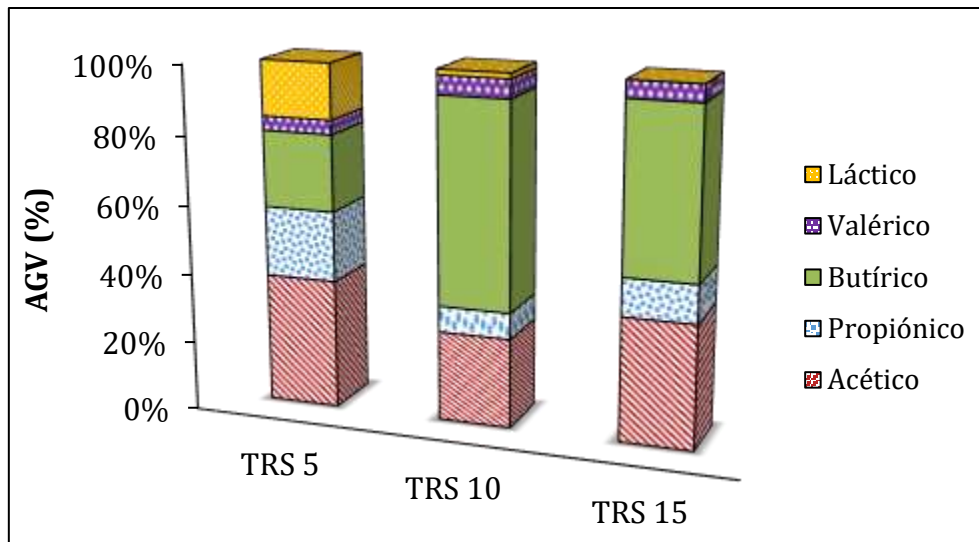


Figura 3.2. Perfil de AGV obtenido para cada uno de los tres TRS (5, 10 y 15 días).

Uno de los parámetros más importantes a la hora de influir en la distribución final de los AGV es el pH (Bengtsson *et al.*, 2008). Según el citado estudio, existe una correlación negativa entre la fermentación butírica y la fermentación propiónica en función del pH. Cuando se establece un pH de 6, la fermentación propiónica prevalece, con un aumento en la producción de ácido acético y ácido propiónico. Sin embargo, cuando el valor de pH se establece en 5, la fermentación butírica cobra ventaja sobre la fermentación propiónica y se puede observar un cambio en el perfil de los AGV. En este segundo caso, los ácidos acético y butírico se convierten en los principales metabolitos de la fermentación. Este hecho se correlacionó muy bien con el perfil de AGV obtenido en la presente investigación, pues el ácido butírico fue el producto de fermentación mayoritario trabajando con un pH de 5. Distribuciones de AGV muy similares también han sido reportadas por Tamis *et al.* (2015) y Calero *et al.* (2017), trabajando con valores de pH próximos a 5. Sin embargo, y en base a los datos experimentales extraídos de la presente investigación, hay otros factores que también influyen sobre el perfil final de los AGV. Uno de estos factores es el TRS. Debido a su gran capacidad de decantación, la concentración de biomasa dentro del reactor aumentó conforme el TRS se hizo más grande. De hecho, la concentración de biomasa prácticamente se dobló al pasar de un TRS de 5 días ( $4,19 \pm 0,39$  g SSV L<sup>-1</sup>) a un TRS de 15 días ( $7,38 \pm 0,66$  g SSV L<sup>-1</sup>). Este hecho supuso una reducción en la relación alimentación/microorganismo (F/M) a medida que el TRS se hizo más

grande (Tabla 3.1). En base a los resultados obtenidos, se pudo concluir que, al aplicar una relación F/M moderada ( $1,13 \pm 0,09$  g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; TRS 10 días), el ácido butírico fue el principal producto de la fermentación, con casi el 60% del total de los AGV. Sin embargo, cuando la relación F/M se acortó ( $0,81 \pm 0,04$  g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; TRS 15 días), la producción de ácido acético aumentó de un 25 a un 35,71% (Figura 3.3). Yang *et al.* (2007) llegaron a conclusiones similares al obtener hasta 2 veces más ácido butírico que ácido acético al imponer relaciones F/M más altas (1, 1,5 y 2), mientras que observaron como la producción de ácido acético se hacía más grande al aplicar la relación F/M más baja (0,5). Sin embargo, de nuestro estudio se desprende que si la relación F/M es excesivamente alta ( $1,46 \pm 0,14$  g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; TRS 5 días), los microorganismos no son capaces de realizar la bioconversión de todo el ácido láctico a los respectivos AGV, al menos para sistemas alimentados con suero lácteo (Figura 3.3).

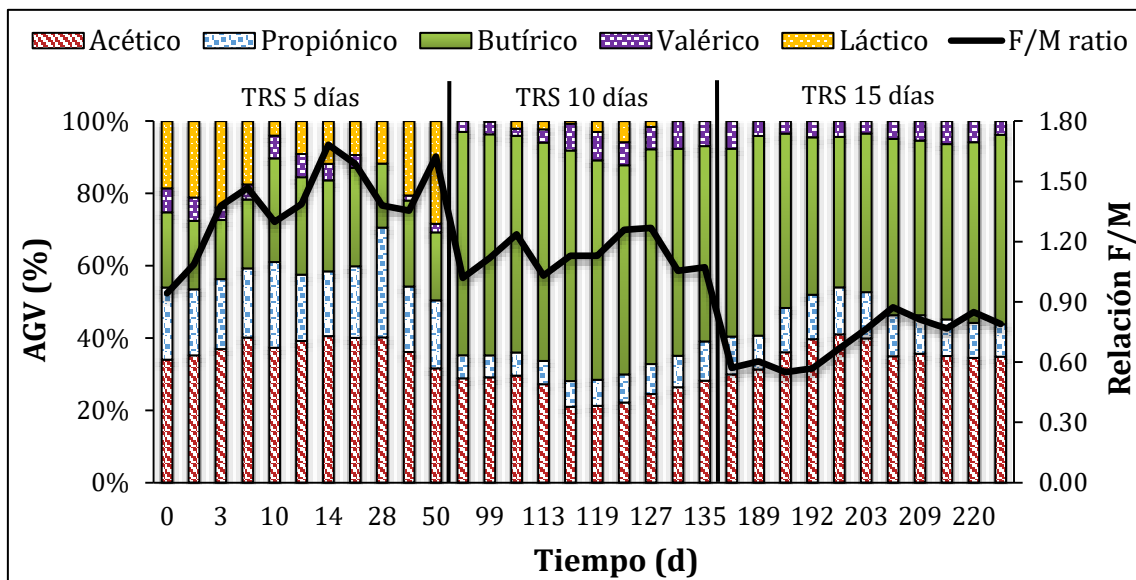


Figura 3.3. Distribución de los AGV en función de la relación F/M para cada uno de los tres TRS (5, 10 y 15 días).

### 3.4.1.1 Experimentos a corto plazo

La monitorización del reactor a largo plazo se acopló con experimentos a corto plazo en los que se registró la evolución de la lactosa y los ácidos orgánicos a lo largo de un ciclo *batch* del AnSBR. Estos experimentos fueron llevados a cabo cuando el reactor se encontró en estado estacionario y fueron muy útiles para estimar las  $-q_s$  y las  $q_{HORG}$ . En base a los resultados obtenidos, cuanto mayor fue el TRS mayor fue la velocidad de consumo de la lactosa. La  $-q_s$  aumentó de 0,10 a 0,12 g DQO-Lactosa g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> al pasar de un TRS de 10 a 15 días (Tabla 3.4). La causa principal de este aumento en la velocidad de consumo fue una mayor concentración de biomasa en el interior del reactor. Al comparar estos datos con la literatura, la velocidad de consumo fue ligeramente superior a la obtenida por Bengtsson *et al.* (2008), con un valor de 0,071 g DQO g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, pero inferior a la obtenida por Calero *et al.* (2018), con un valor de 0,22 g DQO g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Atendiendo a las velocidades de producción de los ácidos orgánicos, fue llamativo la rapidez con la que se produjo el ácido láctico (Tabla 3.4). De entre los AGV, el ácido butírico fue el que tuvo una mayor  $q_{HORG}$ , con valores de 0,019 y 0,011 g DQO-Butírico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para los TRS de 10 y 15 días, respectivamente.

Tabla 3.4. Velocidades de consumo y producción de sustrato y ácidos orgánicos durante un ciclo *batch* del AnSBR para las condiciones de 10 y 15 días de TRS.

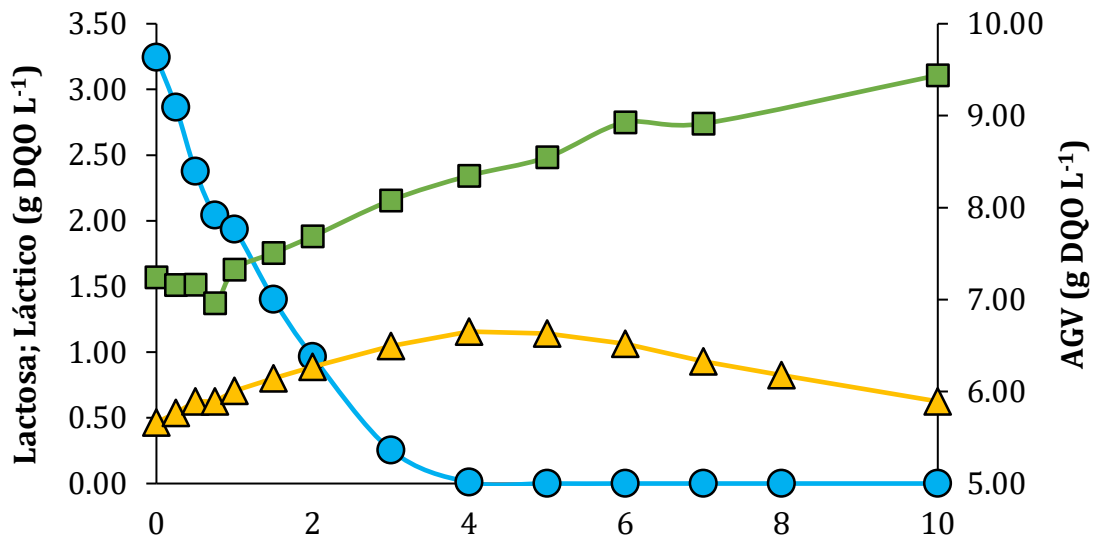
	TRS de 10 días		TRH de 15 días	
	$-q_s^1$	$q_{HORG}^1$	$-q_s$	$q_{HORG}$
Lactosa	0,100	-	0,120	-
Ácido láctico	0,014	0,025	0,010	0,016
Ácido acético	-	0,009	-	0,007
Ácido propiónico	-	0,002	-	0,003
Ácido butírico	-	0,019	-	0,011
Ácido valérico	-	0,005	-	0,001

<sup>1</sup> En g DQO g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Una vez el suero lácteo entró en el AnSBR, la lactosa fue rápidamente consumida del medio. En el caso más rápido (TRS de 15 días) sólo hicieron falta 2 horas, aunque se necesitaron 4 horas cuando se aplicó un TRS de 10 días (Figura 3.4). Una fracción de la lactosa fue transformada en ácido láctico, con independencia del TRS establecido (Figura 3.4). Este hecho confirmó que la fermentación láctica fue uno de los procesos dominantes dentro del reactor, aún incluso cuando no se detectó ácido láctico como producto de fermentación al final del ciclo. El ácido láctico llegó a su pico máximo de concentración justo en el punto exacto en el que la lactosa fue totalmente consumida del medio. A partir de aquí, se inició la transformación del ácido láctico en AGV (Figura 3.4). Este hecho demostró la presencia de un doble metabolismo. En primer lugar, un metabolismo primario que transformó la lactosa en ácido láctico para que, posteriormente, el ácido láctico fuese convertido en AGV (metabolismo secundario). Una dinámica similar fue observada por Domingos *et al.* (2017), aunque a diferencia del citado trabajo, la presente investigación detectó un aumento en la concentración de los AGV desde el inicio del ciclo (Figura 3.4). En base a esta última observación, la transformación directa lactosa → AGV también ha de ser planteada como una ruta alternativa para la producción de AGV. Esta misma evolución también fue descrita por Tamis *et al.* (2015).



A)



B)

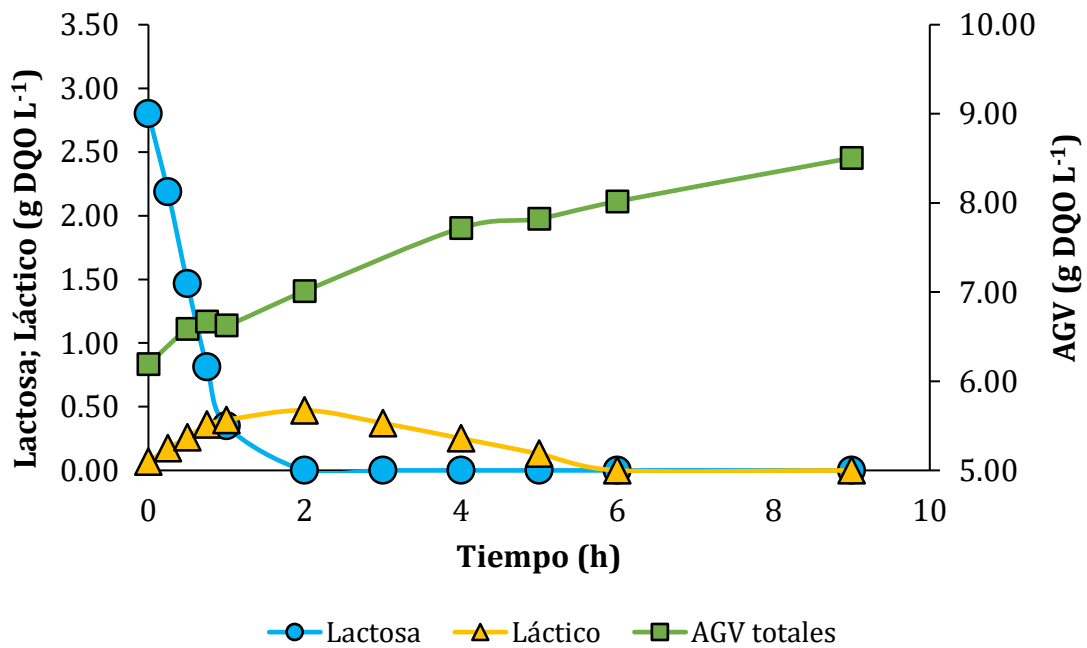


Figura 3.4. Evolución de la lactosa, ácido láctico y AGV a lo largo de un ciclo *batch* en el AnSBR en (A) TRS de 10 días y (B) TRS de 15 días.

---

### 3.4.2 INFLUENCIA DEL TRH SOBRE LA FERMENTACIÓN ACIDOGÉNICA

Se evaluó la influencia del TRH durante aproximadamente 140 días para determinar su efecto sobre los parámetros más importantes a la hora de definir la eficacia del proceso. Primero se estableció un TRH de 3 días, para luego, promover un cambio a un TRH de 1 día. Ambas condiciones se compararon con un TRH de 2 días (misma condición que el TRS de 15 días). Todos los resultados de la operación del AnSBR se resumieron en la Tabla 3.5. A pesar de que las diferencias tanto en el PA como en el  $Y_{AGV/S}$  fueron más pequeñas que en el caso del TRS, sí que se pudo observar una tendencia positiva a medida que el TRH se fue acortando. Así, el PA aumentó de un 79 ( $\pm 5$ ) % a un 83 ( $\pm 3$ ) % al pasar de un TRH de 3 días a un TRH de 1 día. De igual manera, los valores de  $Y_{AGV/S}$  pasaron de un valor de 0,86 ( $\pm 0,06$ ) g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> a un valor de 0,90 ( $\pm 0,05$ ) g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> al disminuir el TRH de 3 a 1 día (Tabla 3.5). El máximo rendimiento se obtuvo, por tanto, a un TRH de 1 día con un valor de 0,90 ( $\pm 0,05$ ) g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>. Este valor fue incluso mejor que el obtenido a un TRH de 2 días y se convirtió en uno de los mejores  $Y_{AGV/S}$  conseguidos hasta el momento usando suero lácteo como sustrato (Tabla 3.3). Sólo Domingos *et al.* (2017) alcanzaron un valor similar, aunque con una VCO más baja a la aplicada en la presente investigación.

Investigaciones ya publicadas sugieren que el PA mejora en paralelo al aumento del TRH hasta cierto punto en el que se alcanza un estancamiento o fase de meseta (Lee *et al.*, 2014a). Sin embargo, uno de los factores que afectan a la hora de aplicar un TRH u otro es la complejidad del sustrato, pues tiempos de retención más largos permitirán a los microorganismos tener más tiempo de reacción con los compuestos orgánicos del residuo. En este sentido, los productos lácteos se caracterizan por una gran cantidad de materia orgánica aunque fácilmente biodegradable, necesitándose poco tiempo para su fermentación. Los resultados de nuestra investigación vinieron a confirmar este hecho, al demostrar que un TRH de 1 día fue suficiente para lograr el pico de máxima acidificación. Sin embargo, sería necesario investigar más para saber si una mayor reducción en el TRH incrementaría todavía más el PA y, por consiguiente, el  $Y_{AGV/S}$ . Kahn *et al.* (2019), por ejemplo, observaron un pico de mayor rendimiento a un TRH de 8 horas.

La productividad siguió la misma dinámica mencionada anteriormente tanto para el PA como para el  $Y_{AGV/S}$  y se pudo observar un ligero aumento al disminuir el TRH. Pasó de 4,53 ( $\pm 0,34$ ) g DQO-AGV  $L^{-1} d^{-1}$  a un TRH de 3 días a 4,65 ( $\pm 0,15$ ) g DQO-AGV  $L^{-1} d^{-1}$  a un TRH de 1 día (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Resultados de la operación del reactor AnSBR en los tres TRH diferentes (2, 3 y 1 día). Se representan los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar entre paréntesis.

	<i>TRH de 2 d</i>	<i>TRH de 3 d</i>	<i>TRH de 1 d</i>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	43	66	42
<i>Carga orgánica (g DQO <math>L^{-1}</math>)</i>	11,54 ( $\pm 0,35$ )	17,13 ( $\pm 0,79$ )	5,58 ( $\pm 0,17$ )
<i>VCO (g DQO <math>L^{-1} d^{-1}</math>)</i>	5,77 ( $\pm 0,17$ )	5,71 ( $\pm 0,26$ )	5,58 ( $\pm 0,17$ )
<i>TRS (d)</i>	15	15	15
<i>Biomasa (g SSV <math>L^{-1}</math>)<sup>1</sup></i>	7,38 ( $\pm 0,66$ )	7,18 ( $\pm 0,44$ )	7,99 ( $\pm 0,56$ )
<i>Relación F/M (g DQO g SSV<sup>-1</sup> <math>d^{-1}</math>)<sup>2</sup></i>	0,81( $\pm 0,04$ )	0,80 ( $\pm 0,06$ )	0,69 ( $\pm 0,05$ )
<i>AGV totales (g DQO-AGV <math>L^{-1}</math>)</i>	10,23 ( $\pm 0,34$ )	14,93 ( $\pm 0,66$ )	5,15 ( $\pm 0,36$ )
<i>Ácido acético (%)</i>	35,71 ( $\pm 3,43$ )	23,33 ( $\pm 2,98$ )	27,97 ( $\pm 3,08$ )
<i>Ácido propiónico (%)</i>	10,99 ( $\pm 1,42$ )	6,83 ( $\pm 2,10$ )	8,84 ( $\pm 4,88$ )
<i>Ácido butírico (%)</i>	48,40 ( $\pm 4,10$ )	60,91 ( $\pm 4,24$ )	53,97 ( $\pm 7,93$ )
<i>Ácido valérico (%)</i>	4,90 ( $\pm 1,32$ )	7,90 ( $\pm 2,28$ )	8,20 ( $\pm 4,06$ )
<i>Ácido láctico (%)</i>	0,00 ( $\pm 0,00$ )	1,04 ( $\pm 1,66$ )	1,02 ( $\pm 0,87$ )
<i>PA (%)<sup>3</sup></i>	83 ( $\pm 4$ )	79 ( $\pm 5$ )	83 ( $\pm 3$ )
<i><math>Y_{AGV/S}</math> (g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>)<sup>4</sup></i>	0,87 ( $\pm 0,03$ )	0,86 ( $\pm 0,06$ )	0,90 ( $\pm 0,05$ )
<i>Productividad (g DQO-AGV <math>L^{-1} d^{-1}</math>)</i>	4,54 ( $\pm 0,48$ )	4,53 ( $\pm 0,34$ )	4,65 ( $\pm 0,15$ )

<sup>1</sup> Concentración de biomasa en el interior del AnSBR.

<sup>2</sup> Relación entre alimentación y microorganismo.

<sup>3</sup> Porcentaje de acidificación.

<sup>4</sup> Rendimiento de acidificación.

Las oscilaciones en la distribución de los AGV no fueron tan pronunciadas como en el caso del TRS. A grandes rasgos, las producciones de ácido acético y ácido butírico fueron las dominantes, independientemente del TRH, con una producción global de entre el 82 – 84% del total de los AGV. Las producciones de ácido propiónico y ácido valérico quedaron en un segundo plano, con una producción que representó el 16 – 18% del total de los AGV (Tabla 3.5; Figura 3.5).

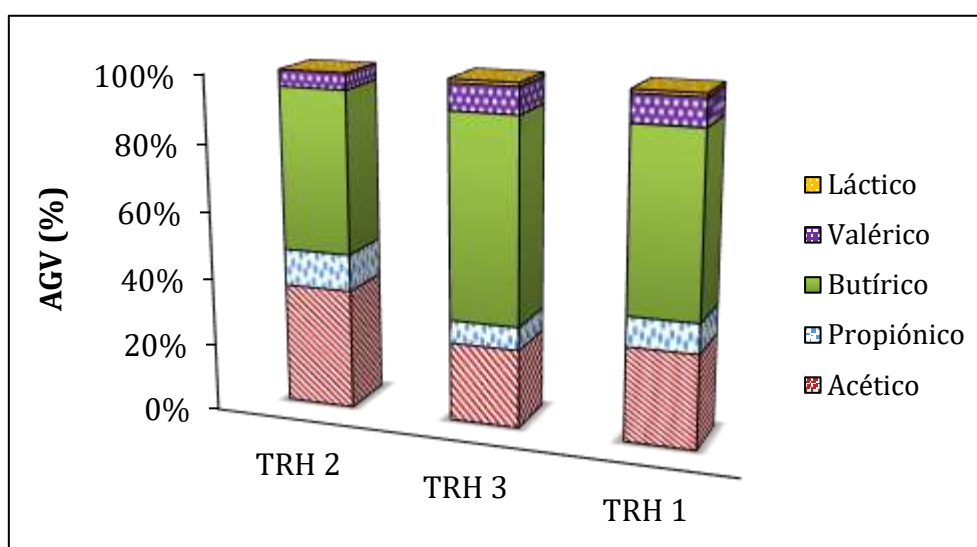


Figura 3.5. Perfil de AGV obtenido para cada uno de los tres TRH (2, 3 y 1 día).

A consecuencia de mantener el TRS constante a 15 días, la concentración de biomasa en el interior del reactor también se mantuvo constante, con valores que oscilaron ligeramente entre 7 – 8 g SSV L<sup>-1</sup>, independientemente del TRH establecido. Esto dio lugar a una relación F/M muy estable que varió entre 0,69 (± 0,05) y 0,80 (± 0,06) g DQO-AGV g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.5). Al establecerse una relación F/M tan baja, el ácido láctico fue prácticamente consumido. Sí que hubo momentos puntuales en los que se detectó una concentración de ácido láctico en el medio, pero ésta fue residual y no se mantuvo a lo largo del tiempo, por lo que el porcentaje global apenas supuso un 1% del total (Tabla 3.5; Figura 3.5). Además, los valores de la relación F/M a los TRH de 3 y 1 día fueron muy similares al obtenido a un TRH de 2 días, lo que originó que la distribución final de los AGV también fuese muy similar. El ácido butírico se convirtió, de lejos, en el producto mayoritario de la fermentación con el ácido acético

en segundo lugar (Figura 3.6). Sin embargo, se observaron ligeras fluctuaciones en la distribución de estos dos AGV de cadena par. La causa de estas variaciones estuvo en la carga orgánica. Así, cuando el reactor trabajó a una carga orgánica de hasta 18 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 3 días), una mayor concentración de ácido butírico se detectó en el efluente (61% del total de los AGV). Mientras, cuando el reactor estuvo trabajando a una carga orgánica de 6 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 1 día), se redujo la producción de ácido butírico a un 54% y aumentó la de ácido acético de un 23 a un 28% (Tabla 3.5; Figura 3.6). Calero *et al.* (2017) obtuvieron resultados similares al registrar un ascenso en la concentración del ácido butírico a medida que se aumentaba la carga orgánica en el medio, hasta el punto de que este metabolito se convirtió en el mayor producto de la fermentación. Kahn *et al.* (2019) también llegaron a conclusiones similares al notar un aumento en la fermentación butírica con el aumento de la carga orgánica.

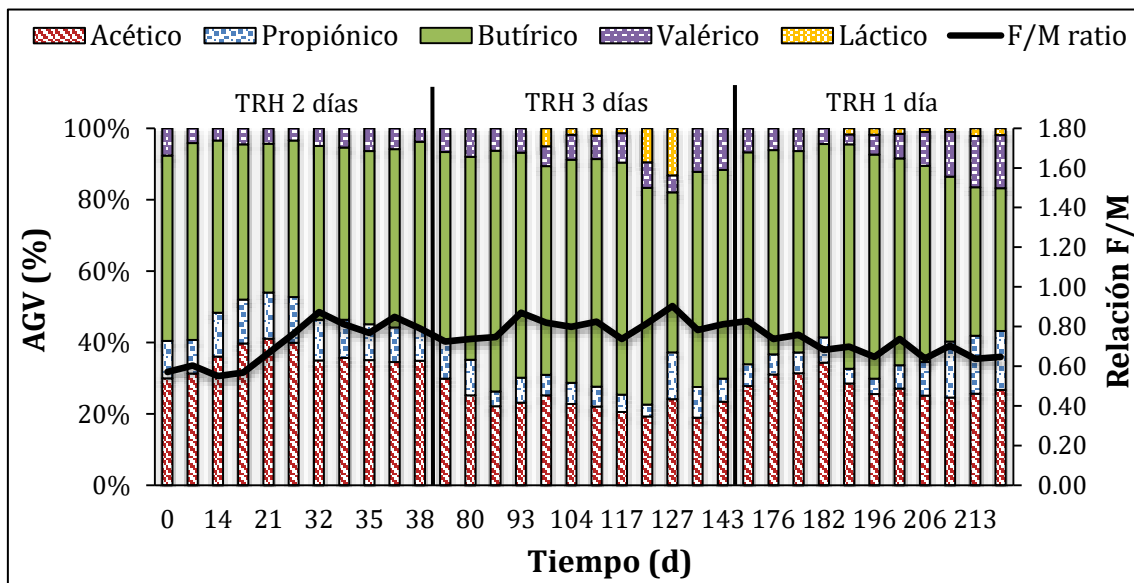


Figura 3.6. Distribución de los AGV en función de la relación F/M para cada uno de los tres TRH (2, 3 y 1 día).

---

### 3.4.2.1 Experimentos a corto plazo

Los experimentos a corto plazo estuvieron diseñados con el objetivo de determinar la influencia de la carga orgánica sobre la  $-q_s$  y la  $q_{HORG}$ . Para ello, se monitorizó la evolución de la lactosa y los ácidos orgánicos a lo largo de un ciclo *batch* del AnSBR. Al igual que en el caso del TRS, los experimentos a corto plazo tuvieron lugar cuando el reactor alcanzó el estado estacionario. Ambos experimentos se compararon con el de un TRH de 2 días. Todos los datos obtenidos se resumieron en la Tabla 3.6. Los resultados mostraron una tendencia muy clara: a menos carga orgánica, más  $-q_s$ . Así, cuando el reactor fue alimentado a una carga orgánica de 6 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 1 día), la biomasa fue capaz de consumir con una mayor velocidad toda la lactosa del medio (0,17 g DQO-Lactosa g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Sin embargo, cuando la carga orgánica fue de 18 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 3 días), la velocidad de consumo de la lactosa se redujo a 0,07 g DQO-Lactosa g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Estos resultados se vieron respaldados por los datos obtenidos a un TRH de 2 días, en los que la  $-q_s$  de la lactosa quedó en una posición intermedia (Tabla 3.6). Debido al retroceso en la velocidad de consumo de la lactosa, todos los demás procesos se vieron afectados. Así, la  $q_{HORG}$  del ácido láctico fue más alta (0,036 g DQO-Láctico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) cuánto más baja fue la carga orgánica (6 g DQO L<sup>-1</sup>; TRH de 1 día) y fue más baja (0,018 g DQO-Láctico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) cuánto más alta fue la carga orgánica (18 g DQO L<sup>-1</sup>; TRH de 3 días) (Tabla 3.6). Igualmente, se observó un retraso en la  $-q_s$  del ácido láctico. Pasó de 0,016 g DQO-Láctico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> cuando el AnSBR operó a 6 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 1 día) a 0,011 g DQO-Láctico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> cuando el AnSBR operó a 18 g DQO L<sup>-1</sup> (TRH de 3 días) (Tabla 3.6). De entre todos los AGV, el ácido butírico volvió a ser el que obtuvo una mayor  $q_{HORG}$ , con un valor máximo de 0,019 g DQO-Butírico g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a un TRH de 3 días (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Velocidades de consumo y producción de sustrato y ácidos orgánicos durante un ciclo *batch* del AnSBR para los TRH de 3 y 1 día. Se compara con el TRH de 2 días.

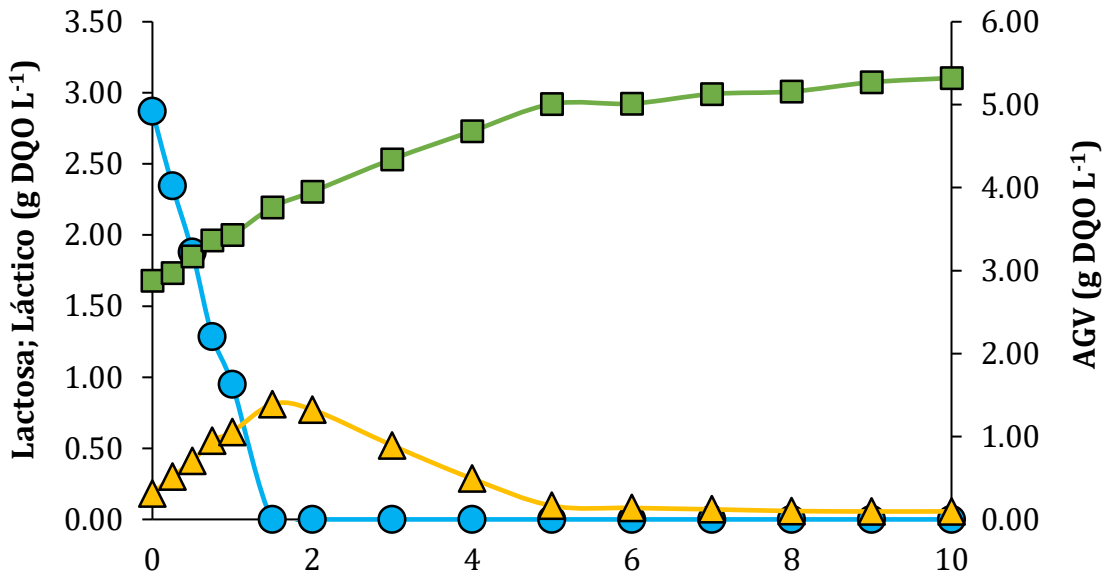
	<i>TRH de 2 días</i>		<i>TRH de 3 días</i>		<i>TRH de 1 día</i>	
	<b>-qs<sup>1</sup></b>	<b>q<sub>HORG</sub><sup>2</sup></b>	<b>-qs</b>	<b>q<sub>HORG</sub></b>	<b>-qs</b>	<b>q<sub>HORG</sub></b>
<i>Lactosa</i>	0,120	-	0,070	-	0,170	-
<i>Ácido láctico</i>	0,010	0,016	0,011	0,018	0,016	0,036
<i>Ácido acético</i>	-	0,007	-	0,004	-	0,004
<i>Ácido propiónico</i>	-	0,003	-	0,001	-	0,003
<i>Ácido butírico</i>	-	0,011	-	0,019	-	0,011
<i>Ácido valérico</i>	-	0,001	-	0,002	-	0,003

La evolución en el consumo de la lactosa así como la producción de los ácidos orgánicos, siguió a la perfección el mismo patrón descrito anteriormente para los TRS de 10 y 15 días. Inmediatamente después de haber introducido el suero lácteo al interior del reactor, se inició la conversión de la lactosa en ácido láctico por acción de las bacterias. El ácido láctico alcanzó su mayor pico de producción en el punto exacto en el que la lactosa fue totalmente consumida del medio. Posteriormente, el ácido láctico empezó a ser transformado a AGV (Figura 3.7). En base a esta dinámica, tanto el metabolismo primario (lactosa → ácido láctico) como el secundario (ácido láctico → AGV) quedaron, de nuevo, de manifiesto. Sin embargo, se volvió a registrar producción de AGV desde el inicio (Figura 3.7), por lo que la transformación directa lactosa → AGV también ha de ser valorada como ruta alternativa para la producción de estos ácidos grasos de cadena corta.

<sup>1</sup> En g DQO g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> En g DQO g DQO-SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

A)



B)

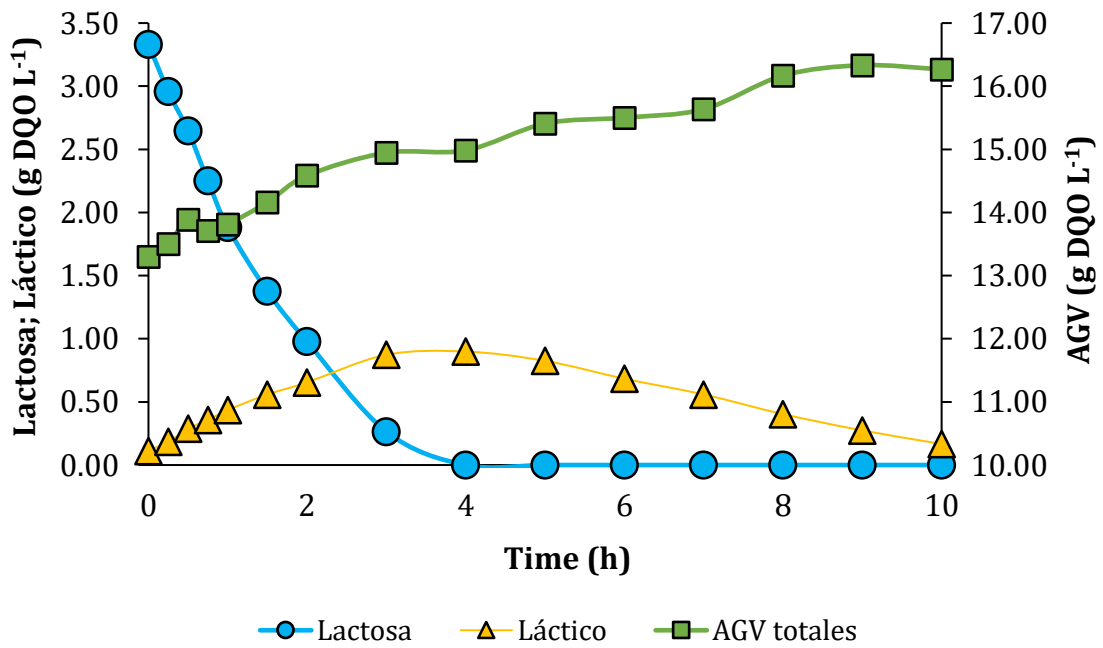


Figura 3.7. Evolución de la lactosa, ácido láctico y AGV a lo largo de un ciclo *batch* en el AnSBR en (A) TRH de 1 día, (B) TRH de 3 días.



### 3.4.3 INFLUENCIA DE LA VCO SOBRE LA FERMENTACIÓN ACIDOGÉNICA

Se estudió la influencia de la VCO durante 86 días aproximadamente, y determinar así, su efecto sobre los parámetros más importantes a la hora de definir la eficacia del proceso. Se evaluaron dos VCO diferentes: 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y se tomó como referencia una VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, que fue la misma condición operacional que cuando se estudió un TRS de 10 días. Todos los resultados de la operación del AnSBR se resumieron en la Tabla 3.7. En base a los resultados obtenidos, se pudo observar un descenso generalizado en el PA al aumentar la VCO. Así, el PA se redujo a un 68% y un 64% para las VCO de 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en comparación al 75% que se alcanzó cuando se estableció la VCO más baja, de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Esto supuso una caída global de entre el 7 – 11% (Tabla 3.7). Por lo tanto, al aumentar la VCO, el PA se vio afectado negativamente. Calero *et al.* (2017) y Calero *et al.* (2018) también observaron una tendencia similar al registrar una reducción en el grado de acidificación del suero lácteo al aumentar la VCO. Wainaina *et al.* (2020) también llegaron a la conclusión de que al aumentar la VCO, el PA disminuía, pero todo en función de la llegada a un óptimo, sin el cual el PA mantendrá una tendencia lineal ascendente (Lee *et al.*, 2014a). A pesar de que los resultados en el presente trabajo detectaron un descenso generalizado en el PA al aumentar la VCO, se ha observado que el Y<sub>AGV/S</sub> se mantuvo en valores muy similares entre sí, independientemente de la VCO aplicada. Así, estos valores fueron de alrededor de 0,80 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup> y muy semejantes al alcanzado con una VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.7). En resumen, al aumentar la VCO, se registró un descenso en el PA, pero no en el Y<sub>AGV/S</sub> que se mantuvo constante a pesar de haber aumentado la VCO. Una explicación a este hecho pudo relacionarse con que los microorganismos no vieron reducida su capacidad para producir AGV a partir de la lactosa, aunque sí a partir de otros componentes del suero lácteo como son, por ejemplo, las proteínas. De hecho, se observó un creciente porcentaje de la DQO soluble en forma de otros compuestos orgánicos diferentes a los AGV. Mientras a una VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> el 95% de la DQO soluble del efluente se correspondía con los AGV, este porcentaje se redujo a un 85 – 86% a los periodos en los que se aplicó una VCO de 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.7). Una reducción del 9 – 10% que indicó la presencia en el efluente de otros componentes diferentes a los AGV.

Tabla 3.7. Resultados de la operación del AnSBR en función de las tres VCO diferentes: 6, 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Se representan los valores medios con las respectivas desviaciones estándar entre paréntesis.

	<i>VCO de 6</i> <i>g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></i>	<i>VCO de 10</i> <i>g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></i>	<i>VCO de 8</i> <i>g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></i>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	41	35	51
<i>Carga orgánica (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	12,06 (± 0,44)	18,93 (± 1,82)	15,20 (± 1,20)
<i>TRH (d)</i>	2	2	2
<i>VCO (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	6,03 (± 0,22)	9,48 (± 0,91)	7,60 (± 0,60)
<i>TRS (d)</i>	10	10	10
<i>Biomasa (g SSV L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></i>	5,36 (± 0,52)	10,73 (± 1,39)	8,80 (± 0,80)
<i>Relación F/M (g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></i>	1,13 (± 0,09)	0,89 (± 0,10)	0,86 (± 0,09)
<i>AGV totales (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	9,44 (± 0,40)	13,72 (± 0,70)	11,15 (± 0,87)
<i>Ácido acético (%)</i>	25,83 (± 3,36)	32,50 (± 1,34)	35,75 (± 1,46)
<i>Ácido propiónico (%)</i>	7,52 (± 1,46)	7,51 (± 1,83)	14,83 (± 1,84)
<i>Ácido butírico (%)</i>	59,62 (± 2,71)	52,60 (± 3,76)	42,46 (± 1,18)
<i>Ácido valérico (%)</i>	5,46 (± 2,20)	5,12 (± 0,54)	6,95 (± 0,78)
<i>Ácido láctico (%)</i>	1,57 (± 1,86)	2,28 (± 3,25)	0,00
<i>PA (%)<sup>3</sup></i>	75 (± 3)	68 (± 5)	64 (± 4)
<i>Y<sub>AGV/S</sub> (g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>)<sup>4</sup></i>	0,78 (± 0,03)	0,80 (± 0,07)	0,79 (± 0,05)
<i>Productividad (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	4,51 (± 0,20)	6,38 (± 0,35)	4,67 (± 0,45)
<i>AGV/DQO (%)<sup>5</sup></i>	95 (± 3)	85 (± 6)	86 (± 8)

<sup>1</sup> Concentración de biomasa en el interior del AnSBR.

<sup>2</sup> Relación entre alimentación y microorganismo.

<sup>3</sup> Porcentaje de acidificación.

<sup>4</sup> Rendimiento de acidificación.

<sup>5</sup> Porcentaje de la DQO soluble del efluente que se encuentra en forma de AGV.

La concentración de AGV en el efluente fue en aumento a medida que la VCO también lo fue. Así, se alcanzó una producción máxima de  $13,72 (\pm 0,70)$  g DQO L<sup>-1</sup> para una VCO de 10 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.7). Al igual que lo ocurrido para el caso del TRH, la distribución final de los AGV fue muy similar entre las VCO de 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con respecto a la VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Esta distribución tuvo al ácido acético y al ácido butírico como los principales productos de la fermentación, con un porcentaje global que alcanzó el 78 – 85%. Por su parte, el ácido propiónico y el ácido valérico quedaron en un segundo plano, representando el 15 – 22% (Tabla 3.7; Figura 3.8). A pesar de la similitud en el perfil de AGV, también se pudieron observar diferencias entre ambas condiciones. Por ejemplo, fue llamativo el aumento en la fermentación propiónica en detrimento de la fermentación butírica cuando se estableció una VCO de 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 3.8). Así, el ácido propiónico dobló su producción al pasar de un 7,51% a un 14,83% mientras que la producción del ácido butírico se redujo de un 52,60% a un 42,46% (Tabla 3.7; Figura 3.8). Los motivos de este aumento en la fermentación propiónica son desconocidos, pues el pH se mantuvo constante a lo largo de toda la operación. Para encontrar las causas de este cambio en el patrón de producción de los AGV, quizá habría que estudiar los cambios que se hayan podido producir en la composición de la comunidad microbiana.

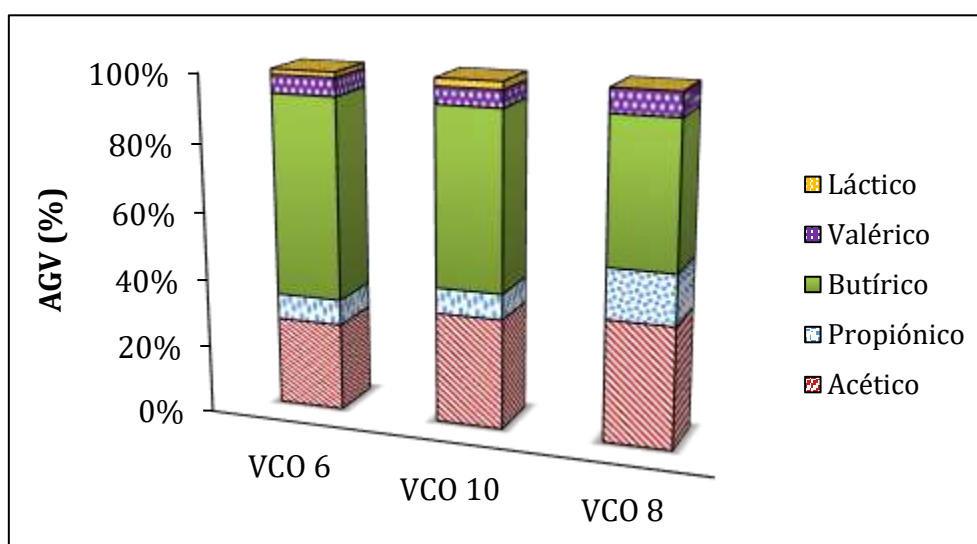
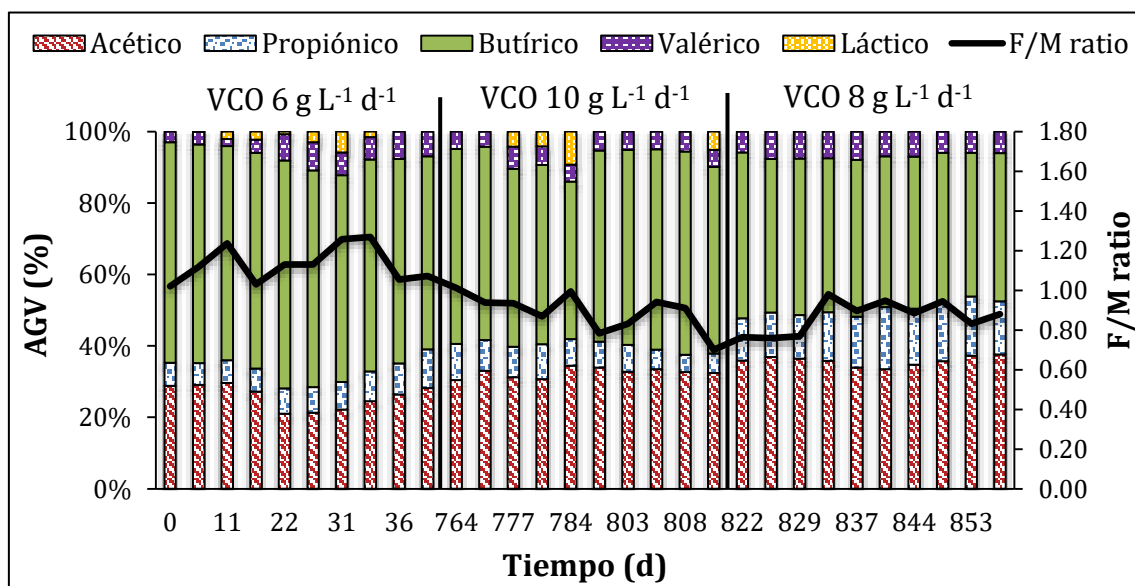


Figura 3.8. Perfil de AGV obtenido para cada una de las tres VCO (6, 10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

A consecuencia de haber aumentado el aporte de sustrato al medio, la concentración de biomasa en el interior del reactor también fue en aumento, aun a pesar de haber mantenido el TRS constante a 10 días. Al aumentar ambos parámetros, alimentación y biomasa, la relación F/M se mantuvo estable con valores de 0,86 – 0,89 g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Al mantener una relación F/M con valores por debajo de 1, se permitió un consumo casi completo del ácido láctico para su conversión a AGV. Su presencia en el medio se aisló a picos puntuales, aunque estos no supusieron un porcentaje global muy elevado (Figura 3.9). La fermentación butírica fue el proceso predominante en el interior del reactor, independientemente de la VCO. Sin embargo, sí que se pudo observar que en ninguna de las dos VCO más elevadas (10 y 8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se llegó a la producción de 59,62% alcanzada con una VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabla 3.7; Figura 3.9).



---

#### 3.4.4 ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIOLÓGICA

Los análisis metagenómicos permitieron no sólo determinar cuál fue la composición de la comunidad microbiana, sino también determinar las dinámicas poblacionales y la función de cada población dentro de la comunidad. Después de procesar todas las muestras de secuenciación siguiendo el flujo de trabajo diseñado por Callahan *et al.* (2016b), las lecturas obtenidas oscilaron entre las 65000 y las 102000. Este número de lecturas se consideró suficiente para poder dar una visión global y fiable de toda la comunidad (Campanaro *et al.*, 2018). La diversidad alfa incluyó cálculos para determinar tanto la riqueza como la biodiversidad del ecosistema y, en ambos casos, se usaron los valores enrarecidos de las muestras. Los resultados mostraron un reactor altamente enriquecido, independientemente del TRS aplicado. A pesar de ello, sí que se pudieron observar diferencias entre los diferentes TRS estudiados. Al establecer los tiempos de retención más bajos (5 y 10 días), el número de unidades operacionales taxonómicas (OTUs) fue menor. Se contaron sólo 64 y 57 OTUs, respectivamente. Al contrario, cuando se estableció un TRS más alto (15 días), el conteo dio lugar a un mayor número de OTUs (72). Una explicación racional a estos resultados fue que, cuando el AnSBR se operó con los TRS más bajos, las poblaciones bacterianas se limitaron sólo a aquellas con una mayor velocidad de crecimiento. Mientras, cuando el AnSBR se operó al TRS más alto, se permitió la aparición de poblaciones con una tasa de crecimiento inferior. El índice de Shannon siguió a la perfección el mismo patrón, y la biodiversidad fue más baja para las muestras en las que se establecieron los TRS más bajos. Los TRS de 5 y 10 días tuvieron valores de 1,98 y 1,69, respectivamente. Sin embargo, el valor fue de 2,51 cuando el TRS subió hasta los 15 días.

Los datos de las abundancias relativas de las distintas poblaciones confirmaron los resultados de baja biodiversidad y alto grado de enriquecimiento observados para la comunidad microbiana. Así, todos los OTUs identificados se agruparon en sólo 7 filos diferentes, aunque la presencia de dos de ellos (*Acidobacteria* y *Spirochaetes*) fue meramente testimonial, con menos de un 1% en su abundancia relativa (Figura 3.10). La otra cara de la moneda fue *Firmicutes*, con diferencia el filo más abundante de toda la comunidad. *Firmicutes* tuvo una cobertura que representó más de la mitad de la abundancia relativa de toda la comunidad microbiana, con independencia del

TRS establecido, aunque destacó especialmente a un TRS de 10 días, en donde sólo su abundancia supuso un 86,9% del total de la comunidad (Figura 3.10). En base a las dinámicas poblacionales, se pudo observar 3 tipos de comportamientos distintos en las poblaciones. En primer lugar, estuvieron las poblaciones sensibles al cambio. En esta categoría se incluyó *Actinobacteria*. Este filo vio drásticamente reducida su abundancia de un 22 a un 2,4% con el simple aumento del TRS de 5 a 10 días (Figura 3.10). En segundo lugar, se encontraron las poblaciones favorecidas por el cambio. Aquí se agruparon *Patescibacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. El aumento en la abundancia de *Patescibacteria* fue gradual, al pasar de un 5% (TRS de 5 días) a un 10% (TRS de 10 días) y un 15% (TRS de 15 días). En el caso de *Proteobacteria* y de *Bacteroidetes* la dinámica fue diferente, al producirse un aumento muy brusco en su abundancia (Figura 3.10). La abundancia relativa de *Bacteroidetes* se incrementó en un 700% al pasar de una cobertura del 0,6% a un TRS de 10 días a un 4,3% a un TRS de 15 días. El incremento en el caso de *Proteobacteria* fue todavía más pronunciado al pasar de una cobertura del 0,2% a un TRS de 10 días a representar el 12,4% de la comunidad a un TRS de 15 días, lo que supuso un aumento en su abundancia de 62 veces. Por último, se encontraron las poblaciones insensibles al cambio. En esta categoría se incluyó el filo *Firmicutes*. Independientemente del TRS establecido, la dominancia de este filo permaneció invariable (Figura 3.10).

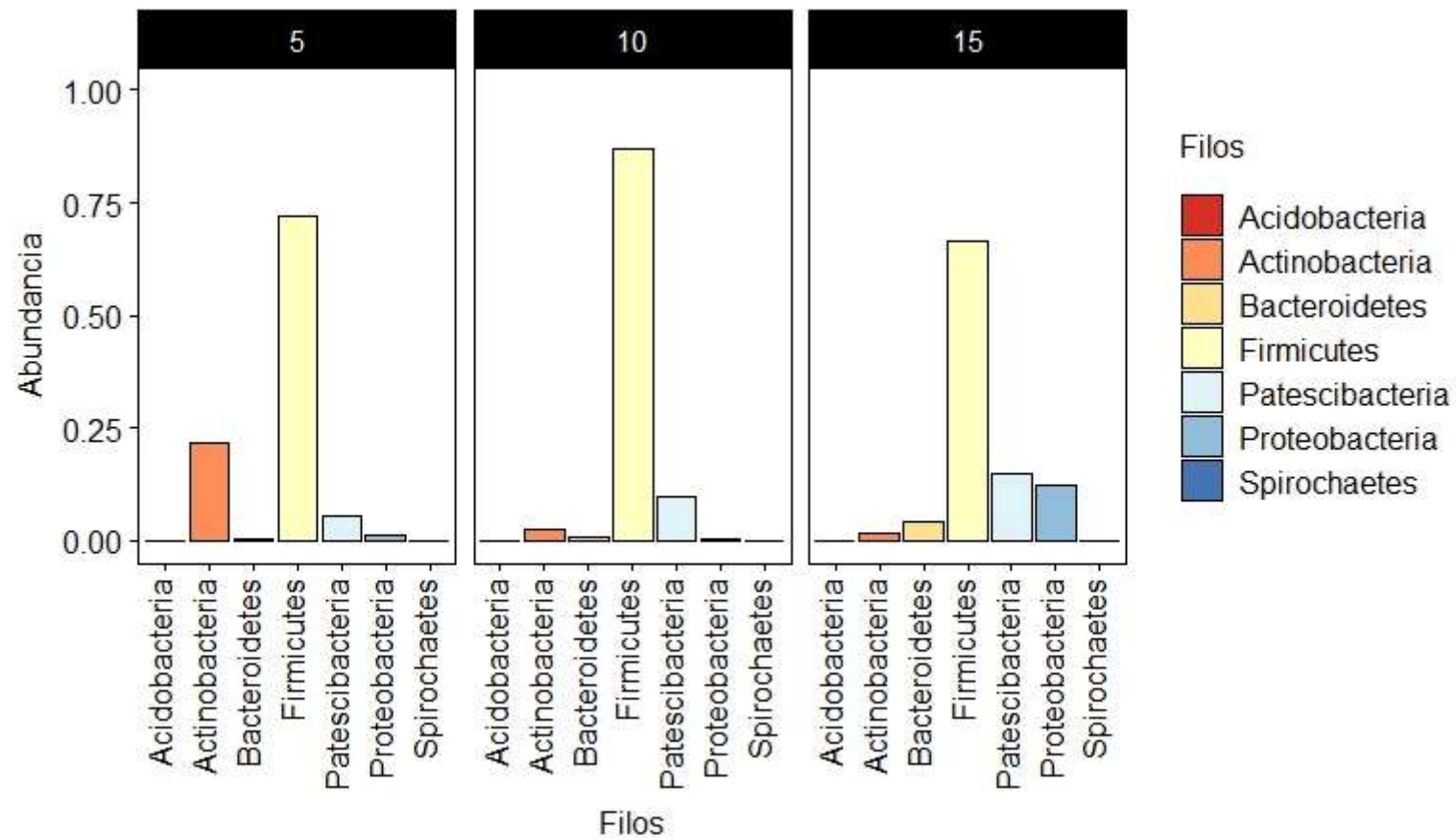


Figura 3.10. Abundancias relativas a nivel filo para un TRS de 5 días (5), un TRS de 10 días (10) y un TRS de 15 días (15).

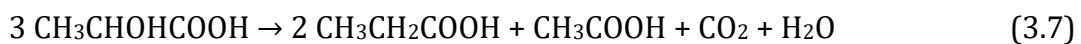
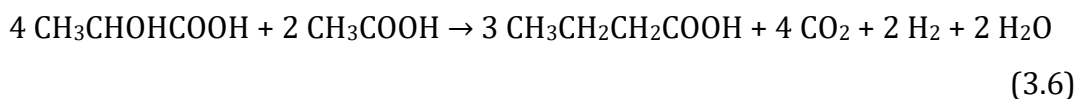
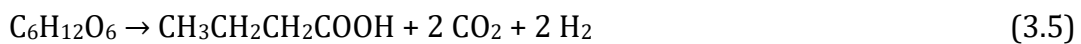
El filo *Firmicutes* estuvo representado por 4 géneros principales. *Lactobacillus*, *Megasphaera* y *Caproiciproducens* fueron los 3 más abundantes y se fueron sucediendo el uno al otro en la comunidad microbiana al cambiar las condiciones operacionales. *Pectinatus* fue el cuarto género y, aunque tuvo una menor influencia en la comunidad, su abundancia se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento (Figura 3.11). Los miembros del género *Lactobacillus* están en estrecha relación con los productos lácteos y no es la primera vez que se detecta su presencia en sistemas de fermentación acidogénica alimentados con suero lácteo (Gouveia *et al.*, 2016; Domingos *et al.*, 2017). Además, también se ha demostrado que su presencia es más abundante cuanto más bajo sea el pH del medio (Cheng *et al.*, 2014). Por ambas razones, la presencia de *Lactobacillus* en la comunidad microbiana no fue una novedad. Atendiendo a su dinámica poblacional, *Lactobacillus* sufrió una reducción diferencial en su abundancia. Pasó de ser la población bacteriana más abundante del reactor con un 52,2% (TRS de 5 días) a que su abundancia se redujese primero a un 26,3% (TRS de 10 días) y después a un 13,1% (TRS de 15 días), lo que supuso un valor de cambio de aproximadamente -0,25 puntos (Figura 3.11). Esto significó que su rol en la comunidad fue perdiendo importancia conforme el TRS se fue alargando. Los miembros de esta población son reconocidos LAB, es decir, son capaces de llevar a cabo la fermentación de carbohidratos como la glucosa con producción final de ácido láctico, en un proceso de fermentación homoláctica y que se detalla en la ecuación 3.4.



La principal población que reemplazó a *Lactobacillus* a medida que el TRS se fue alargando fue *Megasphaera*. *Megasphaera* fue increíblemente abundante a un TRS de 10 días, con más de la mitad del total de la abundancia relativa de toda la comunidad (53,1%). Esto supuso un incremento de hasta casi 4 veces con respecto a su abundancia en la condición anterior (13,9%) (Figura 3.11). Al aumentar el TRS todavía más hasta los 15 días, *Megasphaera* siguió siendo la especie más abundante de la comunidad, pero su porcentaje final se vio reducido a un 37,2% (Figura 3.11). En términos generales, los miembros pertenecientes a este género son reconocidos como bacterias fermentadoras con una gran capacidad de producir ácidos orgánicos (Lobato *et al.*, 2017). En esta línea, Polansky *et al.* (2016) observó que *Megasphaera*

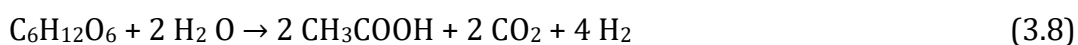


se caracterizó por la expresión de la enzima acetyl-CoA acetiltransferasa, la cual está involucrada en la síntesis de ácido butírico. Además, los miembros de *Megasphaera* expresan una de estas dos enzimas, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa, ambas relacionadas también con la síntesis de este AGV. Feng *et al.* (2018) reportó la habilidad de *Megasphaera* para producir ácido butírico, bien a partir de glucosa o bien a partir de ácido láctico y ácido acético. En la presente investigación se ha observado una evolución conjunta muy evidente entre la abundancia relativa de *Megasphaera* y la concentración del ácido butírico en el medio. Por esta razón, es de suponer que las rutas metabólicas de esta población estuvieron dirigidas hacia la producción de este AGV siguiendo las ecuaciones 3.5 y 3.6. Weimer & Moen (2013), además, describieron una vía alternativa para el crecimiento de *Megasphaera*. En esta ruta metabólica, *Megasphaera* obtuvo la energía necesaria a partir de la fermentación del ácido láctico con producción final de ácido propiónico y ácido acético (ecuación 3.7). Esta ruta, junto con la definida en la ecuación 3.6, podría ser una de las vías de consumo del ácido láctico que se han observado a lo largo de los experimentos a corto plazo diseñados en la presente investigación.



El descenso observado de *Megasphaera* a un TRS de 15 días fue una consecuencia del aumento observado en la abundancia de otras poblaciones bacterianas y, entre ellas, la del género *Caproiciproducens*. Los miembros de este género se convirtieron en uno de los taxones con un mayor incremento diferencial dentro de la comunidad. Presentaron un valor de cambio de aproximadamente 0,75 puntos y su presencia se limitó en exclusiva a un TRS de 15 días (8,9%) (Figura 3.11). Las rutas metabólicas por las que esta población obtiene la energía necesaria para su crecimiento todavía no son muy conocidas pero, tal y como ha sido descrito por Kim *et al.* (2015) y Feng *et al.* (2018), son capaces de fermentar la glucosa obteniendo ácido acético, butírico y caproico como productos finales de su fermentación. El ácido caproico no ha sido detectado en nuestro estudio. En base a la dinámica poblacional y a la distribución

final de los AGV observados en la presente investigación, la función de los miembros de esta población podría haber estado relacionada tanto con la producción de ácido butírico (ecuación 3.5) como con la producción de ácido acético (ecuación 3.8).



Finalmente, *Pectinatus* fue el último género perteneciente al filo *Firmicutes*. Su abundancia relativa no se vio muy influenciada por el aumento del TRS y ésta se mantuvo siempre en valores muy estables a lo largo de todo el experimento (5,6 – 7%) (Figura 3.11). Según Dennis *et al.* (2013), la principal actividad metabólica de los miembros pertenecientes a este género estuvo relacionada con la producción de ácido propiónico. Además, Lee *et al.* (1978) observaron que los miembros de este género son capaces de crecer tanto a partir del uso del ácido láctico (ecuación 3.7) como del uso de la glucosa (ecuación 3.9).



Otras de las poblaciones bacterianas que se han desarrollado con una abundancia relativamente alta en el interior del reactor fueron miembros pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Pantoea*, al igual que miembros no identificados del orden *Saccharimonadales*. *Bifidobacterium* fue el principal género perteneciente al filo *Actinobacteria* y el segundo género más abundante de la comunidad microbiana a un TRS de 5 días, con una cobertura del 20,2%. Sin embargo, los miembros de esta población registraron un descenso muy brusco en su abundancia, hasta el punto de cubrir sólo un 2,1 y un 1,2% de la comunidad microbiana a los TRS de 10 y 15 días, respectivamente (Figura 3.11). Esto supuso una reducción diferencial de -0,5 puntos en su abundancia, lo que vino a significar que su rol en la comunidad fue perdiendo influencia a medida que se incrementó el TRS. Los miembros de *Bifidobacterium* son bacterias anaerobias, gram positivas y que, al igual que los miembros del género *Lactobacillus*, tienen una estrecha relación con los productos lácteos. Son bacterias fermentadoras de azúcares y, de hecho, su capacidad para la fermentación de la lactosa ya ha sido demostrada (Fontana *et al.*, 2018). A diferencia de los miembros del género *Lactobacillus*, los miembros del género *Bifidobacterium* llevan a cabo una fermentación heteroláctica, esto es, son capaces de producir ácido láctico aunque el principal producto de su fermentación es el ácido acético (ecuación 3.10).



*Pantoea* fue el género más abundante perteneciente al filo *Proteobacteria*. Su presencia estuvo asociada exclusivamente a un TRS de 15 días y fue el género con una mayor regulación positiva de toda la comunidad, al presentar un valor de cambio de hasta 1,5 puntos (Figura 3.11). *Pantoea agglomerans* fue el OTU más abundante perteneciente al género *Pantoea*. Según observaciones realizadas por Barbirato *et al.* (1997), Ma *et al.* (2015) o Cortivo *et al.* (2019), la especie *Pantoea agglomerans* realizó una fermentación aceto-alcohólica de diferentes carbohidratos y, entre ellos, la glucosa con producción final de ácido acético y diferentes alcoholes como el etanol o el 2,3-butanodiol. En la presente investigación no se ha detectado ningún alcohol como producto final de la fermentación por lo que, probablemente, el producto final de su fermentación haya sido el ácido acético en base a la ecuación 3.8. Finalmente, los miembros no identificados del orden *Saccharimonadales* fueron los representantes del filo *Patescibacteria*. Su presencia fue detectada en todas las condiciones, con una tendencia al alza a medida que el TRS se fue aumentando y una abundancia máxima del 14,8% a un TRS de 15 días (Figura 3.11). Mediante ensayos fisiológicos, Kindaichi *et al.* (2016) determinaron que los miembros pertenecientes a este grupo taxonómico fueron capaces de llevar a cabo la fermentación de glucosa bajo condiciones anaerobias. Sin embargo, la información todavía es insuficiente en relación a sus rutas metabólicas y los productos finales de su fermentación, por lo que se requiere una mayor investigación para poder determinar cuál fue su función en el conjunto de la comunidad microbiana.

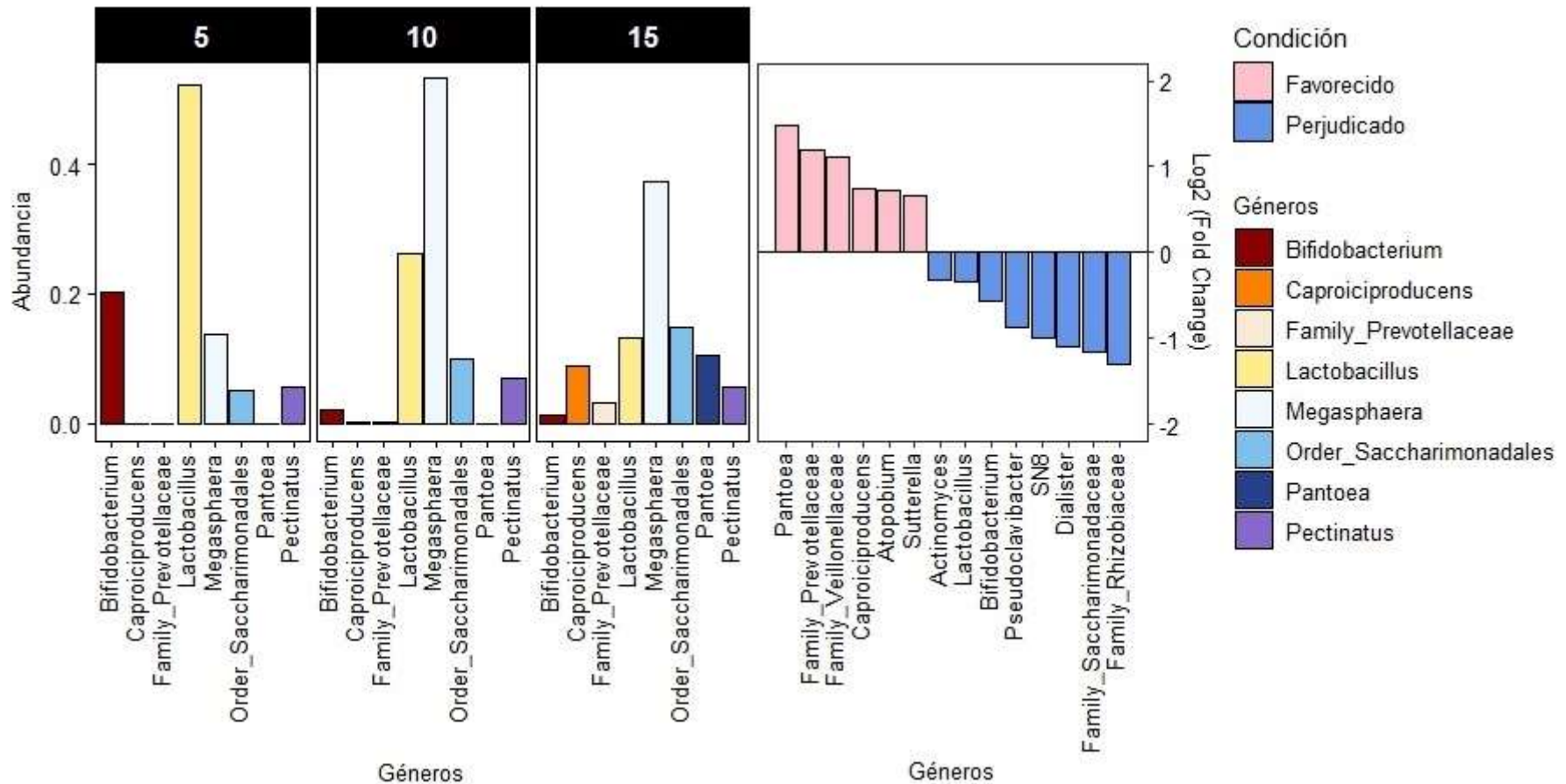


Figura 3.11. Abundancia relativa a nivel género para los TRS de 5 días (5), 10 días (10) y 15 días (15). La gráfica de la derecha muestra los taxones diferenciales con el aumento del TRS. Los taxones que presentan un aumento diferencial en su abundancia se muestran en color rosa mientras que los taxones que presentan una reducción diferencial en su abundancia se muestran en color azul. El valor de cambio está en forma de logaritmo en base 2.

Una vez reveladas las actividades metabólicas, éstas pusieron de manifiesto que la mayor parte de las poblaciones bacterianas estuvieron fuertemente asociadas a la fermentación de carbohidratos, único sustrato en el medio (lactosa). Es imaginable pues, que entre las distintas poblaciones se generase una fuerte competencia por el sustrato, especialmente cuando éste fue introducido en un corto periodo de tiempo (5 min). Sólo las poblaciones con una mayor velocidad de consumo, con la capacidad de obtener la energía para su crecimiento a partir de productos intermedios o con otras ventajas adaptativas, fueron capaces de sobrevivir. Sin embargo, en base a los resultados que se han obtenido de nuestro estudio, modificar ciertas condiciones de operación, como el TRS, alteran dicha competencia ya sea por favorecer o perjudicar a determinadas poblaciones. En última instancia, una alteración en la composición de la comunidad microbiana supondrá un cambio en la distribución final de los AGV. A través de análisis individuales de cada condición, fue posible correlacionar el perfil de los AGV con la comunidad microbiana desarrollada en el interior del AnSBR para cada etapa. Así, al principio del experimento en el que se estableció un TRS de 5 días, las poblaciones bacterianas que dominaron la comunidad fueron aquellas con una estrecha relación con los productos lácteos: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Ambas poblaciones tienen la capacidad de producir ácido láctico por lo que la fermentación láctica fue, con diferencia, el proceso predominante durante esta condición. Además, *Bifidobacterium* realizó una fermentación heteroláctica de la glucosa, produciendo también ácido acético. La presencia en el medio tanto de ácido láctico como de ácido acético supuso una fuente de crecimiento para otras poblaciones. Así, *Megasphaera* y *Pectinatus* pudieron haber obtenido la energía que necesitan para su crecimiento de ambos compuestos. Esto supuso que la distribución final de los AGV durante esta primera etapa estuviese dividida entre el ácido acético, propiónico, butírico y láctico (Figura 3.2). Al incrementar el TRS de 5 a 10 días hubo un cambio estructural en la composición de la comunidad microbiana y, por consiguiente, en el perfil de los AGV. *Lactobacillus* pero, sobre todo, *Bifidobacterium* fueron desplazadas por el aumento en la abundancia de *Megasphaera*. A consecuencia de este cambio en la composición, la fermentación láctica perdió peso en el global del proceso y *Megasphaera* tuvo una posición ventajosa para utilizar la lactosa como fuente de crecimiento mediante la fermentación butírica. Esto, a su vez, provocó que el ácido láctico fuese consumido casi por completo. Así, el ácido butírico se convirtió, con diferencia, en el producto

de fermentación mayoritario (Figura 3.2). Finalmente, cuando se aumentó el TRS de 10 a 15 días, el cambio en la composición de la comunidad microbiana no fue tan drástico. *Megasphaera* siguió siendo la población dominante, aunque su abundancia se vio reducida respecto a la condición anterior. Esto conllevó a un descenso en la producción de ácido butírico (Figura 3.2). Además, la aparición de las poblaciones de *Caproiciproducens* y *Pantoea* pudo haber estado detrás del aumento observado en la concentración de ácido acético con respecto a la condición anterior (Figura 3.2).

### 3.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio, se pudo concluir que el AnSBR fue un sistema robusto y efectivo para los procesos de acidificación de suero lácteo usando MMC. Parámetros como el TRS, TRH o VCO tuvieron una fuerte influencia no sólo sobre la eficacia del proceso sino también sobre el perfil de AGV obtenido al final del ciclo. De todas las condiciones estudiadas, el mejor PA y  $Y_{AGV/S}$  se obtuvieron a un TRS de 15 días, TRH de 1 día y VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con un valor de 83% y 0,90 g DQO-AGV g DQO-Lactosa<sup>-1</sup>, respectivamente. El ácido butírico fue el principal producto de la fermentación. Finalmente, las poblaciones bacterianas que dominaron en la comunidad se pudieron manipular por cambios en determinados parámetros como el TRS. Poblaciones con un rol más ligado a la fermentación láctica predominaron a tiempos de retención más cortos, mientras que bacterias con un rol más dirigido hacia la fermentación butírica dominaron a tiempos de retención más largos. Esto concordó muy bien con el perfil de AGV obtenido durante la operación del reactor.

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. J. Biotechnol. 130, 411 – 421.

- 2 APHA-AWWA-WPCF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- 3 Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., Cetecioglu, Z., 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: current status and future challenges. *Bioresour. Technol.* 268, 773 – 786.
- 4 Barbirato, F., Astruc, S., Soucaille, P., Camarasa, C., Salmon, J.M., Bories, A., 1997. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiol.* 143, 2423 – 2432.
- 5 Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochem. Eng. J.* 40, 492 – 499.
- 6 Bermúdez-Penabad N., Kennes C., Veiga M.C., 2017. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. *Waste Manag.* 68, 96 – 102.
- 7 Bhatia, S.K., Yang, Y.H., 2017. Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16, 327 – 345.
- 8 Calero, R., Iglesias-Iglesias, R., Kennes, C., Veiga, M.C., 2017. Organic loading rate effect on the acidogenesis of cheese whey: a comparison between UASB and SBR reactors. *Environ. Tech.* 39, 3046 – 3054.
- 9 Calero, R.R., Lagoa-Costa, B., Fernandez-Feal, M.M.C., Kennes, C., Veiga, M.C., 2018. Volatile fatty acids production from cheese whey: influence of pH, solid retention time and organic loading rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 1742 – 1747.
- 10 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016a. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581 – 583.
- 11 Callahan, B.J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2016b. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5, 1492.

- 12 Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Luo, G., Angelidaki, I., 2018. Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale biogas plants. *Water Res.* 140, 123 – 134.
- 13 Chen, Y., Xiao, K., Shen, N., Zeng, R.J., Zhou, Y., 2018. Hydrogen production from a thermophilic alkaline waste activated sludge fermenter: Effects of solid retention time (SRT). *Chemosphere* 206, 101 – 106.
- 14 Cheng, W., Chen, H., Yan, S., Su, J., 2014. Illumina sequencing-based analyses of bacterial communities during short-chain fatty-acid production from food waste and sewage sludge fermentation at different pH values. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2387 – 2395.
- 15 Cortivo, P.R.D., Machado, J., Hickert, L.R., Rossi, D.M., Ayub, M.A.Z., 2019. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 and *Pantoea agglomerans* BL1 cultivated in acid and enzymatic hydrolysates of soybean hull. *Biotechnol. Prog.* 35.
- 16 Dennis, P.G., Harnisch, F., Yeoh, Y.K., Tyson, G.W., Rabaey, K., 2013. Dynamics of cathode-associated microbial communities and metabolite profiles in a glycerol-fed bioelectrochemical system. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4008 – 4014.
- 17 Domingos, J.M.B., Martinez, G.A., Scoma, A., Fraraccio, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., Reis, M.A.M., Fava, F., Bertin, L., 2017. Effect of operational parameters in the continuous anaerobic fermentation of cheese whey on titers, yields, productivities, and microbial community structures. *Sustainable Chem. Eng.* 5, 1400 – 1407.
- 18 Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* 31, 276 – 288.
- 19 Eggeman, T., Verser, D., 2005. Recovery of Organic Acids from Fermentation Broths. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 605 – 618.
- 20 FEGA, 2018. Declaraciones Obligatorias del Sector Vacuno de Leche. [https://www.fega.es/sites/default/files/Fega\\_Declarac\\_Lacteo\\_Vacuno\\_2019\\_09.pdf?token=z14Zf5D5](https://www.fega.es/sites/default/files/Fega_Declarac_Lacteo_Vacuno_2019_09.pdf?token=z14Zf5D5)



- 21 Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180 – 188.
- 22 Fontana, A., Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Cappa, F., Morelli, L., Angelidaki, I., 2018. Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. *Water Res.* 134, 181 – 191.
- 23 Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., Etchebehere, C., 2018. Work scheme to isolate the different micro-organisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis. *J. Appl. Microbiol.* 125, 96 – 110.
- 24 Goud, R.K., Arunasri, K., Yeruva, D.K., Krishna, K.V., Dahiya, S., Mohan, S.V., 2017. Impact of selectively enriched microbial communities on long-term fermentative biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 242, 253 – 264.
- 25 Gouveia, A.R., Freitas, E.B., Galinha, C.F., Carvalho, G., Duque, A.F., Reis, M.A.M., 2016. Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. *N. Biotechnol.* 37, 108 – 116.
- 26 Iglesias-Iglesias, R., Campanaro, S., Treu, L., Kennes, C., Veiga, M.C., 2019. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. *Bioresour. Technol.* 291, 121817.
- 27 Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chem. Eng. J.* 326, 901 – 910.
- 28 Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517 – 5530.
- 29 Jin, Y., Lin, Y., Wang, P., Jin, R., Gao, M., Wang, Q., Chang, T., Ma, H., 2019. Volatile fatty acids production from saccharification residue from food waste ethanol fermentation: Effect of pH and microbial community. *Bioresour. Technol.* 292, 121957.
- 30 Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W., Liu, Y., Nghiem, L.D., Chang, S.W., Nguyen, D. D., Zhang, S., Luo, G., Jia, H., 2019. Optimization of hydraulic retention time

- and organic loading rate for volatile fatty acid production from low strength wastewater in an anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 271, 100 – 108.
- 31 Kindaichi, T., Yamaoka, S., Uehara, R., Ozaki, N., Ohashi, A., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., 2016. Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
  - 32 Kim, B.C., Seung Jeon, B., Kim, S., Kim, H., Um, Y., Sang, B.I., 2015. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4902 – 4908.
  - 33 Lagoa-Costa, B., Abubackar, H.N., Fernández-Romasanta, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2017. Integrated bioconversion of syngas into bioethanol and biopolymers. *Bioresour. Technol.* 239, 244 – 249.
  - 34 Lee, S.Y., Mabee, M.S., Jangaard, N.O., 1978. *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 582 – 594.
  - 35 Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014a. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* 235, 83 – 99.
  - 36 Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014b. Influence of temperature on the bioconversion of palm oil mill effluent into volatile fatty acids as precursor to the production of polyhydroxyalkanoates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1038 – 1043.
  - 37 Li, Q.Z., Jiang, X.L., Feng, X.J., Wang, J.M., Sun, C., Zhang, H.B., Xian, M., Liu, H.Z., 2016. Recovery Processes of Organic Acids from Fermentation Broths in the Biomass-Based Industry. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1 – 8.
  - 38 Lovato, G., Albanez, R., Stracieri, L., Ruggero, L.S., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2018. Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: Temperature effect. *Biochem. Eng. J.* 138, 81 – 90.
  - 39 Lovato, G., Lazaro, C.Z., Zaiat, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2017. Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. *Biochem. Eng. J.* 128, 93 – 105.

- 40 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.
- 41 Ma, Y., Huang, A., Zhu, D., Pan, G., Wang, G., 2015. Biohydrogen production via the interaction of nitrogenase and anaerobic mixed-acid fermentation in marine bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 176 – 183.
- 42 Mace, S., Mata-Alvarez, J., 2002. Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41, 5539 – 5553.
- 43 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8.
- 44 Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., Rychlik I., 2016. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1569 – 1576.
- 45 Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manag.* 110, 48 – 68.
- 46 Silva, F.C., Serafim, L.S., Nadais, H., Arroja, L., Capela, I., 2013. Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27, 467 – 476.
- 47 Singhanian, R.R., Patel, A.K., Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C., 2013. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 145, 166 – 174.
- 48 Tamis, J., Joosse, B.M., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2015. High-rate volatile fatty acid (VFA) production by a granular sludge process at low pH. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 2248 – 2255.
- 49 Tian, H., Treu, L., Konstantopoulos, K., Fotidis, I.A., Angelidaki, I., 2019. 16s rRNA gene sequencing and radioisotopic analysis reveal the composition of ammonia acclimatized methanogenic consortia. *Bioresour. Technol.* 272, 54 – 62.
- 50 Wainaina, S., Awasthi, M.K., Horváth, I.S., Taherzadeh, M.J., 2020. Anaerobic digestion of food waste to volatile fatty acids and hydrogen at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors. *Renew. Energy* 152, 1140 – 1148.

- 51 Weimer, P.J., Moen, G.N., 2013. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4075 – 4081.
- 52 Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J.A., Benemann, J.R., 2007. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 4761 – 4771.
- 53 Yarimtepe, C.C., Oz, N.A., Ince, O., 2017. Volatile fatty acid production dynamics during the acidification of pretreated olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 241, 936 – 944.
- 54 Yuan, Q., Sparling, R., Oleszkiewicz, J.A., 2009. Waste activated sludge fermentation: Effect of solids retention time and biomass concentration. *Water Res.* 43, 5180 – 5186.

# Capítulo 4

---

---

## Selección de microorganismos con gran capacidad para acumular polihidroxicanoatos utilizando suero lácteo fermentado como sustrato

### 4.1 RESUMEN

El enriquecimiento de un cultivo microbiano mixto (MMC) en cepas con la capacidad de acumular polihidroxicanoatos (PHA) se puede considerar el punto más crítico en el proceso de 3 etapas. En la presente investigación se ha estudiado la viabilidad de enriquecer un MMC bajo el régimen de *feast/famine* durante un largo periodo de tiempo, usando suero lácteo fermentado como sustrato. Además, el medio de cultivo se ha ido modificando progresivamente con el fin de determinar si la selección de poblaciones con la capacidad de acumular PHA mejoraba o no. Así, se ha evaluado la ausencia/presencia de tiourea, la ausencia/presencia de hierro y magnesio y dos velocidades de carga orgánicas (VCO) distintas, 60 y 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Los resultados mostraron una mejora en el potencial de acumular PHA del MMC cuando la tiourea, el magnesio, el hierro y la VCO más alta formaron parte del medio de cultivo. Bajo estas condiciones, las poblaciones destinaron una mayor cantidad de AGV hacia la acumulación de PHA, con un valor medio de 0,394 ( $\pm$  0,056) Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup>. Esta mejora también se vio reflejada en la capacidad máxima de acumular PHA de los microorganismos, la cual aumentó en más del doble, de un 21 a un 54%. Los análisis taxonómicos demostraron que la simple imposición de un régimen *feast/famine* fue suficiente para seleccionar poblaciones acumuladoras de PHA. Sin embargo, modificar el medio de cultivo supuso un cambio en la composición de la comunidad microbiana. Los géneros *Hydrogenophaga*, *Brevundimonas*, *Thauera*, *Azoarcus* y *Amaricoccus* formaron parte de dicha comunidad microbiana en algún momento del experimento.



## 4.2 INTRODUCCIÓN

En el año 2015 la producción mundial de plásticos derivados de los hidrocarburos había ascendido a 380 millones de toneladas según las estimaciones realizadas por Geyer *et al.* (2017). Lo más seguro es que, a día de hoy, esas cifras hayan quedado atrás. Entre las excelentes propiedades que han hecho que los plásticos sintéticos se conviertan en la actualidad en un material con un amplio rango de posibilidades no se incluye la biodegradabilidad, lo que hace que permanezcan en el medio ambiente a pesar de que su vida útil haya llegado a su fin. Además, los residuos plásticos que alcanzan el medio ambiente están sometidos a ciertos procesos de fragmentación a través de los cuales se generan microplásticos que, en última instancia, acaban en los ecosistemas marinos provocando un fuerte impacto medioambiental (Peng *et al.*, 2020). Si a todo esto se le suma que las reservas de petróleo se están agotando, las causas por las que se buscan alternativas mucho más sostenibles para reemplazar a los plásticos convencionales se entienden mucho mejor.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros biodegradables de origen biológico. Están producidos por los microorganismos en forma de inclusiones citoplasmáticas. Estos biopolímeros son acumulados en situaciones en las que el carbono del medio se encuentra en exceso, pero en las que algún otro nutriente esencial se encuentra en condiciones limitantes (Anjum *et al.*, 2016). Actualmente, la producción de PHA a nivel industrial se lleva a cabo a través de los cultivos puros. Sin embargo, existen múltiples factores como la necesidad de usar condiciones de esterilidad o sustratos puros, que elevan el precio final de estos biopolímeros hasta situarlo en torno a 4,42 – 5,52 €/Kg (Kourmentza *et al.*, 2017). Este precio es demasiado elevado para poder competir con los plásticos convencionales derivados de los hidrocarburos.

Los cultivos microbianos mixtos (MMC) han sido propuestos en contraposición a los cultivos puros con la finalidad de hacer más competitivo el precio final de los PHA. Los MMC no requieren de las condiciones de esterilidad que sí requieren los cultivos puros, logrando una reducción sustancial en el gasto energético que repercutirá de manera muy positiva en el precio final del biopolímero. Además, el coste final del proceso se puede abaratar todavía más si se sustituyen los sustratos sintéticos por fuentes de carbono renovables como son los residuos de carácter agroindustrial.

Fernández-Dacosta *et al.* (2015) estimaron que producir PHA utilizando MMC como inóculo y residuos agroindustriales como fuente de carbono barata, podría alcanzar un precio final de entre 1,40 – 1,95 €/kg en función del método de extracción que se hubiese empleado. La producción de PHA vía MMC lleva asociado un proceso de tres etapas que ha sido descrito en primera instancia por Albuquerque *et al.* (2007). De las tres etapas, quizá la segunda sea el punto más crítico del proceso, pues es la etapa en la que se seleccionan las poblaciones con capacidad de acumular PHA. Una buena selección dará lugar a una elevada productividad al final del proceso. Sin embargo, una selección deficiente reducirá la producción de PHA y, en consecuencia, subirá el precio final del biopolímero.

Dentro de esta segunda etapa se emplea una metodología de selección basada en la alternancia de breves periodos de tiempo en los que el sustrato está presente (*feast*) con largos periodos de tiempo en los que no hay disponibilidad de alimento en el medio (*famine*). Esta estrategia se denomina alimentación dinámica aerobia (ADF). La estrategia ADF ya ha sido ampliamente estudiada (Palmeiro-Sánchez *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018; Tamang *et al.*, 2019) y, gracias a ella, se consigue generar una competencia entre las poblaciones con y sin la capacidad de acumular PHA. En dicha competencia, las poblaciones con capacidad de acumular PHA presentan una ventaja adaptativa frente a aquellas poblaciones que no presentan dicha capacidad, pues las primeras son capaces de sobrevivir a los periodos de *famine* en los que el sustrato no está disponible en el medio. A parte del régimen *feast/famine*, existe una serie de factores con efecto directo sobre la eficacia del proceso de selección. La presencia de nutrientes como nitrógeno o fósforo durante la fase *famine* va a ser clave para el devenir de una buena selección (Johnson *et al.*, 2010b; Korkakaki *et al.*, 2017). Otros parámetros que también van a influir en el proceso de selección son el pH (Montiel-Jarillo *et al.*, 2017), la temperatura (Johnson *et al.*, 2010c), la velocidad de carga orgánica (VCO) (Albuquerque *et al.*, 2010) o el tiempo de retención de sólidos (TRS) (Johnson *et al.*, 2010b).

En la actualidad, ya son muchos los residuos de carácter agroindustrial que han sido evaluados con potencial para producir PHA vía MMC (Jiang *et al.*, 2012; Tamis *et al.*, 2014; Ben *et al.*, 2016; Queirós *et al.*, 2016; Colombo *et al.*, 2017; Fauzi *et al.*, 2019). Un residuo de carácter agroindustrial que es especialmente abundante en Galicia es



el suero lácteo. Anteriormente, Lagoa-Costa *et al.* (2020) ya estudiaron la viabilidad de transformar el suero lácteo en ácidos grasos volátiles (AGV), por un proceso de fermentación acidogénica. Los AGV son los principales precursores en la síntesis de PHA vía MMC. Por ello, la presente investigación se ha centrado en el estudio de las etapas que siguen a la fermentación acidogénica en el proceso de 3 etapas, esto es, selección de cepas con la capacidad de acumular PHA y producción de PHA mediante ensayos *fed-batch*. Para ello, un MMC se ha sometido a un régimen de *feast/famine* durante un largo periodo de tiempo en el que se han ido cambiando determinadas condiciones del medio de cultivo con el fin de optimizar el proceso de selección de cepas con capacidad de acumular PHA. Además, para evaluar la capacidad máxima de acumular PHA de la biomasa seleccionada, se diseñaron ensayos *fed-batch* para cada una de las diferentes condiciones operacionales establecidas. Finalmente, la etapa de selección se ha monitorizado también desde un punto de vista taxonómico, pues se han realizado análisis para identificar a las poblaciones más abundantes en la comunidad microbiana y, por lo tanto, determinar las especies encargadas de los procesos de acumulación de PHA.

## **4.3 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental se centró en las etapas 2 y 3 del proceso de 3 etapas diseñado por Albuquerque *et al.* (2007), tal y como se representa en la Figura 4.1. La etapa 2 se basa en la selección de cepas acumuladoras de PHA. Mientras, la etapa 3 se basa en determinar la capacidad máxima de acumulación de PHA.

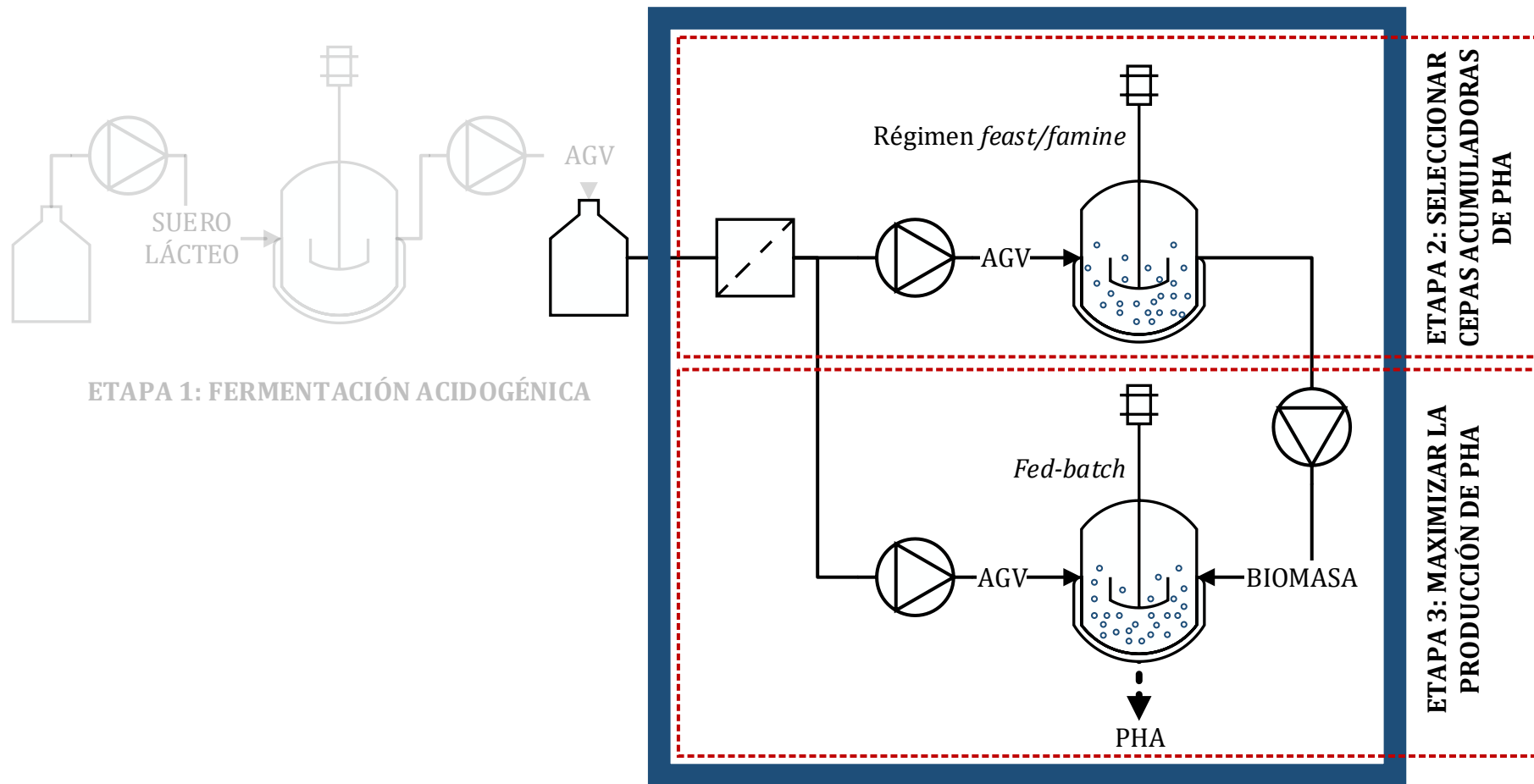


Figura 4.1. Diseño experimental para la selección de cepas acumuladoras de PHA y producción máxima de PHA. Ambos procesos (recuadro azul) están encuadrados dentro del proceso de 3 etapas para la síntesis de PHA usando MMC.

---

#### 4.3.1.1 Selección de cepas con gran capacidad para acumular PHA

Toda la etapa de selección se ha llevado a cabo en un reactor de 2 L. Al inicio del proceso de selección, el reactor se inoculó con varios lodos provenientes del tanque aerobio de distintas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Durante la puesta en marcha del reactor, la mezcla de lodos se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración de sólidos en suspensión volátiles (SSV) de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , concentración de partida del reactor. Para seleccionar cepas con gran capacidad de acumular PHA, se impuso una estrategia ADF en el que la alimentación se introdujo por lotes o *batch* siguiendo una configuración de reactor discontinuo secuencial (SBR). A lo largo de toda la investigación se trabajó de manera cíclica, con 2 ciclos diarios de 12 horas de duración cada uno y en los que se fueron sucediendo 4 fases: alimentación, reacción, decantación y vaciado. Durante la fase de reacción se alternaron las fases de *feast* y de *famine*, típicas de la estrategia ADF.

Por la camisa del reactor circuló agua termostatazada que permitió el desarrollo de una biomasa principalmente mesófila, pues la temperatura se mantuvo constante a  $30^\circ \text{ C}$  durante toda la investigación. El pH fue un parámetro que también se mantuvo estable. El rango en el que osciló el pH fue de entre 8 y 8,5. Dos bombas peristálticas se encargaron de introducir bien NaOH 1 M o bien HCl 1 M cuando el valor del pH se iba de ese rango. El proceso de selección de cepas con gran capacidad para acumular PHA es un proceso completamente aerobio. Es por ello que el reactor estuvo aireado en todo momento a 1 volumen de aire por volumen de reactor y minuto (vvm). Esto supuso un caudal de aire de  $2 \text{ L min}^{-1}$ . Además, para colaborar con la distribución del oxígeno en el interior del reactor y favorecer su transferencia hacia las bacterias, se instaló un agitador mecánico a una velocidad de 500 rpm. A lo largo de toda la investigación se estableció un TRS de 3 días. Para ello, un tercio del volumen del reactor se purgó diariamente al final de la fase de *famine*. Además, durante la fase de vaciado se retiró la mitad del volumen del reactor, lo que supuso un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 1 día.

El medio de cultivo de la biomasa estuvo compuesto tanto por una fuente de carbono como por una fuente de nutrientes. La fuente de carbono consistió en el suero lácteo que, previamente, había sido fermentado a AGV (Lagoa-Costa *et al.*, 2020). A lo largo

de toda la investigación, el perfil de AGV fue siempre muy similar. El ácido acético y el ácido butírico supusieron la principal fuente de carbono al representar, al menos, el 80% de la carga orgánica. En consecuencia, el ácido propiónico y el ácido valérico representaron sólo el 20% restante. La fuente de nutrientes estuvo compuesta, a su vez, por una fuente de nitrógeno y una fuente de fósforo. Como fuente de nitrógeno se utilizó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y como fuente de fósforo se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Para preparar la fuente de nutrientes se diluyeron en agua las cantidades necesarias de ambos compuestos para mantener unas relaciones carbono/nitrógeno (C/N) y carbono/fósforo (C/P) de 7 y 40, respectivamente. Ambas relaciones fueron lo suficientemente altas como para que hubiese disponibilidad de ambos nutrientes a lo largo de todo el ciclo para los microorganismos. El suero lácteo tuvo una concentración remanente de fósforo en forma de fosfato que hubo que contrarrestar para mantener constante la relación C/P. La relación carbono/nitrógeno/fósforo (C/N/P) final fue de 100:14:2,5.

Con el paso de los meses el reactor estuvo sometido a una serie de cambios en otros parámetros operacionales diferentes. Ante cada cambio, se dejó un periodo de unas 3 semanas (21 días) para aclimatar los microorganismos a las nuevas condiciones de operación antes de monitorizar el proceso. Al inicio del experimento el reactor se operó sin la adición de tiourea, un agente inhibidor de las poblaciones nitrificantes (Periodo I). El tiempo de operación bajo estas condiciones fue de unos 86 días (172 ciclos). A partir de aquí, el reactor se empezó a operar con la adición de este químico, el cual se introdujo a una concentración de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (Periodo II). El reactor estuvo operando 80 días (160 ciclos) en estas condiciones. Entonces, 2 nuevos compuestos se añadieron a la fuente de nutrientes: por un lado el magnesio, en forma de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ) y, por el otro el hierro, en forma de sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ). La concentración dentro del reactor de ambos nutrientes fue de 27 y  $8 \text{ mg L}^{-1}$  para magnesio y hierro, respectivamente. El reactor estuvo operando bajo estas condiciones un total de 50 días (100 ciclos) (Periodo III). Finalmente, la VCO se aumentó de 60 a  $80 \text{ Cmmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en un último cambio operacional (Periodo IV). En estas condiciones, el reactor operó durante 77 días (154 ciclos).

Todos los cambios operacionales fueron secuenciales y acumulativos, tal y como se representa en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resumen de las condiciones operacionales del SBR para la selección de cepas con gran capacidad de acumular PHA.

	<b>Periodo I</b>	<b>Periodo II</b>	<b>Periodo III</b>	<b>Periodo IV</b>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	86	80	50	77
<i>Nº de ciclos</i>	172	160	100	154
<b>Condiciones invariables</b>				
<i>Temperatura (°C)</i>	30	30	30	30
<i>pH</i>	8 – 8,5	8 – 8,5	8 – 8,5	8 – 8,5
<i>TRS (d)</i>	3	3	3	3
<i>TRH (d)</i>	1	1	1	1
<i>C/N</i>	7	7	7	7
<i>C/P</i>	40	40	40	40
<i>Sustrato (Ac/Pr/Bu/Val) (%)</i>	26/9/57/8	33/7/56/4	40/14/40/6	42/12/41/5
<b>Condiciones variables</b>				
<i>Tiourea (mg L<sup>-1</sup>)</i>	0	20	20	20
<i>Mg<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</i>	0/0	0/0	27/8	27/8
<i>VCO (Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	60	60	60	80

---

#### 4.3.1.2 Ensayos *fed-batch* para la producción de PHA

Con la finalidad de determinar la capacidad máxima de acumular PHA de la biomasa seleccionada en el SBR, se programaron varios ensayos *fed-batch* en distintos puntos de la investigación. Estos puntos coincidieron con el final de los diferentes periodos por los que se hizo pasar al SBR, ya detallados anteriormente. Todos los ensayos de producción de PHA se realizaron en un reactor con un volumen total de 2 L. Al inicio de cada experimento, el reactor se inoculó con 0,8 L de biomasa proveniente del SBR. La biomasa se recogió al final de la fase *famine* cuando la presencia de nutrientes en el medio y la de PHA en el interior celular se habían minimizado. Para maximizar la producción de PHA se aplicaron las mismas condiciones de agitación, aireación, pH y temperatura en las que se había enriquecido la biomasa.

El sustrato consistió, en exclusiva, en una fuente de carbono. No hubo adición alguna de nutrientes, por lo que los ensayos de producción se realizaron en condiciones N y P-limitantes. La única fuente de nitrógeno y de fósforo disponible para la biomasa consistió en los nutrientes remanentes al final de la fase de *famine* del ciclo previo a la inoculación. La fuente de carbono fue exactamente la misma que la utilizada en la etapa de selección, el suero lácteo fermentado. La alimentación se introdujo siguiendo una estrategia de alimentación manual por pulsos. Cada pulso fue introducido al interior del reactor al final del pulso anterior, hecho que vino determinado por un ascenso brusco en los niveles del oxígeno disuelto (OD).

---

#### 4.3.2 ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

En paralelo a la etapa de selección, se realizó un estudio taxonómico para identificar a las poblaciones más abundantes de la comunidad microbiana. Con esta finalidad, se tomaron muestras de biomasa del interior del SBR cuando éste alcanzó el estado estacionario para los periodos de operación I, III y IV. De esta manera, el estudio fue también útil para conocer las dinámicas poblacionales al cambiar de una condición a otra. Para llevar a cabo el estudio, se utilizó la técnica de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). En primer lugar, se extrajo el ADN genómico de todas las muestras usando el método del fenol y del cloroformo. Posteriormente, se amplificó la región del gen 16S rRNA que comprendió las regiones hipervariables V3 – V5. Para realizar la PCR se utilizaron los *primers* F-357 y R-907. Una vez la PCR

se hubo finalizado, los amplicones se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7,5% con un gradiente desnaturalizante en urea y formamida del 40 – 60%. Todas las muestras se dejaron correr durante 16 horas a 60° C y 55 V siguiendo el método descrito por Valentino *et al.* (2014). Las bandas detectadas se escindieron del gel y fueron reamplificadas con los mismos *primers* citados anteriormente. Una empresa externa (STAB VIDA) secuenció los amplicones y la secuencia consenso se introdujo en la base de datos del NCBI para identificar a los microorganismos.

---

### 4.3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Los sólidos en suspensión totales (SST) y SSV se midieron de acuerdo a lo descrito en los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). La determinación de amonios (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) fue colorimétrica y se realizó por sendas mediciones espectrofotométricas a 635 y 690 nm, respectivamente. Los productos solubles en agua, principalmente AGV, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Finalmente, la cuantificación del PHA intracelular acumulado por los microorganismos tanto en la etapa de selección como en la etapa de producción fue hecha vía cromatografía de gases (CG) utilizando un detector de ionización en llama (FID).

---

### 4.3.4 CÁLCULOS

El PHA acumulado en el interior celular fue calculado como el porcentaje de PHA (en peso) en función de los SSV siguiendo la ecuación 4.1:

$$\text{PHA (\%)} = \frac{\text{PHA (g)}}{\text{SSV (g)}} \times 100 \quad (4.1)$$

El rendimiento de acumulación (Y<sub>PHA/S</sub>) hizo referencia a la producción neta de PHA en función del sustrato consumido, tal y como se detalla en la ecuación 4.2:

$$Y_{\text{PHA/S}} = \frac{\text{PHA}_{\text{fin}} (\text{Cmmol L}^{-1}) - \text{PHA}_{\text{inicio}} (\text{Cmmol L}^{-1})}{S (\text{Cmmol L}^{-1})} \quad (4.2)$$

De igual manera que en el Y<sub>PHA/S</sub>, el rendimiento de crecimiento de la biomasa (Y<sub>X/S</sub>) se calculó como la producción neta de biomasa en función del sustrato consumido, tal y como se detalla en la ecuación 4.3:

$$Y_{\text{X/S}} = \frac{X_{\text{fin}} (\text{Cmmol L}^{-1}) - X_{\text{inicio}} (\text{Cmmol L}^{-1})}{S (\text{Cmmol L}^{-1})} \quad (4.3)$$

La velocidad de consumo del sustrato ( $-q_s$ ) y la de producción de PHA ( $q_{\text{PHA}}$ ) fueron calculadas de la misma manera. Se hizo la regresión lineal del consumo/producción del respectivo parámetro en función del tiempo y de la biomasa activa.

## 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación, se detallan los resultados que se han obtenido durante la operación de los reactores sometidos a las etapas 2 y 3 del proceso de 3 etapas, es decir, la selección de cepas acumuladoras de PHA y su posterior producción. Además se incluye información taxonómica de las poblaciones bacterianas más abundantes que se han identificado durante la etapa de enriquecimiento.

### 4.4.1 SELECCIÓN DE CEPAS CON CAPACIDAD DE ACUMULAR PHA

Durante el proceso de enriquecimiento de un MMC sometido a un proceso de ADF se ejerce una presión selectiva que favorece a las poblaciones acumuladoras de PHA, pues pueden sobrevivir a largos periodos de inanición en los que el sustrato no está disponible en el medio. Por la contra, las poblaciones no acumuladoras carecen de dicha capacidad y no sobreviven. Así, el proceso de enriquecimiento es progresivo. Es por ello que, la etapa de selección, se monitorizó durante un largo periodo de tiempo en el cual los microorganismos estuvieron sometido a los procesos de ADF (470 días).

Desde el momento inicial en el que el reactor fue inoculado, la biomasa se sometió al proceso de ADF. Ya desde la primera semana fue posible observar claramente las fases de *feast* y de *famine*, proceso habitual que caracteriza a esta etapa de selección. En la Figura 4.2 se representa un ciclo típico del SBR al principio de la operación del reactor (día 22). En él, ya se puede observar claramente el régimen *feast/famine* del que se compone la estrategia ADF. Ambas fases estuvieron definidas por los niveles del OD en el medio. Al inicio del ciclo, la alimentación, con fuente de carbono y fuente de nutrientes, fue introducida al interior del reactor. Fue en ese preciso instante que los microorganismos empezaron a hacer uso de los AGV y, en paralelo, de un aceptor de electrones, el oxígeno. En consecuencia, se registró un descenso en los niveles del OD. Este hecho se consideró el inicio de la fase de *feast*. Mientras hubo disponibilidad



de AGV en el medio, la fase de *feast* se consideró activa. En esta fase la concentración de OD fue baja y los microorganismos aumentaron las reservas de PHA gracias al consumo de los AGV. Además, también hubo consumo de nutrientes, especialmente de  $\text{NH}_4^+$ . El consumo del  $\text{NH}_4^+$  se ligó al crecimiento de la biomasa. Esto significó que en la fase de *feast*, tanto la acumulación de PHA como el crecimiento celular tuvieron lugar simultáneamente. Al final, el éxito en la selección consiste en un balance entre el porcentaje de AGV que se destina a la acumulación de PHA frente al porcentaje de AGV que se dirige al crecimiento celular. Cuánto mejor es la selección, mayor es el porcentaje destinado a la acumulación de PHA. En la actualidad, se ha propuesto una estrategia alternativa para maximizar el porcentaje de AGV que se dirige hacia su acumulación en forma de PHA. El principio básico de esta estrategia consiste en desacoplar la fuente de carbono de la fuente de nutrientes y, de esta manera, no hacer coincidir en el tiempo el carbono con el  $\text{NH}_4^+$  (Oliveira *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Para ello, la fuente de nutrientes se introduce al interior del reactor justo al inicio de la fase de *famine*, cuando todos los AGV han sido consumidos por los microorganismos. Esta estrategia no se usó en el presente trabajo, en la que tanto la fuente de carbono como la de nutrientes se introdujeron a la vez durante el periodo de alimentación. Una vez los microorganismos hubieron consumido todos los AGV del medio, ya no requirieron de un aceptor de electrones, registrándose un ascenso brusco en los niveles del OD en el medio (Figura 4.2). Este ascenso brusco fue el que marcó el final de la fase de *feast* y dio comienzo a la fase de *famine*. El PHA, que había sido acumulado como un reservorio de carbono y energía, fue consumido durante la fase de *famine* para que los microorganismos pudiesen sobrevivir al largo periodo de inanición (Figura 4.2). Para utilizar las reservas de PHA, también fue necesario el consumo de  $\text{NH}_4^+$ , siendo este el motivo por el cual hubo un descenso continuado en su concentración, aunque a menor velocidad que durante la fase de *feast*. Tal y como fue descrito por Johnson *et al.* (2010b), si no hay limitación de nutrientes durante la fase de *famine*, se favorece una buena selección de cepas con capacidad de acumular PHA. Para favorecer la disponibilidad de nutrientes, en la presente investigación se ha optado por establecer una relación C/N/P baja.

La evolución aquí descrita del ciclo *feast/famine* ya ha sido ampliamente descrita en múltiples trabajos de investigación (Queirós *et al.*, 2016; Fra-Vázquez *et al.*, 2019; Tamang *et al.*, 2019).

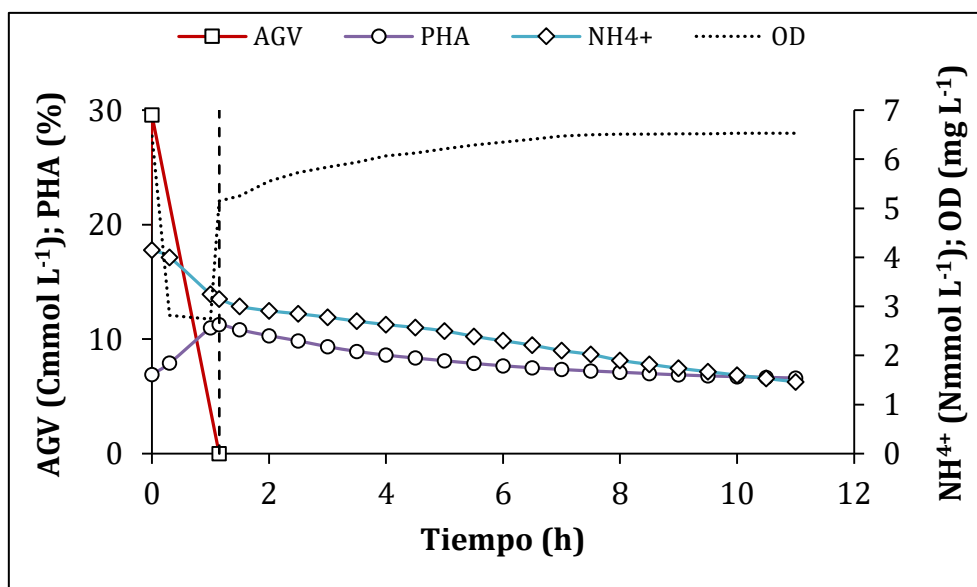


Figura 4.2. Ciclo típico del SBR en el que se diferencian las dos fases de las que se compone la estrategia ADF, la fase de *feast* y la fase de *famine*. Se representa también la evolución en la concentración de AGV, PHA, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y DO a lo largo de todo el ciclo.

Uno de los principales factores que van a intervenir en la selección de las cepas con capacidad de acumular PHA es, precisamente, la relación entre la duración de la fase de *feast* y la fase de *famine* (F/F). Según Dionisi *et al.* (2006), para prevenir de una selección de microorganismos con una respuesta dirigida hacia el crecimiento y así favorecer la respuesta acumuladora, la relación F/F no ha de ser superior a 0,25. En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se pudo observar que, en general, la relación F/F estuvo siempre en el rango óptimo para favorecer una respuesta dirigida hacia la acumulación de PHA (Figura 4.3). Esta relación F/F varió entre valores de 0,05 – 0,15. Alguno de los valores se salió de este rango, e incluso llegó a quedar fuera del rango considerado como óptimo para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA, aunque fueron casos puntuales y sin continuidad en el tiempo, por lo que se puede considerar que la presión selectiva estuvo presente

durante toda la investigación (Figura 4.3). Esta presión selectiva se observó desde el inicio, lo que contrastó con los resultados obtenidos por Queirós *et al.* (2016). En el citado trabajo necesitaron de 261 días para alcanzar una estabilidad en la relación F/F en el rango que se considera óptimo para la selección de cepas acumuladoras de PHA, esto es, por debajo de 0,25. La complejidad del sustrato empleado en el citado trabajo, el cual se caracterizó por la presencia de compuestos lignosulfonados, quizá haya sido la causa principal que ha favorecido esta evolución en la relación F/F. En contraposición, el suero lácteo fermentado que se ha utilizado en el presente trabajo se caracterizó por una elevada proporción de AGV, principal fuente de carbono para la síntesis de PHA. Probablemente este hecho haya favorecido la rápida adaptación del MMC al régimen *feast/famine* que se ha observado desde los primeros días de la operación.

Uno de los parámetros con mayor influencia sobre la relación F/F es la VCO. Varios son los trabajos de investigación en los que ya se ha estudiado su efecto (Dionisi *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2010; Campanari *et al.*, 2014; Fauzi *et al.*, 2019). En base a todos estos estudios se desprende que, al aplicar VCO más bajas, se mantiene una relación F/F más baja. En contraposición, si la VCO se hace más alta, la relación F/F también aumenta. Estos resultados coinciden con lo que se ha podido observar en la presente investigación. Durante el periodo operacional en el que el SBR estuvo trabajando con una VCO de 60 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Periodo III), la relación F/F estuvo en torno a un valor medio de 0,05 ( $\pm$  0,01). Mientras, al subir la VCO hasta los 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Periodo IV), la relación F/F también subió hasta alcanzar un valor medio de 0,07 ( $\pm$  0,01). A pesar de este ascenso, los valores de la relación F/F siguieron dentro del rango considerado como óptimo para ejercer una presión selectiva eficaz. Con independencia de cualquier otro parámetro operacional, el valor de la relación F/F obtenido durante el presente trabajo fue, en general, bastante bajo y comparable al de otros estudios publicados (Colombo *et al.*, 2016; Palmeiro-Sánchez *et al.*, 2016; Korkakaki *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018).

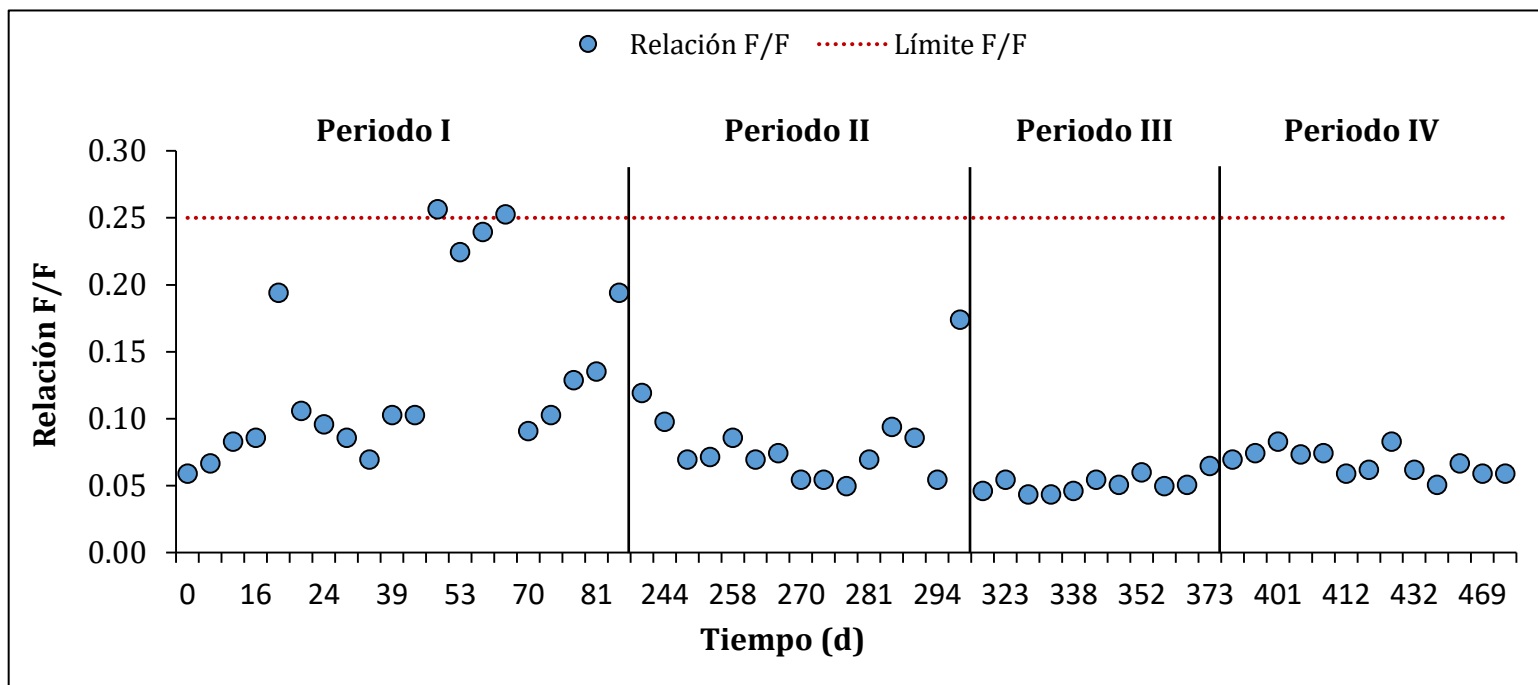


Figura 4.3. Relación F/F a lo largo de todos los periodos por los que se hizo pasar al MMC para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA.

Una de las causas de haber obtenido, en términos generales, relaciones F/F bastante bajas ha sido la velocidad con la que los microorganismos han consumido el sustrato suministrado al medio. La  $-q_s$  es un parámetro que depende de ambos factores, la complejidad del sustrato y la VCO aplicada al reactor, pero también es dependiente de las poblaciones bacterianas (Carvalho *et al.*, 2014). En general, a mayor  $-q_s$  más beneficio para la selección de poblaciones acumuladoras de PHA. Durante los 40 días iniciales de operación, la  $-q_s$  se mantuvo en valores de 0,3 – 0,5 Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 4.4). Sin embargo, se registró un fuerte descenso en este parámetro en los siguientes días (46 – 86) hasta situarse en un valor de 0,1 – 0,2 Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 4.4). La razón de este cambio no está clara, pero pudo haber sido la causa de los valores más altos que se han obtenido en la relación F/F, incluidos aquellos que se salieron del rango que se considera óptimo para el proceso de selección. La introducción de tiourea como parte del medio de cultivo (Periodo II) provocó un nuevo aumento en la  $-q_s$  hasta valores que oscilaron entre 0,3 – 0,8 Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 4.4). Sin embargo, se observó una gran variabilidad a lo largo de este periodo. Fue durante el Periodo III y IV que se alcanzó una mayor estabilidad en este parámetro. El valor medio de la  $-q_s$  fue de 0,574 (± 0,078) Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para el Periodo III y de 0,466 (± 0,085) Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para el Periodo IV.

Curiosamente, fue posible apreciar cierta preferencia de los microorganismos por el consumo de los distintos AGV que compusieron el suero lácteo fermentado que se ha utilizado como sustrato. Los microorganismos consumieron el ácido butírico por delante de cualquier otro AGV, con una velocidad de consumo específica de 0,213 (± 0,098) Cmmol-Butírico Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Resultados similares ya han sido descritos por Marang *et al.* (2013) y Jiang *et al.* (2012). Además, un mayor consumo de este AGV también tiene implicaciones en la acumulación de PHA. Para transformar el ácido butírico en polihidroxibutirato (PHB) se requiere menos energía que cuando se utiliza el ácido acético, lo que repercute de forma positiva en el rendimiento del proceso (Marang *et al.*, 2013). Por lo tanto, las condiciones operacionales de la fermentación acidogénica son susceptibles de ser modificadas para mejorar la producción del ácido butírico y, por lo tanto, optimizar la producción de PHA. Por ejemplo, cambios en el pH (Bengtsson *et al.*, 2008) o en el TRS (Lagoa-Costa *et al.*,

2020), se presumen como una buena opción para maximizar la producción de ácido butírico. Cuando el ácido butírico fue totalmente consumido, el ácido acético fue el AGV con la segunda mayor  $-q_s$ , con un valor medio de  $0,150 (\pm 0,076)$  Cmmol-Acético Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. En un segundo lugar quedó la  $-q_s$  tanto del ácido propiónico como del ácido valérico.

La evolución de la  $-q_s$  estuvo estrechamente relacionada con la evolución de la  $q_{PHA}$ . Cuanto más rápido los microorganismos consumieron todos los AGV del medio de cultivo, más rápido lo dirigieron hacia la producción de PHA (Figura 4.4). Al inicio del experimento (Periodo I) los valores para la  $q_{PHA}$  fueron bajos ( $<0,1$  Cmmol-PHA Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Sin embargo, a partir del día 240 se observó claramente un aumento en la velocidad con la que los microorganismos sintetizaban PHA con un valor medio de  $0,174 (\pm 0,049)$  Cmmol-PHA Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Este hecho sugirió que los cambios introducidos al medio de cultivo llevaron a un mayor enriquecimiento del MMC en poblaciones con la capacidad de acumular PHA.

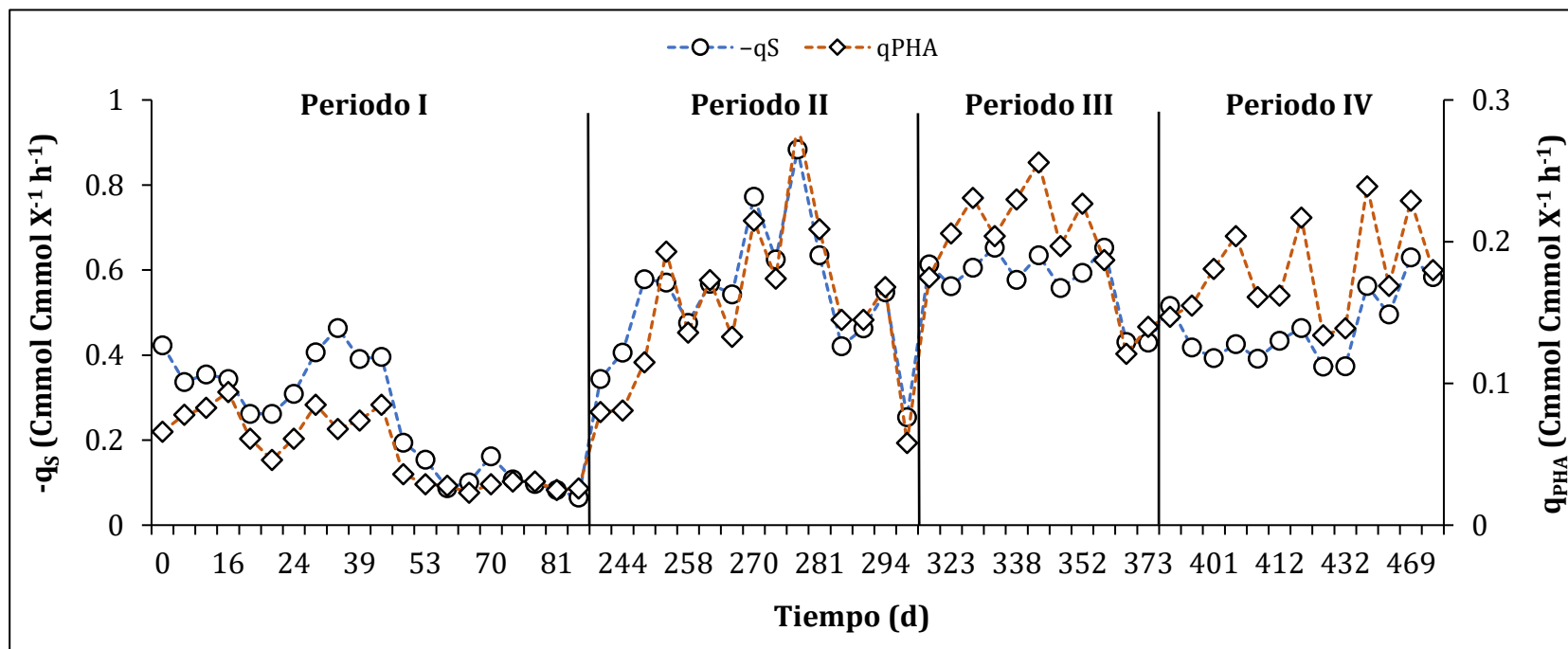


Figura 4.4. Evolución en la  $-q_S$  y la  $q_{PHA}$  a lo largo de todos los periodos por los que se hizo pasar al MMC para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA.

A la hora de definir si la selección de microorganismos con capacidad de acumular PHA está siendo efectiva o no, los rendimientos de acumulación y crecimiento son, quizá, los indicadores más fiables. Un  $Y_{X/S}$  alto simboliza que una elevada proporción de AGV se destina al crecimiento de la biomasa. Por la contra, un  $Y_{PHA/S}$  alto simboliza que una elevada proporción de AGV se dirige hacia la acumulación de PHA. En base a esto, para un buen proceso de selección es crucial minimizar el  $Y_{X/S}$  y maximizar el  $Y_{PHA/S}$ . Es por ello que ambos rendimientos se han monitorizado a lo largo de los 470 días de operación del SBR. Tal y como se puede observar en la Figura 4.5, hubo una tendencia general creciente y decreciente para el  $Y_{PHA/S}$  y el  $Y_{X/S}$ , respectivamente. Dado que el aumento en el  $Y_{PHA/S}$  y el descenso en el  $Y_{X/S}$  ocurren cronológicamente, podría ser discutido que esta mejora estuviese relacionada con la aclimatación de la biomasa a las nuevas condiciones. Sí que hay una mejora en ambos rendimientos los primeros días de operación para cada periodo, pero que luego tiende a estabilizarse sin embargo. Además, para favorecer esta aclimatación de la biomasa a las nuevas condiciones de operación, se estableció un tiempo de tres semanas ( $TRS \times 7$ ) entre los diferentes periodos operacionales. Así, consideramos que las modificaciones que se han introducido en el medio de cultivo sí que tuvieron un efecto positivo sobre la selección del MMC y que, por tanto, la aclimatación de la biomasa como única razón es poco probable. En general, se ha podido observar que el valor del  $Y_{PHA/S}$  fue superior al del  $Y_{X/S}$ . Esto significó que, independientemente del periodo operacional en el que se encontró el SBR, se dirigió una mayor proporción de AGV hacia los procesos de acumulación que hacia los procesos de crecimiento celular. Sin embargo, al inicio de la operación del reactor (Periodo I), ambos rendimientos tuvieron valores muy similares, indicando que los microorganismos casi dirigieron la misma proporción de AGV hacia la acumulación que hacia el crecimiento (Figura 4.5). El valor medio del  $Y_{PHA/S}$  fue de  $0,235 (\pm 0,065)$  Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup> mientras que el del  $Y_{X/S}$  fue de  $0,163 (\pm 0,082)$  Cmmol-X Cmmol-AGV<sup>-1</sup>. Cuando el medio de cultivo se cambió por primera vez con la entrada de tiourea (Periodo II), hubo una evidente diferenciación entre ambos rendimientos. Esta diferenciación no afectó tanto al  $Y_{PHA/S}$  como al  $Y_{X/S}$ . No hubo un gran cambio en relación a la proporción de los AGV dirigida a la acumulación de PHA con un valor medio de  $0,280 (\pm 0,048)$  Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup>. Sin embargo, sí que hubo una reducción en la proporción de los AGV dirigidos hacia el crecimiento celular de casi la mitad, pues el



valor medio del  $Y_{x/s}$  fue de  $0,091 (\pm 0,090)$  Cmmol-X Cmmol-AGV<sup>-1</sup>. Una explicación a estos resultados pudo deberse a una competición por el  $\text{NH}_4^+$  disuelto. Durante el periodo inicial en el que no se añadió tiourea al medio de cultivo, los autótrofos y los heterótrofos coexistieron, compitiendo por el consumo del  $\text{NH}_4^+$ . En consecuencia, las poblaciones con la capacidad de acumular PHA tendieron a dirigir una mayor proporción de AGV hacia el crecimiento. Sin embargo, cuando la tiourea se añadió como parte del medio de cultivo, las poblaciones autótrofas fueron inhibidas y las heterótrofas no necesitaron competir por la fuente de nitrógeno. Fra-Vázquez *et al.* (2019) también investigaron el efecto que ejerció la tiourea sobre la capacidad de acumular PHA de un MMC. Según su estudio, el MMC no se vio afectado por la falta de este compuesto químico y su potencial acumulador fue muy parecido a cuando la tiourea sí que estuvo presente en el medio de cultivo, al contrario de lo observado en la presente investigación. Sin embargo, el mencionado trabajo tuvo un diseño experimental opuesto al nuestro que pudo haber influido en el resultado final. En el trabajo diseñado por Fra-Vázquez *et al.* (2019), primero se enriqueció un MMC en presencia de tiourea y luego se estudió cómo afectaba a las poblaciones el quitar este compuesto químico.

En un segundo cambio operacional del SBR (Periodo III), el magnesio y el hierro se introdujeron al medio de cultivo como parte de la fuente de nutrientes. La adición de ambos elementos químicos se realizó en base a los análisis de espectrometría de masas (ICP-MS) a los que fue sometido el suero lácteo fermentado. Los resultados mostraron un déficit en estos dos elementos en el sustrato y, por ello, se optó por su incorporación externa (Tabla 4.2). La concentración de los nutrientes en el medio de cultivo es un factor muy importante, especialmente cuando se trabaja con aguas reales. Un déficit o un exceso de un nutriente podría provocar que un agua residual deje de ser un sustrato ideal para su bioconversión a PHA. Con la entrada de estos 2 compuestos se mejoró el potencial acumulador de los microorganismos respecto al Periodo II (Figura 4.5). Se dirigió una mayor proporción de AGV hacia la síntesis de PHA ( $0,343 \pm 0,047$  Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup>) y se utilizó una menor proporción para el crecimiento celular ( $0,070 \pm 0,040$  Cmmol-X Cmmol-AGV<sup>-1</sup>). Por lo tanto, al haber incorporado estos dos elementos al medio, se mejoró la competencia del MMC para acumular PHA, y se intensificó la presión selectiva dentro del reactor sobre las

poblaciones no acumuladoras de PHA. El rol de estos nutrientes sobre la etapa de selección de cepas acumuladoras de PHA raramente ha sido tratado en la literatura. Albuquerque *et al.* (2010) observaron que un déficit de magnesio soluble en el medio de cultivo debido a su precipitación en forma de estruvita provocaba una limitación en el crecimiento de la biomasa. En consecuencia, se desencadenaba una reacción en cascada por la que se extendía la relación F/F, se ejercía una menor presión selectiva sobre las poblaciones sin capacidad de acumular PHA y el proceso de selección era menos eficiente. Por otro lado, Mohan & Reddy (2013) evaluaron el efecto de varios parámetros sobre la síntesis de PHA. Entre todos estos parámetros testados estaba el hierro. Como resultado, observaron que la presencia del hierro en el medio de cultivo favorecía la acumulación de PHA respecto a cuando no estaba presente, aunque no era de los parámetros de mayor importancia. En base a estos resultados, se puede concluir que tanto el magnesio como el hierro aparentan tener cierta influencia a la hora de seleccionar poblaciones acumuladoras de PHA, aunque su efecto en las células es todavía incierto y se requiere un mayor conocimiento al respecto.

En un último cambio operacional, la VCO se subió de 60 a 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Periodo IV). Aumentar la VCO también tuvo un efecto positivo en el potencial acumulador de los microorganismos respecto al Periodo III (Figura 4.5). De hecho, el  $Y_{PHA/S}$  fue el más alto de toda la etapa de selección, con un valor medio de 0,394 ( $\pm 0,056$ ) Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup> y un valor máximo que llegó a alcanzar un pico de 0,480 Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup> (día 406). Este valor estuvo en el rango de otros trabajos en los que se han conseguido buenos resultados en cuanto a acumulación de PHA (Palmeiro-Sánchez *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Fra-Vázquez *et al.*, 2019), aunque todavía lejos de otros trabajos en los que se utilizó el suero lácteo fermentado como sustrato (Duque *et al.*, 2014; Colombo *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018) o de aquellos en los que el reactor estuvo dominado por la cepa bacteriana *Plasticicumulans acidivorans* (Jiang *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012; Marang *et al.*, 2013). Si el  $Y_{PHA/S}$  fue el más alto de todos los periodos operacionales, el  $Y_{X/S}$  fue el más bajo, con un valor medio de 0,055 ( $\pm 0,034$ ) Cmmol-X Cmmol-AGV<sup>-1</sup>. Los resultados alcanzados aquí estuvieron en concordancia con otras investigaciones previas. La VCO es uno de los parámetros más importantes y, por lo tanto, de los más estudiados. Cuanto más alta

sea la VCO, mejores rendimientos para la acumulación de PHA, pero hasta un valor umbral a partir del cual la biomasa se ve afectada negativamente (Albuquerque *et al.*, 2010; Campanari *et al.*, 2014; Fauzi *et al.*, 2019). De hecho, parece que una VCO de 90 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> es una de las VCO más adecuadas para el proceso de selección (Albuquerque *et al.*, 2010), similar a lo que se ha observado en el presente trabajo, aunque es algo que va a ser dependiente de otros parámetros operacionales.

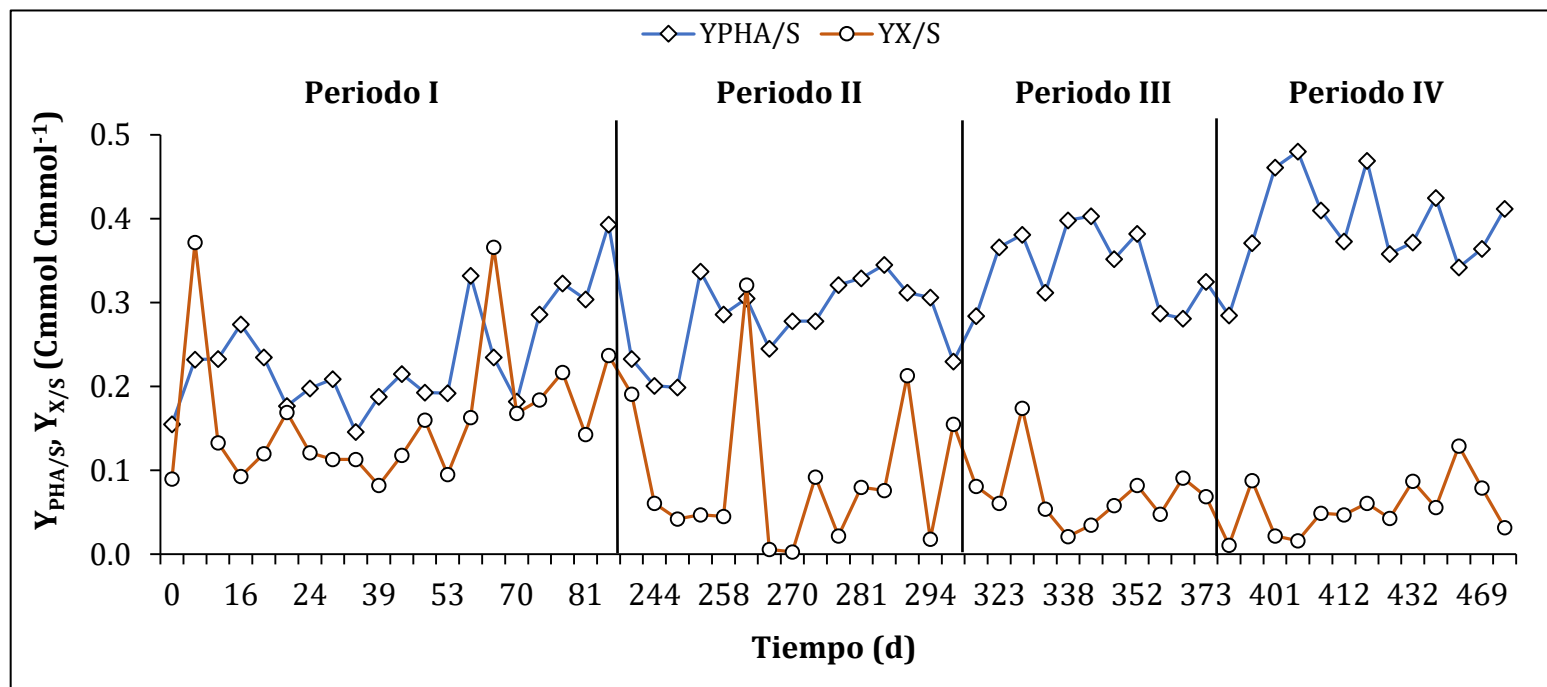


Figura 4.5. Evolución en el  $Y_{X/S}$  y el  $Y_{PHA/S}$  a lo largo de todos los periodos por los que se hizo pasar al MMC para la selección de cepas con capacidad de acumular PHA.

Tabla 4.2. Análisis de ICP-MS para determinar la concentración de los elementos químicos a la entrada y salida del reactor SBR.

	Sodio (mg L <sup>-1</sup> )	Potasio (mg L <sup>-1</sup> )	Calcio (mg L <sup>-1</sup> )	Magnesio (mg L <sup>-1</sup> )	Hierro (µg L <sup>-1</sup> )	Zinc (µg L <sup>-1</sup> )
<i>Entrada SBR</i>	1029	423	48,1	11,8	63	140
<i>Salida SBR</i>	873	38,5	6,62	< 1	5,4	< 10

Atendiendo a la composición del biopolímero sintetizado por los microorganismos, éstos siempre acumularon intracelularmente un copolímero poli(3-hidroxibutirato co 3-hidroxivalerato) (PHBV). Este biopolímero se caracterizó por la presencia de 2 monómeros diferentes, el hidroxibutirato (HB) y el hidroxivalerato (HV). El primero es el monómero más sintetizado por los microorganismos, y en el presente trabajo su proporción varió en torno a un 70 – 80% del total del PHA. El 20 – 30% restante del biopolímero estuvo compuesto por el monómero HV (Figura 4.6). No se detectó la síntesis de ningún otro hidroxialcanoato diferente. La composición tuvo una gran correlación con el perfil de AGV utilizado para alimentar a la biomasa. A día de hoy, es conocida la relación existente entre los AGV de cadena par y la síntesis de HB y los AGV de cadena impar y la síntesis de HV (Shen *et al.*, 2014). La incorporación del HV en un 20 – 30% del total del biopolímero da como resultado una amplia mejora en las propiedades fisicoquímicas del homopolímero PHB. Desde un punto de vista comercial, se traduce en que el copolímero PHBV puede ser muy interesante para la fabricación de films, lo que le augura un gran potencial en la industria del *packaging* (Anjum *et al.*, 2016).

Una vez registrados todos los parámetros, se pudo concluir que los cambios que se han introducido en la operación del SBR (Periodo I → Periodo IV) han optimizado el potencial para acumular PHA del MMC. Con la finalidad de comprobar si esto tuvo repercusiones reales sobre la capacidad máxima de acumular PHA, se diseñaron los ensayos *fed-batch*, cuyos resultados se comentan a continuación.

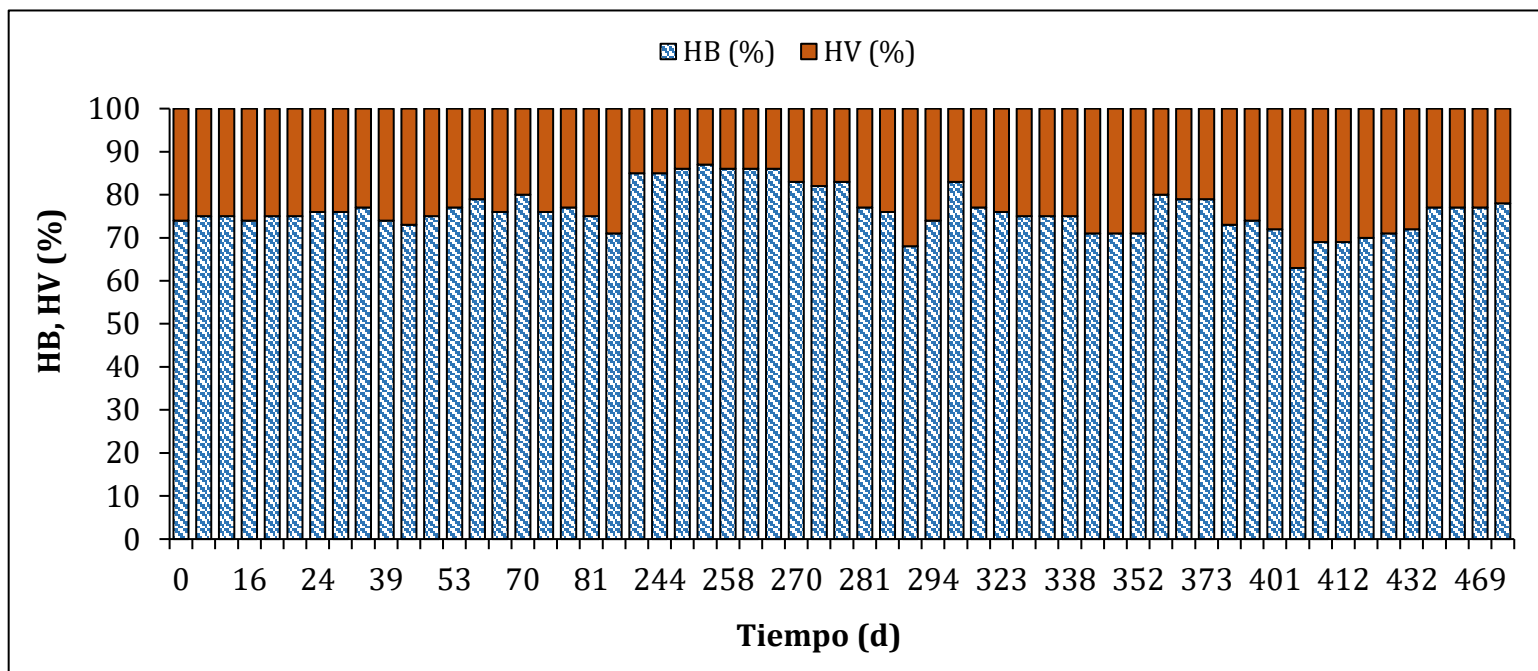


Figura 4.6. Composición monomérica del polímero obtenido a lo largo de todo el proceso de selección de cepas con capacidad de acumular PHA por la que se hizo pasar al MMC.

---

#### 4.4.2 PRODUCCIÓN MÁXIMA DE PHA

Tal y como se mencionaba anteriormente, los ensayos *fed-batch* fueron los test que permitieron evaluar la capacidad máxima de acumular PHA del MMC. Estos ensayos se realizaron al final de cada uno de los sucesivos periodos por los que se ha hecho pasar al MMC en el proceso de enriquecimiento, y permitieron evaluar si la mejora vista en la etapa de selección tenía efectos reales sobre la etapa de acumulación. Los ensayos *fed-batch* fueron diseñados cuando el SBR alcanzó el estado estacionario en cada uno de los respectivos periodos por los que se hizo pasar al MMC. Además, al emplear una estrategia de alimentación manual por pulsos, el OD se convirtió en un factor clave para la introducción de nuevos pulsos de sustrato al medio (Tamang *et al.*, 2019). En la Figura 4.7 se muestra la evolución que sufrió el PHA a lo largo de los diferentes ensayos *fed-batch* para cada uno de los distintos periodos (I – IV). A raíz de estos resultados se confirmó que la mejora en la etapa de selección del MMC en cuanto a su potencial acumulador tuvo efectos reales sobre la capacidad máxima de acumular PHA. De hecho, la capacidad acumuladora aumentó más del doble al pasar del Periodo I al Periodo IV. El porcentaje de PHA al final de estos experimentos pasó de un 21 a un 54%. En el Periodo II y el Periodo III el porcentaje de PHA acumulado quedó en un punto intermedio con un 34 y 39%, respectivamente. Este 54% estuvo en línea con otros trabajos en los que también se usó como sustrato el suero lácteo (Duque *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2018), aunque todavía estuvo lejos de la cantidad de PHA intracelular de otros trabajos (Albuquerque *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2016).

A raíz de la presente investigación se pudo concluir que la optimización del proceso de enriquecimiento del MMC en poblaciones con la capacidad de acumular PHA tuvo éxito. Sin embargo, el enriquecimiento es un proceso progresivo y en el que siempre se puede implementar nuevas condiciones que mejoren la capacidad acumuladora. Desde una perspectiva futura se podrían implementar nuevas condiciones que ya se han estudiado con éxito en otros trabajos y que, aquí, no han sido probadas. Así, se podría aplicar el desacoplamiento carbono – nitrógeno (Oliveira *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017), otro pH (Villano *et al.*, 2010) o la reducción del TRS (Johnson *et al.*, 2010b). Incluso los experimentos *fed-batch* podrían ser objeto de mejora si se opta por una estrategia de alimentación en continuo (Johnson *et al.*, 2010a).

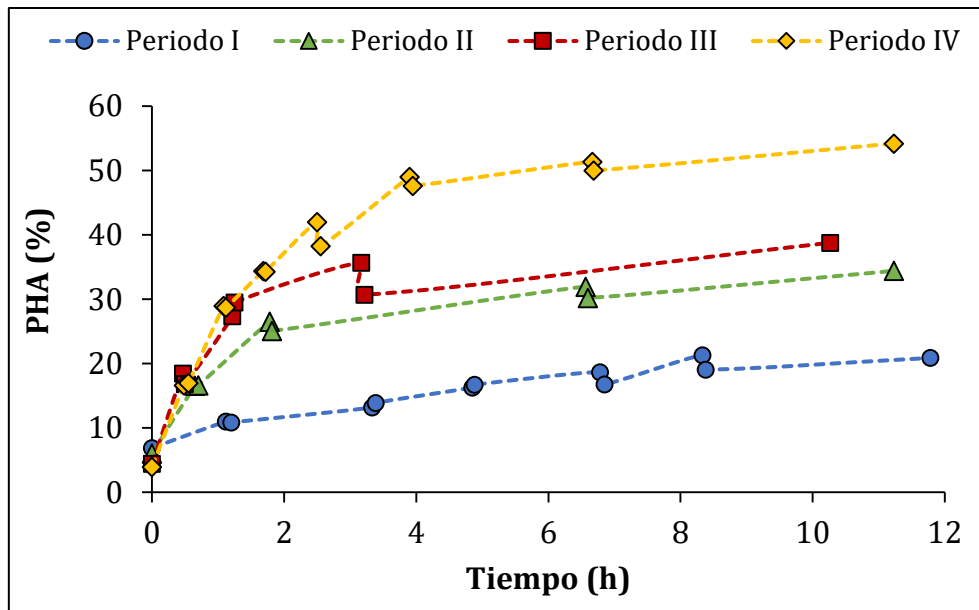


Figura 4.7. Acumulación máxima de PHA alcanzada durante los ensayos *fed-batch* realizados para cada uno de los diferentes periodos operacionales por los que ha pasado el MMC.

#### 4.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

Con el propósito de tener un mayor conocimiento de la estructura de la comunidad microbiana y comprender mejor las dinámicas poblacionales al pasar de un periodo operacional a otro, se realizó una caracterización taxonómica del MMC. Para ello, se han tomado varias muestras de biomasa del SBR a lo largo del periodo de operación y se han analizado usando la técnica de la DGGE.

Al finalizar todo el procedimiento de análisis, se ha obtenido como resultado el típico perfil bandeado característico de esta técnica, en donde cada banda se correspondió con una secuencia única (Figura 4.8). Se han analizado muestras de los periodos de operación I (A), III (B) y IV (C). Con las muestras de biomasa, también se ha migrado un marcador molecular (MM) de 1000 pb para verificar la longitud de los diferentes fragmentos. A raíz de la distancia recorrida por cada una de las bandas con respecto al MM, fue posible determinar que cada una de las secuencias tuvo una longitud algo superior a los 500 pb, coincidiendo con la longitud de los amplicones resultantes de la PCR al utilizar los *primers* F-357 y R-907. El número de secuencias únicas varió en función de la muestra. Así, en el carril A se identificaron 6 bandas diferentes, en el carril B, 3 y en el carril C, 4. Cada una de las bandas se envió a secuenciar, aunque no



todas dieron resultados concluyentes. Las 6 bandas del carril A (A1, A2, A3, A4, A5 y A6), 1 única banda del carril B (B1) y 3 bandas del carril C (C1, C2 y C3) fueron las que dieron lugar a una secuencia consenso que, posteriormente, se comparó con las secuencias de la base de datos del NCBI (Figura 4.8).

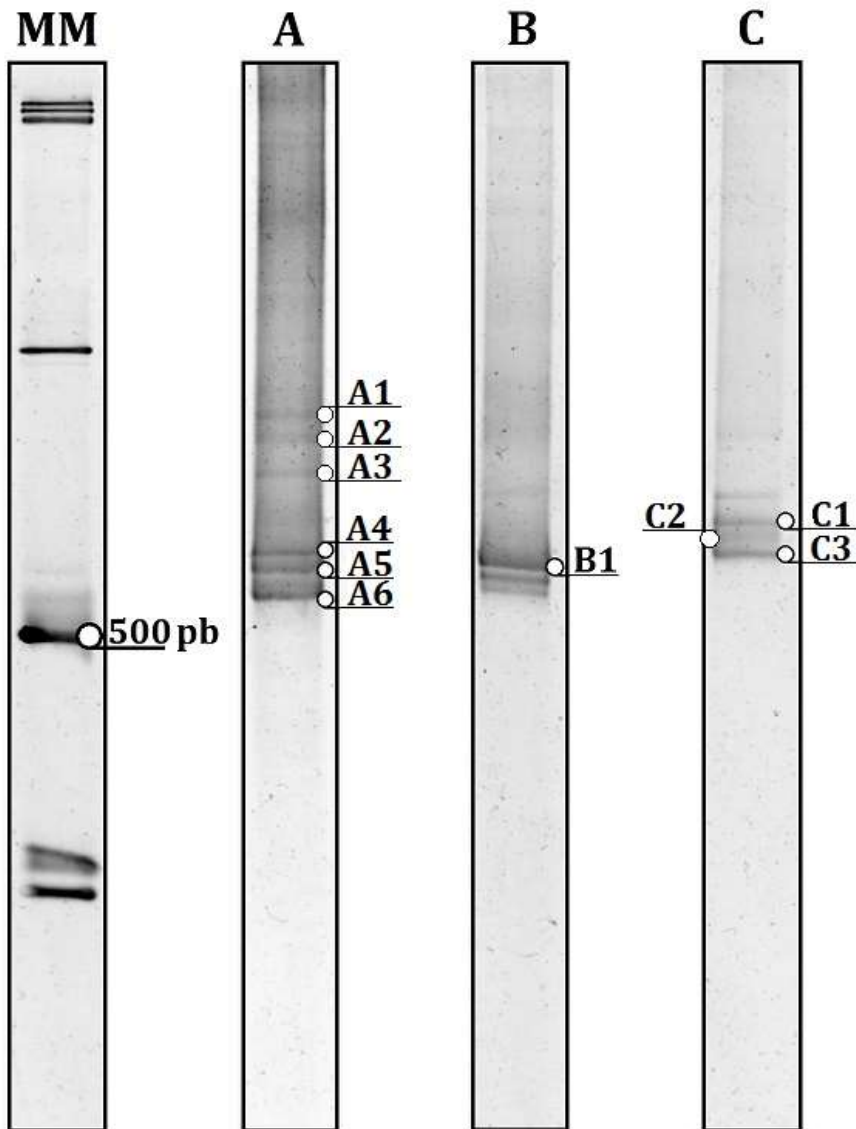


Figura 4.8. Patrón de migración de la DGGE. En el carril A migró la muestra del Periodo I, en el carril B migró la muestra del Periodo III y en el carril C migró la muestra del Periodo IV. También se incluyó una muestra perteneciente a un marcador molecular (MM).

Durante el periodo de operación inicial en el que el reactor estuvo trabajando sin la adición de tiourea como agente inhibidor de las poblaciones nitrificantes (Periodo I), hubo tres poblaciones principales que dominaron la comunidad. Todas las bandas entre la A1 y la A4, ambas incluidas, dieron lugar a una secuencia con un porcentaje de similitud de entre el 89 – 93% con la población *Hydrogenophaga temperata*, de la familia *Comamonadaceae*. En cambio, las bandas A5 y A6 derivaron en secuencias diferentes. La secuencia correspondiente a la banda A5 tuvo un 98% de similitud con *Brevundimonas faecalis* mientras que la secuencia de la banda A6 tuvo un 99% de similitud con *Millisia brevis*. Con la introducción de tiourea, hierro y magnesio al medio (Periodo III) hubo un cambio en las principales poblaciones bacterianas de la comunidad. Durante este periodo operacional sólo se pudo identificar a una única población, correspondiente a la banda B1. La secuencia de esta banda tuvo un 99% de similitud con la especie *Thauera linaloolentis*. Por último, cuando el reactor se operó a una VCO de 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Periodo IV) se identificaron dos poblaciones principales. La secuencia de la banda C1 tuvo un 93% de similitud con la bacteria *Azoarcus tolulyticus*. Mientras, la secuencia de las bandas C2 y C3 tuvo un porcentaje de similitud del 95 y del 99%, respectivamente con *Amaricoccus kaplicensis*.

A raíz de los resultados observados al realizar el análisis taxonómico, se determinó que la composición de la comunidad microbiana estuvo altamente influenciada por las condiciones de operación aplicadas al SBR. Así, se ha observado un fuerte cambio en la composición de la comunidad microbiana cada vez que se ha modificado el medio de cultivo. De hecho, ninguna población ha sido capaz de adaptarse al nuevo medio de cultivo y, al final, ha acabado siendo reemplazada por una nueva población con mejores aptitudes frente a las nuevas condiciones. El perfil de AGV es uno de los factores con mayor influencia sobre el desarrollo de una u otra población (Jiang *et al.*, 2011). Sin embargo, éste se mantuvo constante a lo largo de todo el proceso de operación, por lo que se descartó su efecto sobre el cambio en la composición de la comunidad microbiana. Quizá uno de los factores que ha podido jugar un rol importante en la dinamicidad de la comunidad fue el TRS. Al establecer un TRS tan bajo a lo largo de todo el proceso de selección (3 días) se pudo promover un rápido lavado de las poblaciones bacterianas que no se adaptasen bien a las nuevas condiciones de operación. Tal y como ya se ha mencionado anteriormente, durante

el periodo de operación inicial (Periodo I) fueron tres los taxones que dominaron la comunidad microbiana. La falta de tiourea en el medio puede generar competencia en la comunidad microbiana entre las poblaciones heterótrofas y autótrofas, como ya ha demostrado Fra-Vázquez *et al.* (2019). Sin embargo, los resultados de la DGGE en la presente investigación demostraron que la presión selectiva que ha ejercido la estrategia ADF fue lo suficientemente elevada para seleccionar cepas con capacidad de acumular PHA sin la necesidad de introducir este compuesto químico al medio. De hecho, tanto los miembros del género *Hydrogenophaga* como otros miembros de la familia *Comamonadaceae* ya han sido identificados como microorganismos con la capacidad de acumular PHA (Oliveira *et al.*, 2017; Crognale *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2020). Por su parte, los miembros del género *Brevundimonas* también tienen una contrastada capacidad para acumular PHA (Bhuwal *et al.*, 2013). En relación a este género, cabe destacar que Crognale *et al.* (2019) observaron como *Brevundimonas* era más abundante al inicio de la operación del reactor para después ser desplazada por otras poblaciones, similar a lo descrito en el presente trabajo. Finalmente, no se ha encontrado información en la literatura con respecto a la capacidad acumuladora del tercer taxón identificado en este periodo inicial, *Millisia brevis*, por lo que podría tratarse de una población no acumuladora de PHA. Esto podría indicar que el MMC no estuviese del todo enriquecido. Cabe destacar de este periodo inicial que, a pesar de que se ha favorecido un ambiente propicio para bacterias oxidantes de amonios (AOB) y bacterias oxidantes de nitritos (NOB), ninguna de ellas ha sido identificada. Sin embargo, esto no significó que no formasen parte del MMC, sino que pudieron haberse encontrado con una abundancia relativa inferior a la necesaria para poder ser identificadas mediante esta técnica analítica. De hecho, en el estudio realizado por Fra-Vázquez *et al.* (2019), las poblaciones de AOB sólo representaron un 10% del total de la abundancia relativa, aún a pesar de haber detectado una importante actividad nitrificante. El empleo de nuevas técnicas analíticas como la secuenciación masiva podría ofrecer un mapa más exhaustivo de la composición de la comunidad microbiana, identificando poblaciones que no se han detectado mediante la DGGE, tanto heterótrofas como autótrofas. Otra alternativa para determinar la presencia de poblaciones AOB y NOB sería la medición de nitritos y de nitratos en la presente investigación, productos finales del metabolismo de estas poblaciones bacterianas. Aún a pesar de que todas las condiciones de operación fueron idénticas entre sí con

excepción de la adición de tiourea, hierro y magnesio, hubo un cambio brusco en la composición de la comunidad microbiana presente en el Periodo I con respecto a la presente en el Periodo III. Tanto las especies del género *Hydrogenophaga* como las del género *Brevundimonas* o las del género *Millisia* no fueron identificadas entre las poblaciones con mayor abundancia de la comunidad. En su lugar apareció la especie *Thauera linaloolentis*. Muchas especies del género *Thauera* tienen una relación muy estrecha con los procesos de producción de PHA y su capacidad para acumular PHA ya ha sido altamente contrastada (Jiang *et al.*, 2011; Farghaly *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2018). Sin embargo, según un trabajo que ha sido publicado recientemente, la tiourea no tuvo ningún efecto sobre las poblaciones con capacidad de acumular PHA, sólo sobre el desarrollo de las poblaciones de AOB y de NOB (Fra-Vázquez *et al.*, 2019). Por lo tanto, habría que profundizar más para determinar si la introducción de hierro y magnesio pudo haber ejercido algún papel en el cambio de la composición de la comunidad microbiana cuando se pasó del Periodo I al Periodo III. Finalmente, se volvió a registrar un cambio en la composición de la comunidad microbiana al aumentar la VCO (Periodo IV). Así, la especie *Thauera linaloolentis* fue reemplazada por otras 2 poblaciones bacterianas emparentadas filogenéticamente con miembros de los géneros *Azoarcus* y *Amaricoccus*. La capacidad para acumular PHA de ambas poblaciones también ha sido contrastada por varios estudios previos (Lemos *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017). Albuquerque *et al.* (2010) y Carvalho *et al.* (2014) estudiaron las dinámicas poblacionales al cambiar la VCO, al igual que en la presente investigación. En sus respectivos trabajos se observó una modificación en la composición de la comunidad microbiana con el cambio en la VCO, tal y como se ha observado aquí. Por lo tanto, sí que se puede concluir que este parámetro, la VCO, juega un rol importante en el desarrollo de una u otra población bacteriana.

Una vez analizada la composición de la comunidad microbiana, se pudo relacionar a cada una de las poblaciones bacterianas con su respectiva capacidad para acumular PHA. Así, en base a todas las observaciones realizadas durante la etapa de selección de cepas acumuladoras de PHA y su posterior producción en ensayos *fed-batch*, fue posible concluir que las poblaciones bacterianas seleccionadas durante el Periodo I (*Hydrogenophaga temperata*, *Brevundimonas faecalis* y *Millisia brevis*) fueron las que tuvieron una menor capacidad para acumular PHA. Estas poblaciones dirigieron un

mayor porcentaje de los AGV hacia el crecimiento celular (Figura 4.5). En segundo lugar quedó *Thauera linaloolentis*, cuya capacidad para acumular PHA fue mayor a la de las poblaciones citadas anteriormente, pero todavía inferior a *Amaricoccus* y a *Azoarcus*, las poblaciones desarrolladas durante el Periodo IV. De hecho, Carvalho *et al.* (2014) ya habían observado que los miembros del género *Thauera* dirigían una mayor proporción de AGV hacia el crecimiento celular con respecto a otra población acumuladora como fue el caso de *Azoarcus*. En resumen, los géneros *Amaricoccus* y *Azoarcus* fueron los que tuvieron una mayor capacidad para acumular PHA de todas las poblaciones desarrolladas en el SBR, aunque cabe destacar que estos resultados son específicos del sustrato y de las condiciones operacionales empleados aquí, y no genéricos a cualquier proceso de enriquecimiento.

#### 4.5 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación demostraron que la estrategia ADF fue suficiente para enriquecer a un MMC en cepas con capacidad de acumular PHA. Sin embargo, el potencial acumulador de este MMC ha ido mejorando a medida que se han ido modificando determinadas condiciones de operación. La capacidad máxima de acumular PHA pasó de un 21 a un 54%. Análisis taxonómicos mediante DGGE han demostrado que hubo un cambio en la composición de la comunidad microbiana y que las poblaciones con mayor capacidad para acumular PHA fueron *Amaricoccus* y *Azoarcus*, por delante de otras poblaciones como *Thauera*, *Hydrogenophaga* o *Brevundimonas*, cuya capacidad de acumular PHA también ha sido contrastada.

#### 4.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. J. Biotechnol. 130, 411 – 421.
- 2 Albuquerque, M.G.E., Torres, C.A.V., Reis, M.A.M., 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using

- sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Res.* 44, 3419 – 3433.
- 3 Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161 – 174.
  - 4 APHA-AWWA-WPCF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed. American Public Health Association, Washington, DC.
  - 5 Ben, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2016. Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2817 – 2826.
  - 6 Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochem. Eng. J.* 40, 492 – 499.
  - 7 Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V., Yadav, A., 2013. Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *Int. J. Biomat.* 2013.
  - 8 Campanari, S., Silva, F.A., Bertin, L., Villano, M., Majone, M., 2014. Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater. *Int. J. Biol. Macromol.* 71, 34 – 41.
  - 9 Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2014. The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *N. Biotechnol.* 31, 257 – 263.
  - 10 Carvalho, G., Pedras, I., Karst, S.M., Oliveira, C.S.S., Duque, A.F., Nielsen, P.H., Reis, M.A.M., 2018. Functional redundancy ensures performance robustness in 3-stage PHA-producing mixed cultures under variable feed operation. *N. Biotechnol.* 40, 207 – 217.
  - 11 Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T.P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., Adani, F., 2017. Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of

- municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnol. Biofuels* 10, 201.
- 12 Colombo, B., Sciarria, T.P., Reis, M., Scaglia, B., Adani, F., 2016. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresour. Technol.* 218, 692 – 699.
  - 13 Crognale, S., Tonanzi, B., Valentino, F., Majone, M., Rossetti, S., 2019. Microbiome dynamics and phaC synthase genes selected in a pilot plant producing polyhydroxyalkanoate from the organic fraction of urban waste. *Sci. Tot. Environ.* 689, 765 – 773.
  - 14 Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., Beccari, M., 2006. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotech. Bioeng.* 93, 76 – 88.
  - 15 Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* 31, 276 – 288.
  - 16 Farghaly, A., Enitan, A.M., Kumari, S., Bux, F., Tawfik, A., 2017. Polyhydroxyalkanoates production from fermented paperboard mill wastewater using acetate-enriched bacteria. *Clean Techn. Environ. Policy* 19, 935 – 947.
  - 17 Fauzi, A.H.M., Chua, A.S.M., Yoon, L.W., Nittami, T., Yeoh, H.K., 2019. Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Saf. Environ. Prot.* 122, 200 – 208.
  - 18 Fernández-Dacosta, C., Posada, J.A., Kleerebezem, R., Cuellar, M.C., Ramirez, A., 2015. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresour. Technol.* 185, 368 – 377.
  - 19 Fra-Vázquez, A., Santorio, S., Palmeiro-Sánchez, T., del Río, A.V., Mosquera-Corral, A., 2019. PHA accumulation of a mixed microbial culture co-exists with ammonia partial nitritation. *Chem. Eng. J.* 360, 1255 – 1261.
  - 20 Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, 1700782.

- 21 Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2022 – 2035.
- 22 Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517 – 5530.
- 23 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010a. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *J. Biotechnol.* 147, 73 – 79.
- 24 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010b. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Res.* 44, 2141 – 2152.
- 25 Johnson, K., van Geest, J., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010c. Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. *Water Res.* 44, 1689 – 1700.
- 26 Korkakaki, E., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2017. Impact of phosphate limitation on PHA production in a feast-famine process. *Water Res.* 126, 472 – 480.
- 27 Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioeng.* 4, 55 – 98.
- 28 Lagoa-Costa, B., Kennes, C., Veiga, M.C., 2020. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 308, 123226.
- 29 Lemos, P.C., Levantesi, C., Serafim, L.S., Rossetti, S., Reis, M.A.M., Tandoi, V., 2008. Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 351 – 360.
- 30 Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2013. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresour. Technol.* 142, 232 – 239.



- 31 Mohan, S.V., Reddy, M.V., 2013. Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental methodology. *Bioresour. Technol.* 128, 409 – 416.
- 32 Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M.E., 2017. Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations. *Sci. Tot. Environ.* 583, 300 – 307.
- 33 Oliveira, C.S.S., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2017. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *N. Biotechnol.* 37, 69 – 79.
- 34 Oliveira, C.S.S., Silva, M.O.D., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2018. Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. *Appl. Sci.* 8, 1817.
- 35 Palmeiro-Sánchez, T., Fra-Vázquez, A., Rey-Martínez, N., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., 2016. Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture. *J. Haz. Mat.* 306, 332 – 339.
- 36 Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C.Q., Yu, H., Ge, C., 2020. Micro- and nano-plastics in marine environment: source, distribution and threats — A review. *Sci. Tot. Environ.* 698, 134254.
- 37 Pereira, J., Queirós, D., Lemos, P.C., Rossetti, S., Serafim, L.S., 2020. Enrichment of a mixed microbial culture of PHA-storing microorganisms by using fermented hardwood spent sulfite liquor. *N. Biotechnol.* 56, 79 – 86.
- 38 Queirós, D., Fonseca, A., Lemos, P.C., Serafim, L.S., 2016. Long-term operation of a two-stage polyhydroxyalkanoates production process from hardwood sulphite spent liquor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2480 – 2487.
- 39 Shen, L., Hu, H., Ji, H., Cai, J., He, N., Li, Q., Wang, Y., 2014. Production of poly (hydroxybutyrate–hydroxyvalerate) from waste organics by the two-stage process: Focus on the intermediate volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 166, 194 – 200.
- 40 Silva, F., Campanari, S., Matteo, S., Valentino, F., Majone, M., Villano, M., 2017. Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *N. Biotechnol.* 37, 90 – 98.

- 41 Tamang, P., Banerjee, R., Koster, S., Nogueira, R. 2019. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. *J. Environ. Sci.* 78, 137 – 146.
- 42 Tamis, J., Luzkov, K., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2014. Enrichment of *Plasticicumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *J. Biotechnol.* 192, 161 – 169.
- 43 Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., Majone, M., 2014. Feed frequency in a sequencing batch reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *N. Biotechnol.* 31, 264 – 275.
- 44 Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Micheli, A., Vallini, G., Majone, M., 2010. Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochem.* 45, 714 – 723.
- 45 Wang, X., Oehmen, A., Freitas, E.B., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2017. The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Res.* 112, 269 – 278.
- 46 Wen, Q., Ji, Y., Hao, Y., Huang, L., Chen, Z., Sposob, M., 2018. Effect of sodium chloride on polyhydroxyalkanoate production from food waste fermentation leachate under different organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 267, 133 – 140.



# Capítulo 5

---

---

## Relación entre la composición de la alimentación, las dinámicas microbianas y la eficiencia del proceso de acidogénesis en la producción de polihidroxicanoatos

### 5.1 RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue el de evaluar las dinámicas poblacionales asociadas a un cambio progresivo en la composición de la alimentación durante la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en un proceso de codigestión anaerobia entre dos sustratos, el suero lácteo y el agua residual de la industria cervecera. Para promover estos cambios en la comunidad microbiana, la alimentación estuvo sujeta a un aumento gradual en la proporción del agua residual de la industria cervecera del 0 al 50% de la carga orgánica. Se observó que en las primeras etapas del proceso de acidogénesis las poblaciones dominantes fueron *Megasphaera*, *Bifidobacterium* o *Caproiciproducens*. Sin embargo, cuando el agua residual de la industria cervecera alcanzó un 25% de la carga orgánica aparecieron nuevos taxones que reemplazaron a los anteriores. Entre ellos *Selenomonas*, *Ethanoligenens* o miembros no clasificados del orden *Bacteroidales*. A consecuencia del cambio en el núcleo dominante de las poblaciones bacterianas, también se observó una alteración en la distribución final de los AGV así como en la eficacia del proceso de acidogénesis. El ácido butírico cayó de un 52 a un 27% mientras que la producción de ácido acético se vio favorecida al pasar de un 36 a un 52%. La introducción del agua residual de la industria cervecera tuvo, además, un efecto perjudicial sobre la producción de AGV, pues el porcentaje de acidificación cayó de un 72 a un 57%. Finalmente, la investigación se completó con ensayos *fed-batch* para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) utilizando como sustrato los efluentes obtenidos durante las distintas fases de la fermentación acidogénica. El máximo porcentaje de PHA fue muy similar independientemente del

efluente empleado (50%), aunque hubo diferencias en la composición monomérica del biopolímero en función de la distinta distribución de los AGV de cada efluente.

## 5.2 INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria es una de las industrias más importantes a nivel mundial. Suministra alimento a miles de millones de personas en el mundo al procesar los recursos naturales que el planeta nos ofrece. La industria láctea se puede considerar como uno de los sectores más importantes dentro de la industria alimentaria, pues los productos lácteos, ya sean leche o sus derivados, son un alimento esencial en la dieta humana. Uno de los derivados lácteos más importantes a nivel mundial es el queso. Su producción consiste en la coagulación de la caseína, la proteína de la leche. Sin embargo, al final de la coagulación, queda un remanente líquido de color amarillo verdoso. Este líquido es lo que se conoce como suero lácteo (Siso, 1996). El suero lácteo es el subproducto más abundante dentro de la industria láctea y se caracteriza por presentar una gran cantidad de materia orgánica disuelta. Su valor fluctúa entre 50 – 102 g L<sup>-1</sup>, convirtiéndose así en un producto con un alto potencial contaminante (Carvalho *et al.*, 2013). La industria cervecera también está considerada un sector importante dentro de la industria alimentaria. La cerveza es una de las bebidas más populares y de mayor consumo a nivel mundial. Sin embargo, la producción de esta bebida también lleva asociado una elevada generación de residuos. Entre todos los residuos que se generan en la industria cervecera, el agua residual de la industria cervecera es uno de ellos. Se producen entre 3 y 10 litros de este residuo por cada litro de cerveza producido (Chen *et al.*, 2016). En la composición del agua residual de la industria cervecera se incluyen azúcares, ácidos orgánicos o etanol, entre otros compuestos (Alayu & Yirgu, 2018). Sin embargo, su composición se caracteriza por una amplia variabilidad en sus propiedades fisicoquímicas. Tanto es así que, por ejemplo, puede haber fluctuaciones de entre 2 y 32 g L<sup>-1</sup> en su carga orgánica, según Arantes *et al.* (2017). Las fluctuaciones también afectan a los niveles de nitrógeno, fósforo o sólidos. Al igual que en el caso del suero lácteo, existe también una gran preocupación medioambiental alrededor del agua residual de la industria cervecera, pues está considerado un producto altamente contaminante.

Tanto la industria láctea como la cervecera crecen año tras año y, con ellas, también lo hacen sus residuos. En la actualidad, todos los procesos de digestión anaerobia (DA) están ganando mucha importancia dentro del marco de economía circular que ha promovido la Unión Europea (European Commission, 2015). Es por ello que, la

valorización de estos residuos de carácter orgánico a través de los procesos de DA es una alternativa tremendamente prometedora. La DA consta de una cascada de 4 reacciones secuenciales (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis) en las que, a partir de cada una de ellas, se pueden obtener diferentes productos de interés (Angelidaki *et al.*, 2011). Con independencia de cuál sea el producto deseado, todas y cada una de las reacciones de la cascada están ejecutadas por una comunidad microbiana extremadamente específica y compleja, en la que cada miembro tiene muy bien definido su rol (Angelidaki *et al.*, 2011; Wainaina *et al.*, 2019). Es, durante la etapa de acidogénesis o fermentación acidogénica, cuando se producen los ácidos grasos volátiles (AGV). Hoy en día, los AGV son de los productos más prometedores que se pueden conseguir mediante procesos de DA, pues son valiosos *per se* (Atasoy *et al.*, 2018) o como intermediarios de una amplia variedad de productos como, por ejemplo, los polihidroxialcanoatos (PHA) (Lagoa-Costa *et al.*, 2017). El consorcio de bacterias que se encarga de las reacciones químicas que constituyen la fermentación acidogénica es conocido con el nombre de acidógenos. Este grupo, que está formado por bacterias anaerobias, transforma los compuestos monoméricos provenientes de la etapa de hidrólisis en moléculas mucho más simples como los ácidos orgánicos de cadena corta, los alcoholes o el hidrógeno (Wainaina *et al.*, 2019). Sin embargo, en la mayoría de los digestores en los que se llevan a cabo los procesos de fermentación acidogénica conviven tanto las bacterias hidrolíticas, como los acidógenos e, incluso también, los metanógenos (Wainaina *et al.*, 2019). Esto da lugar a un escenario muy complejo, con innumerables interconexiones y difícil de resolver mediante métodos microbiológicos tradicionales (Campanaro *et al.*, 2018b). Las nuevas tecnologías de secuenciación se han postulado como una de las herramientas más valiosas a la hora de desentrañar estas interconexiones y, en la actualidad, cada vez son más trabajos de investigación los que hacen uso de esta tecnología. Los estudios actuales abordan, principalmente, la relación existente entre determinados parámetros operacionales y las poblaciones bacterianas. Así, se inducen cambios en parámetros como el pH, el tiempo de retención de sólidos (TRS), el tiempo de retención hidráulico (TRH) o la velocidad de carga orgánica (VCO) mientras se estudia cómo esta alteración afecta a las poblaciones bacterianas presentes en el digestor (Gouveia *et al.*, 2016; Domingos *et al.*, 2017; Lin & Li, 2018; Lagoa-Costa *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2020; Wainaina *et al.*, 2020).

Sin embargo, la naturaleza de la alimentación que se ha introducido al interior del digestor también es una variable con una gran influencia sobre el desarrollo de uno u otro grupo microbiano. De hecho, ya se ha demostrado que cambiar la composición de la alimentación afecta a las comunidades microbianas (De Francisci *et al.*, 2015; Fitamo *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018). Sin embargo, desde nuestro punto de vista, estos trabajos promueven un cambio radical en la composición de la alimentación. A día de hoy es todavía incierto qué ocurre con la comunidad microbiana cuando se enfrenta a un cambio gradual en la composición de la alimentación, y creemos que esta información es crucial para optimizar la producción de AGV. Así, para abordar este problema, la presente investigación ha estudiado las dinámicas poblacionales en una comunidad microbiana sometida a un cambio progresivo en la composición de su alimentación a través de un proceso de fermentación acidogénica. Además, se ha estudiado también el efecto que el perfil de AGV tiene sobre la producción de PHA así como sobre la composición monomérica final de los biopolímeros.

## 5.3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El proceso global puede dividirse en dos etapas diferentes, tal y como se representa en la Figura 5.1. En una primera etapa se llevó a cabo la producción de AGV a través de un proceso de codigestión entre los dos residuos, el suero lácteo y el agua residual de la industria cervecera. Un reactor anaerobio de lecho de lodos en flujo ascendente (UASBR) fue la configuración adoptada para ejecutar esta primera etapa. El diseño experimental incluyó 4 fases diferentes en las que el porcentaje del agua residual de la industria cervecera se fue aumentando de manera progresiva. Cada fase tuvo una duración de entre 24 – 40 días. Además, se incluyó un periodo de aclimatación interfase con una duración de entre 21 – 31 días. La Fase I se consideró como el punto de partida del experimento, en donde el UASBR se alimentó con un 100% de suero lácteo. La finalidad de esta fase inicial fue la de determinar la comunidad microbiana basal. Después de 34 días, se cambiaron las condiciones del UASBR y se dio inicio al proceso de codigestión propiamente dicho. Para ello, el porcentaje de agua residual de la industria cervecera se estableció en un 10% del total de la demanda química



de oxígeno (DQO), con el 90% restante en forma de suero lácteo (Fase II). En la Fase III los microorganismos se alimentaron con un 25% del agua residual de la industria cervecera y un 75% de suero lácteo. Por último, en la Fase IV, se igualaron al 50% los porcentajes de suero lácteo y de agua residual de la industria cervecera. Con el fin de monitorizar la evolución de la comunidad microbiana, se tomaron muestras del interior del reactor durante cada una de las diferentes fases por las que se hizo pasar al reactor. La toma de muestras tuvo lugar cuando el UASBR alcanzó para cada fase el estado estacionario.

En una segunda etapa, se llevaron a cabo ensayos *fed-batch* aerobios con el objetivo de producir PHA (Figura 5.1). Se realizó un ensayo *fed-batch* por cada efluente que se hubo obtenido de cada una de las diferentes fases de la fermentación acidogénica. La finalidad de estos ensayos fue la de determinar la contribución del perfil de AGV no sólo sobre la producción de PHA, sino también sobre la distribución monomérica del biopolímero que, a su vez, afectará a sus propiedades fisicoquímicas.

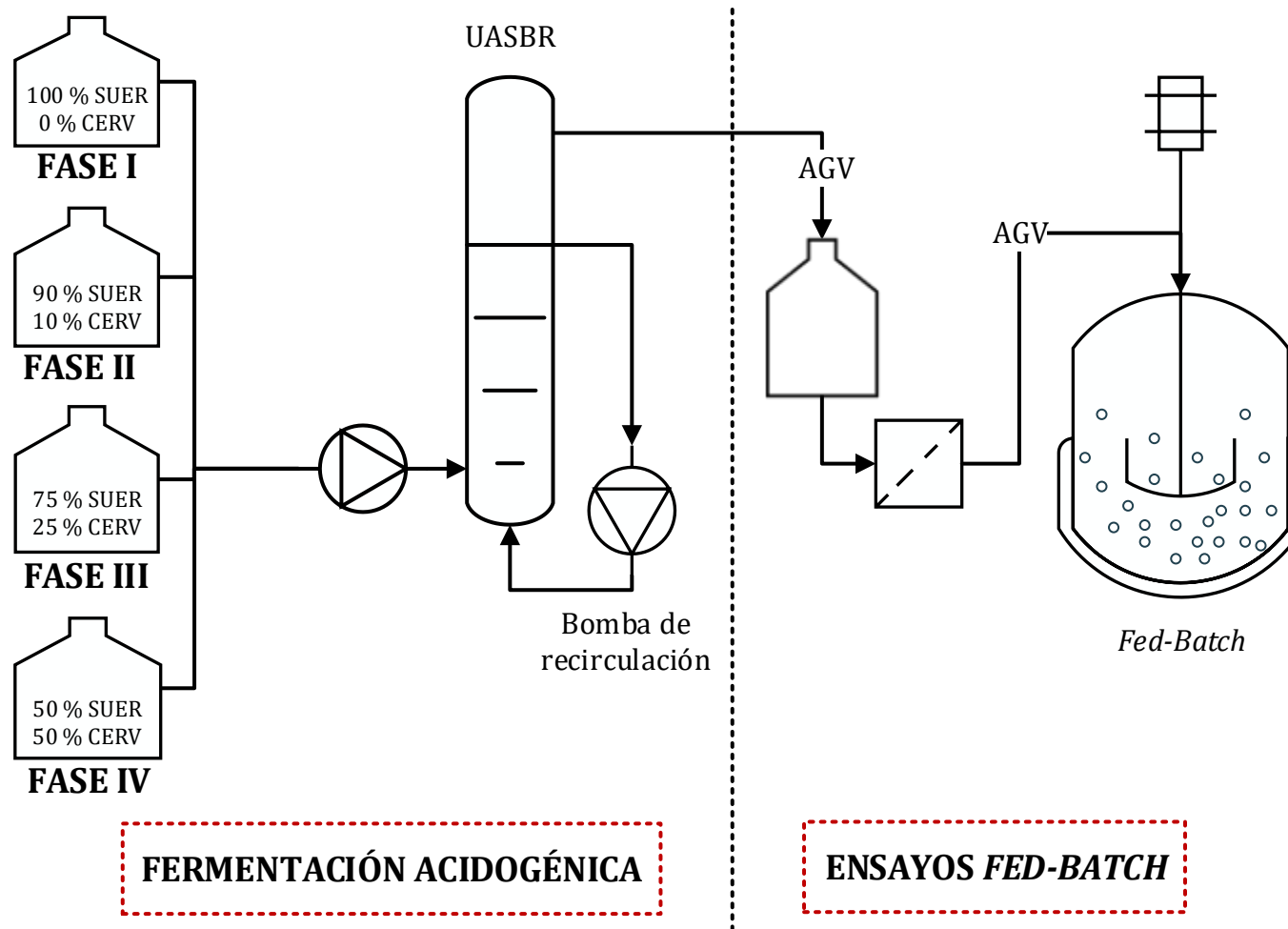


Figura 5.1. Diseño experimental: primera etapa de producción de AGV a través de la codigestión de los 2 residuos en sus diferentes proporciones (Fases I – IV) y subsecuente producción de PHA.

---

## 5.3.2 PRIMERA ETAPA: FERMENTACIÓN ACIDOGÉNICA

---

### 5.3.2.1 Sustratos

Tanto el suero lácteo como el agua residual de la industria cervecera se obtuvieron por la colaboración de compañías gallegas de los respectivos sectores. Para evitar los procesos de fermentación y/o degradación, las garrafas se almacenaron a 4° C desde el primer día que fueron recibidas en el laboratorio. Ese mismo día, también se le hizo la caracterización a cada efluente. El suero lácteo estuvo compuesto en un 90% de lactosa. También se detectó la presencia de una pequeña fracción proteica y de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético) que supuso el 10% restante de la carga orgánica. Estas tres fuentes de carbono dotaron al suero lácteo de una DQO que varió entorno a valores de 54 – 56 g DQO L<sup>-1</sup>. El contenido amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) fue bastante reducido, siendo las dos principales fuentes de nitrógeno el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disuelto en el suero lácteo, con una concentración que osciló entre 10 – 80 mg L<sup>-1</sup>, y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> asociado a la proteína. Por último, el contenido en fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) estuvo siempre en torno a valores de 300 mg L<sup>-1</sup>. El agua residual de la industria cervecera estuvo compuesta por una carga orgánica mucho más baja, con hasta 4,8 g DQO L<sup>-1</sup>, asociada principalmente al etanol, el cual representó un 71% del total de la materia orgánica (3,4 g DQO L<sup>-1</sup>). La presencia de los ácidos acético, propiónico y butírico completaron el 29% restante de la carga orgánica (1,4 g DQO L<sup>-1</sup>). Debido a su baja carga orgánica, y sólo para la Fase IV de la codigestión, el agua residual de la industria cervecera se concentró con etanol y AGV sintéticos hasta una concentración final de 6 g DQO L<sup>-1</sup>. A pesar de dicha adición, la proporción alcohol/AGV original del agua residual de la industria cervecera bruta se mantuvo constante. La caracterización se completó con análisis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> disueltos. En ambos casos, los valores fueron bastante bajos, en torno a 1 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 8 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. No hubo ningún aporte externo de nutrientes al interior del reactor.

---

### 5.3.2.2 Configuración del reactor

El UASBR medía 63 cm de alto por 7 cm de diámetro interno, lo que permitió un volumen de trabajo de aproximadamente un litro (1,1 L). Se usó como inóculo un cultivo microbiano mixto (MMC) proveniente de otro reactor anaerobio, que estaba enriquecido en poblaciones con capacidad de acidificar suero lácteo (Lagoa-Costa *et*

*al.*, 2020). Las condiciones operacionales utilizadas para desarrollar la acidogénesis fueron las mismas que las aplicadas en un trabajo anterior (Lagoa-Costa *et al.*, 2020). A grandes rasgos, la temperatura se mantuvo en condiciones mesófilas (30° C) y el pH se controló a 5 gracias a la medida en continuo de una sonda. Se introdujo un volumen de sustrato de 550 mL al día, lo que supuso una tasa de renovación (o TRH) de 2 días. La carga orgánica se ajustó para entrar a una concentración de 12 g DQO L<sup>-1</sup> y una VCO de 6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. El diseño del UASBR incluyó una recirculación del contenido del interior del reactor, generándose así un flujo ascendente. Además, la buena capacidad para decantar de los microorganismos creó un lecho de biomasa que evitó su lavado del interior del reactor. Se estableció, así, un TRS de 15 días que se mantuvo estable gracias a una purga diaria (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Condiciones operacionales del UASBR durante las diferentes fases del proceso de fermentación acidogénica.

	<i>Fase I</i>	<i>Fase II</i>	<i>Fase III</i>	<i>Fase IV</i>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	34	24	40	33
<i>TRS (d)</i>	15	15	15	15
<i>TRH (d)</i>	2	2	2	2
<i>Carga orgánica (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	12	12	12	12
<i>VCO (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	6	6	6	6
<i>Suero lácteo (%)</i>	100	90	75	50
<i>Agua cervecera (%)</i>	0	10	25	50
<i>pH</i>	5	5	5	5
<i>Temperatura (° C)</i>	30	30	30	30

### 5.3.3 SEGUNDA ETAPA: PRODUCCIÓN DE PHA

#### 5.3.3.1 Configuración del reactor *fed-batch*

Todos los ensayos *fed-batch* se diseñaron en un reactor de vidrio con una capacidad de 2 L. Al inicio de los ensayos *fed-batch* el reactor se inoculó con 800 mL de un MMC

procedente de un reactor aerobio para el enriquecimiento de cepas acumuladoras de PHA ([Capítulo 4](#)). Para realizar los ensayos *fed-batch*, la biomasa se recogió del reactor de enriquecimiento al final de la fase *famine*, cuando las disponibilidades de carbono, nutrientes y PHA intracelular eran mínimas. Las condiciones de operación durante los ensayos *fed-batch* fueron exactamente las mismas en las que se llevó a cabo el enriquecimiento. A grandes rasgos, la temperatura se mantuvo constante a 30° C y el pH en valores de entre 8 y 8,5 gracias a una sonda. Cuando el pH subía o bajaba del valor establecido se añadía bien HCl bien NaOH 1 M a través de sendas bombas peristálticas. La aireación se introdujo a 1 volumen de aire por volumen de reactor y minuto (vvm). Además, un agitador mecánico colaboró en la distribución del oxígeno por todo el reactor a una velocidad de 500 rpm. El oxígeno disuelto (OD) fue monitorizado en todo momento gracias a una segunda sonda. Finalmente, para la realización de los ensayos *fed-batch*, se siguió una estrategia de alimentación por pulsos que estuvo controlada por los niveles de OD en el interior del reactor. Ningún nutriente fue añadido de manera externa con el fin de maximizar la producción de PHA y evitar el posible crecimiento de la biomasa.

---

#### 5.3.3.2 Extracción del biopolímero

Una vez finalizado cada uno de los ensayos *fed-batch*, se extrajo el PHA acumulado por la biomasa del interior celular siguiendo el protocolo diseñado por Duque *et al.* (2014). La biomasa se inactivó con HCl 3 M hasta bajar el pH a un valor aproximado de 3, se recolectó toda la biomasa y se centrifugó. Los pellets se congelaron a -20° C y, posteriormente, se liofilizaron. Una vez seca, la biomasa se disolvió en cloroformo a una proporción de 40 mL de cloroformo por gramo de biomasa. Después de 3 días, la disolución se filtró para eliminar todos los restos celulares y, una vez evaporado el cloroformo, el PHA se obtuvo por polimerización.

---

#### 5.3.4 ANÁLISIS METAGENÓMICOS

La comunidad microbiana que se desarrolló en el interior del UASBR fue objeto de estudio mediante análisis metagenómicos. Con esta finalidad, se tomaron muestras de biomasa del interior del reactor cuando éste llegó al estado estacionario en cada una de las fases por las que se hizo pasar a los microorganismos dentro del proceso de fermentación acidogénica. Cada una de las muestras se tomó por duplicado. Los

análisis metagenómicos se iniciaron con la extracción del ADN genómico, siguiendo el método del fenol y del cloroformo. Una vez extraído el ADN, se midió su calidad y cantidad por NanoDrop y Qubit, respectivamente. Las muestras de ADN genómico fueron enviadas a una empresa externa especializada en este tipo de análisis para la secuenciación de las regiones hipervariables V3 – V4 del gen 16S rRNA utilizando la plataforma Illumina MiSeq (Macrogen). Las lecturas sin procesar han sido enviadas a la base de datos del NCBI bajo el proyecto denominado PRJNA636954.

El post-análisis de las secuencias en bruto se realizó empleando el software libre R (versión 3.5.1) y el flujo de trabajo diseñado por Callahan *et al.* (2016b). Para los análisis se usaron los paquetes de *Bioconductor dada2* (versión 1.8.0) (Callahan *et al.*, 2016a) y *phyloseq* (versión 1.24) (McMurdie & Holmes, 2013). Finalmente, el paquete *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) se usó para realizar un análisis diferencial en la abundancia de los taxones. Los umbrales para este último análisis se establecieron en base al método de Benjamini y Hochberg (BH) para controlar los falsos positivos con un valor de significancia < 0,01.

---

### 5.3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

La evolución del UASBR se monitorizó dos veces por semana. Los análisis incluyeron la caracterización de la entrada (influyente) y de la salida (efluente) del reactor para determinar los sólidos en suspensión totales (SST), sólidos en suspensión volátiles (SSV) y DQO, siguiendo las indicaciones de los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). Además, la determinación de los SST y los SSV también se han usado como medida para estimar la concentración de biomasa en el interior del reactor. Otros análisis del influente y del efluente para monitorizar la evolución del UASBR incluyeron la determinación de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y compuestos solubles en agua. Las determinaciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se han realizado usando sendos métodos colorimétricos a 635 y 690 nm, respectivamente. Los compuestos solubles en agua tales como AGV, etanol y lactosa se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos analíticos para los ensayos *fed-batch* fueron prácticamente los mismos que los utilizados en el proceso de acidogénesis: SST, SSV, DQO, HPLC y  $\text{NH}_4^+$ . A mayores, la cuantificación del contenido acumulado de PHA se realizó por cromatografía de gases (CG).

### 5.3.6 CÁLCULOS

El porcentaje de acidificación (PA) se calculó como el cociente entre la producción neta de AGV (en DQO) respecto a la DQO soluble introducida al interior del reactor, siguiendo la ecuación 5.1.

$$PA (\%) = \frac{AGV_{\text{efl}} (\text{g DQO L}^{-1}) - AGV_{\text{inf}} (\text{g DQO L}^{-1})}{DQO_{\text{sinf}} (\text{g DQO L}^{-1})} \times 100 \quad (5.1)$$

El porcentaje intracelular de PHA fue calculado como el peso de PHA en función del peso total de la biomasa, tal y como se representa en la ecuación 5.2.

$$PHA (\%) = \frac{PHA (\text{g})}{SSV (\text{g})} \times 100 \quad (5.2)$$

El rendimiento de acumulación ( $Y_{\text{PHA/S}}$ ) se calculó como la cantidad de polímero que se ha producido en función de la cantidad de sustrato consumido (ecuación 5.3).

$$Y_{\text{PHA/S}} = \frac{PHA_{\text{inicial}} (\text{Cmmol L}^{-1}) - PHA_{\text{final}} (\text{Cmmol L}^{-1})}{AGV_{\text{inicial}} (\text{Cmmol L}^{-1}) - AGV_{\text{final}} (\text{Cmmol L}^{-1})} \quad (5.3)$$

El rendimiento en el crecimiento de la biomasa ( $Y_{\text{X/S}}$ ) se calculó como el aumento en la concentración de biomasa activa (X) respecto al sustrato consumido. Finalmente, tanto la velocidad de consumo del sustrato ( $-q_s$ ) como la velocidad de producción de PHA ( $q_{\text{PHA}}$ ) se calcularon individualmente para cada pulso de los ensayos *fed-batch*. La  $-q_s$  se calculó como la regresión lineal en el consumo de AGV respecto al tiempo y a la biomasa activa. De igual manera, la  $q_{\text{PHA}}$  se calculó como la regresión lineal en la producción de PHA en función del tiempo y de la biomasa activa.

## 5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cambio en la composición de la alimentación se produjo de manera gradual en un proceso de codigestión que se monitorizó durante 206 días y que estuvo constituido por 4 fases (I – IV). Durante todo este periodo de tiempo las dinámicas poblacionales fueron el principal objeto de estudio. A mayores, también se evaluó la influencia de las dinámicas poblacionales tanto sobre la distribución final de los AGV como sobre los rendimientos finales del proceso de acidogénesis. Finalmente, los efluentes ricos en AGV obtenidos en cada una de las diferentes fases del proceso de codigestión se

testaron individualmente como sustrato para la producción de PHA así como para también evaluar su efecto sobre la composición monomérica final del biopolímero.

---

#### 5.4.1 INFLUENCIA DEL CAMBIO GRADUAL EN LA COMPOSICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA

---

##### 5.4.1.1 Aspectos generales en la composición de la comunidad microbiana

Después de realizar los correspondientes análisis bioinformáticos para cada una de las muestras, los resultados más importantes se resumieron en la Tabla 5.2. Después de todas las etapas de filtración, se obtuvo un número de lecturas superior a 65000, a excepción de la muestra perteneciente a la Fase III B, que obtuvo 59600. Según las observaciones realizadas por Campanaro *et al.* (2018b), este número de lecturas se consideró suficiente para dar una visión fiable de la complejidad de la comunidad microbiana. Los cálculos de diversidad alfa incluyeron medidas tanto para el índice de Shannon como para el número de unidades operacionales taxonómicas (OTUs). En ambos casos se utilizaron los valores enrarecidos de las muestras. El índice de Shannon fue una estimación directa de la biodiversidad del ecosistema y el número de OTUs dio una medida de su riqueza. Los valores de biodiversidad fueron muy similares entre las muestras, con una ligera variación de 3,1 a 3,4 en sus valores. Eso sí, la tendencia fue muy clara: la biodiversidad aumentó con la entrada gradual del nuevo sustrato (Figura 5.2). Sin embargo, la riqueza de la comunidad microbiana siguió una tendencia diametralmente opuesta: el número de OTUs se redujo con la entrada gradual del nuevo sustrato (Figura 5.2). Además, esta reducción fue más acusada en la Fase IV, en donde se alcanzó el número más bajo de OTUs, con un valor medio de 112. Las causas por las que la complejidad de la comunidad microbiana se redujo no están del todo claras. De Francisci *et al.* (2015) también registraron un descenso en la riqueza de las muestras al alimentar el reactor con pulsos de lípidos y proteínas respecto a cuándo lo hicieron con glucosa. Ellos asociaron este hecho al potencial inhibidor que presentan los lípidos y las proteínas, con efecto tóxico sobre múltiples grupos bacterianos mientras que la glucosa favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Una presión selectiva similar, asociada en este caso al efecto tóxico del etanol, podría haber estado detrás de la pérdida de riqueza que se ha detectado en la presente investigación. De esta manera, sólo grupos muy



específicos de microorganismos serían capaces de sobrevivir bajo la influencia del etanol. Según esto, la presión selectiva sería mucho más intensa cuanto mayor fuese la concentración del etanol en el medio, la cual llegó a un valor de 2 g DQO L<sup>-1</sup>. Zhou *et al.* (2015) también observaron resultados similares al detectar una reducción en el número de OTUs al comparar un reactor alimentado con glucosa respecto a otro alimentado con etanol. Otro factor que también pudo haber ejercido una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas de la comunidad microbiana fueron los polifenoles. Los compuestos fenólicos están presentes en la cerveza gracias al aporte realizado por el lúpulo y la malta. Además, ya se ha demostrado la presencia de estos compuestos en el agua residual de la industria cervecera (Tatullo *et al.*, 2016). A pesar de que su concentración no se ha medido en el presente trabajo, podría haber sido un factor clave a la hora de reducir la riqueza en la comunidad, pues presentan una reconocida actividad antimicrobiana (Barbosa-Pereira *et al.*, 2014).

Tabla 5.2. Resultados más importantes obtenidos al analizar cada una de las muestras de la secuenciación. Los datos hacen referencia a las lecturas obtenidas después de cada etapa de análisis.

Muestra	Réplica	Lecturas			
		Brutas	Filtradas	Asignadas (Filo) <sup>1</sup>	Asignadas (Género) <sup>2</sup>
<i>Fase I</i>	A	181001	100961	100961 (100%)	72474 (72%)
<i>Fase I</i>	B	163208	81527	81524 (100%)	55439 (68%)
<i>Fase II</i>	A	160842	93112	93103 (100%)	66185 (71%)
<i>Fase II</i>	B	164227	78157	78150 (100%)	61444 (79%)
<i>Fase III</i>	A	139565	65846	65846 (100%)	46429 (71%)
<i>Fase III</i>	B	147019	59612	59610 (100%)	42253 (71%)
<i>Fase IV</i>	A	123208	69628	69625 (100%)	44780 (64%)
<i>Fase IV</i>	B	141212	66385	66384 (100%)	46488 (70%)

<sup>1</sup> Número de lecturas asignadas a nivel filo. En paréntesis se da el porcentaje.

<sup>2</sup> Número de lecturas asignadas a nivel género. En paréntesis se da el porcentaje.

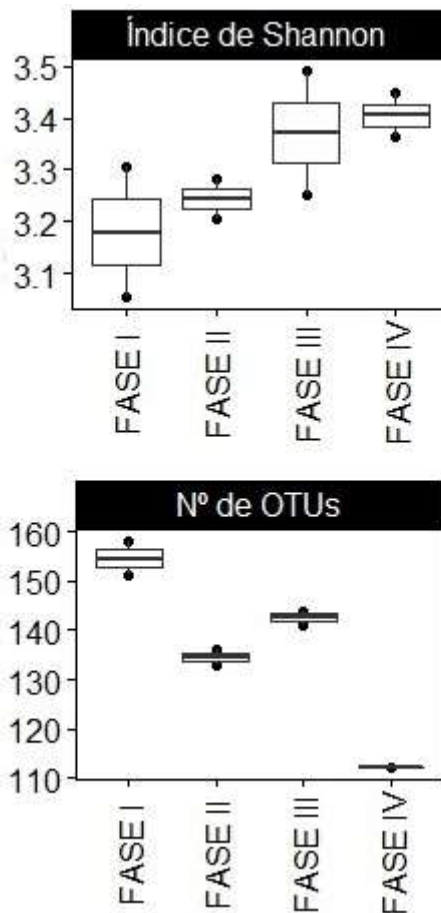


Figura 5.2. Cálculos de diversidad alfa para cada una de las cuatro fases por las que se hizo pasar al UASBR. Cálculos de biodiversidad (arriba) y de riqueza (abajo).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó en base a distancias Bray-Curtis. Fue una herramienta muy útil para determinar las diferencias y similitudes en la composición de las distintas comunidades microbianas desarrolladas a lo largo de las 4 fases de la fermentación acidogénica a nivel de OTU. El PCoA explicó el 81% de la variación existente a través del Eje 1 (63%) y del Eje 2 (18%). Las muestras se distribuyeron en 3 clústeres bien diferenciados (Figura 5.3). Según lo esperado, las réplicas de cada muestra se situaron una muy cerca de la otra. En base a la posición de cada clúster, fue posible inferir que la entrada gradual del agua residual de la industria cervecera ejerció cambios en la composición de la comunidad microbiana. Este posicionamiento fue, además, escalonado a lo largo del Eje 1, sugiriendo que los cambios se produjeron de manera progresiva y en paralelo a la entrada del nuevo sustrato. Sin embargo, esta evolución escalonada se vio alterada en la Fase III, en la

que un 25% de la carga orgánica en forma de agua residual de la industria cervecera fue introducida al interior del reactor (Figura 5.3). En base a estos resultados, fue posible considerar la presencia de un umbral a partir del cual la entrada de un nuevo sustrato provocó una modificación importante en la composición de la comunidad microbiana.

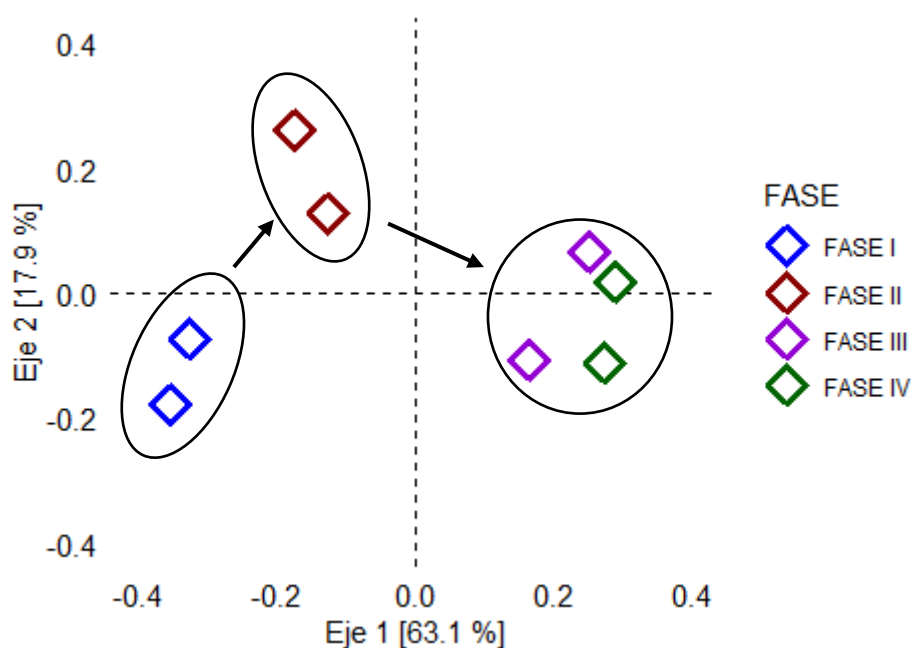


Figura 5.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) para cada una de las cuatro fases por las que se hizo pasar al UASBR.

#### 5.4.1.2 Dinámicas poblacionales en la comunidad microbiana

A nivel filo, casi el 100% de todas las lecturas fueron asignadas a diferentes OTUs (Tabla 5.2). En términos generales, la comunidad microbiana estuvo compuesta por miembros pertenecientes a los filos *Firmicutes* (158 OTUs), *Bacteroidetes* (72 OTUs), *Proteobacteria* (44 OTUs), *Actinobacteria* (25 OTUs) y *Patescibacteria* (4 OTUs). La dominancia de estos filos se vio favorecida, en gran medida, por su capacidad para fermentar diferentes compuestos orgánicos y su presencia en múltiples procesos de DA ya ha sido bien documentada (Campanaro *et al.*, 2018a; He *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019; Lagoa-Costa *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Wainaina *et al.*, 2020).

En la Figura 5.4 se representa la abundancia relativa de los 8 filos más abundantes de la comunidad microbiana, la cual incluyó al 99,9% de todos los OTUs, clasificados o sin clasificar. El filo más abundante fue *Firmicutes*, quien representó el 45 – 57% de toda la comunidad. La entrada de agua residual de la industria cervecera por vez primera al medio (Fase II), provocó una alteración que tuvo consecuencias negativas para este filo, cuya abundancia relativa se vio reducida en un 10%. Sin embargo, los miembros del filo *Firmicutes* fueron capaces de recuperarse en las siguientes fases del proceso, mostrando una gran resiliencia (Figura 5.4). En contraposición, hubo 2 filos con mayor sensibilidad al cambio en la composición de la alimentación. El filo *Actinobacteria* fue insensible al primer cambio en la composición de la alimentación (Fase II), con una cobertura del 18,5%. Sin embargo, cuando el porcentaje del agua residual de la industria cervecera se hizo más grande (Fases III y IV), su abundancia fue progresivamente en descenso hasta alcanzar un tercio del valor original (6,5%) (Figura 5.4). El filo *Patescibacteria* sufrió, al igual que el filo *Firmicutes*, un choque con el primer cambio en la composición de la alimentación (Fase I → Fase II), y su abundancia se vio reducida a más de la mitad (16 → 7%). Sin embargo, este filo no fue capaz de recuperarse en las fases sucesivas y su abundancia se mantuvo estable (Figura 5.4). De todas las poblaciones que compusieron la comunidad microbiana, los miembros del filo *Bacteroidetes* fueron los que más se vieron beneficiados por el cambio en la composición de la alimentación, pues su abundancia se triplicó al pasar de la Fase I (9%) a la Fase IV (27%). En términos generales, los miembros de este filo se definen como un grupo muy heterogéneo a nivel metabólico, interviniendo en procesos de hidrólisis de polisacáridos y proteínas, así como en la fermentación de azúcares y producción de ácidos orgánicos, aunque también pueden jugar un papel importante en los procesos metanogénicos (Hahnke *et al.*, 2016). Esta amplia gama de actividades metabólicas hace de *Bacteroidetes* uno de los filos más abundantes en los procesos de DA (Fitamo *et al.*, 2017; Campanaro *et al.*, 2018a; Iglesias-Iglesias *et al.*, 2019). Además, según recientes observaciones publicadas por Campanaro *et al.* (2018a), existe una relación inversamente proporcional entre la abundancia de *Bacteroidetes* y la presencia de  $\text{NH}_4^+$ , lo que podría haber favorecido el desarrollo de esta población durante la presente investigación. La inmensa mayoría de los grupos taxonómicos fueron clasificados dentro del dominio *Bacteria*, aunque una pequeña fracción de taxones se clasificó dentro del dominio *Archaea*. En concreto, fueron dos

los OTUs identificados dentro del filo *Euryarchaeota*. Su presencia se limitó a las 3 fases en las que el agua residual de la industria cervecera formó parte del medio de cultivo (Fase II, III y IV). Dentro del dominio *Archaea* se incluyen la gran mayoría de las bacterias metanogénicas. Además, según Luo *et al.* (2016), en metanógenos una abundancia relativa baja no es sinónimo de una baja actividad metabólica. Por lo tanto, fue fácil suponer que, a pesar de que la abundancia de este grupo no llegó en ningún caso al 1% (0,05 – 0,46%), hubo cierta actividad metanogénica aunque no se hayan registrado los niveles de metano a lo largo del presente trabajo.

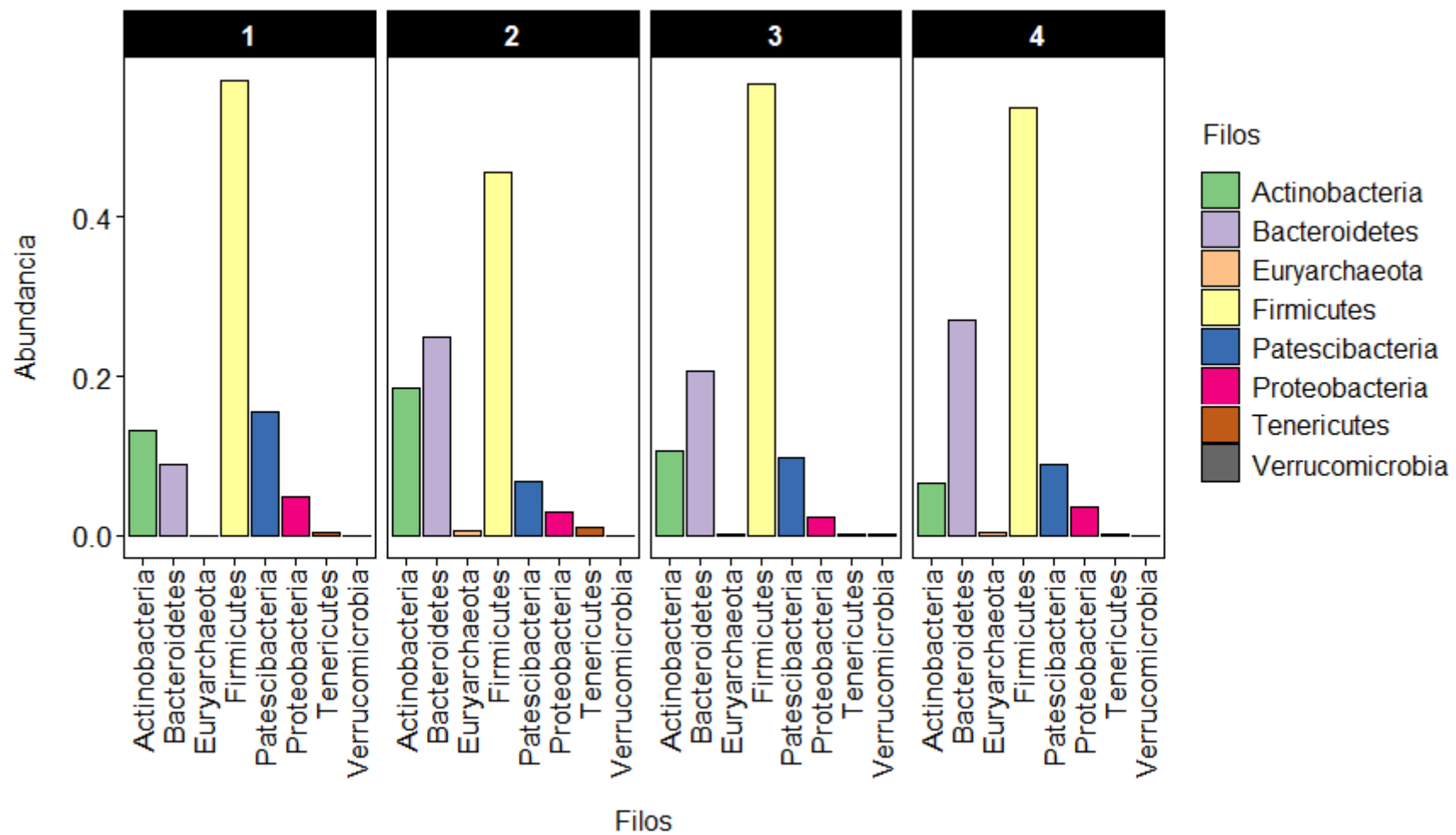


Figura 5.4. Representación gráfica de la abundancia relativa a nivel filo de las 8 poblaciones más abundantes en la Fase I (1), Fase II (2), Fase III (3) y Fase IV (4).

Al descender hacia las categorías taxonómicas más específicas se pudo observar una reducción en el porcentaje de lecturas asignadas, alcanzando un valor del 64 – 79% a nivel de género (Tabla 5.2). Con ello se produjo un aumento en el número de OTUs no clasificados, llegando a suponer aproximadamente un 30% del total de los OTUs. Estos resultados son bastante habituales en la actualidad, ya que existe una falta de información importante en las bases de datos correspondientes al 16S rRNA. Para evitar una falta de información mayor, en la presente investigación se ha decidido por identificar a los taxones no clasificados a nivel de género dentro de la categoría taxonómica más baja posible.

En la Figura 5.5 se representa un mapa de calor con la distribución de los 20 géneros más abundantes dentro de la comunidad microbiana del UASBR cuando éste alcanzó el estado estacionario en cada una de las distintas fases del proceso de fermentación acidogénica. Esta gráfica fue muy útil no solo para determinar las poblaciones más abundantes, sino también para identificar sus dinámicas al introducir gradualmente el nuevo sustrato en el medio. Los resultados vinieron a reforzar aquellos que se obtuvieron durante los PCoA, según los cuales se consideró que una proporción del 25% de la carga orgánica en forma de agua residual de la industria cervecera fue el valor umbral a partir del cual se promovió una fuerte alteración en la composición de la comunidad microbiana. Así, el núcleo dominante de poblaciones bacterianas durante la Fase I estuvo formado por *Faecalibacterium* (15%), *Megasphaera* (13%), *Caproiciproducens* (11%), *Bifidobacterium* (11%), así como por los miembros no identificados del orden *Saccharimonadales* (16%), del orden *Bacteroidales* (6%) y de la familia *Erysipelotrichaceae* (6%) (Figura 5.5). La presencia de muchas de estas poblaciones no fue sorprendente, pues ya habían sido identificados en un trabajo anterior como agentes activos en la bioconversión del suero lácteo a AGV (Lagoa-Costa *et al.*, 2020).

Este núcleo central de poblaciones fue, además, capaz de amortiguar bastante bien el primer cambio en la composición de la alimentación. De hecho, la composición de la comunidad microbiana en la Fase II fue bastante similar a la de la Fase I, estando formado por *Megasphaera* (17%), *Bifidobacterium* (16%), *Caproiciproducens* (14%), así como por miembros no clasificados del orden *Bacteroidales* (10%) y de la familia *Erysipelotrichaceae* (5%). Miembros no identificados del orden *Saccharimonadales*

también formaron parte del núcleo dominante de las poblaciones bacterianas, pero su abundancia se redujo a más de la mitad (7%) (Figura 5.5). Sin embargo, sí que fue posible observar dinámicas significativas con el cambio de fase. Por ejemplo, varios miembros de la familia *Ruminococcaceae*, entre ellos *Faecalibacterium*, fueron de los taxones más afectados por el cambio en la composición de la alimentación, pues se observó una reducción diferencial en sus abundancias (Figura 5.6 A). De hecho, la abundancia relativa de *Faecalibacterium* se redujo hasta 15 veces; de ser una de las poblaciones de mayor abundancia de la comunidad microbiana durante la Fase I, a representar un escaso 1% en la Fase II (Figura 5.5). En base a este cambio tan radical en la distribución de los miembros de una única familia, entendemos que la entrada del agua residual de la industria cervecera ha tenido que ejercer algún tipo de efecto tóxico sobre ellos, pues el cambio en la composición de la alimentación no fue tan brusco como así lo demostró el desplome en su abundancia relativa. Al contrario, los miembros del género *Parabacteroides* y de la familia *Prevotellaceae* (*Prevotellaceae* NK3B31) registraron un aumento en su abundancia relativa de hasta 11 y 22 veces. El primero pasó de una abundancia relativa de 0,8 a 8,7% y el segundo pasó de una abundancia relativa de 0,2 a 4,5% (Figura 5.5). Esto provocó que ambas poblaciones tuviesen uno de los mayores crecimientos diferenciales de la comunidad microbiana al pasar de la Fase I a la Fase II (Figura 5.6 A). Sin embargo, la población bacteriana con la mayor regulación positiva al cambiar de fase fue *Methanobrevibacter* (Figura 5.6 A). A pesar de que esta población bacteriana nunca fue de las más abundantes, sus miembros ejercieron una actividad metanogénica hidrogenotrófica contrastada (Braz *et al.*, 2019), lo que permitió suponer que parte de la materia orgánica ha sido transformada a metano a lo largo de esta Fase II.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la introducción de un 25% de la carga orgánica en forma de agua residual de la industria cervecera (Fase III) se consideró un punto de inflexión a partir del cual la composición de la comunidad microbiana sufrió un gran cambio. Así, se registró un descenso generalizado en la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas más asociadas al suero lácteo. Por ejemplo, la abundancia de *Megasphaera*, *Bifidobacterium* y *Caproiciproducens* se vio reducida a 11, 10 y 4%, respectivamente. También se observó una reducción en la abundancia de los miembros no identificados de la familia *Erysipelotrichaceae* (3%), aunque en



su lugar apareció un nuevo taxón emparentado filogenéticamente con éste como fue *Erysipelotrichaceae* UCG-004 (6%). En contraposición, los miembros sin identificar del orden *Bacteroidales* se vieron beneficiados por el cambio en la composición de la alimentación, ya que su cobertura alcanzó un 15% en esta Fase III. Sin embargo, el principal motivo por el que se consideró un cambio estructural en la composición de la comunidad microbiana fue por la aparición de un nuevo grupo de poblaciones bacterianas. Este grupo estuvo formado por miembros de los géneros *Selenomonas*, *Ethanoligenens*, *Acetitomaculum* y *Solobacterium* y su cobertura antes de la Fase III era inferior al 1% (Figura 5.5). En el caso de las 3 primeras poblaciones fue incluso posible hablar de un crecimiento diferencial en su abundancia relativa (Figura 5.6 B). *Selenomonas* se convirtió en la población predominante de la comunidad en la Fase III, al representar un 17% de la abundancia relativa total. Tal y como ya se ha descrito en la literatura, los miembros de este género se relacionan con procesos de deterioro de la cerveza, pudiendo haber tenido un papel importante en el desarrollo de esta población (Sakamoto & Konings, 2003). La abundancia relativa en el caso de *Ethanoligenens*, *Acetitomaculum* y *Solobacterium* se situó en un 5% en esta Fase III.

Finalmente, cuando las proporciones de suero lácteo y agua residual de la industria cervecera se igualaron al 50% (Fase IV), se observó que la abundancia relativa de las poblaciones con una mayor asociación al suero lácteo continuó a reducirse, con una cobertura de un 6 y 3% para los géneros *Bifidobacterium* y *Caproiciproducens*, respectivamente (Figura 5.5). Una excepción a esto fue *Megasphaera* cuya cobertura se mantuvo al mismo nivel que en la Fase III, un 10%. Una explicación razonable a este hecho es que, al igual que los miembros del género *Selenomonas*, los miembros del género *Megasphaera* también están implicados en los procesos del deterioro de la cerveza, siendo capaces de sobrevivir a concentraciones de etanol de hasta 5,5 g L<sup>-1</sup> (Sakamoto & Konings, 2003). El núcleo dominante de las poblaciones bacterianas durante esta última fase no fue muy diferente al de la Fase III. *Selenomonas* (12%), *Ethanoligenens* (10%), *Megasphaera* (10%), *Erysipelotrichaceae* UCG-004 (6%), *Acetitomaculum* (5%), *Solobacterium* (5%) y miembros no identificados del orden *Bacteroidales* (21%) fueron las poblaciones dominantes (Figura 5.5). De hecho, no se encontraron poblaciones reguladas positivamente cuando se aumentó la carga orgánica de agua residual de la industria cervecera del 25 al 50% (Figura 5.6 C).

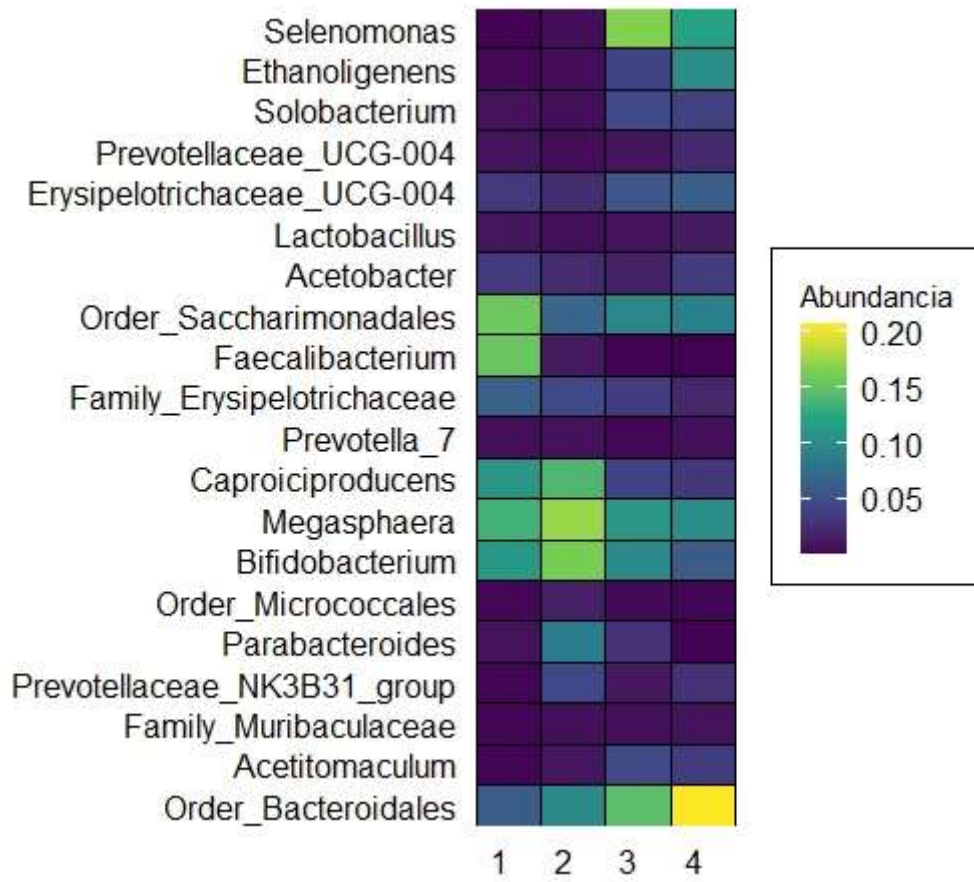


Figura 5.5. Mapa de calor representando los 20 géneros más abundantes en la Fase I (1), Fase II (2), Fase III (3) y Fase IV (4).

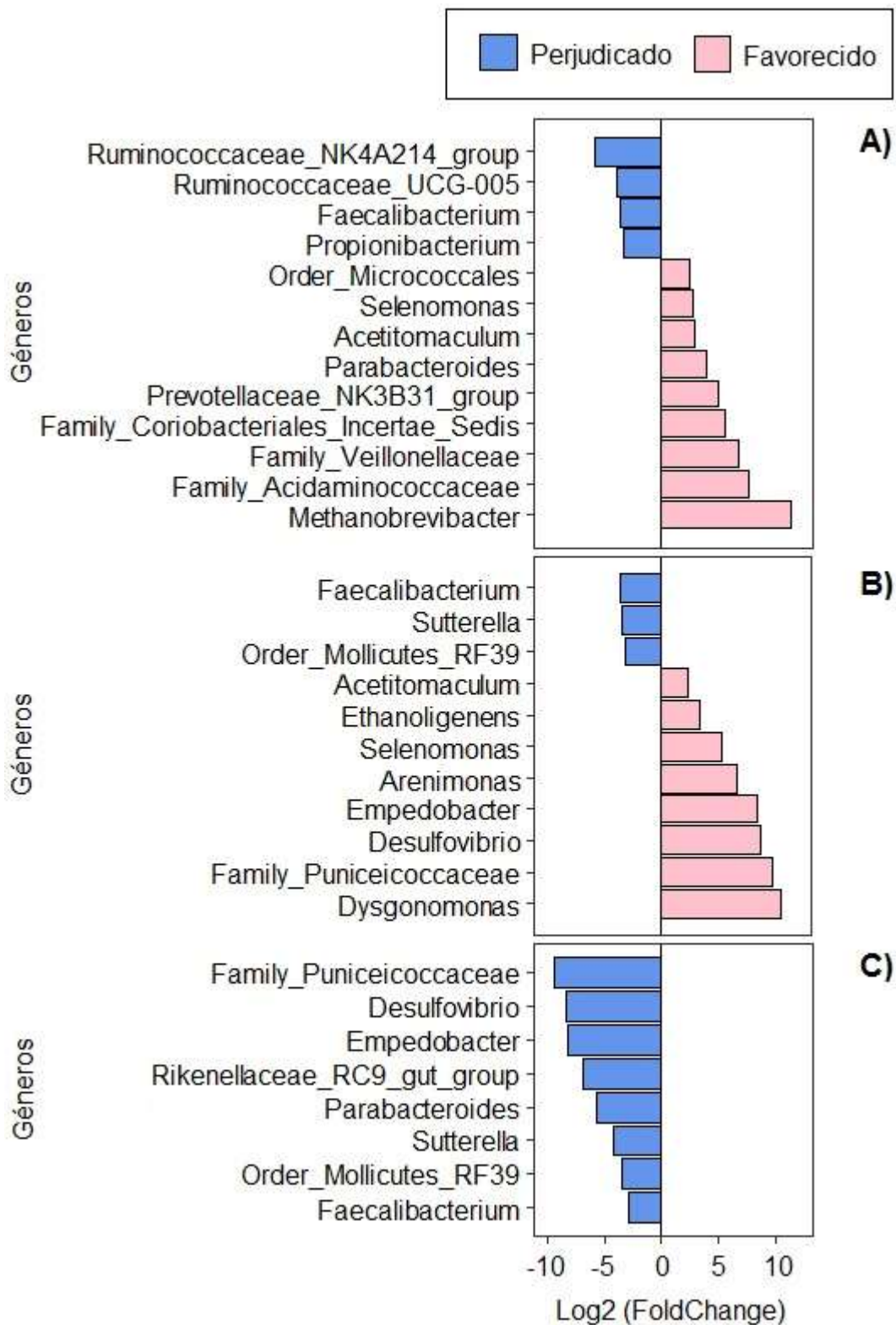


Figura 5.6. Análisis de taxones diferenciales al cambiar de la Fase I a la Fase II (A), de la Fase II a la Fase III (B) y de la Fase III a la Fase IV (C). Taxones regulados positivamente (rosa) y negativamente (azul). El valor de cambio se presenta en forma de logaritmo en base 2.

---

### 5.4.1.3 Correlación entre comunidad microbiana y acidogénesis

Desde el inicio del proceso de acidogénesis se observó una respuesta inmediata por parte de la biomasa para producir AGV, la cual se extendió a lo largo de las diferentes fases con independencia de los cambios sufridos en la composición de la comunidad microbiana. Esta respuesta fue indicativa de que la mayor parte de las poblaciones desarrolladas en el UASBR fueron bacterias acidogénicas, independientemente de la composición de la alimentación (Tabla 5.3). Al establecerse un pH de 5 se favoreció el desarrollo de una comunidad microbiana muy especializada en la fermentación butírica y, especialmente, durante la Fase I. Estos resultados fueron muy similares a los observados por Bengtsson *et al.* (2008a).

En la Fase I, *Megasphaera*, *Caproiciproducens*, *Faecalibacterium* y los miembros no identificados de la familia *Erysipelotrichaceae* se beneficiaron por este ambiente. Las poblaciones mencionadas tuvieron una estrecha relación metabólica con la síntesis del ácido butírico (Tabla 5.3). Tanto fue así que, este conjunto de microorganismos, hizo del ácido butírico el producto predominante de la fermentación durante la Fase I, con un 52% de la producción total de los AGV (Figura 5.7). Además, a pesar de no tener la habilidad de producir ácido butírico, también fue un ambiente propicio para el crecimiento de *Bifidobacterium*, población muy asociada a los productos lácteos. Muchos de los miembros que pertenecen a esta población tienen la capacidad de llevar a cabo una fermentación heteroláctica de la lactosa, con producción final de ácido acético y ácido láctico (Tabla 5.3). De hecho, el ácido acético fue el AGV con la segunda mayor abundancia de esta fase con, aproximadamente, el 36% del total de los AGV (Figura 5.7). Esto hizo que el porcentaje global de ambos AGV abarcara el 88% de la producción total. En un segundo plano quedó la producción de los ácidos propiónico y valérico, que abarcó el 12% restante (Figura 5.7).

La distribución final de los AGV observada durante esta fase inicial fue muy similar a la de un trabajo previo en el que se usó el mismo sustrato y las mismas condiciones operacionales (Lagoa-Costa *et al.* 2020). Además, la distribución también fue muy parecida a la de otros trabajos similares que ya han sido publicados (Tamis *et al.*, 2015; Calero *et al.*, 2018). El ácido láctico suele ser uno de los productos finales más abundantes en el proceso de fermentación acidogénica del suero lácteo (Gouveia *et*

*al.*, 2016; Giroto *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2019; Lagoa-Costa *et al.*, 2020). Sin embargo, este ácido orgánico no se detectó en ningún momento a lo largo de nuestro trabajo, especialmente en la Fase I, en donde el sustrato estuvo compuesto sólo por suero lácteo. El desarrollo de una comunidad libre de bacterias acidolácticas (LAB) pudo haber favorecido la ausencia de este metabolito. Se identificaron un total de 16 OTUs pertenecientes al orden *Lactobacillales*, orden que incluye a todas las LAB. De todos estos OTUs, el 75% perteneció a miembros del género *Lactobacillus* que, a pesar de ser la LAB más abundante de toda la comunidad, tuvo una influencia muy pobre sobre la misma, y apenas supuso un 1% de la abundancia relativa total, con independencia de la fase establecida (Figura 5.5). Otra alternativa a la ausencia total de ácido láctico como producto final del proceso de acidogénesis pudo haber sido su consumo. En base a esto, el ácido láctico sí que podría haber sido producido durante la fermentación acidogénica pero que, una vez producido, habría sido consumido por algunas poblaciones bacterianas como sustrato como, por ejemplo, es el caso de *Megasphaera* (Weimer & Moen., 2013).

Tabla 5.3. Principales poblaciones bacterianas identificadas en el interior del UASBR, función dentro de la comunidad y metabolismo.

<b>Población</b>	<b>Filo</b>	<b>Función</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Producto final</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético y láctico	Feng <i>et al.</i> (2018)
<i>Megasphaera</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido butírico	Polansky <i>et al.</i> (2016)
<i>Faecalibacterium</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido butírico	Polansky <i>et al.</i> (2016)
<i>Caproiciproducens</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético, butírico y caproico	Kim <i>et al.</i> (2015)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido butírico, láctico y fórmico	Si <i>et al.</i> (2016)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido láctico	Feng <i>et al.</i> (2018)
<i>Parabacteroides</i>	<i>Bacteroidetes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido propiónico	Polansky <i>et al.</i> (2016)
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético y succínico	Shah & Collins (1990)
<i>Solobacterium</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético, láctico y butírico	Kageyama & Benno (2000)
<i>Ethanoligenens</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético y etanol	Li <i>et al.</i> (2019)
<i>Selenomonas</i>	<i>Firmicutes</i>	Acidogénesis	Carbohidratos	Ácido acético, propiónico y láctico	Schleifer <i>et al.</i> (1990)
<i>Acetitomaculum</i>	<i>Firmicutes</i>	Acetogénesis	Glucosa/CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	Ácido acético	Le Van <i>et al.</i> (1998)
<i>Acetobacter</i>	<i>Proteobacteria</i>	Bacteria ácido acético	Etanol	Ácido acético	Saeki <i>et al.</i> (1997)
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Euryarchaeota</i>	Metanogénesis	CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	Braz <i>et al.</i> (2019)

Después de 34 días de operación en los que el UASBR fue alimentado exclusivamente con suero lácteo, se promovió el primer cambio en la composición de la alimentación (Fase II). La introducción de un 10% de la carga orgánica en forma de agua residual de la industria cervecera redujo la producción de ácido butírico de un 52 a un 42% (Figura 5.7). El motivo principal de este cambio fue la casi total desaparición de *Faecalibacterium* de la comunidad microbiana, tal y cómo se recogió en la Figura 5.5 y 5.6 A. El descenso en la fermentación del ácido butírico conllevó un aumento en la proporción final del ácido acético. Al final de la Fase II, el ácido acético se convirtió en el AGV mayoritario con un valor medio del 46% de la producción total de los AGV (Figura 5.7). Varias fueron las rutas metabólicas utilizadas para la síntesis de este metabolito. En primer lugar, la fermentación heteroláctica de *Bifidobacterium* (Feng *et al.*, 2018). En segundo lugar, la conversión directa de la lactosa en el ácido acético por medio de la fermentación ácido mixta. Tanto el género *Caproiciproducens* como los miembros no identificados de la familia *Prevotellaceae* son 2 poblaciones con la capacidad de llevar a cabo esta reacción (Tabla 5.3). Finalmente, el ácido acético se pudo haber sintetizado a través de la oxidación del ácido butírico, en un proceso de interacción sintrófica. En condiciones normales, este proceso no es energéticamente favorable debido a la elevada presión parcial de H<sub>2</sub> que se genera en la fermentación butírica (Sieber *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia de *Methanobrevibacter* como agente metanógeno hidrogenotrófico pudo haber colaborado en la reducción de la presión parcial de este gas en el medio y haber hecho favorable el proceso de oxidar el ácido butírico en ácido acético por la acción de determinadas poblaciones. De igual manera a la Fase I, en esta Fase II los AGV de cadena par representaron el 88% del total de la producción de AGV. Respecto a los AGV de cadena impar, éstos volvieron a quedar en un segundo plano, con un 12% del total. Sin embargo, se pudo observar una inversión en la producción entre los ácidos propiónico y valérico con respecto a la fase anterior (Figura 5.7). El crecimiento diferencial de *Parabacteroides* pudo haber potenciado esta respuesta (Tabla 5.3).

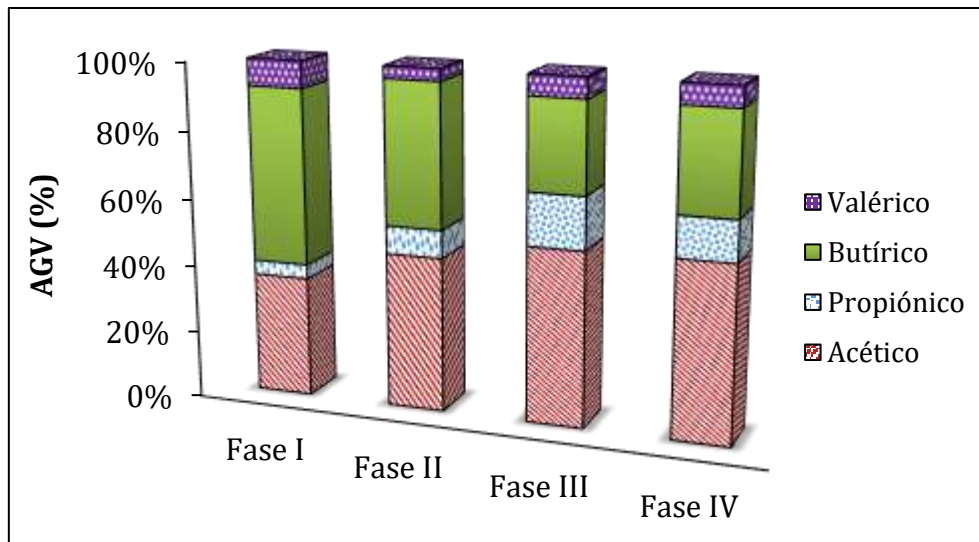


Figura 5.7. Perfil de AGV obtenido durante las cuatro fases del proceso de acidogénesis (I, II, III y IV).

El cambio estructural que se observó en la composición de la comunidad microbiana a partir de la Fase III también tuvo sus repercusiones sobre la distribución final de los AGV. Tanto en la Fase III como en la Fase IV se terminó de completar la inversión entre el ácido acético y butírico que se había iniciado con la entrada del agua residual de la industria cervecera en la Fase II (Figura 5.7 y 5.8). El ácido acético alcanzó sus valores máximos en la Fase III y IV, con un 51,9 y un 52,4%, respectivamente. Por la contra, el ácido butírico alcanzó sus valores mínimos en ambas fases al representar un 26,7 y un 29,7%. La aparición de *Selenomonas*, *Ethanoligenens*, *Solobacterium* y *Acetitomaculum* en la comunidad tuvo un efecto positivo sobre la síntesis del ácido acético, aunque ésta tuvo lugar por distintas rutas metabólicas. Tanto *Selenomonas* como *Solobacterium* produjeron ácido acético a partir de una fermentación ácido-mixta. *Ethanoligenens* produjo ácido acético por medio de una fermentación aceto-alcohólica. Por último, *Acetitomaculum* es un microorganismo homoacetogénico con la capacidad de producir ácido acético por medio de una ruta metabólica que reduce el CO<sub>2</sub> (Tabla 5.3). A pesar de la inversión observada en la producción entre el ácido acético y el butírico, su porcentaje global siguió siendo el predominante, abarcando el 79 – 82% de la producción total de los AGV. Sin embargo, hubo también un ligero aumento en la producción del ácido propiónico que provocó un incremento en la proporción de los AGV de cadena impar hasta alcanzar un 18 – 21%. Polansky *et al.*



(2016) mencionaron la capacidad de muchos de los miembros del filo *Bacteroidetes* de expresar enzimas involucradas en la síntesis del ácido propiónico. En el presente trabajo se pudo observar que, efectivamente, el aumento en la producción de ácido propiónico vino acompañado por el incremento en la abundancia de un miembro no identificado del orden *Bacteroidales*. Sin embargo, debido a la limitación que supone la falta de información en las bases de datos del 16S rRNA fue muy difícil asociar los dos sucesos. Dentro del orden *Bacteroidales* existe una gran variedad de bacterias con una amplia multifuncionalidad a nivel metabólico. Podría estar relacionado bien con la síntesis de ácido propiónico, pero también con la síntesis de cualquier otro AGV.

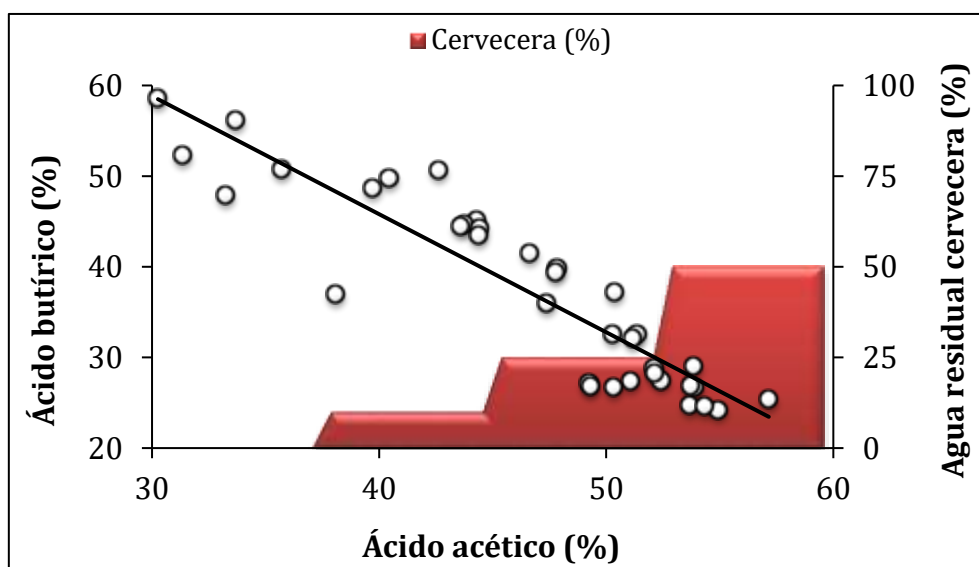


Figura 5.8. Inversión en las producciones de ácido acético y ácido butírico con la entrada gradual del agua residual de la industria cervecera (rojo).

Al haberse desarrollado una comunidad microbiana principalmente acidógena en el interior del UASBR, los metabolitos principales de la fermentación fueron los AGV. Más del 95% de la carga orgánica del efluente estuvo representada por AGV, excepto en la Fase I, en donde este porcentaje fue menor, 88% (Tabla 5.4). La concentración de estos ácidos grasos de cadena corta en el efluente varió entre 7,4 y 8,6 g DQO L<sup>-1</sup>, aunque la producción fue ligeramente superior en las fases I y II con respecto a las fases III y IV (Tabla 5.4). Sin embargo, a partir de la entrada del agua residual de la

industria cervecera (fases II, III y IV) también se detectó una pequeña concentración residual de etanol en el efluente. Esta concentración alcanzó valores de 0,09 ( $\pm$  0,06) (Fase II), 0,25 ( $\pm$  0,24) (Fase III) y 0,17 ( $\pm$  0,11) g DQO L<sup>-1</sup> (Fase IV) (Tabla 5.4). El origen de este etanol fue incierto. De hecho, o bien fue un producto final del proceso de fermentación del suero lácteo tal y como ya ha sido demostrado con anterioridad (Perna *et al.*, 2013; Duque *et al.*, 2014; Gouveia *et al.*, 2016; Girotto *et al.*, 2017; Domingos *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018), o bien fue parte del etanol introducido al medio con el agua residual de la industria cervecera que ha quedado sin consumir.

El cambio en la composición de la alimentación también tuvo un claro efecto sobre la eficacia en la conversión del sustrato en AGV. Esta eficacia se definió en función del PA, el cual fue mayor durante la Fase I. Durante esta fase inicial se alcanzó el pico máximo en el PA, con un valor medio del 72,2 ( $\pm$  4,5) % (Tabla 5.4). La presencia de poblaciones como *Bifidobacterium*, *Megasphaera* o *Caproiciproducens* ya había sido reportada en otro proceso de acidificación del suero lácteo que alcanzó muy buenos resultados en términos de PA, con un valor medio del 83% (Lagoa-Costa *et al.*, 2020). Sin embargo, a medida que la proporción del agua residual de la industria cervecera se fue haciendo más grande en el medio, el PA se fue reduciendo progresivamente (Tabla 5.4). En base a estos resultados fue posible concluir que la entrada del agua residual de la industria cervecera tuvo un efecto perjudicial sobre la eficacia en la producción de AGV. El suero lácteo, que se caracteriza por la fácil biodegradabilidad de sus componentes y por una baja alcalinidad, es un sustrato idóneo para producir AGV, incluso por delante de la producción de metano (Treu *et al.*, 2019). Al contrario, las características del agua residual de la industria cervecera lo hacen menos afín a la síntesis de estos ácidos grasos de cadena corta. La disponibilidad de etanol, que es un compuesto tóxico para muchos grupos microbianos, puede limitar la presencia de poblaciones que presenten un alto poder de acidificación, tal y como se demostró en el presente trabajo. Además, la entrada de agua residual de la industria cervecera en el medio ha promovido la aparición de bacterias sintetizadoras de ácido acético, acetógenos e incluso también metanógenos. En resumen, el agua residual de la industria cervecera tiende a la metanogénesis y, por eso, es crucial ejecutar una buena estrategia de selección durante el uso de este sustrato para maximizar la producción de AGV.

Tabla 5.4. Resultados de la operación del UASBR con la entrada progresiva de agua residual cervecera en el medio (Fases I - IV). Se representan los valores medios con las respectivas desviaciones estándar entre paréntesis.

	<i>Fase I</i>	<i>Fase II</i>	<i>Fase III</i>	<i>Fase IV</i>
<i>Tiempo de operación (d)</i>	34	24	40	33
<i>Suero lácteo (%)</i>	100	90	75	50
<i>Agua residual cervecera (%)</i>	0	10	25	50
<i>Carga orgánica (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	11,3 (± 0,7)	11,4 (± 0,5)	10,8 (± 0,5)	9,9 (± 0,7)
<i>VCO (g DQO L<sup>-1</sup>)</i>	5,7 (± 0,3)	5,7 (± 0,3)	5,4 (± 0,3)	5,0 (± 0,3)
<i>Biomasa (g SSV L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></i>	4,0 (± 0,3)	4,8 (± 0,3)	5,8 (± 0,6)	5,4 (± 0,4)
<i>Relación F/M (g DQO g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></i>	1,4 (± 0,2)	1,2 (± 0,1)	1,0 (± 0,1)	0,9 (± 0,1)
<i>AGV totales (g DQO L<sup>-1</sup>)<sup>3</sup></i>	8,4 (± 0,3)	8,6 (± 0,3)	8,2 (± 0,4)	7,4 (± 0,7)
<i>Etanol (g DQO L<sup>-1</sup>)<sup>4</sup></i>	0,0	0,1 (± 0,1)	0,3 ± (0,2)	0,2 (± 0,1)
<i>Ácido acético (%)</i>	35,9 (± 4,6)	45,9 (± 2,4)	51,9 (± 2,0)	52,4 (± 2,8)
<i>Ácido propiónico (%)</i>	4,3 (± 2,2)	8,2 (± 0,6)	15,4 (± 1,5)	11,9 (± 0,8)
<i>Ácido butírico (%)</i>	51,9 (± 3,7)	42,3 (± 2,9)	26,7 (± 1,4)	29,7 (± 3,8)
<i>Ácido valérico (%)</i>	7,9 (± 2,6)	3,6 (± 0,3)	6,0 (± 0,7)	6,0 (± 1,7)
<i>PA (%)<sup>5</sup></i>	72,2 (± 4,5)	65,4 (± 4,3)	59,3 (± 5,2)	57,5 (± 2,7)
<i>Productividad (g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</i>	3,8 (± 0,5)	3,7 (± 0,2)	3,2 (± 0,2)	2,9 (± 0,3)
<i>AGV/DQO (%)<sup>6</sup></i>	88 (± 5)	100 (± 5)	97 (± 6)	95 (± 5)

<sup>1</sup> Concentración de biomasa en el interior del UASBR.

<sup>2</sup> Relación entre alimentación y microorganismo.

<sup>3</sup> Concentración de AGV detectada en el efluente.

<sup>4</sup> Concentración de etanol detectada en el efluente.

<sup>5</sup> Porcentaje de acidificación.

<sup>6</sup> Porcentaje de la DQO soluble del efluente en forma de AGV.

---

#### 5.4.2 INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PHA

Los AGV fueron los principales productos de la fermentación durante las diferentes fases por las que se hizo pasar al UASBR en el proceso de codigestión entre el suero lácteo y el agua residual de la industria cervecera. Estos ácidos grasos de cadena corta son los principales precursores que utilizan las bacterias de un MMC para sintetizar PHA. Con la finalidad de comprobar su idoneidad, se evaluó la capacidad de producir PHA de una flora ya enriquecida en cepas acumuladoras de PHA. Para ello, se diseñaron cuatro ensayos *fed-batch* en los que, para cada uno, la biomasa se alimentó con uno de los cuatro efluentes obtenidos durante las diferentes fases del proceso de codigestión (I – IV). Todos los ensayos *fed-batch* se prolongaron entre 7 y 10 horas en las que un número variable de entre 4 y 6 pulsos fueron introducidos al interior del reactor (Tabla 5.5). Cada pulso tuvo una concentración inicial de 30 Cmmol-AGV L<sup>-1</sup> aproximadamente y la biomasa fue siempre capaz de consumir todo el sustrato. Independientemente del efluente empleado para el ensayo *fed-batch*, la respuesta de la biomasa fue siempre muy similar. Al introducir los primeros pulsos al medio, se observó un descenso en los niveles de OD. Esta respuesta fue un claro indicador de que los microorganismos estaban consumiendo el sustrato. Cuando la biomasa consumió todo el sustrato del pulso, el OD volvió a subir, indicando el fin del pulso y la posibilidad de añadir uno nuevo (Figura 5.9). En paralelo al consumo del sustrato, se registró un ascenso rápido en las reservas del PHA intracelular. Este aumento se vio favorecido por la rápida respuesta metabólica de las poblaciones que compusieron el MMC (Figura 5.9). De hecho, tanto la  $-q_s$  como la  $q_{PHA}$  alcanzaron sus valores máximos al comienzo de los ensayos *fed-batch*. Esto supuso que, en apenas tres horas, los microorganismos acumulasen más de la mitad del total del PHA. Sin embargo, con el paso de los pulsos la biomasa se empezó a saturar y la respuesta metabólica fue cada vez más lenta. La caída en los niveles de OD fue cada vez menos pronunciada (Figura 5.9) y se registró un descenso en la velocidad tanto de consumo como de producción. Esto llevó a un fase de meseta en la acumulación de PHA, que es la respuesta más habitual en todos los ensayos *fed-batch* (Johnson *et al.*, 2010b; Tamang *et al.*, 2019).

Todos los efluentes fueron de por sí N-limitantes, pues el poco  $\text{NH}_4^+$  disponible tanto en el suero lácteo como en el agua residual de la industria cervecera fue totalmente consumido por la biomasa en el proceso de fermentación acidogénica. Sin embargo, y a pesar de que no hubo adición externa de ningún tipo de nutriente, sí que hubo cierta disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo. La causa principal fue que parte del  $\text{NH}_4^+$  suministrado al interior del reactor durante la etapa de enriquecimiento quedó disponible al final de la fase *famine*, justo cuando se recogió la biomasa para realizar los ensayos *fed-batch* (Tabla 5.5). Se monitorizó la evolución del  $\text{NH}_4^+$  y se pudo ver que éste se fue consumiendo progresivamente con la entrada del sustrato. A causa de este consumo, se registró un ascenso en la concentración de la biomasa activa en el interior del reactor durante las 2 primeras horas de los ensayos *fed-batch* (Figura 5.9). Estos resultados demostraron que, mientras hubo disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$ , las funciones de crecimiento celular y acumulación de PHA tuvieron lugar simultáneamente. En trabajos previos ya se ha demostrado que la presencia de  $\text{NH}_4^+$  afecta negativamente a la acumulación de PHA (Bengtsson *et al.*, 2008b; Johnsson *et al.*, 2010a). Sin embargo, en ellos se hace referencia a un aporte continuo de  $\text{NH}_4^+$ , no a una concentración residual. Esto pudo provocar que la capacidad máxima de acumular PHA del MMC no distase demasiado del valor alcanzado, tal y como ha sido reportado por Jiang *et al.* (2012). De hecho, la acumulación máxima de PHA estuvo en un 50% en todos los ensayos *fed-batch*, a excepción del experimento realizado con el efluente de la Fase III en el que el porcentaje acumulado fue de un 45% (Figura 5.9).

Tabla 5.5. Resultados principales en los ensayos *fed-batch* para cada uno de los efluentes obtenidos durante las diferentes fases de la fermentación acidogénica (I – IV).

	1	2	3	4
<i>Efluente</i>	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
<i>Tiempo (h)</i>	7,50	8,73	9,88	7,92
<i>Nº de pulsos</i>	6	6	6	4
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inicial (Nmmol L<sup>-1</sup>)</i>	1,63	1,61	2,21	2,40
<i>Composición efluente (%)</i> <sup>1</sup>	36/4/52/8	46/8/42/4	52/15/27/6	52/12/30/6
<i>PHA (%)</i>	50,23	51,45	45,39	49,88
<i>Y<sub>PHA/S</sub> (Cmmol-PHA Cmmol-AGV<sup>-1</sup>)</i> <sup>2</sup>	0,314	0,292	0,221	0,311
<i>Y<sub>X/S</sub> (Cmmol-X Cmmol-AGV<sup>-1</sup>)</i> <sup>3</sup>	0,129	0,137	0,122	0,109
<i>-q<sub>S</sub> (Cmmol-AGV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</i> <sup>4</sup>	0,965	0,883	1,279	0,903
<i>q<sub>PHA</sub>(Cmmol-PHA Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</i> <sup>5</sup>	0,270	0,298	0,310	0,365
<i>q<sub>PHB</sub>(Cmmol-PHB Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</i> <sup>6</sup>	0,216	0,240	0,202	0,247
<i>q<sub>PHV</sub>(Cmmol-PHV Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</i> <sup>7</sup>	0,054	0,057	0,109	0,118
<i>Composición del polímero (%)</i> <sup>8</sup>	88/12	86/14	76/24	76/24

<sup>1</sup> Composición de AGV en el efluente (en %): ácidos Acético/Propiónico/Butírico/Valérico.

<sup>2</sup> Rendimiento en la acumulación de PHA en función del sustrato consumido.

<sup>3</sup> Rendimiento en el crecimiento de la biomasa activa (X) en función del sustrato consumido.

<sup>4</sup> Velocidad máxima en el consumo del sustrato.

<sup>5</sup> Velocidad máxima en la producción de PHA.

<sup>6</sup> Velocidad máxima en la producción de PHB.

<sup>7</sup> Velocidad máxima en la producción de PHV.

<sup>8</sup> Composición del biopolímero en %: monómero HB/monómero HV.

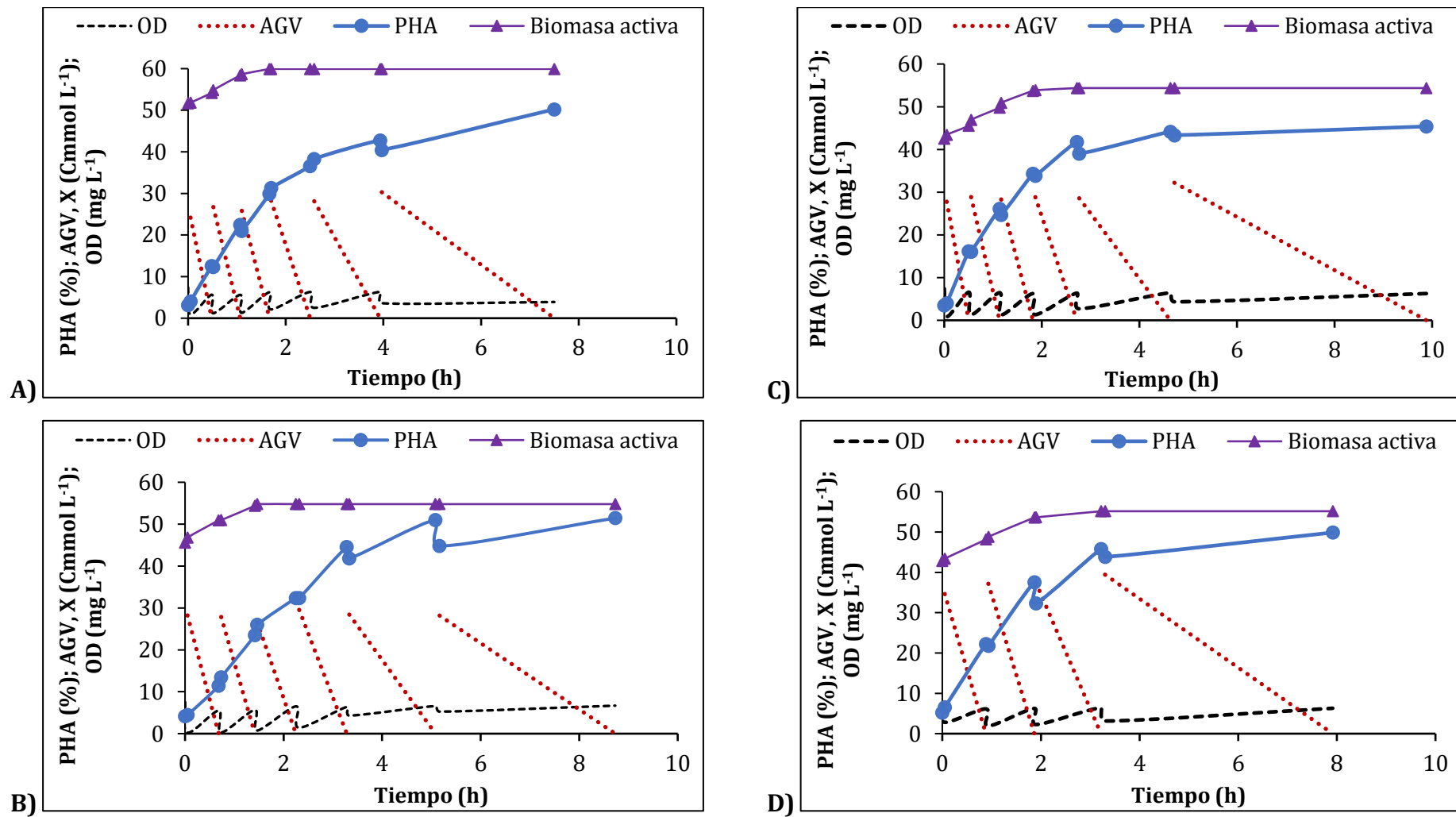


Figura 5.9. Experimentos *fed-batch* para la producción de PHA a partir de los diferentes efluentes obtenidos durante cada una de las fases del proceso de acidogénesis: Fase I (A), Fase II (B), Fase III (C) y Fase IV (D).

La distribución de los AGV fue un factor clave en la composición monomérica del biopolímero. A día de hoy, es sabido que existe una gran correlación entre los AGV de cadena par y la síntesis del monómero hidroxibutirato (HB) y los AGV de cadena impar y la síntesis del monómero hidroxivalerato (HV) (Shen *et al.*, 2014). Esto tiene su impacto sobre las propiedades fisicoquímicas del polímero. Un biopolímero con una mayor proporción en monómeros HV se caracterizará por una reducida rigidez, cristalinidad y fragilidad si se compara a un biopolímero con una mayor proporción en monómeros HB, lo que finalmente se traducirá en un biopolímero más elástico y resistente (Reis *et al.*, 2011). En la presente investigación, se produjo un cambio en la composición de la alimentación durante el proceso de fermentación acidogénica en el que se promovió una alteración en el perfil de AGV. La entrada del agua residual de la industria cervecera promovió una completa inversión entre los AGV de cadena par, el ácido acético y el ácido butírico (Figura 5.8). Además, también se registró un aumento en la fracción correspondiente a los AGV de cadena impar y, en especial, en el ácido propiónico (Tabla 5.5). La inversión entre los AGV de cadena par no tuvo una repercusión directa sobre las propiedades de los biopolímeros, pues ambos AGV dan lugar al monómero HB. Sin embargo, el aumento en la proporción de los AGV de cadena impar sí que la tuvo. En todos los ensayos *fed-batch* se obtuvo un copolímero poli (3-hidroxibutirato co 3-hidroxivalerato) (PHBV), aunque la distribución de los monómeros varió en función del efluente utilizado. Así, para los ensayos *fed-batch* en los que se usaron los efluentes obtenidos en la Fase I y II y que tuvieron un mayor porcentaje de AGV de cadena par, el monómero HB supuso un 86 – 88% mientras que el monómero HV representó un 12 – 14% (Tabla 5.5). En contraposición, para los ensayos *fed-batch* en los que se usaron los efluentes que se obtuvieron durante la Fase III y IV y con un mayor porcentaje de AGV de cadena impar, el biopolímero estuvo compuesto en un 24% por el monómero HV (Tabla 5.5). Estos resultados vinieron a demostrar que hubo una fuerte correlación entre la distribución final de los AGV y su consecuente proporción de monómeros HB y HV. Además, se puede moldear la composición monomérica del biopolímero en base a las condiciones aplicadas en el proceso de fermentación acidogénica.



## 5.5 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación es posible deducir que el cambio progresivo en la composición de la alimentación tuvo efectos notables en la composición de la comunidad microbiana que se hubo desarrollado en el interior del UASBR. De hecho, la comunidad microbiana se fue adaptando a las nuevas condiciones del medio y evolucionó en paralelo al aumento en el porcentaje del agua residual de la industria cervecera. Sin embargo, sí que se apreció un punto de inflexión a partir del cual hubo un cambio estructural en la composición de las principales poblaciones. Este umbral fue a partir de un 25% de la carga orgánica en forma de agua residual de la industria cervecera. Al inicio del experimento, todas las poblaciones principales estuvieron muy ligadas a la fermentación butírica. Mientras, con la entrada del agua residual de la industria cervecera estas poblaciones fueron desplazadas por otras más relacionadas con la síntesis del ácido acético. También se vio afectada la eficacia con la que las poblaciones producían los AGV, pues el PA se redujo progresivamente en paralelo a la entrada del nuevo sustrato. Finalmente, el uso de los diferentes perfiles de AGV obtenidos durante el proceso de acidogénesis no tuvo diferencias apreciables en la acumulación de PHA, en torno al 50%, pero sí se pudo moldear la composición monomérica final del biopolímero.

## 5.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alayu, E., Yirgu, Z., 2018. Advanced technologies for the treatment of wastewaters from agro-processing industries and cogeneration of by-products: a case of slaughterhouse, dairy and beverage industries. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 1581 – 1596.
- 2 Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2011. Biomethanation and its potential. *Methods Enzymol.* 494, 327 – 351.
- 3 APHA-AWWA-WPCF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed. American Public Health Association, Washington, DC.

- 4 Arantes, M.K., Alves, H.J., Sequinel, R., da Silva, E.A., 2017. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 26243 – 26256.
- 5 Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., Cetecioglu, Z., 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresour. Technol.* 268, 773 – 786.
- 6 Barbosa-Pereira, L., Bilbao, A., Vilches, P., Angulo, I., Lluís, J., Fité, B., Paseiro-Losada, P., Cruz, J.M., 2014. Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimisation of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chem.* 145, 191 – 197.
- 7 Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008a. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochem. Eng. J.* 40, 492 – 499.
- 8 Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., 2008b. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 509 – 516.
- 9 Braz, G.H.R., Fernández-González, N., Lema, J.M., Carballa, M., 2019. Organic overloading affects the microbial interactions during anaerobic digestion in sewage sludge reactors. *Chemosphere.* 222, 323 – 332.
- 10 Calero, R.R., Lagoa-Costa, B., Fernandez-Feal, M.M.C., Kennes, C., Veiga, M.C., 2018. Volatile fatty acids production from cheese whey: influence of pH, solid retention time and organic loading rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 1742 – 1747.
- 11 Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016a. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581 – 583.
- 12 Callahan, B.J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2016b. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* 5, 1492.
- 13 Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Luo, G., Angelidaki, I., 2018a. Metagenomic binning reveals the functional roles of core abundant microorganisms in twelve full-scale biogas plants. *Water Res.* 140, 123 – 134.

- 14 Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Zhu, X., Angelidaki, I., 2018b. Taxonomy of anaerobic digestion microbiome reveals biases associated with the applied high throughput sequencing strategies. *Sci. Rep.* 8, 1926 – 1938.
- 15 Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Tot. Environ.* 445 – 446, 385 – 396.
- 16 Carvalho, G., Pedras, I., Karst, S.M., Oliveira, C.S.S., Duque, A.F., Nielsen, P.H., Reis, M.A.M., 2018. Functional redundancy ensures performance robustness in 3-stage PHA-producing mixed cultures under variable feed operation. *N. Biotechnol.* 40, 207 – 217.
- 17 Chen, H., Chang, S., Guo, Q., Hong, Y., Wu, P., 2016. Brewery wastewater treatment using an anaerobic membrane bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 105, 321 – 331.
- 18 Colombo, B., Calvo, M.V., Sciarria, T.P., Scaglia, B., Kizito, S.S., D'Imporzano, G., Adani, F., 2019. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes. *Waste Manag.* 95, 22 – 31.
- 19 De Francisci, D., Kougias, P.G., Treu, L., Campanaro, S., Angelidaki, I., 2015. Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition. *Bioresour. Technol.* 176, 56 – 64.
- 20 Domingos, J.M.B., Martinez, G.A., Scoma, A., Fraraccio, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., Reis, M.A.M., Fava, F., Bertin, L., 2017. Effect of operational parameters in the continuous anaerobic fermentation of cheese whey on titers, yields, productivities, and microbial community structures. *Sustainable Chem. Eng.* 5, 1400 – 1407.
- 21 Domingos, J.M.B., Puccio, S., Martinez, G.A., Amaral, N., Reis, M.A.M., Bandini, S., Fava, F., Bertin, L., 2018. Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chem. Eng. J.* 336, 47 – 53.
- 22 Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* 31, 276 – 288.

- 23 Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180 – 188.
- 24 Fitamo, T., Treu, L., Boldrin, A., Sartori, C., Angelidaki, I., Scheutz, C., 2017. Microbial population dynamics in urban organic waste anaerobic co-digestion with mixed sludge during a change in feedstock composition and different hydraulic retention times. *Water Res.* 118, 261 – 271.
- 25 Giroto, F., Lavagnolo, M.C., Pivato, A., Cossu, R., 2017. Acidogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste and cheese whey for bio-plastic precursors recovery – Effects of process conditions during batch tests. *Waste Manag.* 70, 71 – 80.
- 26 Gouveia, A.R., Freitas, E.B., Galinha, C.F., Carvalho, G., Duque, A.F., Reis, M.A.M., 2016. Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. *N. Biotechnol.* 37, 108 – 116.
- 27 Hahnke, S., Langer, T., Koeck, D.E., Klocke, M., 2016. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1466 – 1475.
- 28 He, X., Yin, J., Liu, J., Chen, T., Shen, D., 2019. Characteristics of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste at high concentrations of NaCl. *Bioresour. Technol.* 271, 244 – 250.
- 29 Iglesias-Iglesias, R., Campanaro, S., Treu, L., Kennes, C., Veiga, M.C., 2019. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. *Bioresour. Technol.* 291, 121817.
- 30 Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517 – 5530.
- 31 Jin, Y., Lin, Y., Wang, P., Jin, R., Gao, M., Wang, Q., Chang, T., Ma, H., 2019. Volatile fatty acids production from saccharification residue from food waste ethanol fermentation: Effect of pH and microbial community. *Bioresour. Technol.* 292, 121957.

- 32 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010a. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *J. Biotechnol.* 147, 73 – 79.
- 33 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010b. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Res.* 44, 2141 – 2152.
- 34 Kageyama, A., Benno, Y., 2000. Phylogenic and phenotypic characterization of some *Eubacterium*-like isolates from human feces: description of *Solobacterium moorei* Gen. Nov., Sp. Nov. *Microbiol. Immunol.* 44, 223 – 227.
- 35 Kim, B.C., Seung Jeon, B., Kim, S., Kim, H., Um, Y., Sang, B.I., 2015. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4902 – 4908.
- 36 Lagoa-Costa, B., Abubackar, H.N., Fernández-Romasanta, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2017. Integrated bioconversion of syngas into bioethanol and biopolymers. *Bioresour. Technol.* 239, 244 – 249.
- 37 Lagoa-Costa, B., Kennes, C., Veiga, M.C., 2020. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 308, 123226.
- 38 Le Van, T.D., Robinson, J.A., Ralph, J., Greening, R.C., Smolenski, W.J., Leedle, J.A.Z., Schaefer, D.M., 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetitomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3429 – 3436.
- 39 Li, Y., Hua, D., Xu, H., Jin, F., Mu, H., Zhao, Y., Fang, X., 2020. Acidogenic and methanogenic properties of corn straw silage: Regulation and microbial analysis of two-phase anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 307, 123180.
- 40 Li, Z., Liu, B., Cui, H., Ding, J., Li, H., Xie, G., Ren, N., Xing, D., 2019. The complete genome sequence of *Ethanoligenens harbinense* reveals the metabolic pathway of acetate-ethanol fermentation: A novel understanding of the principles of anaerobic biotechnology. *Environ. Int.* 131, 105053.
- 41 Lin, L., Li, X., 2018. Acidogenic fermentation of iron-enhanced primary sedimentation sludge under different pH conditions for production of volatile fatty acids. *Chemosphere.* 194, 692 – 700.

- 42 Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- 43 Luo, G., Fotidis, I.A., Angelidaki, I., 2016. Comparative analysis of taxonomic, functional, and metabolic patterns of microbiomes from 14 full-scale biogas reactors by metagenomic sequencing and radioisotopic analysis. *Biotechnol. Biofuels* 9.
- 44 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8.
- 45 Oliveira, C.S.S., Silva, M.O.D., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2018. Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. *Appl. Sci.* 8, 1817.
- 46 Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C. 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 54 – 62.
- 47 Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., Rychlik I., 2016. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1569 – 1576.
- 48 Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., Majone, M., 2011. Mixed culture processes for polyhydroxyalkanoate production from agro-industrial surplus/wastes as feedstocks, in: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, B. V., The Netherlands, pp. 669 – 683.
- 49 Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Yoyama, H., Lotong, N., Adachi, O., 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 138 – 145.
- 50 Sakamoto, K., Konings, W.N., 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105 – 124.
- 51 Schleifer, K.H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G., Seidel-Rufer, H., 1990. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 19 – 27.

- 52 Shah, H.N., Collins, D.M., 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 205 – 208.
- 53 Shen, L., Hu, H., Ji, H., Cai, J., He, N., Li, Q., Wang, Y., 2014. Production of poly (hydroxybutyrate–hydroxyvalerate) from waste organics by the two-stage process: Focus on the intermediate volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 166, 194 – 200.
- 54 Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Shen, R., Zhu, Z., Xing, X., 2016. Towards biohythane production from biomass: Influence of operational stage on anaerobic fermentation and microbial community. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 4429 – 4438.
- 55 Sieber, J.R., McInerney, M.J., Gunsalus, R.P., 2012. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 429 – 452.
- 56 Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour. Technol.* 57, 1 – 11.
- 57 Tamang, P., Banerjee, R., Koster, S., Nogueira, R., 2019. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. *J. Environ. Sci.* 78, 137 – 146.
- 58 Tamis, J., Joosse, B.M., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2015. High-rate volatile fatty acid (VFA) production by a granular sludge process at low pH. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 2248 – 2255.
- 59 Tatullo, M., Simone, G.M., Tarullo, F., Irlandese, G., De Vito, D., Marrelli, M., Santacroce, L., Cocco, T., Ballini, A., Scacco, S., 2016. Antioxidant and antitumor activity of a bioactive polyphenolic fraction isolated from the brewing process. *Sci. Rep.* 6, 36042.
- 60 Teixeira, M.R., Guarda, E.C., Freitas, E.B., Galinha, C.F., Duque, A.F., Reis, M.A.M., 2020. Valorization of raw brewers' spent grain through the production of volatile fatty acids. *N. Biotechnol.* 57, 4 – 10.
- 61 Treu, L., Tsapekos, P., Pehrah, M., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V., Kougias, P.G., Angelidaki, I., 2019. Microbial profiling during anaerobic

- digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions. *Bioresour. Technol.* 275, 375 – 385.
- 62 Wainaina, S., Awasthi, M.K., Horváth, I.S., Taherzadeh, M.J., 2020. Anaerobic digestion of food waste to volatile fatty acids and hydrogen at high organic loading rates in immersed membrane bioreactors. *Renew. Energy* 152, 1140 – 1148.
- 63 Wainaina, S., Lukitawesa, Awasthi, M.K., Taherzadeh, M.J., 2019. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioeng.* 10, 437 – 458.
- 64 Weimer, P.J., Moen, G.N., 2013. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4075 – 4081.
- 65 Zhou, J., Zhou, X., Li, Y., Xing, J., 2015. Bacterial communities in haloalkaliphilic sulphate-reducing bioreactors under different electron donors revealed by 16S rRNA MiSeq sequencing. *J. Hazard. Mat.* 295, 176 – 184.

## 5.7 REFERENCIAS WEB

- 1 European Commission, 2015. Closing the loop: commission adopts ambitious new circular economy package to boost competitiveness, create jobs and generate sustainable growth. [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP\\_15\\_6203](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_15_6203)





# Capítulo 6

---

---

## Producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros a partir del gas de síntesis

### 6.1 RESUMEN

La transformación biológica del gas de síntesis para la obtención de bioalcoholes es una tecnología muy prometedora en la actualidad. Sin embargo, durante el proceso quedan ácidos grasos volátiles (AGV) sin ser consumidos en el medio, lo que dificulta la labor de purificación y extracción del producto final. Es por ello que, en la presente investigación, un segundo proceso se ha acoplado a la tecnología del gas de síntesis con la finalidad de aprovechar los AGV del medio para obtener un segundo producto de alto valor añadido, los polihidroxialcanoatos (PHA). Para ello, se ha diseñado una serie de ensayos *fed-batch* en los que se han utilizado como sustrato tres efluentes diferentes que provenían de la fermentación anaerobia del gas de síntesis. Además, para el proceso de producción de PHA, se han utilizado cultivos microbianos mixtos que previamente se habían enriquecido en poblaciones bacterianas con la capacidad de acumular PHA como, por ejemplo, miembros del género *Thauera* o miembros del género *Pseudoxanthomonas*. Con independencia del efluente utilizado, la respuesta de los microorganismos fue siempre muy similar, pues fueron capaces de consumir todos los AGV mientras que los alcoholes permanecieron en el medio sin apenas ser consumidos. Al final de los experimentos, se obtuvo un efluente rico en alcoholes y libre de AGV, además de una biomasa con PHA acumulado en su interior, el cual llegó a alcanzar valores que oscilaron entre el 24 y el 42% del peso seco celular.



## 6.2 INTRODUCCIÓN

Los recursos fósiles todavía siguen siendo usados como materia prima tanto para la producción de combustibles como para la producción de plásticos. Concretamente, la producción mundial de plásticos ascendió a 380 millones de toneladas en el año 2015 (Geyer *et al.*, 2017) y, probablemente, esta cantidad haya quedado atrás a día de hoy. El uso desenfrenado de estos recursos no renovables nos está conduciendo hacia una crisis energética con un gran impacto a nivel medioambiental. Es por ello que, en la actualidad, se dedican muchos recursos al desarrollo de tecnologías más sostenibles que ejerzan un menor impacto en el entorno natural. Entre todas ellas, destacan las tecnologías que promueven el desarrollo de una economía más circular como son, por ejemplo, las que se basan en procesos de valorización.

La fermentación del gas de síntesis es una tecnología sostenible y muy prometedora que se basa en producir biocombustibles a través de un proceso de valorización de emisiones gaseosas (van Groenestijn *et al.*, 2013). Muchos tipos diferentes de materiales carbonados, entre los que se incluyen los residuos sólidos urbanos, los residuos industriales o los residuos agroindustriales pueden ser gasificados para producir gas de síntesis a través de una tecnología de gasificación bien establecida (Sansaniwal *et al.*, 2017). Este gas de síntesis está compuesto, principalmente, por CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Además, algunos de los procesos industriales más importantes a nivel mundial, como son la producción del acero o la fabricación de diversos productos químicos, también liberan grandes cantidades de gases C1 a la atmósfera con un claro carácter contaminante. Estas moléculas gaseosas pueden ser utilizadas por las bacterias acetogénicas como fuente de carbono y/o energía. De entre la amplia gama de bacterias acetogénicas, cobran especial atención las especies pertenecientes al género *Clostridium*. A través de la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl, las bacterias acetogénicas son capaces de convertir estos sustratos gaseosos en productos como los ácidos orgánicos (ácido acético, ácido butírico, ácido hexanoico) o los alcoholes (etanol, butanol, hexanol) (Fernández-Naveira *et al.*, 2017b; Kennes *et al.*, 2016).

Por otra parte, son varias las tecnologías que, a día de hoy, se están barajando como alternativa a los plásticos sintéticos derivados de los hidrocarburos, con la finalidad de que permitan un desarrollo más sostenible a la par que tengan unas propiedades

fisicoquímicas similares. Los polihidroxicanoatos (PHA) se sitúan como uno de los plásticos biodegradables con mayor proyección en la actualidad, pues son polímeros de origen microbiológico cuyas propiedades fisicoquímicas son muy similares a las de muchos plásticos sintéticos, lo que los convierte en una opción de reemplazo muy atractiva (Laycock *et al.*, 2013). La producción actual de PHA tiene lugar por medio de cultivos puros, aunque el coste de su producción es, todavía, demasiado elevado si se compara a los plásticos convencionales (Chanprateep, 2010). El requerimiento de una esterilidad estricta al igual que el uso de fuentes de carbono sintéticas, hacen que los costes de producción de los PHA se disparen con esta estrategia. Los cultivos microbianos mixtos (MMC), se han propuesto en contraposición a los cultivos puros debido a sus costes de producción más reducidos. Los MMC no requieren de medidas de esterilidad, por lo que la producción de PHA se vuelve una tecnología mucho más rentable (Fernandez-Dacosta *et al.*, 2015). Además, el uso de los MMC conjuga a la perfección con los procesos de valorización, pues sustratos alternativos mucho más económicos como los residuos agroindustriales pueden ser utilizados como fuente de carbono para la síntesis de PHA (Albuquerque *et al.*, 2007). Finalmente, el hecho de desarrollar una estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF) ha impulsado la producción de PHA vía MMC, pues ha permitido seleccionar microorganismos con gran capacidad de acumular PHA (Ben *et al.*, 2016), hasta el punto de poder alcanzar elevados porcentajes de acumulación, los cuales pueden llegar a suponer el 89% del peso seco celular (Johnson *et al.*, 2009), cifras que son muy similares a las alcanzadas por los cultivos puros.

Tanto la fermentación del gas de síntesis como la producción de PHA son tecnologías que, a nuestro entender, se han desarrollado en paralelo en los últimos años y pocas veces han sido combinadas. Los trabajos de investigación que hasta el momento han abordado la posibilidad de utilizar ambas tecnologías conjuntamente, lo han hecho de forma directa por acción de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Choi *et al.*, 2010; Drzyzga *et al.*, 2015; Revelles *et al.*, 2016). Esta bacteria se encarga de catalizar la reacción que transforma el CO en PHA. Al final del proceso se obtienen 2 productos de alto interés comercial, el H<sub>2</sub> (biocombustible) y el PHA (biopolímero). Sin embargo, la presente investigación ha aunado ambas tecnologías desde un punto de vista diferente. Al proceso habitual de conversión del gas de síntesis en alcoholes

se le ha acoplado un segundo proceso para la producción de PHA, dando lugar a un proceso final de 2 etapas. Tal y como se ha mencionado anteriormente, durante la fermentación del gas de síntesis se producen alcoholes, pero también se producen ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales permanecen en el medio sin ser totalmente consumidos. A su vez, los AGV son los principales precursores para sintetizar PHA a través de MMC (Dias *et al.*, 2006). Por ello, en la presente investigación se ha tratado de aprovechar los AGV para obtener un segundo producto de alto interés comercial, los PHA. Con esta finalidad, los efluentes provenientes de la fermentación del gas de síntesis se han sometido a varios ensayos *fed-batch*.

## 6.3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 6.1 se representa la incorporación del proceso de producción de PHA a la tecnología del gas de síntesis, para dar lugar a un proceso final de dos etapas en el que se llevó a cabo la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros. Esta segunda etapa consistió en un proceso para la producción de PHA mediante ensayos *fed-batch* en los que se aprovecharon los AGV remanentes del proceso de conversión del gas de síntesis. El proceso de producción de PHA fue un proceso aerobio, tal y como se representa en la Figura 6.1, y en la que se han utilizado MMC como inóculo, los cuales han sido previamente enriquecidos en cepas acumuladoras de PHA. Al final del proceso, se obtuvieron dos productos de alto valor comercial: un efluente libre de AGV en el que permanecieron la mayor parte de los alcoholes y una biomasa con el PHA acumulado en su interior (Figura 6.1).

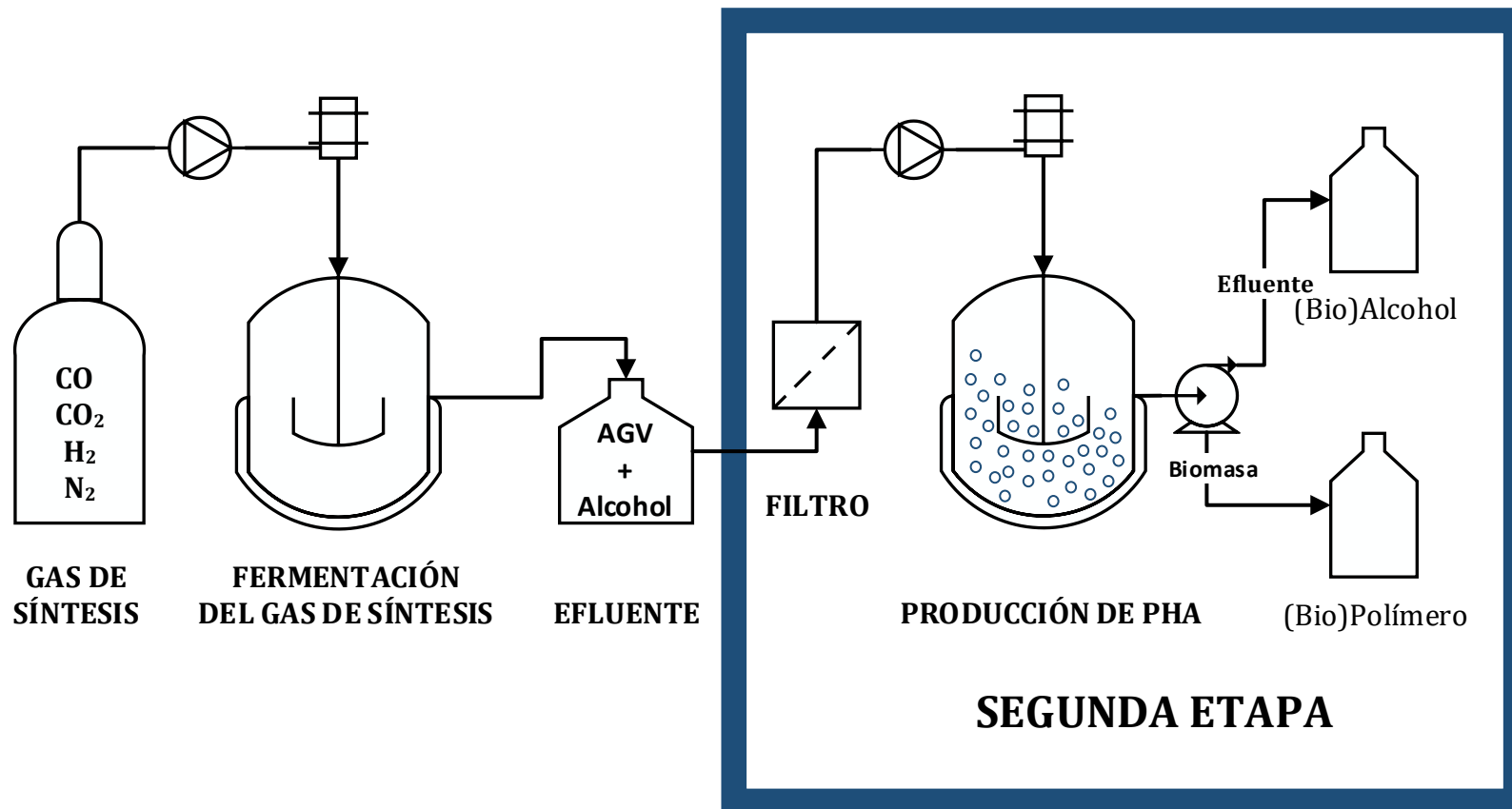


Figura 6.1. Diseño experimental en el que se incorpora una segunda etapa para la producción de PHA (recuadro azul) a la tecnología del gas de síntesis.

---

## 6.3.2 PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DEL GAS DE SÍNTESIS

---

### 6.3.2.1 Obtención de los efluentes del gas de síntesis

Se obtuvieron tres efluentes diferentes provenientes de tres fermentaciones del gas de síntesis diferentes en las que, para cada una, se usó una cepa diferente del género *Clostridium*. Debido a que el agente catalizador de la reacción fue diferente para cada caso, la mezcla de alcoholes y AGV también fue diferente. El Efluente 1 se obtuvo de la conversión que hizo la bacteria *Clostridium autoethanogenum* del gas de síntesis de composición 30/10/20/40 (CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) (Abubackar *et al.*, 2015). El Efluente 2 se obtuvo de la conversión que hizo la bacteria *Clostridium carboxidivorans* del gas de síntesis de composición 20/20/10/50 (CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) (Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). Finalmente, el Efluente 3 se ha obtenido por una tercera conversión del gas de síntesis de composición 30/5/15/50 (CO/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) a su correspondiente bioalcohol por acción de la cepa *Clostridium aceticum* (Arslan *et al.*, 2019).

---

### 6.3.2.2 Caracterización de los efluentes

Los diferentes efluentes fueron recogidos al finalizar las respectivas fermentaciones anaerobias del gas de síntesis. Antes de su utilización para la producción de PHA, los efluentes se centrifugaron a 8000 rpm durante un periodo de tiempo de 5 minutos. A continuación, los efluentes se filtraron por un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm. La finalidad de este pretratamiento fue la de eliminar los restos celulares de la fermentación anaerobia del gas de síntesis. Ningún otro pretratamiento se le realizó a los efluentes antes de su uso como sustrato en el proceso de producción de PHA.

Sin embargo, sí que fue necesario determinar las propiedades fisicoquímicas de los efluentes. Fue por ello que se realizó una completa caracterización de los mismos. Los principales parámetros a determinar fueron la demanda química de oxígeno (DQO), la concentración tanto de los AGV como de los alcoholes, la concentración de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) disueltos, así como también el pH. Todos los resultados de la caracterización se resumieron en la Tabla 6.1.



Tabla 6.1. Principales características de los 3 efluentes provenientes de la fermentación del gas de síntesis que han sido utilizados para la producción de PHA.

	<i>Efluente 1</i>	<i>Efluente 2</i>	<i>Efluente 3</i>
<i>Cepa</i>	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. carboxidivorans</i>	<i>C. aceticum</i>
<i>DQO (g L<sup>-1</sup>)</i>	13,43	11,73	12,48
<i>% AGV<sup>1</sup></i>	23,43	73,46	72,10
<i>% Alcoholes<sup>2</sup></i>	61,65	12,76	7,12
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</i>	37,69	387,00	0,00
<i>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</i>	368,15	40,00	1701
<i>Relación C/N</i>	356	30	∞
<i>Relación C/P</i>	36,49	293	7
<i>pH</i>	5,35	4,75	7,90
<i>Composición</i>	Ac. Acético Etanol 2,3-Butanodiol	Ac. Acético Ac. Butírico Ac. Hexanoico Etanol Butanol	Ac. Acético Etanol

<sup>1</sup> Porcentaje de AGV respecto al total de la DQO soluble.

<sup>2</sup> Porcentaje de alcoholes respecto al total de la DQO soluble.

---

### 6.3.2.3 Obtención de un MMC con capacidad para acumular PHA

Tal y como se ha mencionado anteriormente, para el proceso de producción de PHA se han utilizado MMC que previamente habían sido enriquecidos en poblaciones con capacidad para acumular PHA. Concretamente, se han utilizado 2 MMC distintos los cuales se diferenciaron entre sí por el proceso de enriquecimiento al que estuvieron sometidos.

En primer lugar, se obtuvo un MMC de un reactor discontinuo secuencial (SBR) que estuvo operado bajo condiciones ADF durante un largo periodo de tiempo. El MMC estuvo alimentado con un agua residual de la industria cervecera que previamente había sido fermentada a AGV (Ben *et al.*, 2016). Los microorganismos del MMC se mantuvieron a una temperatura constante de 30° C para favorecer el desarrollo de una biomasa completamente mesófila. El pH no estuvo controlado, lo que permitió la libre fluctuación de su valor entre 7,5 – 9. La operación del reactor se programó de manera cíclica, con 2 ciclos diarios de 12 horas de duración cada uno. Además, cada ciclo incluyó 4 fases: (1) alimentación, (2) reacción, la cual incluyó las fases de *feast* y de *famine*, (3) decantación y (4) vaciado. Otros parámetros como el tiempo de retención hidráulico (TRH) o el tiempo de retención de sólidos (TRS) se ajustaron a 1 y 10 días, respectivamente. Finalmente, la velocidad de carga orgánica (VCO) se ajustó a 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Este MMC se utilizó como inóculo durante la producción de PHA con el Efluente 1 como sustrato.

En segundo lugar, se obtuvo otro MMC de otro SBR que también estuvo operado bajo condiciones ADF durante un largo periodo de tiempo. En este caso, el MMC estuvo alimentado con suero lácteo, el cuál había sido previamente fermentado a AGV (dato no publicado). En el interior del reactor de 10 L de capacidad, también se desarrolló una biomasa completamente mesófila al mantener la temperatura a 30° C de manera constante. Al contrario de lo que sucedía con el primer MMC, el pH de este segundo MMC sí que estuvo regulado con el fin de evitar que su valor bajase de 8,00 durante los periodos en los que la alimentación se introducía al interior del reactor. Para ello, una bomba peristáltica introducía automáticamente NaOH 2M al interior del reactor cada vez que el pH bajaba del valor de referencia. El modo de operación se programó de igual manera al caso anterior, con 2 ciclos diarios de 12 horas de duración cada

uno. Cada ciclo estuvo compuesto por las mismas cuatro fases: (1) alimentación, (2) reacción, con fases de *feast* y de *famine*, (3) decantación y (4) vaciado. El TRH se ajustó a 1 día, el TRS a 3 días y la VCO fue de 60 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Este MMC se utilizó como inóculo para la producción de PHA utilizando el Efluente 2 y el Efluente 3 como sustrato.

---

#### 6.3.2.4 Producción de PHA con los efluentes del gas de síntesis

Para llevar a cabo la producción de PHA utilizando los efluentes provenientes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis, se diseñaron una serie de ensayos *fed-batch*. Estos ensayos *fed-batch* se realizaron en un reactor con un volumen de 2 L de capacidad. Para iniciar la producción de PHA con el Efluente 1, el reactor se inoculó con un volumen inicial de 0,5 L del MMC que había sido enriquecido en agua residual fermentada de la industria cervecera. Para iniciar la producción de PHA utilizando el Efluente 2 y el Efluente 3, el reactor se inoculó con un volumen inicial de 0,8 L del MMC que había sido enriquecido en suero lácteo fermentado. En ambos casos, la biomasa se recogió al final de la fase de *famine*, cuando la disponibilidad de carbono, de nutrientes y de PHA estaban al mínimo. Con el fin de maximizar los procesos de acumulación de PHA, todos los ensayos *fed-batch* se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de pH, temperatura, aireación y agitación en las que se enriquecieron los respectivos MMC. La biomasa se alimentó siguiendo una estrategia por pulsos manual y la evolución de los *fed-batch* se controló por los niveles de oxígeno disuelto (OD) en el medio. El OD se monitorizó durante todos los experimentos gracias a una sonda y los pulsos se fueron añadiendo manualmente a medida que el pulso anterior terminaba. El final de cada pulso vino determinado por un incremento brusco en los niveles de OD en el interior del reactor. Para realizar los ensayos *fed-batch* no hubo adición externa de ningún nutriente con el fin de maximizar la acumulación de PHA.

---

#### 6.3.3 ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Para determinar cuáles eran las poblaciones bacterianas más abundantes de los dos MMC a la hora de realizar los experimentos para la producción de PHA, se tomó una muestra de biomasa de ambos reactores de enriquecimiento. La técnica de análisis seleccionada fue la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). Para llevar a cabo esta técnica, fue necesario hacer una extracción del ADN genómico. Este

proceso se realizó siguiendo el método del fenol y del cloroformo. Posteriormente, la región V3 – V5 del gen 16S rRNA fue amplificada vía PCR utilizando los *primers* F-357 y R-907. Todos los amplicones se corrieron en un gel al 7,5% de poliacrilamida (37,5:1) con urea y formamida como agentes desnaturalizantes, en un gradiente del 40 – 60% (Valentino *et al.*, 2014). Cada banda del gel fue escindida y reamplificada. Los amplicones se enviaron a secuenciar a varias empresas externas especializadas en este tipo de análisis (BioArray y STAB VIDA). Finalmente, las secuencias fueron comparadas con las bases de datos del NCBI.

---

#### 6.3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Tanto la determinación de la DQO como la de los sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles (SSV), se hizo en base a los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2012). La determinación del contenido disuelto de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se realizó siguiendo sendos métodos espectrofotométricos, a 635 y 690 nm, respectivamente. La concentración de los compuestos solubles en agua (alcoholes y AGV) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por último, el contenido de PHA en el interior de las células se determinó por cromatografía de gases (CG), utilizando un detector de ionización en llama (FID).

---

#### 6.3.5 CÁLCULOS

El contenido de PHA (expresado en porcentaje) se calculó como la concentración de PHA (en  $\text{mg mL}^{-1}$ ) obtenida por CG en función del contenido en SSV (en  $\text{mg mL}^{-1}$ ), siguiendo la ecuación 6.1:

$$\text{PHA (\%)} = \frac{\text{PHA (g)}}{\text{SSV(g)}} \times 100 \quad (6.1)$$

El rendimiento de acumulación de PHA ( $Y_{\text{PHA/S}}$ ) fue calculado como la relación entre la cantidad de polímero producido (en  $\text{Cmmol}$ ) y la cantidad de sustrato consumido (en  $\text{Cmmol}$ ) en base a la ecuación 6.2.

$$Y_{\text{PHA/S}} = \frac{\text{PHA}_{\text{final}} (\text{Cmmol L}^{-1}) - \text{PHA}_{\text{inicial}} (\text{Cmmol L}^{-1})}{S (\text{Cmmol L}^{-1})} \quad (6.2)$$

Finalmente, las velocidades de consumo de los diferentes sustratos, AGV ( $-q_{\text{AGV}}$ ) y alcoholes ( $-q_{\text{Alc}}$ ), fueron calculadas individualmente para cada uno de los pulsos

introducidos durante los diferentes ensayos *fed-batch*. En ambos casos, se calculó la velocidad de consumo como la regresión lineal en el consumo de los AGV o alcoholes en función del tiempo y de la biomasa activa en ese determinado periodo de tiempo.

## 6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efluentes provenientes de la fermentación del gas de síntesis están constituidos por una mezcla de alcoholes y AGV. Esto se debe a que, durante la conversión del gas de síntesis, no todos los AGV se transforman a su correspondiente alcohol. Con el fin de evaluar la idoneidad de esos efluentes para producir un segundo producto de alto interés comercial como son los PHA, en la presente investigación se han diseñado una serie de ensayos *fed-batch* utilizando la tecnología de los MMC. Además, con la finalidad de identificar si las poblaciones bacterianas que componían el MMC tenían realmente la capacidad de acumular PHA se han llevado a cabo técnicas analíticas para su caracterización taxonómica.

### 6.4.1 COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA BASAL

Antes de realizar los ensayos *fed-batch* para testar la capacidad de acumular PHA de ambos MMC, se recogieron muestras de los 2 reactores con el fin de determinar las poblaciones bacterianas más abundantes en la comunidad microbiana. La toma de muestras tuvo lugar el día anterior al proceso de acumulación, y siempre con el reactor estable durante un largo periodo de tiempo. La caracterización se hizo con la DGGE, un método de identificación microbiológico que es ampliamente utilizado en los reactores para el enriquecimiento de cepas acumuladoras de PHA (Jiang *et al.*, 2011; Marang *et al.*, 2013; Valentino *et al.*, 2014). En la Figura 6.2 se muestra el típico perfil bandeado de las muestras de ambos reactores. Además, se incluyó también el respectivo marcador molecular para cada una de las muestras. El patrón de bandas es muy característico de esta técnica y se debe, principalmente, a la separación de secuencias únicas en el gel por acción de un gradiente desnaturizante. En el carril A migró la muestra perteneciente al MMC enriquecido con agua residual fermentada de la industria cervecera. Al final del proceso de electroforesis se pudo observar la presencia de una única banda, A1 (Figura 6.2). En el carril B migró la muestra que

perteneció al reactor enriquecido con suero lácteo fermentado. En este caso, al final del proceso de electroforesis se separaron dos bandas diferentes, B1 y B2 (Figura 6.2). Todas las bandas fueron escindidas y enviadas a secuenciar y, de todas ellas, se obtuvo una secuencia consenso que fue comparada con la base de datos del NCBI.

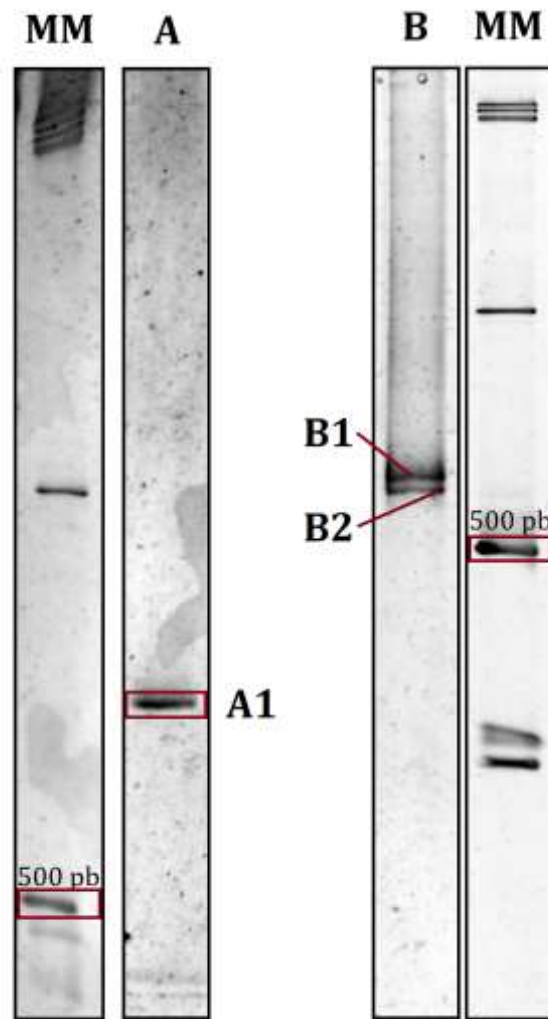


Figura 6.2. Patrón de migración de la DGGE. Reactor enriquecido en agua residual fermentada de la industria cervecera (carril A) y reactor enriquecido con suero lácteo fermentado (carril B). Además, al lado de cada carril se incluyó su respectivo marcador molecular (MM).

A pesar de que la DGGE no permite la identificación de la totalidad de las poblaciones bacterianas presentes en la comunidad microbiana, la presencia de sólo 1 y 2 bandas para los reactores enriquecidos con agua residual de la industria cervecera y suero lácteo, permitió considerar que los 2 reactores habían sido enriquecidos de manera eficaz. Así, la comunidad microbiana perteneciente al reactor que estuvo alimentado con agua residual fermentada de la industria cervecera fue dominada por un único taxón con una estrecha relación filogenética con especies del género *Thauera* (banda A1). La secuencia de este taxón tuvo un porcentaje de identidad  $\geq 95\%$  con especies de este género. En el caso del reactor alimentado con suero lácteo fermentado, una de las bandas (B1) también estuvo emparentado filogenéticamente con especies del género *Thauera*. Al igual que en el caso anterior, la secuencia tuvo un porcentaje de identidad  $\geq 95\%$  con especies de este género. Finalmente, el porcentaje de identidad de la banda B2 fue algo más bajo (92 – 93%). Los taxones con un mayor grado de parentesco a este microorganismo fueron varias especies pertenecientes al género *Pseudoxanthomonas*. Todos los taxones identificados en la presente investigación ya se han registrado como microorganismos con la capacidad de acumular PHA.

Especialmente caracterizadas como microorganismos productores de PHA están las especies del género *Thauera*. El género *Thauera* está muy ligado a las estaciones de depuración de aguas residuales y, por ello, es muy habitual encontrarla en los MMC que han sido enriquecidos en cepas acumuladoras de PHA, tal y como se describe en múltiples trabajos de investigación (Fra-Vázquez *et al.*, 2019; Bhalerao *et al.*, 2020; Colpa *et al.*, 2020; Sruamsiri *et al.*, 2020). Carvalho *et al.* (2014) observaron que las especies que pertenecen a este género dirigen una mayor proporción de carbono a las funciones básicas de crecimiento, por lo que los rendimientos de acumulación no son tan altos como en el caso de otras poblaciones bacterianas como, por ejemplo, *Azoarcus*. Aun así, la capacidad de acumulación máxima de esta población bacteriana puede llegar a alcanzar el 81% del peso seco celular al enriquecerse en un sustrato sintético (Jiang *et al.*, 2011). Sin embargo, este porcentaje es considerablemente más bajo cuando se usan como sustrato las aguas residuales reales (Albuquerque *et al.*, 2013; Wijeyekoon *et al.*, 2018; Fra-Vázquez *et al.*, 2019). Albuquerque *et al.* (2013) estudiaron el vínculo existente entre *Thauera* y su preferencia de sustrato. En base a sus observaciones, *Thauera* mostró una fuerte preferencia por el ácido butírico.

Sin embargo, esto no significa que este género no pueda sintetizar PHA a partir de otras fuentes de carbono, como el ácido acético (Lemos *et al.*, 2008) o el ácido láctico (Jiang *et al.*, 2011). La facilidad con la que *Thauera* puede desarrollarse en ambientes dominados por distintos AGV ha propiciado que esta población haya sido de las más abundantes en los 2 MMC durante la presente investigación. En el caso del MMC que se enriqueció en agua residual fermentada de la industria cervecera, el ácido acético fue la principal fuente de carbono del medio de cultivo con hasta un 70% de la carga orgánica (Ben *et al.*, 2016). Mientras, en el caso del MMC que se enriqueció en suero lácteo fermentado, *Thauera* creció en un medio de cultivo rico tanto en ácido acético como en ácido butírico, un perfil de AGV muy parecido al obtenido por Lagoa-Costa *et al.* (2020).

Al contrario de lo que ocurre con el género *Thauera*, cuya capacidad para acumular PHA está muy contrastada, poco se ha registrado del género *Pseudoxanthomonas*. A nuestro entender, sólo Oliveira *et al.* (2017) han identificado a algún miembro de la familia *Xanthomonadaceae* en un MMC enriquecido en poblaciones bacterianas con la capacidad de acumular PHA. Al igual que en nuestro estudio, este trabajo también utilizó el suero lácteo fermentado como sustrato, lo que podría haber ejercido cierta influencia en el desarrollo de este taxón.

---

#### 6.4.2 PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DEL GAS DE SÍNTESIS

La habilidad de los 2 MMC para producir PHA fue evaluada utilizando los diferentes efluentes provenientes de las tres fermentaciones anaerobias del gas de síntesis, las cuales se realizaron con cepas distintas del género *Clostridium* (Tabla 6.1). Como se ha comentado anteriormente, todos los ensayos *fed-batch* se diseñaron para seguir una estrategia de alimentación por pulsos. La finalidad de esta estrategia fue la de evitar una inhibición en el proceso de acumulación por una elevada concentración de sustrato en el medio (Serafim *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2007). En todos los ensayos *fed-batch* que se diseñan utilizando esta estrategia, el OD está considerado como el principal indicador para la adición de los nuevos pulsos, por lo que juega un papel fundamental en el devenir del proceso de acumulación (Johnson *et al.*, 2010b). Sin embargo, y a pesar de que el diseño experimental fue exactamente el mismo para los tres efluentes, la respuesta de los microorganismos no fue idéntica.



Durante el ensayo *fed-batch* que se realizó con el Efluente 1, se observó un descenso generalizado en la concentración del OD a medida que se iban introduciendo cada uno de los pulsos en el medio (Figura 6.3 A). Esta evolución en la concentración del OD fue una señal inequívoca de que los microorganismos estaban consumiendo el sustrato que había sido introducido al interior del reactor, respuesta más habitual cuando se aplica este tipo de estrategia (Tamang *et al.*, 2019). En términos generales, el final de cada pulso viene determinado por un ascenso brusco en la concentración del OD cuando toda la materia orgánica es consumida. Sin embargo, en la presente investigación se ha observado que este ascenso no fue tan pronunciado y en ningún momento se alcanzó la concentración inicial de 6 – 7 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, sino que ésta se situó en torno a 3 – 4 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Figura 6.3 A). Esta misma evolución en la concentración del OD ya había sido descrita por Marang *et al.* (2014) y es normal cuando el sustrato está compuesto por dos fuentes de carbono completamente diferentes, una que es rápidamente asimilada por los microorganismos, los AGV, y otra cuya velocidad de consumo es mucho más baja, los alcoholes. De hecho, al monitorizar la evolución del sustrato en el interior del reactor, se pudo observar como hacia el final de los pulsos todo el ácido acético, único AGV del medio, había sido consumido mientras que la gran mayoría de los alcoholes permanecieron en el medio sin apenas ser utilizados (Figura 6.3 B). A pesar de que la concentración del OD no recuperó su valor inicial, a nivel práctico este incremento fue lo suficientemente pronunciado para identificar cuando el ácido acético, principal precursor de los PHA en este efluente, había sido totalmente consumido. A medida que se fueron sucediendo los pulsos, el incremento en la concentración del OD fue, cada vez, más sutil (Figura 6.3 A). En consecuencia, distinguir cuando los microorganismos habían terminado de consumir todo el ácido acético fue bastante más complicado. El principal motivo por el que la concentración del OD dejó de subir fue debido a la acumulación de alcoholes en el medio. Al no ser consumidos, los alcoholes se acumularon hasta convertirse en la principal fuente de carbono disponible en el medio, incluso por delante del ácido acético que pasó a ser la fuente de carbono limitante. Esto provocó un aumento en la disponibilidad de los alcoholes en el medio que hizo que los microorganismos los consumiesen de manera simultánea al ácido acético, hasta el punto de que la biomasa entró en una fase de *feast* continua (Figura 6.3 B). Como el consumo de los alcoholes no tenía interés para la investigación, el ensayo *fed-batch* se dio por finalizado. Al finalizar el experimento,

todo el ácido acético había sido consumido ( $68 \text{ Cmmol L}^{-1}$ ), aunque buena parte de los alcoholes permanecieron en el medio sin ser utilizados ( $90$  de  $132 \text{ Cmmol L}^{-1}$ ) (Figura 6.3 B).

Durante el ensayo *fed-batch* en el que se usó el Efluente 2 producido por *Clostridium carboxidivorans*, también se registró un descenso en la concentración del OD con la entrada de cada uno de los pulsos (Figura 6.3 C), señal de que los microorganismos estaban a consumir el sustrato que había sido introducido al interior del reactor. Sin embargo, el descenso registrado en la concentración del OD durante el primer pulso fue menos pronunciado de lo esperado. Así, la concentración del OD apenas pasó de  $7$  a  $4,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  (Figura 6.3 C). Esta respuesta quizá hubiese sido diferente si no se hubiese generado espuma en el interior del reactor. Uno de los factores que pudo haber influido en la generación de esta espuma fue la acidez del medio. De los tres efluentes obtenidos durante las fermentaciones anaerobias del gas de síntesis, el Efluente 2 fue el que tuvo un valor de pH más bajo (Tabla 6.1). Además, el medio de cultivo estuvo compuesto por ciertos productos químicos con una alta capacidad de amortiguación que se encontraban en altas concentraciones (Fernández-Naveira *et al.*, 2017a). Al añadir manualmente el primer pulso, se registró un rápido descenso en el valor del pH que la bomba encargada de regular este parámetro no fue capaz de contrarrestar. El pH bajó así hasta un valor de  $5 - 6$ , lo que afectó negativamente a la biomasa. A pesar de este contratiempo, los microorganismos consumieron los AGV. De nuevo, el final del primer pulso vino determinado por un ascenso moderado en la concentración del OD y la respuesta de la biomasa fue la misma que había sido reportada por Marang *et al.* (2014); se consumieron los AGV, pero no los alcoholes (Figura 6.3 D). Sin embargo, no todos los AGV fueron, en este caso, completamente consumidos (Figura 6.3 D). De los tres AGV diferentes que compusieron el Efluente 2, tanto el ácido acético como el ácido butírico fueron rápidamente asimilados por los microorganismos pero no así el ácido hexanoico, el cual quedó en el medio sin ser del todo consumido. El que la biomasa haya tenido una mayor preferencia por un sustrato antes que por otro tuvo su explicación en el proceso de enriquecimiento del MMC. Durante todo el proceso de enriquecimiento, el MMC estuvo alimentado con un perfil de AGV similar al obtenido por Lagoa-Costa *et al.* (2020). Tanto el ácido acético como el ácido butírico fueron los principales sustratos del medio, pero sin

ácido hexanoico. Esto hizo que en el MMC se desarrollasen poblaciones bacterianas con una elevada afinidad por el ácido acético y el ácido butírico, pero con una baja afinidad por el ácido hexanoico. Del segundo pulso en adelante, la alimentación se cambió de manual a automática para regular más eficazmente el caudal de entrada. En consecuencia, el flujo de entrada se redujo y la bomba encargada de ajustar el pH fue capaz de controlar este valor de una manera más estricta, evitándose así que los microorganismos sufriesen un nuevo choque debido a un cambio brusco en el valor de este parámetro. De hecho con el nuevo sistema se redujo la generación de espuma aunque ésta siguió siendo visible durante todo el proceso. Con el paso de los pulsos, la concentración del OD siguió una tendencia descendente sin que la biomasa mostrase síntomas de saturación por acumulación de PHA. Aun así, la dinámica fue la misma, con los AGV siendo consumidos (excepto parte del ácido hexanoico) y con los alcoholes acumulándose en el medio (Figura 6.3 D). Sin embargo, con el último pulso la biomasa entró en una fase continua de *feast*. En esta fase, la concentración del OD alcanzó los valores más bajos de todo el experimento y tuvo una duración de unas 2 horas aproximadamente (Figura 6.3 C). A diferencia de lo que se observó para el Efluente 1, en donde la causa por la que la biomasa entró en una fase continua de *feast* fue la acumulación de los alcoholes en el medio, en este caso se debió a la baja relación carbono/nitrógeno (C/N) del Efluente 2 (Tabla 6.1). La alta disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  permitió el crecimiento de otras poblaciones bacterianas no acumuladoras de PHA que usaron tanto los alcoholes como el ácido hexanoico como sustrato para crecer. De hecho, en el último pulso se pudo observar un consumo obvio en ambos sustratos (Figura 6.3 D) y es por ello que se dio por finalizado el ensayo *fed-batch*. Al final del experimento se consumieron 161 de los 164 Cmmol-AGV  $\text{L}^{-1}$ . Además, 12 de los 19 Cmmol-Alcohol  $\text{L}^{-1}$  también fueron consumidos.

La respuesta en la evolución del OD en el interior del reactor fue diferente a los otros dos experimentos cuando se utilizó como sustrato el Efluente 3 obtenido durante la fermentación anaerobia del gas de síntesis de *Clostridium aceticum*. En este caso, en ningún momento se generó espuma en el interior del reactor ya que el pH del medio apenas se vio alterado por la entrada de los distintos pulsos. Esto se debió, en gran medida, a que el Efluente 3 tuvo un valor de pH ligeramente básico (Tabla 6.1). Con la introducción del primer pulso, la concentración del OD en el interior del reactor

bajó de 7,5 a 2,5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Figura 6.3 E). De igual manera a lo ocurrido con los otros 2 experimentos, al final del pulso todo el ácido acético (único AGV) fue consumido, mientras que buena parte del etanol (único alcohol) quedó en el medio sin ser usado (Figura 6.3 F). Tanto el descenso en la concentración del OD con la entrada del pulso como su posterior aumento al haberse consumido todo el ácido acético, fueron más pronunciados en este caso con respecto a lo que se había observado para el Efluente 1 (Figura 6.3 E). De hecho, esta respuesta se asemejó más a la típica evolución del OD en los ensayos *fed-batch* que se diseñan siguiendo una estrategia de alimentación por pulsos (Tamang *et al.*, 2019). El motivo principal que favoreció esta evolución fue la menor concentración de etanol que permaneció en el medio después de que se hubiese consumido todo el ácido acético. Mientras que al final del primer pulso del ensayo *fed-batch* realizado con el Efluente 1 quedó un 62% del total de la DQO sin consumir en forma de alcoholes, sólo un 7% del total de la DQO lo hizo con el Efluente 3 (Tabla 6.1). Con el paso de los pulsos, la concentración del OD fue bajando cada vez menos hasta que, en el último pulso introducido, apenas bajó de los 5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Figura 6.3 E). Esta evolución en la concentración del OD es característica de cuando los microorganismos alcanzan su punto de saturación por acumulación de PHA y es la respuesta más habitual de los ensayos *fed-batch* (Tamang *et al.*, 2019). Al entender que la biomasa no iba a responder adecuadamente a la entrada de otros pulsos, se dio por finalizado el experimento en este punto. Al final del experimento, los microorganismos consumieron todo el ácido acético (134 Cmmol L<sup>-1</sup>), mientras que dejaron el 60% del etanol sin consumir (6 de 10 Cmmol L<sup>-1</sup>) (Figura 6.3 F).

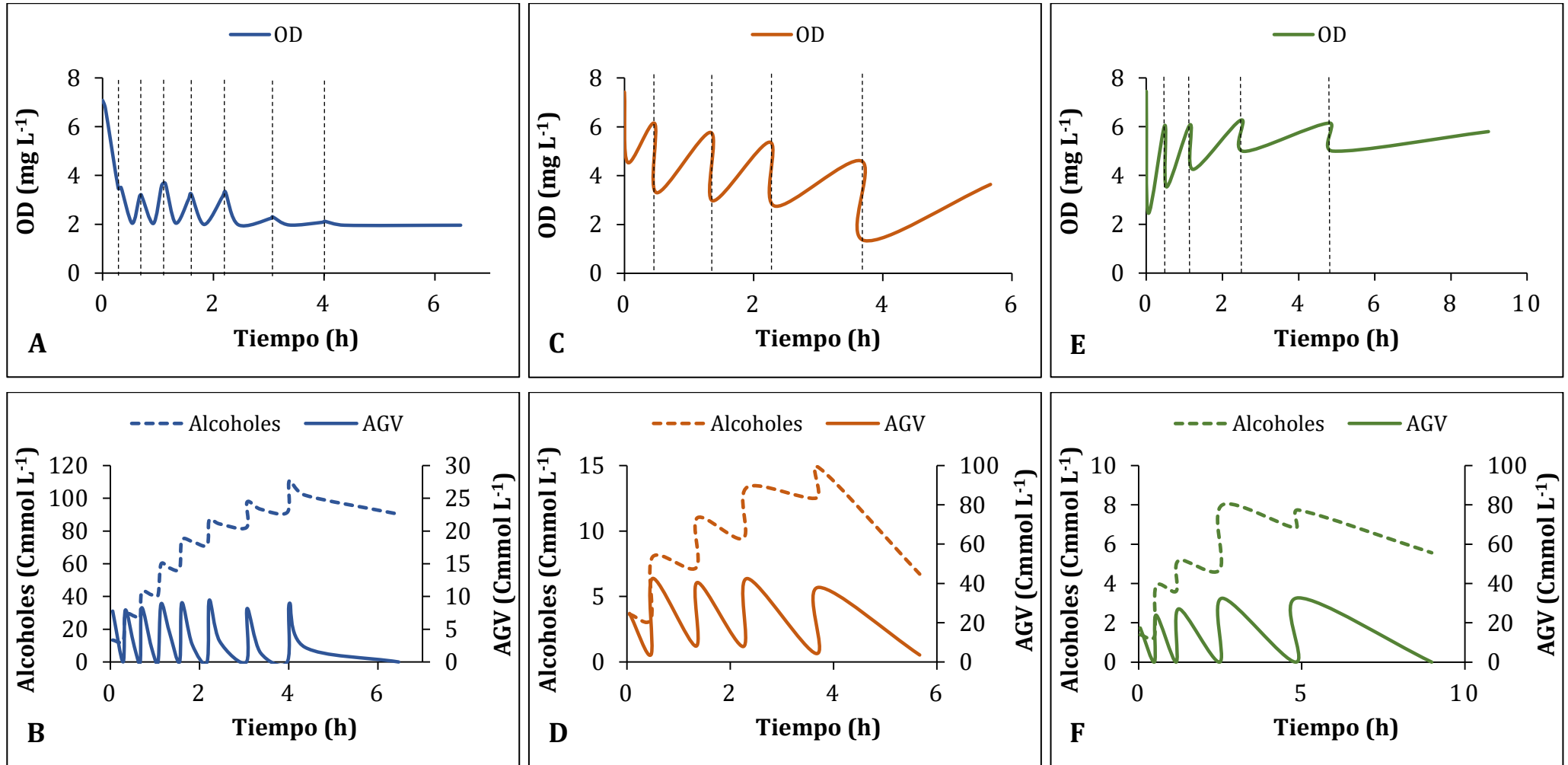
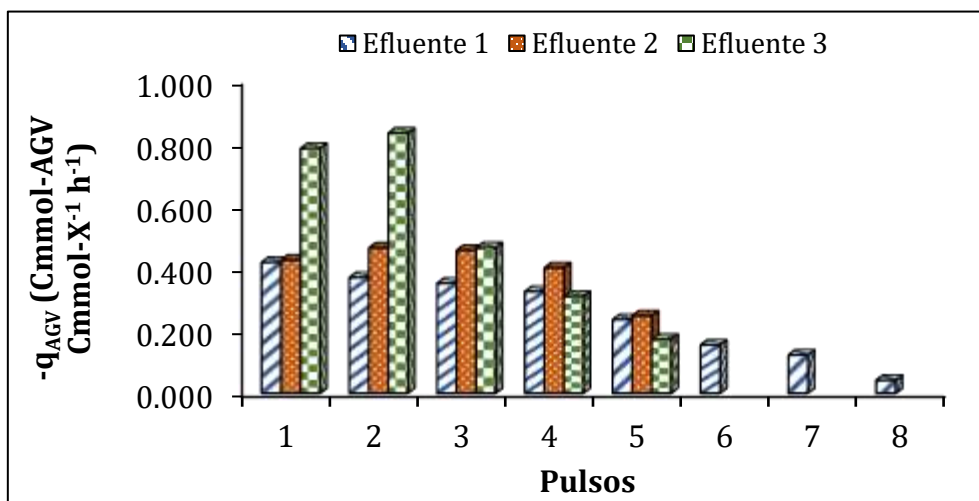


Figura 6.3. Evolución durante el ensayo *fed-batch* con el Efluente 1 de (A) el OD y (B) los AGV y alcoholes. Evolución durante el ensayo *fed-batch* con el Efluente 2 de (C) el OD y (D) los AGV y alcoholes. Evolución durante el ensayo *fed-batch* con el Efluente 3 de (E) el OD y (F) los AGV y alcoholes. Las líneas discontinuas simbolizan la entrada de cada uno de los diferentes pulsos al interior del reactor.

Una de las características que otorga una ventaja adaptativa a las poblaciones que tienen la capacidad de acumular PHA frente a aquellas poblaciones que no la tienen, es su elevada tasa de consumo de los AGV (Reis *et al.*, 2003). Ante un sustrato que está formado por una mezcla de AGV y alcoholes como en la presente investigación, el MMC tuvo una mayor preferencia por los AGV antes que por los alcoholes. Esta es una respuesta que ya había sido descrita anteriormente por Marang *et al.* (2014) y Korkakaki *et al.* (2016) utilizando sustratos muy similares. Sin embargo, a lo largo de la presente investigación se ha podido apreciar un cambio en la velocidad con la que los distintos sustratos eran consumidos (AGV y alcoholes). Independientemente del efluente empleado, se observó una reducción en la  $-q_{AGV}$  con el paso de los pulsos (Figura 6.4 A). Esta respuesta es habitual debido a la saturación que sufre la biomasa por la acumulación de PHA en su interior. Además, con el paso de los pulsos también se observó un cambio en la  $-q_{Alc}$ . Sin embargo, las fluctuaciones en este caso fueron distintas en función del efluente empleado. En el ensayo *fed-batch* realizado con el Efluente 1 se observó un aumento progresivo de la  $-q_{Alc}$  de un valor de 0,031 hasta uno de 0,113 Cmmol-Alcohol Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 6.4 B). La causa que ha influido en el aumento de la  $-q_{Alc}$  fue la mayor disponibilidad de éstos a medida que se iban acumulando en el medio. En cambio, en el ensayo *fed-batch* realizado con el Efluente 2 la dinámica fue distinta, pues la  $-q_{Alc}$  se mantuvo constante hasta que en el último pulso sí que se registró un claro ascenso de su valor, el cual alcanzó un valor de 0,058 Cmmol-Alcohol Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 6.4 B). Tal y como se había mencionado, la alta disponibilidad de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio permitió el crecimiento de microorganismos con la capacidad de utilizar los alcoholes como sustrato y, de ahí, que se haya registrado un aumento tan brusco en este parámetro. De hecho, Marang *et al.* (2014) ya habían observado el mismo efecto cuando diseñaron ensayos *fed-batch* con un exceso de nitrógeno. Por último, cuando se utilizó el Efluente 3 como sustrato para realizar los ensayos *fed-batch*, no hubo una fluctuación importante en la  $-q_{Alc}$ , la cual se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento con un valor que no sobrepasó los 0,011 Cmmol-Alcohol Cmmol-X<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 6.4 B). La baja concentración de alcoholes que se acumularon en el medio como la total ausencia de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> favoreció que la  $-q_{Alc}$  se mantuviese en valores tan bajos. Por lo tanto, se puede concluir que las propiedades fisicoquímicas de los distintos efluentes afectaron al consumo de los alcoholes en el medio. Desde un punto de vista biotecnológico los alcoholes son productos con un

alto valor en la industria de los biocombustibles y, es por ello, que no interesa que se produzca su consumo. Ajustar las propiedades de los efluentes como por ejemplo la disponibilidad de amonio disuelto, podría minimizar su consumo. También podría ser interesante aplicar una estrategia de recuperación de alcoholes a medida que los microorganismos van consumiendo los AGV del medio. Para ello, habría que inducir periodos selectivos de decantación en la biomasa, similar al diseño realizado por Korkakaki *et al.* (2016).

A)



B)

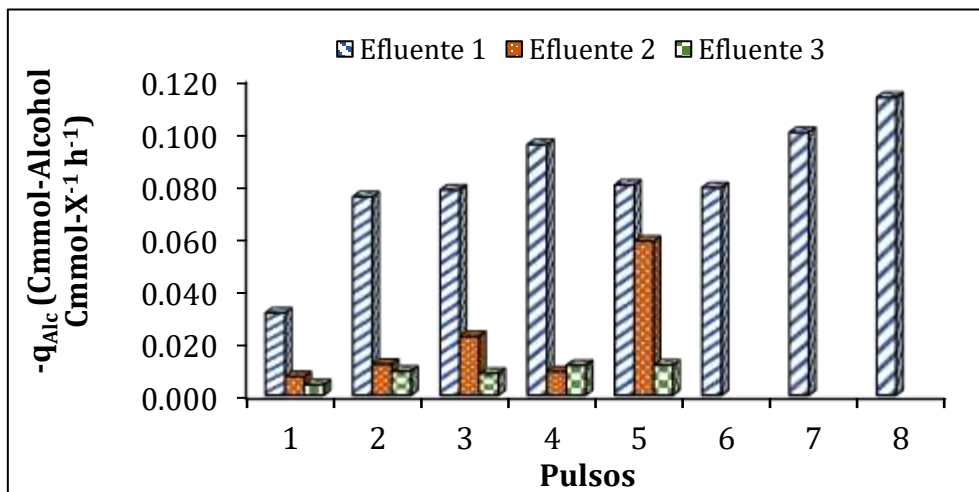


Figura 6.4. Evolución de la velocidad de consumo de los AGV (A) y la velocidad de consumo de los alcoholes (B) para cada uno de los ensayos *fed-batch*.

La evolución del PHA para cada uno de los 3 efluentes se monitorizó desde el inicio hasta el final de los experimentos (Figura 6.5). Gracias a haber recogido la biomasa al final de la etapa *famine*, el contenido de PHA al inicio de los ensayos *fed-batch* se minimizó. Sin embargo, el PHA sufrió una evolución que fue diferente en función de la presencia o no de amonio en el medio. Al inicio de los experimentos, el contenido de PHA aumentó rápidamente independientemente del efluente utilizado (Figura 6.5). Con el devenir de los pulsos este aumento fue haciéndose, cada vez, más lento, hasta que los 3 efluentes alcanzaron su pico máximo de PHA con 24%, 41% y 42% (Figura 6.5). Sin embargo, hubo una diferencia muy importante entre los 3 efluentes en esta evolución del PHA. Mientras que el pico máximo de PHA coincidió con el final del ensayo para los efluentes cuyo contenido amoniacal fue bajo (1 y 3), el contenido de PHA se redujo después de haber alcanzado su máximo para el efluente que tuvo mayor disponibilidad de amonio (Figura 6.5). La reducción en el contenido máximo de PHA en sustratos con un exceso de nitrógeno ya se ha descrito anteriormente en la literatura (Johnson *et al.*, 2010; Marang *et al.*, 2014). Además, esta reducción no está asociada tanto a un consumo en las reservas de PHA como a una dilución en las mismas por el crecimiento de la biomasa.

A pesar de que el porcentaje final de PHA no ha sido demasiado elevado, a raíz de la presente investigación se ha podido demostrar que es factible utilizar los efluentes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis para la producción de PHA. Mejorar los porcentajes y rendimientos de acumulación son aspectos a optimizar en futuros experimentos. En base a nuestro estudio, son varios los factores que pueden influir sobre estos parámetros. Por un lado, optimizar el proceso de enriquecimiento daría lugar a un MMC con una capacidad mejorada para acumular los AGV como PHA. Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas de los efluentes también ejercen una gran influencia sobre la etapa de acumulación de PHA. Adaptar estas propiedades a los requerimientos de los MMC, especialmente el contenido de amonio disuelto, daría lugar a una mejora considerable no sólo en la acumulación de PHA sino también en el no consumo de los alcoholes. De hecho, se ha demostrado que una limitación de nitrógeno favorece incluso la producción de alcoholes durante la fermentación del gas de síntesis (Abubackar *et al.*, 2012, 2015).



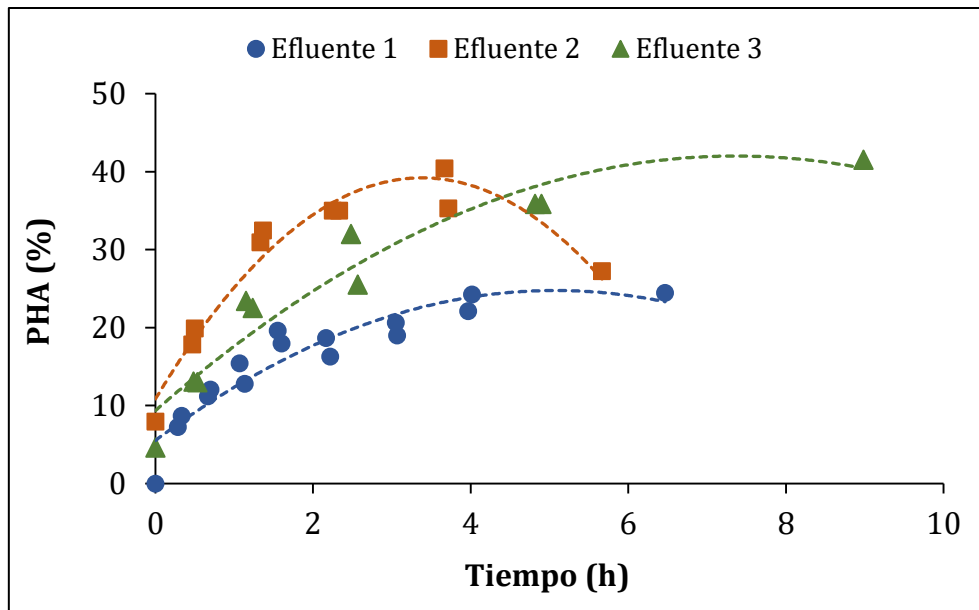


Figura 6.5. Evolución del PHA acumulado por los microorganismos para cada uno de los tres efluentes utilizados.

Independientemente del efluente utilizado, la mayoría de los AGV se transformaron principalmente en un único monómero, el hidroxibutirato (HB). La presencia casi exclusiva de ácido acético y ácido butírico dirigió la síntesis de PHA hacia la de este monómero. La ausencia total de AGV de cadena impar hizo que no hubiese síntesis alguna de hidroxivalerato (HV). De hecho, la relación entre los AGV de cadena par y la síntesis de HB y los AGV de cadena impar y la síntesis de HV ya ha sido estudiada por Shen *et al.* (2014). Aun así, se detectó algo de HV en la composición final de 2 de los biopolímeros (Tabla 6.2). Sin embargo, no fue resultado de una síntesis si no que se debió a una cantidad residual que quedó del ciclo de enriquecimiento previo al ensayo *fed-batch*. Curiosamente, a parte de la síntesis del HB también se detectó una pequeña síntesis de hidroxihexanoato (HHx). Su síntesis probablemente haya sido resultado de la transformación del ácido hexanoico por parte de las poblaciones con capacidad de acumular PHA (Furutate *et al.*, 2017).

Desde un punto de vista comercial, un homopolímero de polihidroxibutirato (PHB) no es interesante. La razón es que el PHB se caracteriza por una elevada fragilidad que lo limita, en gran medida, para multitud de aplicaciones (Anjum *et al.*, 2016). Es por ello que, a día de hoy, los copolímeros son mucho más interesantes. Incorporar

otros monómeros a la composición final del biopolímero incrementaría el interés comercial del mismo. Por un lado, la incorporación de monómeros HV hasta suponer un 20 – 30% del total del biopolímero, daría lugar al poli (3-hidroxi butirato co 3-hidroxi valerato) (PHBV) que tendría mejores propiedades mecánicas al ser mucho más flexible (Reis *et al.*, 2011). Sin embargo, para aumentar el porcentaje de HV sería necesaria la presencia de sus principales precursores, los AGV de cadena impar. Usar otra cepa del género *Clostridium* como biocatalizador en la fermentación anaerobia del gas de síntesis podría resultar en la síntesis de estos AGV. Por ejemplo, ya ha sido publicado en la literatura la capacidad de la cepa *C. ragsdalei* para producir ácido acético, propiónico, butírico y valérico durante la fermentación anaerobia del gas de síntesis (El-Gammal *et al.*, 2017). Otra alternativa para obtener un biopolímero con unas propiedades fisicoquímicas atractivas desde un punto de vista comercial sería la incorporación de monómeros HHx al PHB, para dar lugar al copolímero poli (3-hidroxi butirato co 3-hidroxi hexanoato) (PHBHHx). Al añadir el HHx, la elongación hasta ruptura del biopolímero aumentaría de un 6 a un 850% (Sudesh *et al.*, 2000). En resumen, el copolímero ganaría gran flexibilidad respecto al homopolímero y se volvería mucho más interesante desde un punto de vista comercial. En este caso, no habría necesidad de cambiar el proceso de fermentación del gas de síntesis puesto que el ácido hexanoico producido por *C. carboxidivorans* sería suficiente para que las bacterias del MMC sintetizaran el HHx. Sin embargo, el 1% alcanzado durante la presente investigación sería una proporción bastante baja para obtener una mejora considerable en las propiedades fisicoquímicas del polímero. Para incrementar este porcentaje sería interesante obtener un MMC más eficiente en la síntesis del HHx a partir del ácido hexanoico como sustrato.

Tabla 6.2. Resultados principales en los ensayos *fed-batch* con los diferentes efluentes de la fermentación anaerobia del gas de síntesis.

	<i>Efluente 1</i>	<i>Efluente 2</i>	<i>Efluente 3</i>
<i>Cepa</i>	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. carboxidivorans</i>	<i>C. aceticum</i>
<i>Tiempo (h)</i>	6,5	5,7	9,0
<i>Número de pulsos</i>	8	5	5
<i>Cmmol L<sup>-1</sup> introducidos</i>	200	183	143
<i>AGV (Cmmol L<sup>-1</sup>)</i>	68	164	133
<i>Alcoholes (Cmmol L<sup>-1</sup>)</i>	132	19	10
<i>Comp. PHA (HB/HV/HHx)</i>	100/0/0	96/3/1	99/1/0
<i>Y<sub>PHA/S</sub></i>	0,172	0,330	0,221
<i>PHA máximo (%)</i>	24,5	40,5	41,6

## 6.5 CONCLUSIONES

La presente investigación permitió demostrar que la incorporación de un proceso de producción de PHA a la tecnología del gas de síntesis fue una solución innovadora para aprovechar los AGV. Se obtuvieron así dos productos de alto valor añadido. Por un lado los biopolímeros y por otro los bioalcoholes. A través de varios ensayos *fed-batch*, se observó que los microorganismos fueron capaces de utilizar los AGV como sustrato para la síntesis de PHA, mientras que dejaron los alcoholes sin consumir. La producción máxima de PHA alcanzó valores en torno al 24 – 42%. Sin embargo, se pudo observar que hay varios factores que pueden influir tanto en la acumulación de PHA como en el consumo de los alcoholes como, por ejemplo, la disponibilidad de amonio en el medio. Un MMC con mayor capacidad para producir PHA, así como una limitación en la presencia de macronutrientes, se prevén los factores claves para mejorar esta tecnología de cara al futuro.

## 6.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2012. Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. *Bioresour. Technol.* 114, 518–522.
- 2 Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2015. Ethanol and acetic acid production from carbon monoxide in a *Clostridium* strain in batch and continuous gas-fed bioreactors. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 1029 – 1043.
- 3 Albuquerque, M.G.E., Carvalho, G., Kragelund, C., Silva, A.F., Crespo, M.T.B., Reis, M.A.M., Nielsen, P.H., 2013. Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 7, 1 – 12.
- 4 Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130, 411 – 421.
- 5 Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161 – 174.
- 6 APHA-AWWA-WPCF, (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd edn. Washington DC.
- 7 Arslan, K., Bayar, B., Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2019. Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high concentrations of ethanol from syngas. *Bioresour. Technol.* 292, 121941.
- 8 Ben, M., Kennes, C., Veiga, M.C., 2016. Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2817 – 2826.
- 9 Bhalerao, A., Banerjee, R., Nogueira, R., 2020. Continuous cultivation strategy for yeast industrial wastewater-based polyhydroxyalkanoate production. *J. Biosci. Bioeng.* 129, 595 – 602.
- 10 Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2014. The relationship between mixed microbial culture composition and PHA

- production performance from fermented molasses. *N. Biotechnol.* 31, 257 – 263.
- 11 Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 621 – 632.
  - 12 Choi, D.W., Chipman, D.C., Bents, S.C., Brown, R.C., 2010. A Techno-economic analysis of polyhydroxyalkanoate and hydrogen production from syngas fermentation of gasified biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1032 – 1046.
  - 13 Colpa, D.I., Zhou, W., Wempe, J.P., Tamis, J., Stuart, M.C.A., Krooneman, J., Euverink, G.W., 2020. *Thauera aminoaromatica* MZ1T identified as a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium within a mixed microbial consortium. *Bioeng.* 7, 19.
  - 14 Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6, 885 – 906.
  - 15 Drzyzga, O., Revelles, O., Durante-Rodríguez, G., Díaz, E., García, J.L., Prieto, A., 2015. New challenges for syngas fermentation: towards production of biopolymers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 1735 – 1751.
  - 16 El-Gammal, M., Abou-Shanab, R., Angelidaki, I., Omar, B., Sveding, P.V., Karakashev, D.B., Zhang, Y., 2017. High efficient ethanol and VFA production from gas fermentation: Effect of acetate, gas and inoculum microbial composition. *Biomass Bioenergy* 105, 32 – 40.
  - 17 Fernández-Dacosta, C., Posada, J.A., Kleerebezem, R., Cuellar, M.C., Ramirez, A., 2015. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresour. Technol.* 185, 368 – 377.
  - 18 Fernández-Naveira, Á., Veiga, M.C., Kennes, C., 2017a. Effect of pH control on the anaerobic H-B-E fermentation of syngas in bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 1178 – 1185.
  - 19 Fernández-Naveira, Á., Veiga, M.C., Kennes, C., 2017b. H-B-E (Hexanol-Butanol-Ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 712 – 731.

- 20 Fra-Vázquez, A., Santorio, S., Palmeiro-Sánchez, T., del Río, A.V., Mosquera-Corral, A., 2019. PHA accumulation of a mixed microbial culture co-exists with ammonia partial nitrification. *Chem. Eng. J.* 360, 1255 – 1261.
- 21 Furutate, S., Nakazaki, H., Maejima, K., Hiroe, A., Abe, H., Tsuge, T., 2017. Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate copolymers consisting of 3-hydroxy-2-methylbutyrate and 3-hydroxyhexanoate. *J. Polym. Res.* 24, 221.
- 22 Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, 1700782.
- 23 Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotech. Bioeng.* 108, 2022 – 2035.
- 24 Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromol.* 10, 670 – 676.
- 25 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010a. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Bioresour. Technol.* 147, 73 – 79.
- 26 Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2010b. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Res.* 44, 2141 – 2152.
- 27 Kennes, D., Abubackar, H.N., Diaz, M., Veiga, M.C., Kennes, C., 2016. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 304 – 17.
- 28 Korkakaki, E., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2016. Survival of the fastest: selective removal of the side population for enhanced PHA production in a mixed substrate enrichment. *Bioresour. Technol.* 216, 1022 – 1029.
- 29 Lagoa-Costa, B., Kennes, C., Veiga, M.C., 2020. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 308, 123226.

- 30 Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., Lant, P., 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog. Polym. Sci.* 38, 536 – 583.
- 31 Lemos, P.C., Levantesi, C., Serafim, L.S., Rossetti, S., Reis, M.A.M., Tandoi, V., 2008. Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 351 – 360.
- 32 Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2013. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresour. Technol.* 142, 232 – 239.
- 33 Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2014. Impact of non-storing biomass on PHA production: An enrichment culture on acetate and methanol. *Int. J. Biol. Macromol.* 71, 74 – 80.
- 34 Oliveira, C.S.S., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2017. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *N. Biotechnol.* 37, 69 – 79.
- 35 Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., Majone, M., 2011. Mixed culture processes for polyhydroxyalkanoate production from agro-industrial surplus/wastes as feedstocks, in: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, B. V., The Netherlands, pp. 669 – 683.
- 36 Reis, M.A.M., Serafim, L.S., Lemos, P.C., Ramos, A.M., Aguiar, F.R., van Loosdrecht, M.C.M., 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 377 – 385.
- 37 Revelles, O., Tarazona, N., García, J.L., Prieto, M.A., 2016. Carbon roadmap from syngas to polyhydroxyalkanoates in *Rhodospirillum rubrum*. *Environ. Microbiol.* 18, 708 – 720.
- 38 Sansaniwal, S.K., Pal, K., Rosen, M.A., Tyagi, S.K., 2017. Recent advances in the development of biomass gasification technology: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72, 363 – 384.
- 39 Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145 – 160.

- 40 Shen, L., Hu, H., Ji, H., Cai, J., He, N., Li, Q., Wang, Y., 2014. Production of poly (hydroxybutyrate–hydroxyvalerate) from waste organics by the two-stage process: Focus on the intermediate volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 166, 194 – 200.
- 41 Sruamsiri, D., Thayanukul, P., Suwannasilp, B.B., 2020. *In situ* identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Sci. Rep.* 10, 3752.
- 42 Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25, 1503 – 1555.
- 43 Tamang, P., Banerjee, R., Koster, S., Nogueira, R. 2019. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. *J. Environ. Sci.* 78, 137 – 146.
- 44 Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., Majone, M., 2014. Feed frequency in a sequencing batch reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *N. Biotechnol.* 31, 264 – 275.
- 45 van Groenestijn, J.W., Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2013. Bioethanol. In: Kennes, C., Veiga, M.C. (Eds.), *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 431 – 463.
- 46 Wijeyekoon, S., Carere, C.R., West, M., Nath, S. Gapes, D., 2018. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors. *Water Res.* 140, 1 – 11.





# Conclusiones finales

---

---

- ❖ Se estableció satisfactoriamente un proceso de 3 etapas para la producción de PHA usando un MMC como inóculo y suero lácteo como sustrato.
- ❖ Como sustrato, el suero lácteo tuvo las características fisicoquímicas ideales para su bioconversión a PHA.
- ❖ La fácil biodegradabilidad de los distintos componentes que compusieron el suero lácteo, principalmente la lactosa, convirtieron a este efluente industrial en un sustrato ideal para obtener AGV a partir de un proceso de fermentación acidogénica.
- ❖ Dentro del proceso de acidogénesis son varios los factores con influencia en el rendimiento del mismo. De la presente investigación se desprendió que el TRS, el TRH o la VCO fueron algunos de ellos.
- ❖ La fermentación butírica fue la principal ruta metabólica a lo largo de todo el proceso de acidogénesis, con independencia de las condiciones establecidas.
- ❖ Los cambios en las condiciones de operación durante la acidogénesis no sólo tuvieron influencia sobre los parámetros que definen la eficacia del proceso, sino que también afectaron a las poblaciones desarrolladas en el interior del reactor. Así, al modificar el TRS se alteró la composición de la comunidad microbiana.
- ❖ El régimen *feast/famine* (o estrategia ADF) fue un proceso ideal para lograr un enriquecimiento en poblaciones acumuladoras de PHA dentro de un MMC. Además, la entrada de tiourea, hierro y magnesio al medio de cultivo, al igual que el aumento en la VCO de 60 a 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> favoreció la selección de poblaciones con mayor capacidad de acumular PHA. De hecho, el potencial acumulador del MMC se vio mejorado en más del doble, pasando de un 21 a un 54%.

- ❖ Durante el proceso de enriquecimiento, la dinamicidad de las poblaciones fue también dependiente de las condiciones operacionales aplicadas. Al cambiar las condiciones de operación hubo una modificación en la composición de la comunidad microbiana.
- ❖ Cambiar gradualmente la composición de la alimentación durante el proceso de fermentación acidogénica repercutió tanto en la comunidad microbiana como en la producción de AGV. La comunidad microbiana cambió en paralelo a la entrada del nuevo sustrato, aunque se observó un valor umbral a partir del cual el cambio fue mucho más brusco. De igual manera, la fermentación butírica fue desplazada por la síntesis de ácido acético, especialmente cuando se produjo el cambio brusco en la comunidad microbiana. La distribución de los AGV se correspondió muy bien con las poblaciones desarrolladas en cada una de las fases de la fermentación acidogénica.
- ❖ Los AGV producidos durante la fermentación acidogénica son idóneos para la síntesis de PHA, con una producción muy similar independientemente del efluente utilizado (45 – 50%). Eso sí, el perfil de los AGV tuvo repercusiones sobre la composición monomérica final del biopolímero.
- ❖ La incorporación de una segunda etapa al proceso de fermentación anaerobia del gas de síntesis para la producción de PHA a partir de los AGV remanentes permitió la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros. Ambos son dos productos muy interesantes desde un punto de vista biotecnológico.
- ❖ Las características fisicoquímicas de los efluentes jugaron un rol importante en la producción integrada de bioalcoholes y biopolímeros y, especialmente, la presencia de  $\text{NH}_4^+$ , que favoreció un mayor consumo de los alcoholes y permitió el crecimiento de la biomasa.

## Final conclusions

---

---

- ❖ A three-stage process for the production of PHA was successfully established using an MMC as inoculum and cheese whey as substrate.
- ❖ As substrate, cheese whey had the optimal physicochemical properties to be bioconverted into PHA.
- ❖ Due to the high biodegradation rate of its different elements (mainly lactose), cheese whey became a good substrate for its bioconversion into VFA through an acidogenic fermentation process.
- ❖ Several factors influence the acidogenic fermentation stage. The current work showed that SRT, HRT and OLR were some of them.
- ❖ Butyric fermentation became the main metabolic pathway by far throughout the entire acidogenic fermentation stage, no matter the applied operational condition.
- ❖ Changes in operational conditions during the acidogenic fermentation stage not only affected the process performance, but also the bacterial populations. As shown in the present research, increasing the SRT modified the microbial community.
- ❖ The feast to famine regimen (or ADF) was a well-established process for the selection of PHA accumulating bacteria from an MMC. The selection stage has been optimized through addition of thiourea, magnesium and iron to the culture medium. An increase in the OLR from 60 to 80 Cmmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> also had a positive impact on the potential of PHA storage. In consequence, the PHA content reached 54% at the end of the selection stage, more than double that at the beginning of the process (21%).

- ❖ During the selection stage, the dynamics of the bacterial populations were dependant on the applied operational conditions. The microbial community changed as new operational conditions were applied to the system.
- ❖ A gradual change in feedstock composition during acidogenesis affected both the microbial community and the VFA production. The microbial community changed in parallel to the introduction of the new substrate, even though a threshold was observed from which the change was much more pronounced. Similarly, butyric fermentation was gradually displaced by the synthesis of acetic acid. The VFA profile matched quite well with the present populations at each of the phases of the acidogenic fermentation.
- ❖ The VFA produced during the acidogenic fermentation were a good substrate for the synthesis of PHA. All the experiments reached similar PHA contents (45 – 50%), though the different VFA profiles led to different PHA monomeric composition.
- ❖ The integration of a second stage to the syngas fermentation technology, in order to produce PHA from residual VFA, led to a combined production of bioalcohols and biopolymers. Both are high added value products from a biotechnological point of view.
- ❖ The physicochemical properties of the effluents from the syngas fermentation played an important role in the production of PHA and especially, the presence of  $\text{NH}_4^+$ . It led to a higher alcohol consumption rate as well as a higher biomass growth.