UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS MARGARITA SALAS

TESIS DOCTORAL

Tecnologías de vanguardia para la producción de bioplásticos a partir de residuos complejos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Natalia Hernández Herreros

Directora

María Auxiliadora Prieto Jiménez

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas

Madrid, 2021

© Natalia Hernández Herreros, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología molecular

TESIS DOCTORAL

Tecnologías de vanguardia para la producción de bioplásticos a partir de residuos complejos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Natalia Hernández Herreros

Directora

María Auxiliadora Prieto Jiménez

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas

Departamento de Biotecnología de Polímeros

No son los más fuertes de la especie los que sobreviven, ni los más inteligentes.
Sobreviven los más flexibles y adaptables a los cambios.

Charles Darwin

Agradecimientos

Después de momentos de incertidumbre, cansancio y hartazgo me parece increíble estar escribiendo por fin estas líneas. Al final, la perseverancia y esa pequeña intuición que me decía "tú también puedes" ha merecido la pena. No obstante, en este camino, he tenido la suerte de coincidir con algunas personas que, bien por su función científica o personal, han sido pilares fundamentales sin los que este proceso no hubiera tenido lugar.

En primer lugar, me gustaría comenzar dándole las gracias a mi directora de Tesis, Auxi Prieto, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y abrirme las puertas a este mundo tan maravillo que es la investigación. Durante estos años, como sueles decir, hemos aprendido mucho.

Agradecer, también, a los participantes del proyecto Afterlife y la coordinadora María López, porque trabajar en este proyecto me ha ayudado a crecer a nivel profesional. También, a Antonia Rojas y al departamento de escalado, porque la estancia en las instalaciones de Biopolis fue muy enriquecedora. Además, al Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB-CSIC) y a sus servicios, especialmente a Cromatografía de Gases, Resonancia Magnética y Servicio Técnico por las innumerables muestras analizadas y liofilizadas.

Gracias a Los Rubenes por ayudarme a entender el significado de trabajar en grupo. Sobre todo, gracias a aquellos que se dejaron la piel (y las caderas) ensayando conmigo al preparar la Fiesta de Primavera del 2016, 2017 y 2019. Gracias a mis compañeros de grupo, especialmente a los habitantes del 348, por soportar todos mis TOCs y el olor de las aguas residuales. Gracias Sofía, por tu optimismo y por unirte a todos mis experimentos locos. Sin ninguna duda, Vir, gracias infinitas por cada consejo y por cada palabra de apoyo cuando las cosas se complicaban. Sabes tanto como yo que esta Tesis es "nuestra niña". Gracias Cris, Sergio y Roberto, por esos ratitos que nos hacen recordar que, sin ellos, este trabajo no tendría sentido. Junto a San Ortodoxio, hemos remado los cinco en la misma dirección generando lazos que van mucho más allá de la ciencia y que voy a llevar conmigo siempre.

Sara y Lu, Lu y Sara, gracias por recordarme cada día lo bonita que es la vida y que, aunque tengo la suerte de trabajar en algo que me apasiona no te debe arrastrar. Sois mi conexión con el mundo real y estoy segura de que sin vuestro apoyo este proceso hubiera sido mucho más difícil.

Gracias a mis padres, por su educación, por inculcarme el valor del esfuerzo y la constancia, y por confiar siempre en mi valía. A mi padre, por contagiarme de su perfeccionismo e inculcarme la pasión por la naturaleza y la ecología. A mi madre, por ser el motor que me da fuerza en los momentos de flaqueza.

A Jorge, por tantas cosas que no tendría hueco para poder enumerar. Por su apoyo incondicional, por su paciencia infinita, por transmitirme su energía y positividad y, por no dejarme abandonar. Esta Tesis es tan tuya como mía.

Y al final, gracias, a todos aquellos que han formado parte de esta cadena tan bonita que es la ciencia, porque gracias a ellos, mi eslabón ha podido unirse.

ÍNDICE

ABREVIATURAS 1

RESUMEN 5

SUMMARY 8

INTRODUCCIÓN 13

1.1 Los residuos y la economía circular: conceptos, situación actual y desafíos 13

1.2 Valorización de residuos 15

1.3 Producción de bioplásticos a partir de residuos 17

1.3.1 Residuos de origen agro-alimentario 22

1.3.2 Aguas residuales de origen industrial 24

1.3.3 Gas de síntesis como subproducto de la pirolisis o gasificación de residuos sólidos orgánicos 24

1.4 Los bioplásticos 25

1.5 Poliésteres de origen biológico: los PHA y el PLA 29

1.5.1 Características generales de los PHA 30

1.5.2 Propiedades químicas y térmicas de los PHA 31

1.5.3 Microorganismos modelo implicados en la producción de P(3HB) 35

1.5.4 PLA: un polímero compostable procedente de recursos renovables 43

1.5.5 Estrategias de ingeniería metabólica para producir PLA 45

OBJETIVOS 49

MATERIALES Y MÉTODOS 53

3.1 Cepas bacterianas 53

3.2 Medios y condiciones de cultivo 53

3.2.1 *Cupriavidus necator* H16 54

3.2.2 *Rhodospirillum rubrum* 55

3.3 Parámetros de fermentación y control de las condiciones de crecimiento 57

3.3.1 Evaluación de la viabilidad celular 57

3.3.2 Cálculo de la biomasa total 57

3.3.3 Cálculo de la tasa de crecimiento 57
3.3.4 Cálculo de la tasa de productividad 57
3.3.5 Determinación de amonio y fosfato en medios de cultivo 58
3.4 Cultivo de microorganismos en biorreactor 58
3.5 Adaptación evolutiva a escala de laboratorio (ALE) 59
3.6 Técnicas de manipulación de DNA 60
3.6.1 Aislamiento de DNA 60
3.6.2 Secuenciación y análisis de DNA genómico 60
3.7 Técnicas de análisis de proteínas 61
3.7.1 Extracción del proteoma 61
3.7.2 Determinación de la concentración de proteínas 61
3.7.3 Análisis del proteoma 62
3.8 Técnicas de cromatografía analítica 63
3.8.1 Análisis del perfil de consumo/producción de gases por GC-TCD 63
3.8.2 Cuantificación de PHA y análisis de la composición de los monómeros por GC-MS 64
3.8.3 Identificación y determinación de compuestos orgánicos por HPLC 64
3.9 Extracción de poliésteres bacterianos 65
3.10 Resonancia magnética nuclear espectroscópica (RMN) 65
3.11 Caracterización de las propiedades térmicas y mecánicas de poliésteres bacterianos 66
3.12 Microscopía 66
3.12.1 Microscopía óptica 66
3.12.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) 66
3.13 Análisis estadísticos 67
RESULTADOS 73
Capítulo 1. *C. necator* H16 como cepa modelo para la síntesis de poliésteres bacterianos a partir de aguas residuales de la industria alimentaria. 73
4.1 Selección de la cepa *C. necator* H16 para la síntesis de PHA a partir de aguas residuales de la industria alimentaria 74

4.2 Límites de tolerancia a ácidos grasos volátiles 78

4.3 Síntesis de PHA a escala de laboratorio a partir de residuos de origen industrial. 82

4.4 Diseño y optimización de la producción de biopolímeros a escala de 2L mediante la fermentación de aguas residuales. 86

4.4.1 Fermentación discontinua (D) 87

4.4.2 Fermentación semi-continua alimentada por lotes (F) 88

4.5 Caracterización de los biopolímeros producidos a partir de aguas residuales de origen industrial 96

Capítulo 2. Biosíntesis de polímeros derivados de ácido láctico en la estirpe salvaje *C. necator* H16. 103

4.6 Análisis de la producción de P(3HB-*co*-LA) en aguas residuales fermentadas con altos niveles de lactato 104

4.7 Generación de P(3HB-*co*-LA) en un medio de producción definido 113

4.8 Impacto del nitrógeno en la producción de P(3HB-*co*-LA) 119

4.9 Análisis proteómico *shotgun* en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA) 121

4.9.1 Anotación funcional del proteoma 122

4.9.2 Análisis funcional del proteoma 128

Capítulo 3. Adaptación evolutiva de *R. rubrum* para mejorar la síntesis de productos de alto valor añadido a partir de la fotofermentación del *syngas*. 137

4.10 Diseño experimental y establecimiento de las condiciones de fotofermentación del *syngas* 138

4.10.1 Determinación de la concentración de CO para el proceso de ALE 139

4.10.2 Determinación del tiempo de crecimiento para el proceso de ALE 146

4.11 Adaptación evolutiva y aislamiento de las variantes con capacidades metabólicas mejoradas para el crecimiento en *syngas* 148

4.12 Caracterización fenotípica de las variantes con capacidades metabólicas mejoradas para el crecimiento en *syngas* 150

4.13 Análisis del genoma de las variantes evolucionadas: reordenamiento, alineamiento e identificación de polimorfismos 157

4.14 Análisis del proteoma en condiciones de crecimiento fotoheterotrófico 160

DISCUSION 169

5.1 *C. necator* H16, un catalizador robusto para la valorización de efluentes derivados de la AD de aguas residuales. 171

5.2 Valorización de efluentes enriquecidos en ácido láctico para la síntesis de copoliésteres de PLA 180

5.3 Domesticación de *R. rubrum* para la producción de PHA a partir de *syngas* y ácido acético 186

6. CONCLUSIONES 198

7. BIBLIOGRAFÍA 202

8. ANEXOS 223

Material suplementario del Capítulo 1 223

Material suplementario del Capítulo 2 224

Material suplementario del Capítulo 3 233

ABREVIATURAS

A continuación, se muestra el significado de las abreviaturas utilizadas en esta Tesis Doctoral en orden alfabético. Se ha mantenido la abreviatura en inglés de los términos más utilizados en la comunidad científica. Se muestra entre paréntesis el significado de las siglas correspondientes.

2HA	2-hidroxialcanoatos
2HB	Ácido 2-hidroxibutírico
3HB	Ácido 3-hidroxibutírico
3MB	Ácido 3-metilbenzoico
Aa	Aminoácido
AD	Digestión anaerobia (*anaerobic digestion*)
AE	Adaptación evolutiva
ALE	Adaptación evolutiva a escala de laboratorio
ASTM	Sociedad Estadounidense para pruebas y materiales
ATCC	Medio de levaduras de Van Niel
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)
CB	Cobertura
CDW	Peso seco celular (*cell dry weight)*
CFU	Unidad formadora de colonia (*colony forming unit*)
CMM	Cultivos mixtos microbianos
C/N	Ratio carbono/nitrógeno
CO	Monóxido de carbono
Cp	Capacidad calorífica
D	Fermentación discontinua
DML	Desplazamiento del marco de lectura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (*differential scanning calorimetry*)
DSMO	Dimetilsulfóxido

ED	Ruta de Entner-Doudroff
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EEA	Agencia Europea del medio ambiente
EM-CoA	Ruta del etilmalonil-CoA
F	Fermentación semi-continua
FAB	Fermentación acoplada a la producción de biomasa
FAP	Fermentación alimentada por pulsos
FAC	Fermentación a caudal constante
FAVC	Fermentación con alimentación acoplada a la producción de biomasa a volumen de trabajo constante
FT	Fisher-Tropsch
FV	Frecuencia de variación
GAPS	Proteínas asociadas al granulo (*granule associated proteins*)
GO	Ontología génica (*gene ontology*)
CBB	Ciclo de Calvin-Benson-Bassham
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GEI	Gases de efecto invernadero
GPC	Columna de permeación en gel (*gel permeation chromatography*)
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HV	Hidroxivalerato
IS	Secuencias de inserción (*insertion sequence*)
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
LA	Ácido láctico
LA-CoA	Lactoil-CoA
LB	Medio de cultivo de Luria y Bertani
LCB	Bloque colinear (*locally colinear block*)
LPE	Polimerasa de lactato (*lactate polimerizing enzyme*)
M_n	Peso molecular medio en número
M_w	Peso molecular medio en peso
NB	Nutrient Broth

OD	Densidad óptica (*optical density*)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBAT	Polibutilén adipato-*co*-tereftalato
PBS*	Tampón fosfato salino
PBS	Succinato de polibutileno
PCL	Policaprolactona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pct	Propionil-CoA transferasa
PDA	Detector de matriz de fotodiodo
PDI	Índice de polidispersidad
PE	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
PHA	Polihidroxialcanoatos
PhaC	PHA polimerasa
scl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena corta
mcl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena media
P(3HB)	Polihidroxibutirato
P(3HB-*co*-3HV)	Polihidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato
P(3HB-*co*-LA)	Polihidroxibutirato-*co*-lactato
P(3HO)	Polihidroxioctanoato
P(3HO-co-HHx)	Polihidroxioctanoato-*co*-hidroxihexanoato
PLA	Ácido poliláctico
PP	Polipropileno
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
PS	Poliestireno
PTS	Sistema fosfotransferasa (*phosphotransferase system*)
PVC	Cloruro de polivinilo
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
(R)-HA	Ácido (*R*)-3-hidroxicarboxílico
RID	Índice de refracción

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RR	*Rhodospirillum rubrum* RR02_01
RRNCO	Medio mineral *R. rubrum* (*R. rubrum no-light carbon monoxide*)
SAPEA	Science Advice for Policy by European Academies
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNP	Polimorfismo puntual (*single nucleotide polymorphisms)*
SM	Medio Schlegel modificado
SMN	Medio Schlegel sin nitrógeno
SYN	Medio mineral derivado del RRNCO
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TCD	Detector de conductividad térmica
T_C	Temperatura de degradación térmica
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
T_g	Temperatura de transición vítrea
T_m	Temperatura de fusión
TPS	Almidón termoplástico
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VFAs	Ácidos volátiles grasos (*volatile fatty acids*)
vvm	Volumen de aire por medio

RESUMEN

El aumento de la población y de la demanda de productos, combinado con la escasa gestión de los residuos generados desde la industrialización, ha promovido la acumulación de una cantidad devastadora de desechos generando una huella ecológica imborrable en nuestro planeta. Un ejemplo especialmente relevante es el aumento de los residuos plásticos de origen petroquímico, así como todos los problemas medioambientales derivados del uso de combustibles fósiles en su producción, y los problemas de contaminación que generan debido a su resistencia a la biodegradación. Como consecuencia, se ha promovido un cambio de paradigma en la manera de producir y gestionar los residuos, estableciendo estrategias basadas en la economía circular. Específicamente en el caso de los materiales plásticos, se plantean dos objetivos principales: (I) cambiar la gestión de los residuos de los plásticos de origen petroquímico, (II) y tornar la producción hacia alternativas sostenibles basadas en la obtención de materiales plásticos biodegradables a través de la revalorización de residuos y la utilización de materias primas renovables.

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el contexto del proyecto europeo "AFTERLIFE" (*Advanced Filtration TEchnologies for the Recovery and Later conversIon of relevant Fractions from wastEwater*), donde se propone el desarrollo de un proceso flexible y eficiente a través del cual se puedan recuperar y revalorizar diferentes fracciones del agua residual de origen agro-industrial. En este contexto, y en el primer capítulo de esta memoria, *Cupriavidus necator* H16 ha sido seleccionada para la transformación de ácidos grasos volátiles (VFAs), derivados de la digestión anaerobia (AD) de las aguas residuales, en bioplásticos de origen bacteriano o polihidroxialcanoatos (PHA). A través de la caracterización de las materias primas y del estudio de los límites de tolerancia a los componentes mayoritarios del residuo, se maximizó la producción de PHA en un biorreactor a una escala de 2L. Aplicando una estrategia de alimentación acoplada a la producción de biomasa y la tasa específica de consumo de las fuentes de carbono disponibles en el residuo, se alcanzó una acumulación de PHA del 80 % (p/p) en relación al peso seco de la biomasa y una productividad de 0,8 $g^{-1}L^{-1}h^{-1}$. Además, mediante el análisis la composición monomérica y de las propiedades térmicas de los polímeros obtenidos, se determinó la influencia del modo de operación sobre las características finales del material. Las estrategias de producción basadas en la alimentación continua de fuente de carbono aumentan tanto el peso molecular como la temperatura de fusión, mientras que las

estrategias de alimentación discontinuas disminuyen dicha temperatura. Estas propiedades determinan las aplicaciones que se podrían derivar de estos bioplásticos.

En el segundo capítulo se ahonda en un resultado obtenido durante la puesta a punto del bioproceso de producción de bioplásticos a partir de un residuo rico en ácido láctico. En este caso, se observó la acumulación del copolímero polihidroxibutirato-*co*-lactato (P(3HB-*co*-LA)) en la estirpe parental *C. necator* H16, sólo descrita previamente en la literatura en cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *C. necator* modificadas genéticamente. A través de una estrategia de incubación de células quiescentes en un medio de producción definido, y utilizando únicamente lactato como precursor, se consiguió modular la composición monomérica del polímero obteniéndose un panel de poliésteres con un rango entre 20-90 % de ácido láctico. Asimismo, mediante el estudio del proteoma de *C. necator* H16 en condiciones de producción, se estudiaron las proteínas cuya producción estaba aumentada durante la síntesis del copolímero. Se detectaron 17 proteínas posiblemente involucradas en la síntesis de P(3HB-*co*-LA), donde destacan una L-lactato permeasa (Llp2), responsable del transporte de lactato al interior celular, y dos proteínas anotadas como posibles subunidades α y β de una CoA transferasa (Pct) que, de acuerdo a lo descrito en la literatura para proteínas similares, catalizaría la conversión del lactato en lactoil-CoA, siendo el paso crucial para su incorporación en el polímero a través de una reacción catalizada por la PHA sintasa (PhaC) de *C. necator* H16. Este estudio sirve como punto de partida para dilucidar las posibles rutas metabólicas implicadas en el proceso con el fin de diseñar estrategias de ingeniería metabólica que permitan maximizar el rendimiento.

En el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral se aborda la revalorización del gas de síntesis o *syngas.* El *syngas* se puede obtener a partir de efluentes industriales gaseosos y mediante procesos de pirólisis y/o gasificación de residuos complejos cuando otros métodos de pretratamiento no son eficaces. El proceso que se desarrolla está basado en la capacidad de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* para generar PHA a partir de *syngas*. Inicialmente se establecieron las mejores condiciones de fermentación del *syngas* en *R. rubrum.* Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de adaptación evolutiva a escala de laboratorio (ALE) durante aproximadamente 200 generaciones, dando lugar a una librería de variantes evolucionadas con un aumento en la velocidad de crecimiento y producción de biomasa del 22 y 60 %, respectivamente, en comparación con la cepa parental RR02_01. Mediante la caracterización fisiológica de cinco aislados diferentes, se seleccionaron dos variantes con capacidades metabólicas mejoradas para la síntesis de PHA. Además, en condiciones de crecimiento fotoheterotrófico, usando *syngas* y ácido acético como co-sustrato, se observó una disminución muy significativa de la fase de latencia en estas variantes concomitante a

un aumento de la asimilación de ácido acético y la acumulación de PHA. Mediante el análisis del proteoma de ambas variantes se identificó la ruta del etilmalonil-CoA (EM-CoA) como la vía principal del metabolismo central a través de la cual se asimila el ácido acético en esta bacteria.

SUMMARY

The market development, the population increase, and the poor management of the residues generated since industrialization have fostered the accumulation of an immense amount of waste, provoking an indelible ecological footprint. In this regard, the increase of plastic residues from a petrochemical origin comes with specific problems such as their long residence in ecosystems due to their recalcitrant character, or the mobilization of the carbon from fossil fuels consumed in their production, and the pollution problems they generate due to their resistance to biodegradation. All combined has promoted a paradigm shift in the way of producing and managing waste, establishing strategies based on the circular economy. Specifically, in the case of plastic materials, two main objectives are posed by implementing circular economy strategies: (I) changing the management of plastic waste from a petrochemical origin, and (II) turning production towards sustainable alternatives based on the obtention of biodegradable plastic materials through waste revalorization and the use of renewable raw materials.

This Doctoral Thesis has been carried out in the context of the European project "AFTERLIFE" (Advanced Filtration Technologies for the Recovery and Later conversion of relevant Fractions from wastEwater) where the development of a flexible and efficient process is proposed for the recovery and revalorization of different fractions from wastewater of agro-industrial origin. In this context, and the first chapter of this report, the bacterium *Cupriavidus necator* H16 was selected for the transformation of volatile fatty acids (VFAs), derived from the anaerobic digestion (AD) of wastewater, into bioplastics from microbial origin or polyhydroxyalkanoates (PHA). Through the characterization of the raw materials and the study of the tolerance limits to the major components of the waste, the production of PHA was maximized in a bioreactor at a scale of 2 L. Applying a strategy of feeding coupled to biomass production and specific uptake rate of the carbon sources available in the wastewater, a PHA accumulation of 80 % (w/w) was achieved with respect to the biomass dry weight, as well as a 0.8 $g^{-1}L^{-1}h^{-1}$ yield. Besides, through the analysis of mechanical and thermal properties of the resulting polymers, the influence of the operation mode on the final features of the material was determined. The production strategies based on fed-batching the carbon source increased both the molecular weight and the fusion temperature of the polymer. However, batch strategies, in which the system is not modified during the bioprocess, diminished such temperature. These properties determine the applications that could be derived from these bioplastics.

The second chapter delves into a result obtained during the fine-tuning of the bioprocess for the production of bioplastics from a residue rich in lactic acid. In this case, the accumulation of the polyhydroxybutyrate-*co*-lactate copolymer (P(3HB-*co*-LA)) was observed in the wild-type strain *C. necator* H16, only previously described in the literature in modified bacterial strains of *Escherichia coli* and *C. necator*. Through a strategy of quiescent cells incubation in a defined medium, and using L-lactate as a precursor in the polymer production, the monomer composition of the polyester was modulated ranging 20-90 % lactic acid. Likewise, the enzymatic activities taking part in the co-polymer synthesis were unveiled by studying the bacterial proteome in the production conditions. Seventeen proteins were detected with a possible involvement in (P(3HB-*co*-LA)) synthesis, with the special relevance of an L-lactate permease (Llp2), responsible for the lactate transport into the cell, and two proteins annotated as possible α and β subunits of a CoA transferase (Pct) which, according to what is described in the literature for similar proteins, would catalyze the conversion of lactate to lactyl-CoA, the crucial step for its incorporation into the polymer in a reaction catalyzed by the PHA synthase (PhaC) of *C. necator* H16. This study will serve as a starting point to elucidate the possible metabolic routes involved in this process and therefore apply genetic engineering strategies to maximize its yield.

The third chapter deals with the revaluation of synthesis gas or *syngas*. *Syngas* can be obtained from gaseous industrial effluents and by pyrolysis and/or gasification processes of complex waste when other pretreatment methods are not effective. The developed process is based on the ability of the bacterium *Rhodospirillum rubrum* to generate PHA from *syngas*. For this, the best fermentation conditions of the *syngas* were initially established in *R. rubrum*. Subsequently, an evolutionary adaptation process was carried out on a laboratory scale (ALE) for approximately 200 generations, giving rise to a library of evolved variants with an increase in growth speed and biomass production of 22 and 60 %, respectively, compared to the parental strain. From five physiologically characterized isolates, two variants were selected that had enhanced metabolic abilities for the synthesis of PHA. Moreover, in heterotrophic growth conditions, and using *syngas* and acetic acid as a co-substrate, a very significant decrease in the latency phase was observed in these variants, concomitant with an increase in the assimilation of acetic acid and the accumulation of PHA. By analyzing the proteome of these variants, the ethylmalonyl-CoA pathway (EM-CoA) was identified as the main pathway of central metabolism through which acetic acid is assimilated in this bacterium.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1 Los residuos y la economía circular: conceptos, situación actual y desafíos

La gestión de los residuos es un proceso esencial para el mantenimiento sostenible de las ciudades y el cuidado del medioambiente en nuestra sociedad. El volumen de desechos generados, su composición y la manera en la que se gestionan influye directamente en la huella ecológica que generan. En este sentido y según el último informe del Banco Mundial "*What a waste* 2.0", publicado en 2018, se deben adoptar medidas urgentes para evitar que la generación de residuos en 2050 incremente hasta un 70 % con respecto a los niveles actuales (Geyer et al., 2017; Kaza et al., 2018).

La producción y acumulación de residuos aumentó exponencialmente a partir de la industrialización, el crecimiento de los mercados, la rápida urbanización, y el aumento de la población (Figura 1). Desde entonces, el modelo productivo se ha ajustado a la demanda de la sociedad, facilitando algunas actividades de la vida cotidiana y aumentando el desecho. Además, durante el siglo pasado se incorporaron nuevos materiales al sistema como los plásticos de origen sintético, desplazando al metal, el papel y el vidrio. Desde ese momento, la mala y escasa gestión de estos residuos ha provocado diversos problemas ambientales como la contaminación de suelos, de aguas superficiales y acuíferos por lixiviados, y un aumento en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (Geyer et al., 2017; Naser et al., 2021).

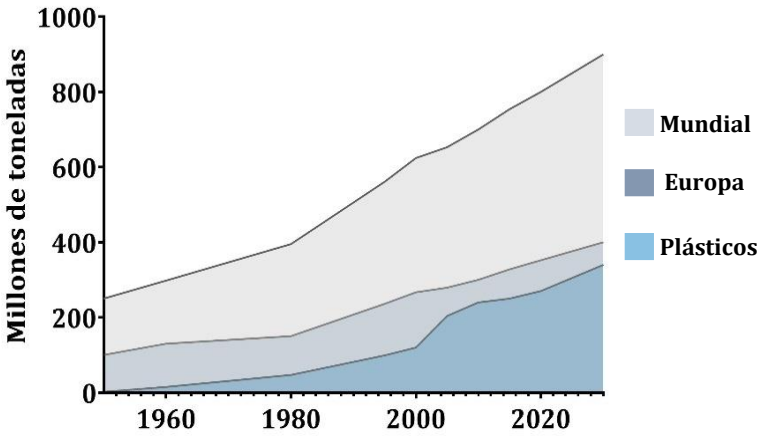


Figura 1. Evolución y previsión anual de la generación de residuos en el mundo. Los datos se muestran en millones de toneladas desde el año 1950 hasta una previsión en 2030. Fuentes: Foro Económico Mundial y Agencia Europea del medio ambiente, 2020 (EEA).

En la actualidad, el plástico es un material indispensable en nuestra economía, contribuyendo a una vida más práctica y eficiente. Gracias a su funcionalidad y excelentes características (bajo costo, poco peso, permeabilidad y durabilidad), desde su invención a mitad del siglo XIX hasta nuestros días, la sociedad se ha beneficiado de su uso y ha podido abordar diferentes retos como, por ejemplo, mejorar la seguridad alimentaria, desarrollar transportes más eficientes, y facilitar tratamientos y procesos quirúrgicos en el ámbito sanitario. Sin embargo, desde 1960 su consumo ha aumentado exponencialmente alcanzando en 2019 una producción global de casi 370 millones de toneladas, siendo el embalaje y la construcción los sectores más demandantes con casi un 60 % del total de la producción (ONU Medio Ambiente, 2018; Plastics Europe, 2020). Desgraciadamente, la producción masiva de plásticos de origen petroquímico y la mala gestión de sus residuos tienen un gran impacto ambiental, siendo la acumulación de sus residuos en vertederos y océanos una gran amenaza para el mantenimiento de la biodiversidad. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas iniciativas de producción y reciclaje, complementadas con actividades educativas que favorezcan la concienciación social y la generación de nuevas normativas de carácter ecológico, son pasos imprescindibles para construir un sistema de producción y gestión de residuos plásticos basado en la economía circular.

El concepto de economía circular fue impulsado por Ellen MacArthur en 2010. Bajo la propuesta de maximizar el valor de los materiales utilizados reduciendo los residuos al mínimo, este cambio de paradigma ha escalado posiciones entre los sectores económicos más importantes a nivel mundial. Desde 2015, la Unión Europea (UE) ha intentado promover un cambio en el modelo de gestión de residuos actual, adoptando ese mismo año el primer plan de acción de economía circular. Este plan tenía como objetivo fomentar el crecimiento económico sostenible estableciendo acciones concretas a lo largo del ciclo de vida de los productos desde su producción, pasando por el consumo y hasta la gestión de sus residuos. En 2018 se presentó la Estrategia europea para el plástico en una economía circular (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=COM:2018:28:FIN) con el objetivo de transformar la manera en que los plásticos y sus productos derivados son diseñados, producidos, usados y reciclados en la UE. Posteriormente, en 2020 se adoptó un nuevo plan de acción como pilar principal dentro del Pacto Verde Europeo (https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en), siendo ampliado en febrero de 2021 con medidas adicionales para avanzar hacia una economía neutra en carbono, sostenible, libre de tóxicos y completamente circular en 2050. En España, el proyecto de Ley de Residuos y Suelos Contaminados, revisa la actual normativa de 2011 para cumplir los nuevos objetivos de residuos establecidos en las

directivas de la UE que conforman el Paquete de Economía Circular. Destacan las restricciones a los plásticos de un solo uso, la recogida separada y reciclado y la regulación de los suelos contaminados. Su aplicación está prevista a partir del 1 de enero de 2023.

Los datos de mercado muestran como desde el año 2006 la cantidad de residuos plásticos reciclados en Europa ha aumentado un 92 %. Por ejemplo, a lo largo del 2019, se recogieron 30 toneladas de residuos plásticos en el continente europeo, de los cuales solo fueron susceptibles de ser sometidos a un proceso de reciclaje el 25 %, depositándose el 75 % restante en vertederos (Plastics Europe, 2020). Además del incremento de las emisiones de GEI debido a la movilización del carbono que forma parte de los combustibles fósiles que se usan para su producción, la acumulación de estos materiales en el medio ambiente y su resistencia a la degradación agrava los problemas de contaminación que ocasionan. El principal impacto se encuentra en la contaminación de mares y océanos, representando una gran amenaza para la biodiversidad marina, ya que el bajo peso de los productos plásticos promueve su desplazamiento por las corrientes subterráneas ríos y océanos. El informe presentado en 2021 sobre el impacto de la basura marina en la pesca por el Parlamento Europeo (https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2021-0030_ES.html) considera que los residuos flotantes en la superficie suponen solo un 1 % del total de plástico presente en los océanos y estima que cada día se vierten 730 toneladas de residuos al mar Mediterráneo, convirtiéndolo en uno de los más contaminados del mundo.

En este contexto, el desafío principal no es solo cambiar la gestión de los residuos plásticos de origen petroquímico sino tornar la producción hacia alternativas sostenibles basadas en la obtención de materiales plásticos más ecológicos a través de la revalorización de residuos.

1.2 Valorización de residuos

La acumulación de residuos es una consecuencia directa de la urbanización, desarrollo económico y crecimiento de la población. En todo el planeta, más del 40 % de los residuos se acumulan en vertederos de forma que sólo se recicla y composta un 20 %. La composición y la gestión de estos residuos varía en función del nivel de ingresos medio de la población residente, disminuyendo el porcentaje en materia orgánica y aumentando la regulación sobre su almacenamiento en las zonas con más renta *per cápita*. En términos generales, los desechos alimentarios, desperdicios agrícolas, gomas y plásticos suponen un 73 % del total, y la acumulación en vertederos y en zonas no controladas son las prácticas más habituales (Figura 2).

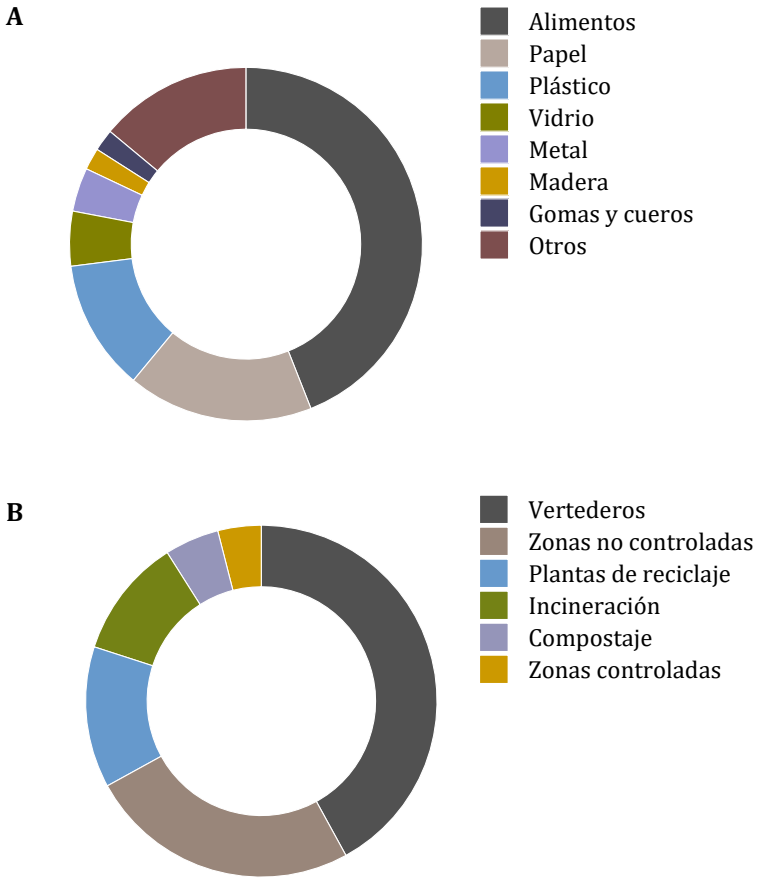


Figura 2. Composición y tratamiento de los residuos a nivel global. A) Composición habitual de los residuos globales. B) Tratamiento de los residuos globales. Fuente Banco Mundial, 2018.

En este sentido, la valorización de residuos es una herramienta que disminuye su acumulación a través de su reutilización como materia prima en otros procesos. De acuerdo con la Directiva 2018/851 del Parlamento Europeo, la valorización se define como "la operación cuyo resultado principal es que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales que, de otro modo, se habrían fabricado solo para cumplir una función particular". A pesar de que el concepto de valorización existe desde hace mucho tiempo, la implementación de nuevos protocolos en la gestión de residuos ha relanzado esta práctica.

Actualmente existen diferentes técnicas de valorización de residuos respetuosas con el medio ambiente y la aplicación de unas u otras está determinada en gran medida por la naturaleza del desecho (Ferronato et al., 2019). Dentro de las técnicas físico-químicas, una de las estrategias más prometedoras es la química en flujo continuo, donde las reacciones químicas se ejecutan de forma secuencial ofreciendo más flexibilidad para modificar las condiciones a lo largo del curso de una reacción. Un ejemplo lo constituye la valorización de las materias primas derivadas de la biomasa, donde la composición química de los productos iniciales es muy diferente a la de los productos finales, necesitando múltiples

pasos de procesamiento intermedios. La utilización de procesos de flujo continuo permite, a diferencia del procesamiento por lotes, regenerar el catalizador después de cada reacción, dando lugar a un alto rendimiento. Por otro lado, durante la mayoría de procesos por lotes se requieren pasos para eliminar el oxígeno, ya que este compuesto se suele acumular en los reactores provocando un aumento de la presión. En cambio, durante un proceso de flujo la eliminación del oxígeno es continua, evitando interferencias con el proceso catalítico principal. Además, su facilidad de escalado permite valorizar compuestos altamente estables y recalcitrantes como la lignina, con un gasto energético inferior a otras metodologías al reducir los pretratamientos necesarios tales como la trituración, la lisis química o los tratamientos térmicos (Den et al., 2018; Serrano-Ruiz et al., 2012). Adicionalmente, englobados también dentro del grupo de tratamientos físico-químicos, se encuentran los métodos térmicos como la pirólisis y gasificación. Ambos se basan en un proceso de combustión y permiten la degradación de una gran variedad de residuos generando gas de síntesis o *syngas*. Durante el proceso de pirólisis los desechos se degradan térmicamente casi ausencia de aire. Sin embargo, la gasificación es un proceso en el que los materiales se degradan en presencia de una baja concentración de oxígeno, que no permite que se produzca la combustión (Beneroso et al., 2014a; Luque et al., 2012).

Por otro lado, los métodos de valorización basados en procesos biotecnológicos implican el uso de enzimas y/o microorganismos en procesos como la digestión anaerobia (AD, de *anaerobic digestion*), que consiste en la transformación de la materia orgánica en compuestos inorgánicos y gaseosos en ausencia de oxígeno (Lin et al., 2019).

Por último, la bioconversión o biotransformación es uno de los avances más significativos dentro del campo de la valorización de residuos, combinando el control de las rutas metabólicas de los microorganismos para desarrollar procesos sostenibles para la producción de compuestos de alto valor añadido como los bioplásticos (Tsang et al., 2019).

1.3 Producción de bioplásticos a partir de residuos

Actualmente, los termoplásticos como el tereftalato de polietileno (PET), el polietileno (PE), el polipropileno (PP) y el poliestireno (PS) representan un 60 % de la demanda total de plástico en Europa. Aunque, a día de hoy, la industria química tiene un papel predominante en la producción de plásticos, la demanda de polímeros de base biológica, conocidos como bioplásticos, ha aumentado en todo mundo durante los últimos años. A pesar de que todos los bioplásticos se producen a partir de fuentes renovables, solo algunos

pueden ser producidos de forma biológica por microorganismos, entre los que destacan los polihidroxialcanoatos (PHA) (Ver apartado 1.5 de la Introducción para saber más detalles sobre este tipo de bioplásticos). En este contexto, la producción biológica de PHA a partir de residuos ricos en materia orgánica es un campo en el que se han realizado múltiples esfuerzos. Por un lado, se ha intentado aumentar el rendimiento del proceso mediante estrategias basadas en ingeniería metabólica y de bioprocesos, incluyendo el uso de cultivos mixtos microbianos (CMM) que reducen considerablemente los costes de operación, mientras que también, se ha estudiado el empleo de fuentes de carbono de bajo coste y el desarrollo de procesos de extracción más eficientes (Kourmentza et al., 2017; Nikodinovic-Runic et al., 2013).

En la producción de polímeros de origen bacteriano pueden utilizarse como materia prima una amplia gama de residuos y subproductos industriales generados en diferentes etapas de los ciclos de producción (Figura 3) (Nikodinovic-Runic et al., 2013). A pesar de que estos procesos están ampliamente aceptados como una estrategia viable, existen algunos obstáculos a considerar que son específicos de cada proceso, ya que dependen del residuo a utilizar en particular y del polímero que se quiera producir. La composición, las características físico-químicas del residuo y la selección del cultivo influyen notablemente en el rendimiento del proceso. Además, un suministro constante de residuo en cuanto a su cantidad y calidad, su estabilidad y facilidad de almacenamiento son requerimientos esenciales para ser considerados sustratos viables en la producción de PHA (Arcos-Hernandez et al., 2013; Rodriguez-Perez et al., 2018). Por último, factores como la concentración de carbono y la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano en las materias primas son determinantes a la hora de establecer los parámetros del bioproceso.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los rendimientos obtenidos en la producción biológica de PHA a partir de diferentes tipos de residuos.

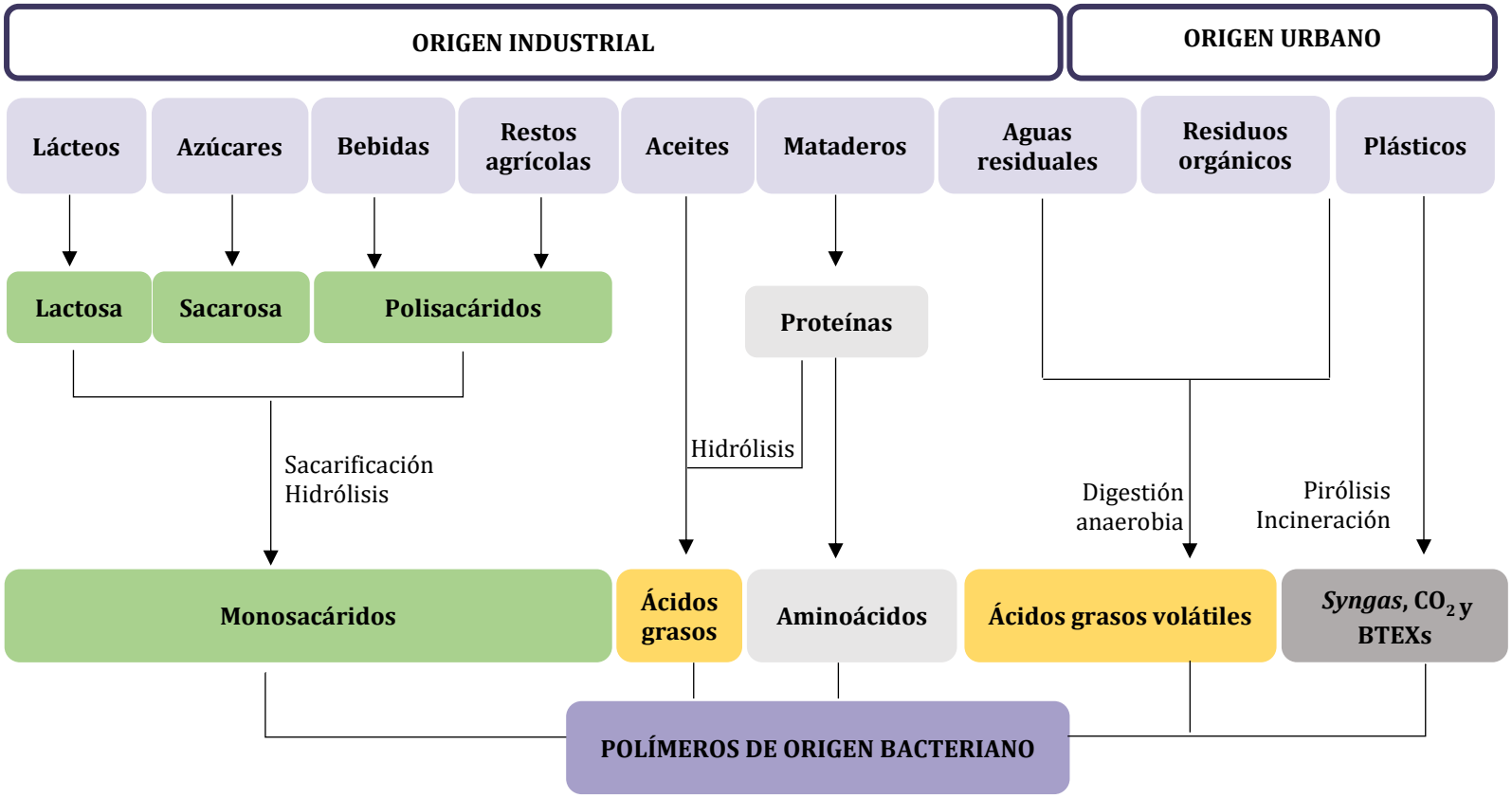


Figura 3. Diagrama resumen de los diferentes tipos de residuos de origen industrial y urbanos utilizados para la producción de polímeros bacterianos. Los colores de los recuadros indican el porcentaje mayoritario de fuente de carbono en la composición: verde (hidratos de carbono), amarillo (lípidos y ácidos grasos), gris claro (aminoácidos) y gris oscuro (compuestos recalcitrantes). Se indican los procesos o tratamientos necesarios para convertir los residuos en sustratos asimilables por las bacterias. BTEX: acrónimo de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (Modificado de Blanco et al., 2021).

Origen del residuo	Microorganismo	Productividad ($g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$)	Polímero	Referencia
Suero de leche				
	Alcaligenes latus	2,6	P(3HB)	(Berwig et al., 2016)
	Caulobacter segnis	4,6	P(3HB)	(Bustamante et al., 2019)
	Haloferax mediterranei	4,0	P(3HB)	(Pais et al., 2016)
	Cupriavidus necator DSM 545 (R)	0,8	P(3HB)	(Povolo et al., 2010)
Melaza de caña				
	Pseudomonas	2,2	(PHO-*co*-HHx)	(Chaudhry et al., 2011)
	Bacillus megaterium BA-019	30,5	P(3HB)	(Kulpreecha et al., 2009)
	CMM	10,9	*mcl*-PHA	(Albuquerque et al., 2010)
Restos agrícolas				
Vinaza	*H. mediterranei*	5,0	P(3HB-*co*-3HV)	(Pramanik et al., 2012)
Bagazo	*C. necator*	3,2	P(3HB)	(Yu & Stahl, 2008)
Pulpa de uva	*P. putida* KT2440	1,2	P(HO-*co*-HHx)	(Follonier et al., 2015)
Paja de arroz	*B. cepacecea* USM	1,9	P(3HB)	(Heng et al., 2017)
Aceites				
Sésamo	*C. necator* H16	31,3	P(3HB)	(Follonier et al., 2015; Yu & Stahl, 2008)
Girasol	*C. necator* H16	35,0	P(3HB)	(Follonier et al., 2015; Yu & Stahl, 2008)
Canola	*C. necator* ATCC 17699	10,9	P(3HB)	(López-Cuellar et al., 2011)
Palma	*C. necator* H16	4,2	P(3HB)	(Kamilah et al., 2018)
Domésticos	*P.aeruginosa* 42A2	0,8	P(3HB)	(Fernández et al., 2005)

Continuación Tabla 1.

Origen del residuo	**Microorganismo**	**Productividad ($g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$)**	**Polímero**	**Referencia**
Agua residual				
Procesamiento de frutas	*Halomonas* i4786	1,8	P(3HB)	(Elain et al., 2016)
Agua residual fermentada				
Municipal	Lodos activos	1,4	P(3HB-*co*-3HV)	(Campanari et al., 2014)
Ind. papelera	Lodos activos	3,0	P(3HB-*co*-3HV)	(Farghaly et al., 2017)
Ind. azucarera	*Plasticicumulans acidivorans*	0,1 (g PHA/g VSS)	P(3HB-*co*-3HV)	(Tamisa et al., 2014)
Residuos urbanos	Lodos activos	0,7 (g PHA/g VSS)	P(3HB-*co*-3HV)	(Moretto et al., 2020)
Lodos de aguas residuales	Lodos activos	8,6	*scl*-PHA	(Valentino et al., 2019)

Tabla 1. Ejemplos de producción de PHA a partir de residuos de origen industrial y urbano. Abreviaturas: CMM (Cultivos mixtos microbianos); R (cepa bacteriana recombinante); P(3HB) (polihidroxibutirato); P(3HB-*co*-3HV) (polihidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato); P(HO-*co*-HHx) (polihidroxioctanoato-*co*-hidroxihexanoato); *scl*-PHA (PHA de cadena corta) y *mcl*-PHA (PHA de cadena media). La productividad se muestra en $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$.

1.3.1 Residuos de origen agro-alimentario

Los residuos de origen agro-alimentario incluyen una gran variedad de desechos. De forma general, tienen una composición compleja e indefinida y, por lo tanto, en función de su composición, concentración y pureza requieren un tratamiento previo a su utilización (Brigham & Riedel, 2019). Estos pretratamientos representan una primera etapa basada en diferentes pasos mecánicos, físicos y químicos que solubilizan las fracciones orgánicas complejas para aumentar su biodisponibilidad durante las etapas posteriores (Figura 4) (Battista et al., 2019). A continuación, se aplica un tratamiento biológico, siendo la AD uno de los más utilizados para producir biogás (CH_4) y ácidos orgánicos volátiles (VFAs, de *volatile fatty acids*) (Strazzera et al., 2018). Aunque la AD puede ser llevaba a cabo tanto por cultivos puros como por CMM, los CMM tienen varias ventajas, ya que no necesitan condiciones estériles y pueden metabolizar un amplio espectro de moléculas afrontando sustratos de composición heterogénea (Strazzera et al., 2018).

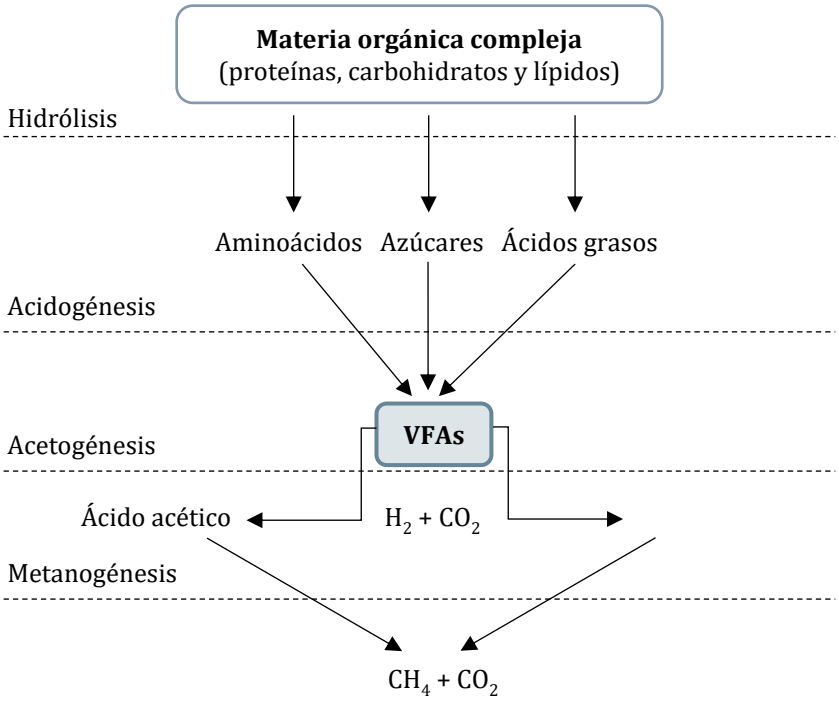


Figura 4. Esquema del proceso de digestión anaerobia (AD) mediante la cual se produce la bioconversión de los residuos ricos en materia orgánica en biogás y VFAs. La hidrólisis y la acidogénesis son los primeros pasos en los que los polímeros presentes en la materia orgánica compleja se reducen a monómeros solubles que se fermentan mediante CMM produciendo VFAs, H_2 y CO_2 como compuestos mayoritarios (Ramos-Suarez et al., 2021; Strazzera et al., 2018).

En la actualidad, uno de los residuos alimentarios más interesantes es el suero de leche, no solo por su alto contenido en lactosa, proteínas, vitaminas hidrosolubles y minerales que permiten el crecimiento microbiano, sino también por su alta disponibilidad y por no necesitar un tratamiento previo a su revalorización (Girotto et al., 2015). Aunque algunos de los microorganismos productores de PHA, como por ejemplo *C. necator*, no pueden metabolizar directamente los componentes del suero, el desarrollo de nuevas estrategias basadas en hidrolizar el suero en glucosa y galactosa permiten obtener rendimientos competitivos con las fuentes de carbono utilizadas tradicionalmente (Povolo et al., 2010). Por otro lado, el aceite de origen vegetal ha demostrado ser una buena materia prima para la producción de PHA ya que, tanto los aceites domésticos como los industriales, generalmente, no requieren tratamiento previo y se pueden agregar directamente al medio de cultivo como fuente de carbono (Nielsen et al., 2017). Por ejemplo, usando el aceite de girasol se ha alcanzado una producción de hasta 35 $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$ de P(3HB) seguido del aceite de sésamo con 31 $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$ de P(3HB) (Tabla 1). Asimismo, se ha comprobado el potencial de los residuos de la industria azucarera donde uno de los principales componentes de esta corriente de residuos es la melaza, un subproducto viscoso resultante del refinado de la caña de azúcar o la remolacha azucarera. La melaza contiene muchos azúcares, hasta un 50 % de sacarosa, y otros nutrientes, incluidos ácidos orgánicos, vitaminas y minerales con un bajo contenido de nitrógeno. Todas estas características hacen que estos desechos sean adecuados para lograr una producción de PHA de hasta 30 $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$ de P(3HB) mediante cultivos puros de *B. megaterium* (Tabla 1) (Desouky et al., 2017; Nielsen et al., 2017). El bagazo es otro derivado de la industria azucarera, cuya composición es muy similar a la de la madera. Se genera como desecho de la caña de azúcar una vez que se extrae el jugo azucarado. Actualmente se utiliza como biocombustible, y como materia prima para papel y relleno para materiales de construcción, pero se han demostrado sus posibilidades como sustrato adecuado para la producción de biopolímeros llegando a obtener hasta 3 $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$ de P(3HB) en *C. necator* (Tabla 1). No obstante, el bagazo y otros carbohidratos similares como la xilosa, requieren un pretratamiento basado en reacciones químicas a elevadas temperaturas que generan hidrolizados inhibidores del crecimiento de los microorganismos, como el furfural (Yu & Stahl, 2008). En este sentido, la sacarificación es una alternativa a los métodos químicos, que requiere únicamente un pretratamiento suave para hacer que la biomasa sea susceptible de hidrolisis enzimática (Navarro et al., 2018; Zhang et al., 2018). Finalmente, la producción de PHA utilizando vinazas, el residuo de la producción de etanol a partir de la melaza, solo se ha logrado mediante arqueas extremadamente halófilas como *Haloarcula marismortui* y *Haloferax mediterranei*, debido a su resistencia a los compuestos fenólicos contenidos en este sustrato con una producción

máxima de 5 g·L^{-1}·$día^{-1}$ de P(3HB-*co*-3HV) (Tabla 1) (Bhattacharyya et al., 2012; Pramanik et al., 2012).

1.3.2 Aguas residuales de origen industrial

Desde su origen, el objetivo del tratamiento de aguas residuales siempre ha sido eliminar los contaminantes para proteger la salud humana y el medio ambiente. Sin embargo, en el contexto de la economía circular y la sostenibilidad, el agua residual es además un recurso excelente, ya que la presencia de cultivos microbianos en las depuradoras reduce el costo de la generación de productos de valor añadido a la vez que favorece la eliminación y depuración de los lodos (Mannina et al., 2019).

La síntesis de PHA por CMM, se observó por primera vez en una planta de tratamiento de aguas residuales diseñada para la reducción biológica de fósforo en 1974. Mediante el estudio de las poblaciones bacterianas, se determinó que la configuración del proceso con periodos de exceso y limitación de nutrientes aumentaba significativamente la capacidad de almacenamiento de PHA (Morgan-Sagastume et al., 2014; Wallen & Rohwedder, 1974). Estos estudios fueron la base del actual sistema dual de depuración de aguas y producción de PHA en tres etapas: (I) fermentación acidogénica del agua para producir una corriente rica en VFAs, (II) acumulación de PHA utilizando el efluente resultante y, como etapa final (III) la recuperación y purificación del PHA (Lemos et al., 2008; Morgan-Sagastume et al., 2010; Serafim et al., 2004). Aunque existe un amplio conocimiento sobre la producción de PHA a partir de VFAs, la aplicabilidad de materias primas de composición compleja, como los lodos, sigue teniendo una escasa presencia en las plantas de tratamiento de aguas residuales, alcanzando, por el momento, una productividad de 8,6 g·L^{-1} (Tabla 1). Sin embargo, la producción comercial de PHA podría integrarse en varias configuraciones de tratamiento de aguas residuales de origen urbano ya que, algunas de estas instalaciones incorporan fermentación de sólidos primarios para generar una corriente de desechos rica en ácidos orgánicos solubles de cadena corta.

1.3.3 Gas de síntesis como subproducto de la pirolisis o gasificación de residuos sólidos orgánicos

Como se ha comentado anteriormente, el gas de síntesis, también conocido como *syngas*, se produce durante la pirólisis de residuos y, además, es uno de los principales productos

en las corrientes gaseosas industriales como las acererías. Contiene principalmente monóxido de carbono (CO), hidrógeno (H_2) y, en menor medida, dióxido de carbono (CO_2) y trazas de otros gases como el nitrógeno (Karmann et al., 2019; Koller, 2019; Köpke et al., 2011).

El *syngas* es una materia prima muy relevante que puede transformarse aún más en diferentes productos mediante catálisis química o biológica. Así, el *syngas* se ha utilizado como materia prima para la producción de productos químicos a granel como ácido acético, ácido butírico o biocombustibles (por ejemplo, etanol y butanol), mediante conversión catalítica química (por ejemplo, síntesis de Fischer-Tropsch (FT)). Sin embargo, los enfoques biológicos se consideran más atractivos porque brindan varias ventajas en comparación con los procesos químicos (Den et al., 2018; Drzyzga et al., 2015). A través de la fermentación microbiana del *syngas*, se puede obtener una variedad de productos que pueden incluir monómeros, útiles para la síntesis de biopolímeros, o directamente biopolímeros, como el PHA (Choi et al., 2010; Köpke et al., 2011a). Aunque se sabe que más de 300 microorganismos sintetizan PHA, solo algunos de ellos pueden procesar los componentes del *syngas* debido a la toxicidad general del CO para la mayoría de los organismos vivos (Beneroso et al., 2014b). Se han investigado organismos autótrofos como *Rhodospirillum rubrum*, *Acetobacterium woodi* o especies de *Clostridium* por su capacidad para transformar el CO a partir del *syngas* en productos de valor añadido que incluyen bioetanol, ácido acético, 2-butanol o PHA (Brigham, 2019; Karmann et al., 2019). Aun así, la viabilidad económica de este proceso sigue en discusión inclinando la balanza hacia estrategias basadas en dos etapas en las que un primer microorganismo genere ácido acético como producto de la fermentación del *syngas* para que, posteriormente, una biomasa productora de PHA logre una gran acumulación al metabolizar el ácido acético generado (Lagoa-Costa et al., 2017; Revelles et al., 2016). A pesar de los últimos avances, se debe continuar la búsqueda de alternativas que deriven en un proceso rentable y sostenible para su implementación a gran escala.

1.4 Los bioplásticos

Los bioplásticos han surgido como una alternativa a los plásticos derivados de la industria petroquímica. A diferencia de los plásticos convencionales basados en combustibles fósiles, el prefijo "bio" del término "bioplástico" incluye tanto a los materiales plásticos compuestos de polímeros biodegradables como a los materiales plásticos

compuestos de polímeros de base biológica (SAPEA Science Advice for Policy by European Academies, 2020).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un polímero de origen o base biológica está compuesto total o parcialmente de productos biológicos, clasificándose en tres categorías diferentes:

- Biopolímeros de origen natural, como la celulosa, almidón, PHA y lignina
- Polímeros derivados, como el acetato de celulosa
- Polímeros sintéticos construidos a partir de materiales primas renovables, como el ácido poliláctico (PLA).

Los términos "biodegradable" y "de origen biológico" a menudo generan confusión, ya que no todos los polímeros de origen biológico son biodegradables ni todos los plásticos biodegradables son de origen biológico. Es decir, la naturaleza de la materia prima a partir de la cual se produce el polímero biodegradable (de base fósil o de base biológica) no determina si el polímero es biodegradable. En las Figuras 5 y 6 se muestra una clasificación y las estructuras químicas más representativas.

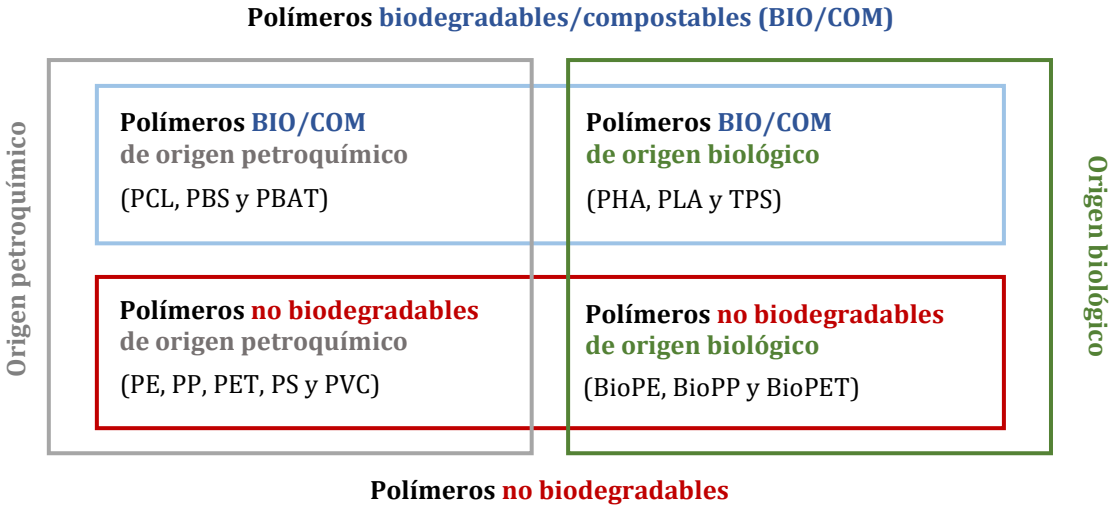


Figura 5. Clasificación de plásticos biodegradables y no biodegradables. El grupo de polímeros no biodegradables basados en combustibles fósiles abarca polímeros sintéticos tradicionales como el polietileno (PE), polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS) y cloruro de polivinilo (PVC). Aunque no son biodegradables, pueden estar sintetizados a partir de monómeros de base biológica (derivados por ejemplo del bioetanol), dando lugar al BioPE, BioPP y BioPET. Por otro lado, los procedentes de fuentes no renovables y biodegradables son policaprolactona (PCL), PBS y el polibutilén adipato-*co*-tereftalato (PBAT). Los procedentes de fuentes renovables y biodegradables y/o compostables son ácido poliláctico (PLA), polihidroxialcanoatos (PHA) y almidón termoplástico (TPS) (Adaptado de *European Bioplastics*, 2020 y SAPEA, 2020).

El que un plástico sea o no biodegradable, depende de dos factores combinados: la naturaleza de su estructura química y las condiciones ambientales del entorno en el que se encuentre (Naser et al., 2021; Zumstein et al., 2018). La biodegradación se define como la conversión microbiana de todos sus componentes orgánicos a CO_2, CH_4, agua y biomasa (Zhong et al., 2020). En primer lugar, se produce la hidrólisis del polímero en el que el carbono que compone el plástico se convierte en compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Posteriormente, son catabolizados por los microorganismos dando lugar a los productos mencionados anteriormente (Agarwal, 2020). Según la ASTM (Sociedad Estadounidense para pruebas y materiales), un material biodegradable es, además, compostable si tiene la misma velocidad de degradación que otros materiales naturales tales como hojas, papel o trozos de madera (aproximadamente 180 días). No obstante, habría que matizar si se trata de compostaje industrial o casero, ya que las condiciones de aireación, pH y temperatura son distintas (Narancic et al., 2020). También es muy relevante mencionar que algunos bioplásticos, como el PLA y algunos PHA, no se biodegradan fácilmente en ambientes naturales en un tiempo definido, por lo que se consideran bioplásticos compostables cuya gestión de residuos debe implicar un compostaje industrial o casero (SAPEA, 2020)

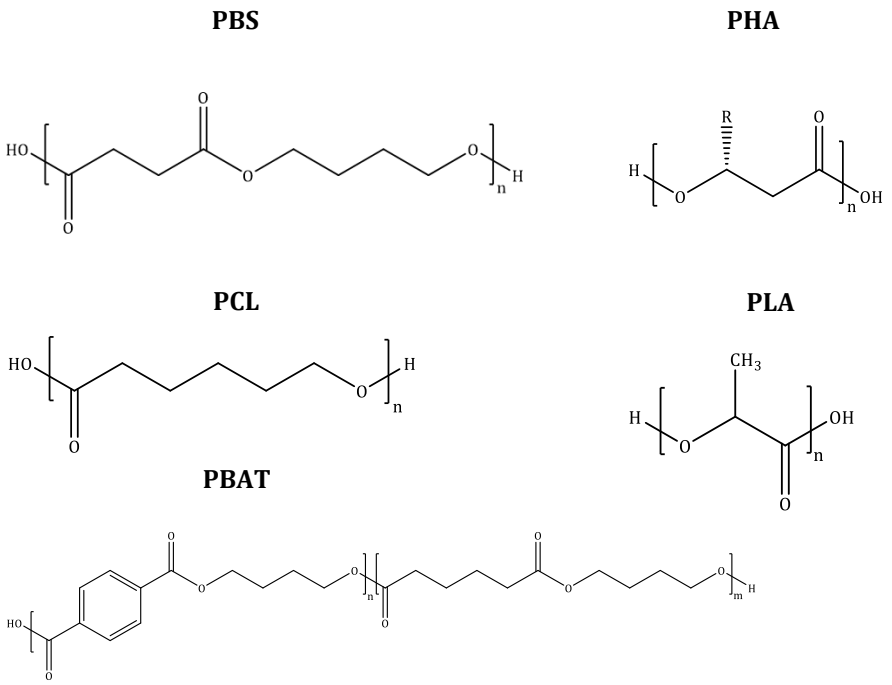


Figura 6. Estructuras químicas de los polímeros biodegradables más utilizados como bioplásticos. En el caso del PBAT se muestra una estructura general, debido a que tiene diferentes variantes. En el caso del PLA, existen dos estereoisómeros D y L, cuya proporción determina las propiedades del polímero final.

La gran demanda y la previsión de consumo durante los próximos años, ha promovido la inversión en la producción de polímeros de base biológica. Se prevé que la capacidad de producción mundial de bioplásticos aumente hasta 3 millones de toneladas en 2025, lo que supone un aumento de hasta 7 veces la producción actual (Figura 7) (*European Bioplastics*, 2020). Hoy en día existen múltiples productores y proveedores que crean alternativas para prácticamente todas las aplicaciones a partir de sustratos sostenibles (Tabla 2). No obstante, aunque se espera un crecimiento en el mercado de polímeros como el PP, PHA y PLA, la capacidad de producción actual de este tipo de polímeros es todavía muy inferior a la de los polímeros derivados del petróleo. Sin embargo, esto no debe verse como una desventaja, sino como una oportunidad para sentar las bases hacia una producción sostenible basada en el uso de residuos como principales materias primas.

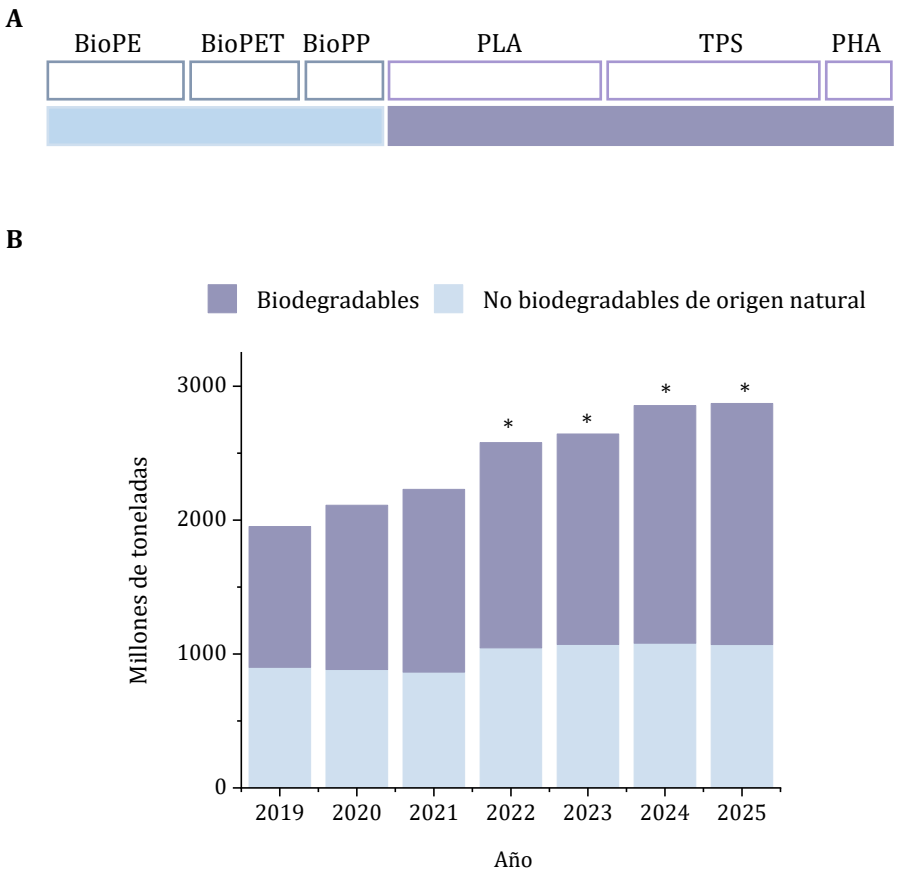


Figura 7. Producción de bioplásticos a nivel mundial. A) Producción de bioplásticos en el año 2020 en función del tipo de material. Se dividen entre biodegradables y no biodegradables de origen natural. B) Capacidad mundial de producción de bioplásticos actual y estimaciones hasta el año 2025. El asterisco marca la estimación prevista. Fuente: *Nova Institut* (https://www.european-bioplastics.org/market/).

Compañía	Polímero	Sustrato
Daimer Scientific (Estados Unidos)	Nodax™ (*mcl*-PHA)	n.d
Tianan (China)	Enmat (P(3HB-*co*-3HV))	n.d
Biocycle® (Brasil)	P(3HB) y P(3HB-*co*-3HV)	Bagazo de caña de azúcar y sacarosa
Kaneka (Japón)	PHBH™	Restos vegetales y aceites
NaturePlast (Francia)	PHA y PLA	n.d
Biomer (Alemania)	P(3HB)	n.d
Bio-on (Italia)	MINERV™ (*mcl*-PHA)	Jugo de remolacha azucarera
Polyferm (Canadá)	VersaMer™ (*mcl*-PHA)	Azúcar y aceites vegetales
Tepha (Estado Unidos)	TephaFLEX™ (P(4HB))	n.d
Tianjin GreenBio (China)	Sogreen™ (P(3-4HB))	n.d

Tabla 2. Resumen de empresas líderes en la producción de PHA en 2021. n.d = No disponible. Modificado de Kourmentza et al., 2017 con datos actualizados a 2021.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo diferentes propuestas para mejorar la producción de poliésteres de origen biológico a partir de residuos de diversa naturaleza abordando diferentes estrategias biotecnológicas.

1.5 Poliésteres de origen biológico: los PHA y el PLA

Los biopolímeros son macromoléculas sintetizadas por organismos vivos, tanto procariotas como eucariotas. Existen muchos tipos diferentes que se catalogan según su estructura química en: ácidos nucleicos, poliamidas, polifosfatos, polisacáridos, poliésteres, poliisoprenoides y polifenoles (Pellicer et al., 2017).

El PLA no es un biopolímero propiamente dicho, ya que actualmente se produce a nivel industrial mediante la polimerización química del ácido láctico, monómero que sí se

produce mediante fermentación bacteriana. Sin embargo, se han diseñado diferentes estrategias de ingeniera metabólica para abordar su producción biológica a lo largo de los últimos años. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo experimentos relacionados con la síntesis *in vivo* de este polímero, por lo que en el Apartado 1.5.4 se describen sus características principales (ver más adelante).

1.5.1 Características generales de los PHA

Los PHA fueron descubiertos en 1926 por M. Lemoigne en forma de inclusiones citoplasmáticas en la bacteria *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926), aunque su valor como polímeros con propiedades termoplásticas y elásticas no se consideró hasta varias décadas después, cuando se reconoció su valor comercial. Estos polímeros se definen como poliésteres lineales de ácidos (*R*)-3-hidroxicarboxílicos ((*R*)-HA) no tóxicos, biodegradables y biocompatibles que son producidos de forma natural por un amplio rango de microorganismos en condiciones de desequilibrio nutricional como reserva de carbono y energía (Han et al., 2010). Los organismos productores de PHA se localizan en hábitats muy diversos, desde los tapetes microbianos marinos y la rizosfera hasta las plantas de tratamiento de aguas residuales (Koller et al., 2017). Esta amplia distribución permite proponer la acumulación de PHA como una posible estrategia bacteriana, adquirida y mantenida evolutivamente, que contribuye a la supervivencia y tolerancia al estrés cuando las condiciones ambientales son desfavorables, confiriendo, por lo tanto, una ventaja ecológica frente al resto de poblaciones microbianas del nicho (Obruca et al., 2018).

Dependiendo del organismo y de las condiciones de crecimiento, la producción de PHA puede alcanzar niveles de hasta el 90 % del peso seco de la célula, acumulándose en forma de inclusiones o gránulos intracelulares de naturaleza hidrofóbica (Figura 8). De forma general, los gránulos están recubiertos por una capa de fosfolípidos en la que se encuentran ancladas proteínas asociadas al gránulo o GAPs (de *granule associated proteins*) con funciones tanto estructurales como biosintéticas, catabólicas o reguladoras (Jendrossek & Pfeiffer, 2014). Dentro de este grupo se incluyen las polimerasas (también denominadas sintasas) y las despolimerasas de PHA, enzimas involucradas en la síntesis y degradación del polímero, respectivamente. Además, están presentes de forma mayoritaria un grupo de proteínas surfactantes de bajo peso molecular conocidas como fasinas, y en menor proporción, reguladores transcripcionales y enzimas relacionadas con la generación de los monómeros (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

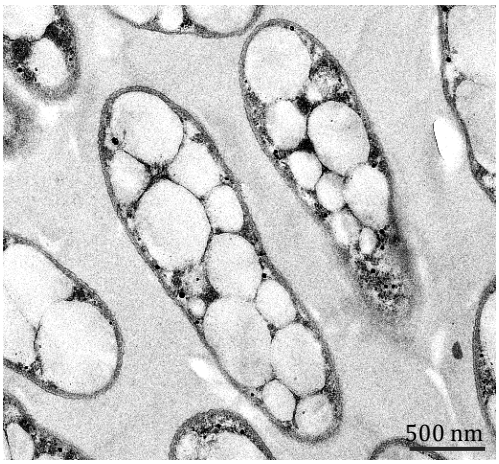


Figura 8. Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de *C. necator* H16 creciendo en condiciones de producción de PHA. Los gránulos se acumulan en el citoplasma en forma de inclusiones esféricas hidrofóbicas. El número y el tamaño de los gránulos, así como su disposición dependen del organismo productor y de las condiciones de producción.

1.5.2 Propiedades químicas y térmicas de los PHA

Los PHA son termoplásticos lineales compuestos por múltiples monómeros de (*R*)-HAs unidos por enlaces tipo éster, en los que la variabilidad reside tanto en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, como en la proporción en la que se encuentre cada tipo de monómero en el polímero final (Figura 9).

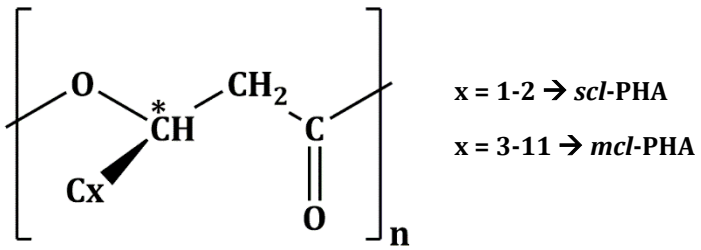


Figura 9. Estructura química de los PHA. Todas las unidades monoméricas tienen un carbono central asimétrico (*) y una configuración del enantiómero *R*. PHA de cadena corta (*short-chain lenght* (*scl*-PHA)), PHA de cadena media (*medium-chain-lenght* (*mcl*-PHA)).

Los PHA se clasifican principalmente en dos grupos en función del tamaño de sus monómeros: los PHA de cadena corta (*short-chain lenght* (*scl*-PHA)), obtenidos a partir de monómeros con 4 ó 5 átomos de carbono como el polihidroxibutirato o P(3HB); y los de cadena media (*medium-chain-lenght* (*mcl*-PHA)), constituidos por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono como el polihidroxioctanoato o P(3HO) (Li et al., 2016). Esta diferencia

se debe principalmente a la especificidad de sustrato de las polimerasas, enzimas clave involucradas en la biosíntesis del PHA, que tienen preferencia para aceptar precursores de una longitud determinada. Los sustratos de esta enzima son los (*R*)-HA esterificados con una molécula de CoA (*R*-hidroxialcanoil-CoA). El polímero formado en cada especie depende, por lo tanto, de la especificidad de la polimerasa y de su capacidad metabólica para generar un determinado *R*-hidroxialcanoil-CoA, lo que limita el tipo de sustrato empleado en la fermentación (Prieto et al., 2016). Además, los PHA pueden estar formados por monómeros de igual naturaleza (homopolímeros) o estar constituidos por más de un tipo de unidades monoméricas diferentes (heteropolímeros o copolímeros) (Olivera et al., 2010). Se han descrito en la literatura más de 150 tipos diferentes de monómeros incluyendo grupos insaturados, alifáticos y aromáticos entre otros, en la cadena lateral (Zinn et al., 2001) (Figura 10).

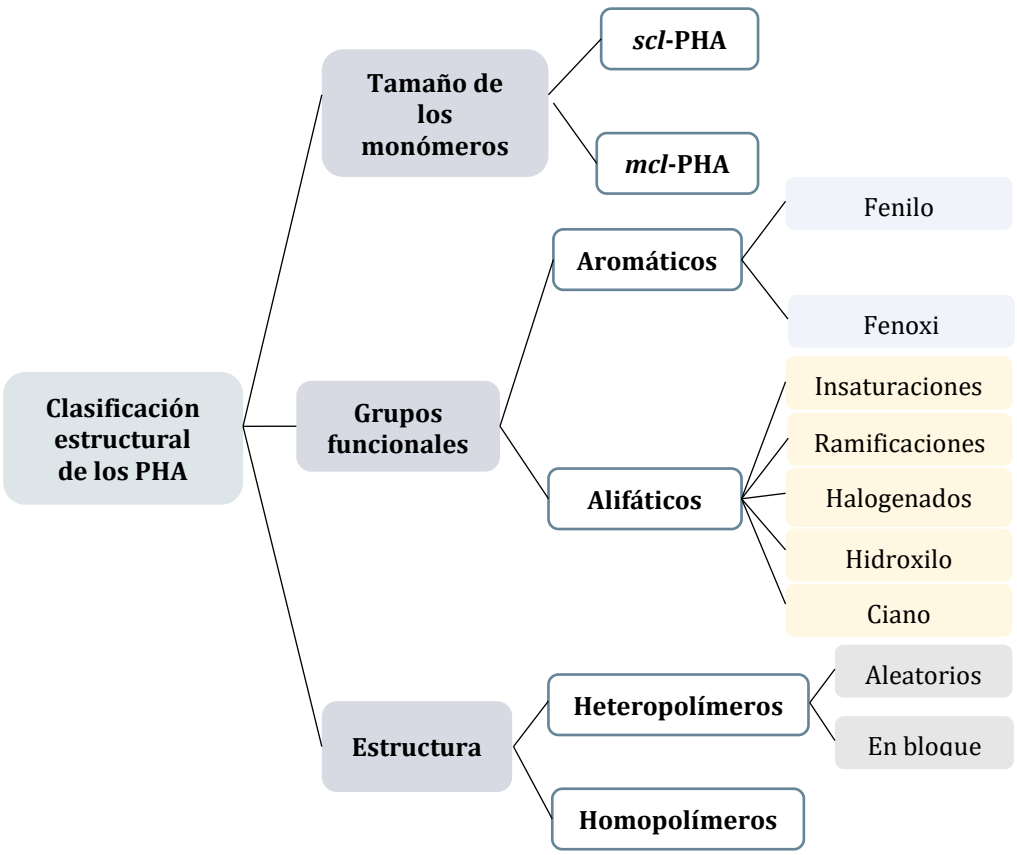


Figura 10. Diversidad en función de los grupos presentes en la cadena lateral. Según la longitud de la cadena, se distinguen en *scl*-PHA y *mcl*-PHA. La longitud y la variabilidad monomérica se correlacionan directamente con el sustrato o mezcla de sustratos empleados para su producción (Modificado de Prieto et al., 2016).

Dependiendo de la composición del monómero y la longitud de la cadena lateral, los polímeros presentan diferentes propiedades de hidrofobicidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y grado de cristalinidad, dando lugar a una amplia diversidad de propiedades mecánicas que varían desde rígidas y cristalinas hasta flexibles, amorfas o elásticas. Por tanto, el análisis de las propiedades químicas y térmicas de un polímero adquiere gran relevancia a la hora de evaluar las posibles aplicaciones del material final.

El peso molecular de un polímero está directamente relacionado con el grado de polimerización y el peso molecular de la unidad que se repite. Los valores que determinan sus propiedades químicas son:

- El peso molecular medio en número (M_n) es el peso total de las moléculas del polímero dividido por el número total de moléculas del polímero.
- El peso molecular medio en peso (M_w) incluye la contribución de la fracción de peso de cada tipo de molécula al peso total del polímero. Cuanta más presencia haya de un tipo de molécula y mayor sea tu tamaño, mayor será su contribución al peso total.
- El índice de polidispersidad (PDI) es la relación entre el peso molecular medio en peso y el peso molecular medio en número.

El segundo tipo de propiedades que se analizan durante la caracterización de un polímero son las térmicas. En este contexto, cuando un polímero solidifica desde el estado líquido puede formar un sólido cristalino o uno amorfo. La solidificación y el enfriamiento lento de un polímero amorfo produce una paulatina disminución del volumen específico de la muestra. Se pasa de un líquido con gran fluidez a un estado de líquido subenfriado, que no llega a ser un sólido y que se comporta de forma similar a un elastómero. Si continuamos enfriando, llega un momento en el que el material se vuelve duro y frágil, y se comporta de modo parecido a un vidrio, ya que la movilidad de las cadenas es muy restringida. Este cambio de comportamiento se produce a una temperatura conocida como temperatura de transición vítrea (T_g). Cuando el material semicristalino se enfría desde su estado líquido, se produce un repentino descenso de su volumen específico, originándose un mayor empaquetamiento de las cadenas poliméricas, que se ordenan bajo la acción de fuerzas secundarias. A medida que el enfriamiento continúa, también se reduce la movilidad de las cadenas que no integran los cristales, es decir, se manifiesta la transición vítrea en la región amorfa. Por otro lado, el punto de fusión (T_m) en un polímero semicristalino es la transición de la fase ordenada a la fase desordenada y suele aumentar con la presencia de dobles enlaces y grupos laterales grandes (Hermida, 2011; Kantesh et al., 2015).

Las propiedades químicas y térmicas determinan las propiedades mecánicas de los polímeros y, por lo tanto, sus aplicaciones. Así, los *scl*-PHA tienden a ser rígidos y quebradizos con un alto grado de cristalinidad (60-80 %), mientras que los *mcl*-PHA son elásticos con baja cristalinidad (25 %), baja resistencia a la tracción, alta elongación a la rotura, bajo T_m, y T_g por debajo de la temperatura ambiente (Tabla 3) (Anjum et al., 2016).

Polímero	T_m (°C)	T_g (°C)	Cristalinidad (%)
P(3HB)	160-175	5-9	50-60
P(4HB)	60	–51	-
PLA	170-200	50-60	14
PP	160-170	(–20) - (–5)	40-60
PET	260	60-80	10
PVC	100-230	80-90	-

Tabla 3. Resumen de las propiedades mecánicas de algunos polímeros biodegradables o compostables (P(3HB), P(4HB) y PLA) y no biodegradables (PP, PET y PVC). Abreviaturas: T_m (temperatura de fusión) y T_g (temperatura de transición vítrea) (Martin & Williams, 2003; McAdam et al., 2020).

En cuanto a sus aplicaciones, se ha demostrado que el P(3HB) tiene buenas propiedades como barrera al oxígeno y que los copolímeros derivados como el P(3HB-*co*-3HV) o las mezclas PLA-P(3HB) tienen características mejoradas al reducir la T_g y la T_m, haciendo que sea menos quebradizo y ampliando la ventana de procesamiento (Markl, 2018).

Entre sus aplicaciones, existen dos tipos mayoritarios:

- Aplicaciones las relacionadas con la biomedicina, como por ejemplo los implantes de huesos y conductos nerviosos usando P(3HB) (Meischel et al., 2016; Shishatskaya et al., 2014; Xu et al., 2010) o los parches cardiacos y suturas quirúrgicas a partir de P(3HB-*co*-3HV) (He et al., 2014; Kenar et al., 2010; Shen et al., 2014).
- Aplicaciones relacionadas con la industria alimentaria, como por ejemplo el embalaje de productos donde destacan las mezclas con otros polímeros como el PLA (Arrieta et al., 2017).

1.5.3 Microorganismos modelo implicados en la producción de P(3HB)

La viabilidad de los microorganismos y sus capacidades biosintéticas o degradadoras en condiciones ambientales específicas determinan su adecuación para el desarrollo de determinados procesos biotecnológicos. En el contexto de la producción de bioplásticos de origen bacteriano, el biocatalizador celular se selecciona, por una parte, en función del tipo de sustrato disponible, y por otra, de acuerdo con las propiedades del polímero que se pretenda generar.

Como se ha comentado anteriormente, el P(3HB) es un polímero biodegradable de origen biológico que se considera como un material alternativo a los plásticos de origen sintético, como el PP y el PE, debido a sus propiedades físicas. Desde su descubrimiento en 1926 (Lemoigne, 1926), este polímero ha sido ampliamente estudiado por la comunidad científica, identificando especies bacterianas pertenecientes a 75 géneros diferentes capaces de acumular P(3HB) en forma de gránulos. Algunos ejemplos de las cepas productoras son *C. necator* (conocida también como *Ralstonia eutropha*) y diversas especies de múltiples géneros como por ejemplo *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum* y *Rhizobium* spp., siendo *C. necator* la más ampliamente estudiada.

A continuación, se reseñarán los microorganismos de interés para el desarrollo de esta Tesis Doctoral en función de los sustratos utilizados (VFAs y *syngas*).

1.5.3.1 *Cupriavidus necator* H16

C. necator H16, anteriormente clasificada como *Ralstonia eutropha* H16, es una bacteria litoautotrófica Gram-negativa perteneciente al grupo de las β-proteobacterias ubicua tanto en suelos como en ambientes acuáticos y adaptada a hábitats con anoxia transitoria. Es una cepa no patógena a diferencia de otras especies pertenecientes al género *Cupriavidus* como *C. pauculus* o *C. metallidurans* que pueden causar infecciones en humanos (Kutralam-Muniasamy & Peréz-Guevara, 2018). Su genoma tiene un gran tamaño, compuesto por tres cromosomas y un megaplásmido con un total de 7,5 Mb, lo que explica su versatilidad y plasticidad metabólica. Una de las claves del estilo de vida de este microorganismo es la capacidad para utilizar, de forma alternativa o concomitante, compuestos orgánicos e H_2 como fuentes de energía. En ausencia de oxígeno, *C. necator* activa una vía de desnitrificación que le permite utilizar aceptores de electrones alternativos como el NO_3^- y el NO_2^-. Además, es capaz de adaptarse rápidamente a niveles fluctuantes de O_2 y carbono

en el medio ambiente mediante la fijación de CO_2 a través del ciclo de Calvin-Benson (CBB) y la acumulación de PHA (Cramm, 2008; Lu et al., 2016). A diferencia de otros microorganismos acumuladores de PHA, como *Azotobacter vinelandii* o *Pseudomonas aeruginosa*, el genoma de *C. necator* H16 no tiene los genes necesarios para la producción de otras sustancias secundarias, como alginatos o ramnolípidos, canalizando los intermediarios metabólicos al completo hacia la producción de PHA. De esta forma, es capaz de acumular hasta un 90 % de su peso seco en forma de biopoliéster (Kutralam-Muniasamy & Peréz-Guevara, 2018; Pohlmann et al., 2006).

Respecto a la maquinaria de producción de P(3HB) destacan cuatro grupos de enzimas involucradas en el proceso de síntesis y degradación (Figura 11):

- Acetil-CoA reductasas: los cromosomas 1 y 2 contienen 15 copias del gen *pha*A (ej. H16_A1438 y H16_A1445). Estas enzimas son responsables del primer paso en la producción de P(3HB), que consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA.
- Acetoacetil-CoA reductasas y β-cetotiolasas: el genoma de *C. necator* H16 contiene hasta 21 copias del gen *pha*B y 15 homólogos de β-cetotiolasas (ej. H16_A2171, H16_A1526 y H16_A0461). Estas enzimas están implicadas en la segunda reacción, donde se produce una reducción del acetoacetil-CoA a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA.
- PHA sintasas o PHA polimerasas: el cromosoma 1 de *C. necator* H16 contiene los genes *pha*C1 (H16_A1437) y *pha*C2 (H16_2003). PhaC1 es responsable de polimerizar los monómeros de (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA, mientras todos los estudios indican que PhaC2 es no tiene actividad en condiciones naturales. (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).
- Fasinas: dentro de las GAPS se encuentran 7 fasinas (PhaP1-PhaP7). Destaca PhaP1 y PhaP3 solo cuando PhaP1 está ausente. Además, en la superficie de los gránulos, también, se localizan PhaR, que es un regulador transcripcional que activa la expresión las fasinas, y PhaM, que actúa como activador de PhaC1, aunque el mecanismo de esta activación no se ha demostrado por de momento. PhaM, además, facilita la distribución equitativa de los gránulos de P(3HB) durante la división celular gracias a su unión a DNA a través de un motivo C-terminal PAKKA (Juengert et al., 2018).
- PHA despolimerasas: *C. necator* H16 tiene identificadas 7 enzimas con actividad despolimerasa PhaZ1-PhaZ7 (ej. H16_A1150, H16_A2862 y H16_B0339) y 2 enzimas con actividad 3-hidroxibutirato hidrolasas PhaY1 y PhaY2 (ej. H16_A2251) (Eggers & Steinbuchel, 2013).

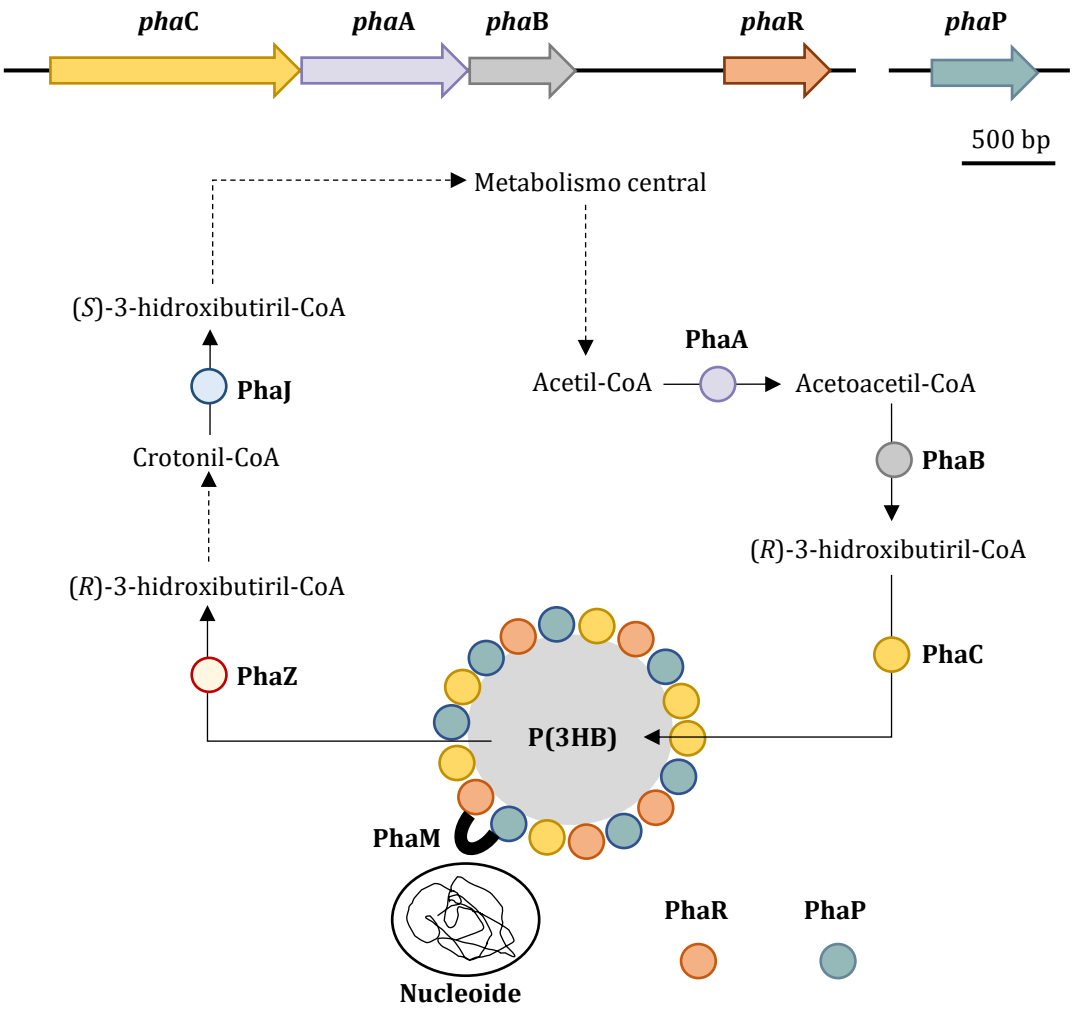


Figura 11. Modelo simplificado de la organización génica y el ciclo de P(3HB) en *C. necator* H16 incluyendo la síntesis y la degradación a partir de acetil-CoA. Las abreviaturas son: PhaA (acetil-coA reductasa), PhaB (acetoacetil-CoA reductasa), PhaC (PHA sintasa), PhaZ (PHA despolimerasa), PhaJ (enoil-CoA hidratasa), PhaM (activador de PhaC1), PhaR (regulador transcripcional de la expresión de fasinas) y PhaP (fasinas) (Modificado de Reinecke & Steinbüchel, 2008 y Eggers & Steinbüchel, 2013).

En cuanto a la regulación de la producción de P(3HB) en *C. necator* H16, se han observado 3 mecanismos principales. En primer lugar, la presencia de PhaR, cuyo gen está localizado adyacente al cluster *pha*CAB, reprime la expresión de PhaP1 uniéndose a su promotor. En condiciones de acumulación de P(3HB), el regulador PhaR se mantiene inactivo, permitiendo la expresión de los genes que codifican las fasinas y del operon *pha*CAB. A medida que aumenta la cantidad intracelular de gránulos, aumentan los niveles de PhaP en el citosol, actuando como un sensor sobre PhaR. Además, el sistema fosfotransferasa de azúcar del fosfoenolpiruvato (PEP o TPS) actúa activando el sistema de movilización del

polímero acumulado en función de los niveles intracelulares de Spot 1, PtsI y PtsH, como principales proteínas involucradas (Mitra et al., 2021).

A nivel genético, el cromosoma 2 de *C. necator* H16 codifica la mayoría de las rutas del metabolismo central, incluyendo la vía de Entner-Doudroff (ED), el CBB y la gluconeogénesis. La síntesis de precursores de nucleótidos y aminoácidos se deriva a través del ciclo CBB a partir de la ribosa 5P. A diferencia de otros microorganismos, la cepa H16 de *C. necator* no contiene en su genoma glucosidasas capaces de degradar diversos azúcares como la glucosa, por lo que el metabolismo de sustratos simples está restringido a fructosa y gluconato (Volodina et al., 2016). Sin embargo, *C. necator* H16 es capaz de metabolizar los VFAs a través de diferentes rutas hasta llegar a acetil-CoA, que actúa como precursor principal en la síntesis de PHA (Figura 12). Usando ácido acético (C2) y butírico (C4) como fuente de carbono acumula P(3HB), mientras que si la mezcla contiene propiónico (C3) o valérico (C5) es capaz de producir el copolímero P(3HB-*co*-3HV) (Chakraborty et al., 2009; Wang et al., 2010). También es capaz de utilizar otros ácidos orgánicos, como el ácido fumárico, succínico, aspártico, málico y glutámico a través del ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA).

Durante las últimas tres décadas, *C. necator* H16 ha sido ampliamente estudiada como modelo industrial para la producción de PHA. En muchos procesos comerciales se generan desechos ricos en carbono que se tratan mediante AD dando lugar a altas concentración de VFAs, tales como ácido acético, láctico, butírico y propiónico (Szacherska et al., 2021). A pesar de que tradicionalmente el transporte de sustancias hidrofóbicas, como los VFAs, se ha asociado con la difusión pasiva, hay estudios recientes que evidencian el transporte activo. No obstante, la acumulación de ácidos grasos en el interior celular tiene efectos negativos a nivel fisiológico, por lo que facilitar su secreción al medio extracelular se considera un mecanismo de defensa microbiano para evitar efectos tóxicos (Salvador López & Van Bogaert, 2021). En este sentido, no se han identificado en *C. necator* H16 sistemas específicos para la secreción de VFAs, llegando a ser compuestos tóxicos e inhibidores del crecimiento. Se ha demostrado que en presencia de altas concentraciones de VFAs, aumenta la liberación de energía a través de la ATPasa de las membranas desacoplando el sistema de transporte de electrones para mantener el pH intracelular. Esto provoca una disminución de la utilización de estos sustratos, así como en el crecimiento y la acumulación PHA (Cheung et al., 2010). Gracias al amplio conocimiento de las redes metabólicas de *C. necator* H16 y al estudio de la toxicidad utilizando los VFAs tanto de manera independiente como en mezclas se puede obtener un buen equilibrio entre la tasa de consumo, el crecimiento y la acumulación de biopolímeros.

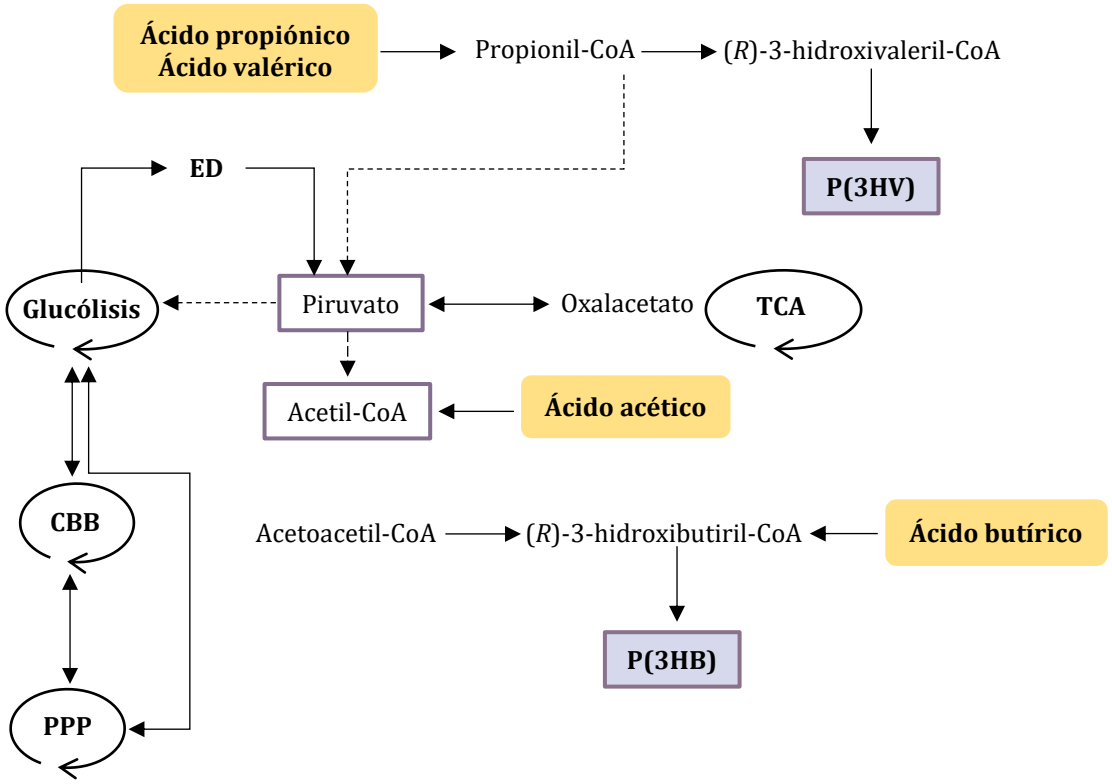


Figura 12. Representación esquemática del metabolismo central y de la producción de PHA a partir de VFAs en *C. necator* H16. Los sustratos principales (VFAs) se encuentran destacados en color amarillo. Las flechas con líneas discontinúas hacen referencia a reacciones metabólicas no mostradas. Abreviaturas: PPP (vía de las pentosas fosfato); ED (vía de Entner-Doudroff); CBB (ciclo de Calvin Benson-Bassham); TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos).

1.5.3.2 *Rhodospirillum rubrum* S1

Las bacterias púrpuras no del azufre son un grupo de microorganismos fotosintéticos ampliamente extendido y metabólicamente muy diverso. Dentro de este grupo, *R. rubrum* es una de las especies más interesantes en microbiología y biología de sistemas debido a su versatilidad en términos de metabolismo y adaptabilidad (Drzyzga et al., 2015; Revelles et al., 2016). *R. rubrum* es un bacilo Gram-negativo móvil, cuya morfología, tamaño y pigmentación varían según el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, adquiriendo en ocasiones una forma en espiral y en otras una forma arqueada de color rosado debido a los pigmentos fotosintéticos que contiene en sus membranas (Figura 13) (Hickman & Frenkel, 1959; Lee & Fitzsimons, 1976). Su hábitat es un entorno natural donde haya sedimentos, frecuentemente en lodos de lagos, aguas estancadas y entornos acuáticos

con suelos húmedos, lo que explica su gran capacidad para utilizar diversos sustratos como fuente de carbono y energía (Hickman & Frenkel, 1959; Kantachote et al., 2005).

En presencia de oxígeno, *R. rubrum* lleva a cabo el proceso de respiración para obtener energía. Sin embargo, cuando el oxígeno es limitante y en presencia de luz, esta bacteria fotosintética facultativa responde mediante la síntesis de un gran sistema de membranas intracitoplasmáticas con pigmentos que le permiten captar la luz, como la bacterioclorofila y los carotenoides, cambiando su metabolismo hacia la fotoheterotrofía o fotoautotrofía si usa CO_2 y donadores de electrones como el H_2 (Hädicke et al., 2011).

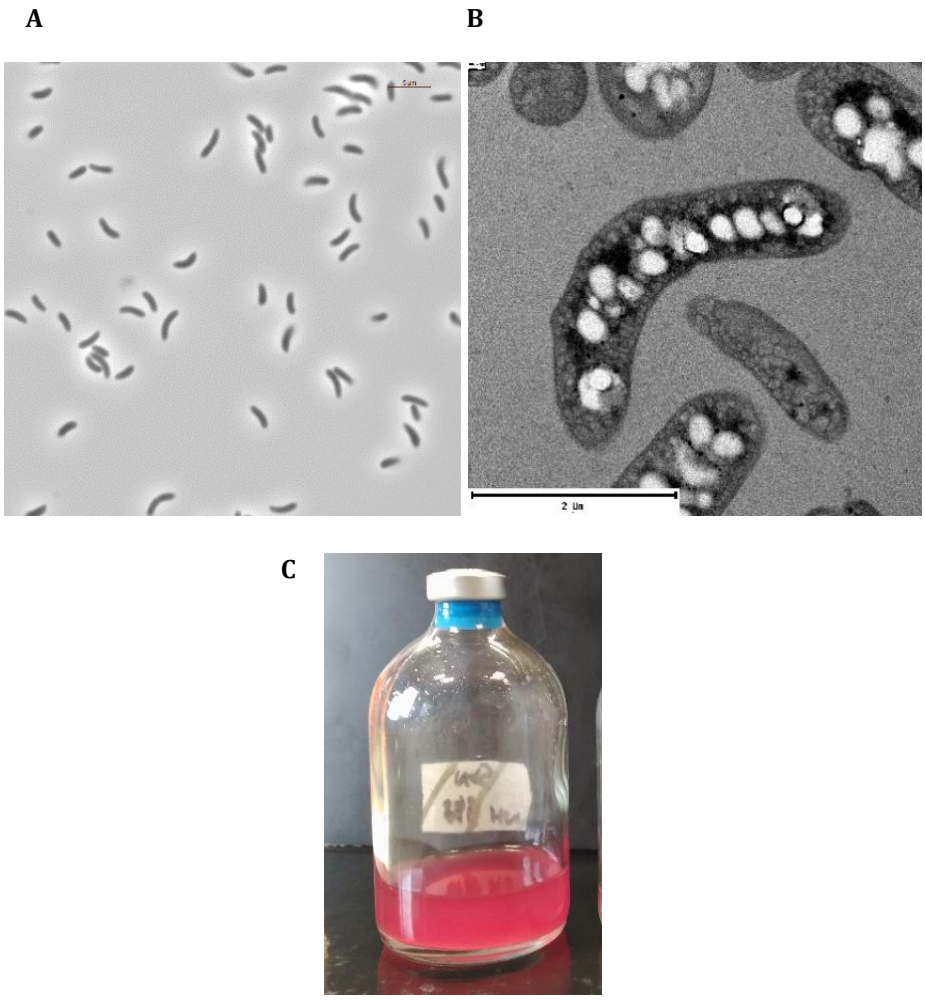


Figura 13. Morfología de *R. rubrum*. A) Microscopía de contraste de fases de *R. rubrum* creciendo en condiciones anaeróbicas. B) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *R. rubrum* creciendo en condiciones de producción de PHA. C) Cultivo líquido en ausencia de oxígeno y presencia de luz utilizando fructosa como fuente de carbono.

En presencia de CO, *R. rubrum* induce la expresión de una CO-deshidrogenasa (CODH, Rru_A1427) responsable de catalizar la conversión del CO a CO_2 mediante una reacción conocida como *water-shift reaction* (Kerby et al., 1995):

$$CO + H_2O \rightarrow H_2 + CO_2$$

En condiciones anaerobias los niveles de la enzima CODH aumentan, y parte del CO_2 producido mediante esta reacción es, además, asimilado en forma de biomasa a través del ciclo del CCB, mediante la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO; Rru_A1998) en condiciones fotoautotróficas. Sin embargo, en condiciones fotoheterótroficas, otras carboxilasas como la piruvato sintasa (Rru_A2398) o la crotonil-CoA reductasa (Rru_A3063) podrían catalizar la transformación directa del carbono inorgánico en moléculas precursoras ingresando en el metabolismo central a través de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la gluconeogénesis (Revelles et al., 2016). Además, debido a la ausencia de la isocitrato liasa (Icl), que cataliza la conversión de isocitrato en glioxilato y succinato, el ciclo del glioxilato se presenta, para este microorganismo, como una variante del TCA que permite la movilización de compuestos de reserva como los ácidos grasos o el P(3HB) a través del acetil-CoA por el ciclo del etilmalonil-CoA (EM-CoA) (Figura 14). El modo de cultivo más común en la literatura es la fotoheterotrofía anoxigénica teniendo como sustratos principales ácidos grasos volátiles, la mayoría de intermediarios del TCA y algunos aminoácidos, ya que la presencia de un co-sustrato, como el acetato, y de una fuente de energía adicional, como la luz, favorecen la acumulación de P(3HB) (Revelles et al., 2016).

Debido a esta versatilidad metabólica, *R. rubrum* ha sido utilizado en diferentes aplicaciones biotecnológicas, entre las que se encuentra la obtención de productos de alto valor añadido como los PHA, a partir de fuentes de carbono no convencionales como el *syngas* (Revelles et al., 2016). Sin embargo, aunque este microorganismo tiene un gran potencial para producir PHA a partir de la fermentación del *syngas*, al tener la tasa de utilización especifica de CO más alta comparada con bacterias con las mismas rutas metabólicas (Karmann et al., 2017; Revelles et al., 2017; Zhu et al., 2001), estudios tecno-económicos recientes proponen el uso de ingeniería metabólica para aumentar el rendimiento del proceso (Choi et al., 2010; Dadak et al., 2016; Heinrich et al., 2016; Jin & Nikolau, 2014; Klask et al., 2015).

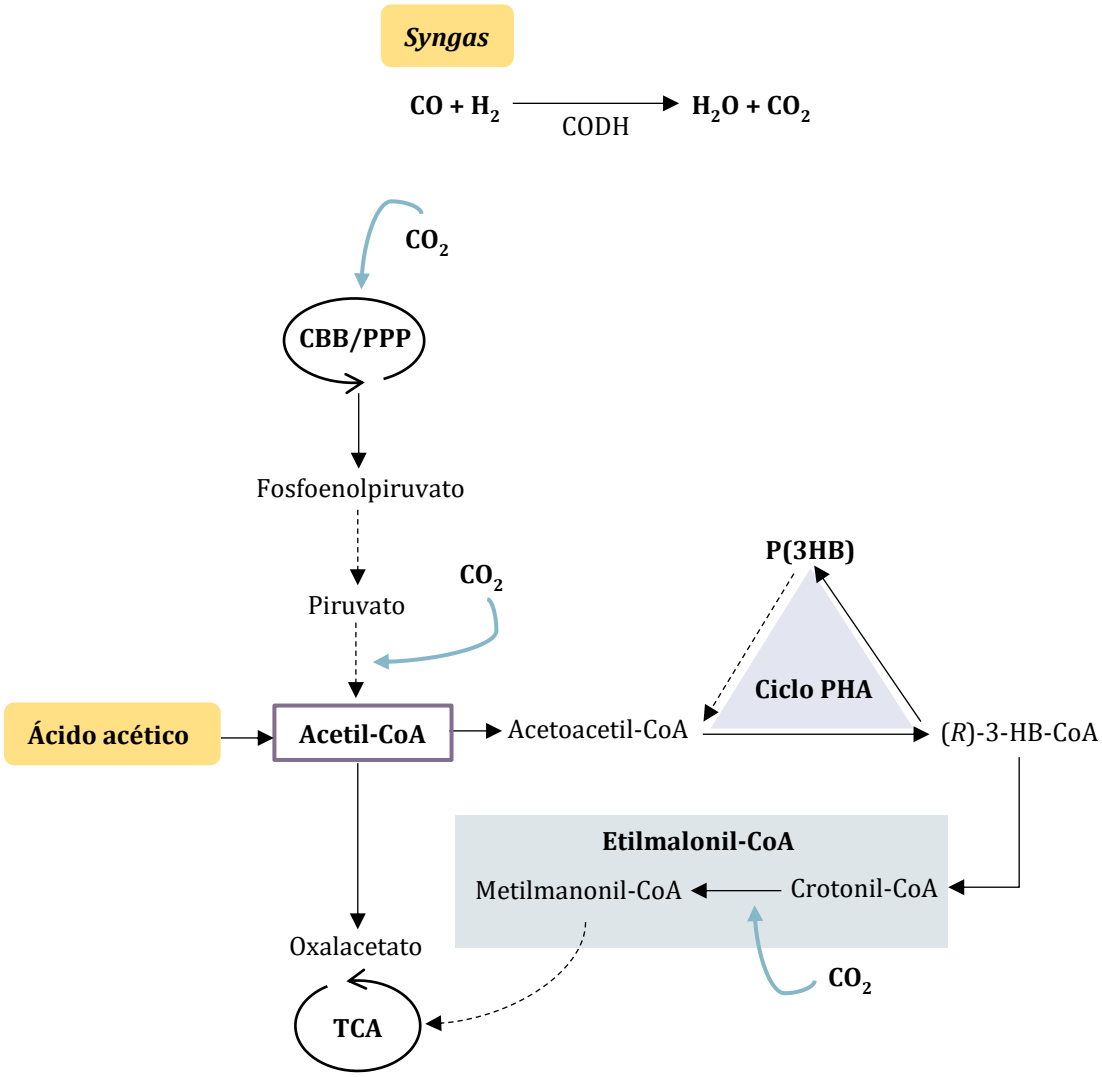


Figura 14. Metabolismo central del carbono de *R. rubrum*. Los sustratos principales, acetato y *syngas*, se encuentran destacados en color amarillo. Las flechas con líneas discontinúas hacen referencia a reacciones metabólicas no mostradas. Las flechas continuas de color azul muestran las algunas de las carboxilasas implicadas en la asimilación del CO_2. Abreviaturas: PPP (vía de las pentosas fosfato); CBB (ciclo de Calvin Benson-Bassham); TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos); CODH (CO-deshidrogenasa); (*R*)-3-HB-CoA ((*R*)-3-hidroxibutiril-CoA). Figura modificada de Revelles et al., 2016.

Debido a la gran plasticidad que muestra *R. rubrum*, en esta Tesis Doctoral se propone la adaptación evolutiva en un ambiente de laboratorio controlado (ALE), como método de optimización y mejora de la fotofermentación del *syngas* en este microorganismo.

1.5.4 PLA: un polímero compostable procedente de recursos renovables

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero rígido y termoplástico que se clasifica dentro de los poliésteres alifáticos con propiedades similares al PET y PP. Este poliéster se obtiene a partir del ácido láctico (LA), que se produce generalmente mediante fermentación bacteriana de carbohidratos en las especies del género *Lactobacillus* (Jamshidian et al., 2010) o ácido 2-hidroxipropanoico, siendo el ácido carboxílico más simple con un átomo de carbono asimétrico. Además, es soluble en agua y tiene dos formas enantioméricas tal y como se muestra en la Figura 15. Mientras que el LA de origen natural se encuentra mayoritariamente en la forma L, el sintetizado químicamente puede ser una mezcla racémica de las formas D y L.

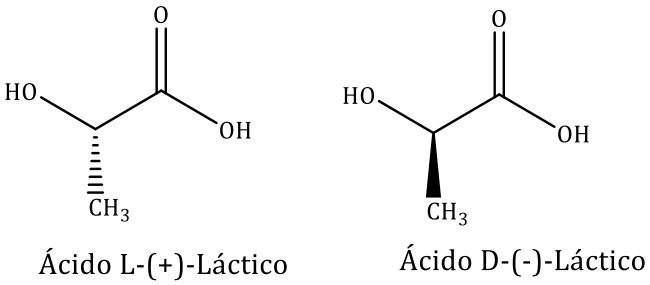


Figura 15. Formas enantioméricas del LA.

A nivel industrial, la producción de PLA se lleva a cabo generalmente en dos etapas consecutivas: en primer lugar, se produce la síntesis del LA y posteriormente, la polimerización. Este proceso tiene asociadas algunas desventajas como la obtención de numerosas impurezas y/o el uso de catalizadores tóxicos. Además, el bajo peso molecular de los polímeros que se obtienen es una gran limitación. Para conseguir PLA de alto peso molecular ($M_w \geq 100000$) es necesario realizar un proceso en tres etapas, donde el PLA purificado se convierte en el correspondiente poliéster de mayor peso molecular vía ROP, de las siglas en inglés de polimerización por apertura del anillo del lactida (Figura 16)(Naser et al., 2021).

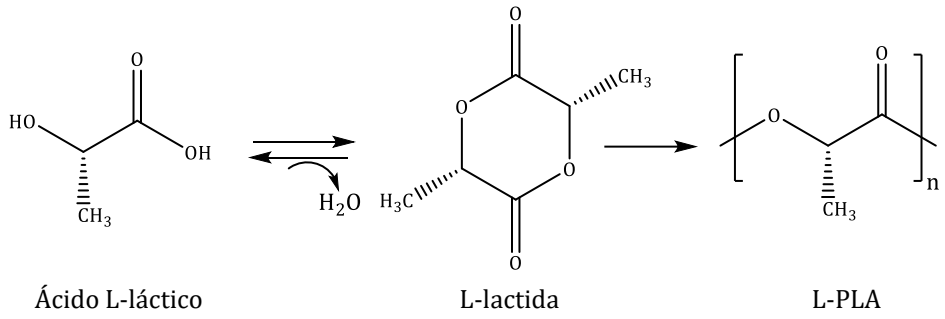


Figura 16. Polimerización por apertura de anillo (ROP) del ácido poliláctico (Riaz et al., 2018)**.**

La estereoquímica del polímero tiene un impacto crucial en las propiedades del material. De hecho, el PLA obtenido puede ser semicristalino o amorfo dependiendo de la estereoquímica de los monómeros de partida. De esta forma, el PLLA (poli(L-láctico)) es semicristalino mientras que el PDLLA (poli(meso-láctico)) es prácticamente amorfo y carece de punto de fusión (Naser et al., 2021). En cuanto a las propiedades mecánicas, el PLA es un material quebradizo con poca elasticidad y resistencia al impacto, tal y como sucede con el poliestireno (PS). Por este motivo, se ha evitado el uso de este polímero en aplicaciones que requieren deformación plástica (Avérous, 2008).

Los materiales basados en PLA se emplean principalmente en dos campos diferentes: aplicaciones biomédicas (implantes, suturas, encapsulación de fármacos, etc.) gracias a su alta biocompatibilidad, y en el sector del embalaje, principalmente en alimentos, ya que su sensibilidad a procesos de compostaje industrial es compatible con la gestión de envases alimentarios. Actualmente, es un polímero ampliamente utilizado como material para envases debido a sus buenas propiedades de barrera con respecto a nitrógeno, dióxido de carbono y metano, y un poco más débiles para el oxígeno. Además, la amplia disponibilidad y maleabilidad, ha hecho que se convierta en una alternativa a los plásticos convencionales para envases tales como: vasos, bandejas y botellas (Naser et al., 2021).

Como se ha comentado anteriormente, el PLA está clasificado como polímero compostable, que no se degrada fácilmente en ambientes naturales (Narancic et al., 2020). Sin embargo, controlando el peso molecular del PLA se puede controlar su degradación, ya que los poliésteres de alto peso molecular tienen tiempos de degradación mayores porque las moléculas tienen un mayor entrelazamiento, lo que les hace más resistentes a la hidrólisis (Naser et al., 2021). Actualmente, el estudio de la biodegradación del PLA es de gran importancia para la industria del plástico con el objetivo de poder cumplir con las estrictas normas vigentes.

1.5.5 Estrategias de ingeniería metabólica para producir PLA

Los avances en biotecnología, incluyendo la ingeniería genética, la biología sintética y la biología de sistemas, han supuesto un aumento en las herramientas disponibles para el desarrollo de estrategias que nos permitan usar microorganismos como plataformas en la síntesis de productos de alto valor añadido. El gran mercado del PLA y la necesidad de abordar métodos de producción más sostenibles ha promovido, durante los últimos años, un auge en la investigación relacionada con la síntesis directa del PLA mediante procesos biotecnológicos.

Por un lado, se ha especulado sobre la posibilidad de que las sintasas de PHA (PhaCs) pudieran usar lactoil-CoA como sustrato debido a su similitud con los 3-hidroxiacil-CoAs (Matsumoto & Taguchi, 2010). Sin embargo, hasta hace pocos años, no se había demostrado que la sintasa tipo I nativa de *C. necator* puede reconocer HAs con el grupo hidroxilo en la posición C2. Hasta la realización de esta Tesis doctoral, solo se había conseguido producir PHA utilizando monómeros de 2-hidroxibutirato (2HB) en experimentos *in vitro* pero no *in vivo* (S. Choi et al., 2016; Park et al., 2012).

En este sentido, se han realizado grandes esfuerzos para diseñar PhaCs que posean una actividad catalítica mejorada con diferentes especificidades de sustrato para poder modular la concentración del monómero incorporado. Mediante estrategias de ingeniería genética, Matsumoto y colaboradores generaron en 2006 una mutación en el residuo 477 (S477R) de la sintasa de *C. necator* H16 modificando la especificidad de sustrato a monómeros más pequeños que una unidad de 3-hidroxibutiritil-CoA (3-HB-CoA) (Matsumoto et al., 2006). Además, añadiendo mutaciones en las posiciones 392 y 420 se consiguió potenciar esta actividad (Yamada et al., 2010).

Por otro lado, dado que las propionil-CoA transferasas (Pcts), que se encuentran en las vías de fermentación de la alanina en bacterias como *Clostridium propionicum* o *Megasphaera esldenni*, pueden convertir el LA en lactoil-CoA (LA-CoA) utilizando propionil-CoA o acetil-CoA como donantes de CoA, se ha estudiado su funcionalidad en la generación de LA-CoA en cepas recombinantes de *Escherichia coli* como una aproximación a la producción de poliésteres que contienen LA. Por ejemplo, se ha conseguido producir PLA *in vivo* a partir de 3-hidroxibutirato (3HB) y glucosa utilizando las sintasas optimizadas mencionadas anteriormente en combinación con la inclusión de una propionil-CoA-transferasa heteróloga de *C. propionicum* (Pct_{Cp}) para generar LA-CoA, a la vez que redirigir el flujo metabólico hacia la síntesis de lactato desde piruvato mediante la inactivación de la

fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*). Además, como el 3-HB-CoA y LA-CoA se sintetizan a través de una tioesterificación utilizando el acetil-CoA como donador de CoA, la estrategia conllevó la inactivación del gen *ack*A para aumentar la disponibilidad de acetil-CoA en la célula (Figura 17) (Jung et al., 2010).

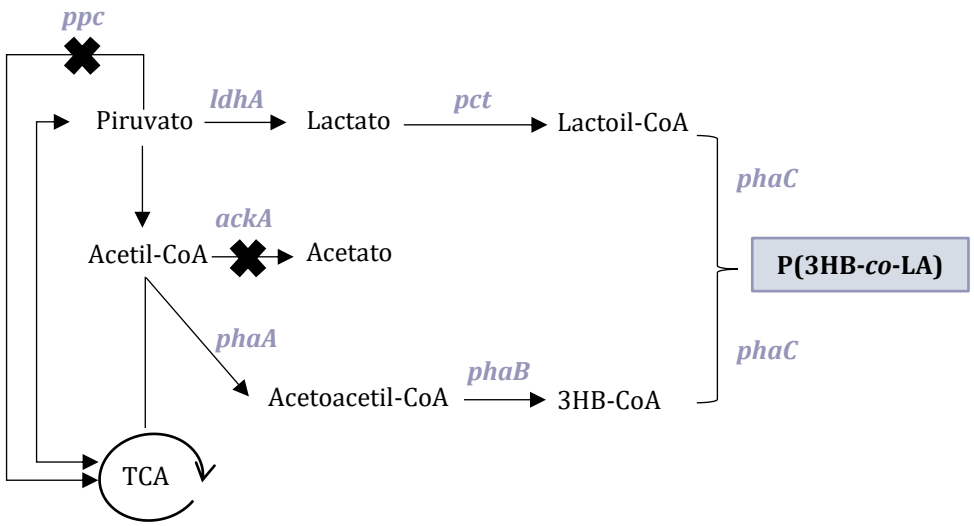


Figura 17. Estrategias de ingeniera metabólica en *E. coli* para la producción del copolímero P(3HB-*co*-LA). Abreviaturas: *ppc* (fosfoenolpiruvato carboxilasa), *ldh*A (lactato deshidrogenasa), *pct* (propionil-CoA transferasa de *C. propionicum*), *ack*A (acetato quinasa), *pha*A (acetil-CoA reductasa), *pha*B (acetoacetil-CoA reductasa), *pha*C (PHA sintasa) y 3HB-CoA (3-hidroxibutiril-CoA).

Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente, hasta el desarrollo de esta Tesis Doctoral no se había conseguido sintetizar *in vivo* un copolímero con LA utilizando la PHA sintasa nativa de *C. necator* H16.

Objetivos

OBJETIVOS

Las consecuencias del modelo de producción basado en la economía lineal, que se plasma en la mala gestión de residuos y en el efecto nocivo sobre el medioambiente derivado de su acumulación, plantea como desafío un cambio en los modelos de producción hacia la economía circular, basado en la obtención de materiales menos perjudiciales para el medioambiente a través de la revalorización de residuos. En este contexto, los bioplásticos se plantean como una alternativa sostenible a los plásticos de origen petroquímico.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es la utilización de residuos complejos, como las aguas residuales de origen industrial y el gas de síntesis, para la producción de PHA mediante estrategias de biotecnología microbiana.

Para llevar a cabo este objetivo se abordarán los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1:

- Establecimiento y desarrollo de un proceso sostenible para la producción de bioplásticos mediante la revalorización de aguas residuales de origen industrial.

Objetivo 2:

- Producción *in vivo* de poliésteres bacterianos derivados del ácido láctico y estudio de los mecanismos implicados para su optimización.

Objetivo 3:

- Domesticación de catalizadores celulares para la utilización de gas de síntesis como precursor de bioplásticos.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis Doctoral se detallan en la Tabla 4. Se mencionan sus características más relevantes.

Cepa	Características relevantes	Origen
C. necator H16	Estirpe salvaje	Colección de laboratorio
***R. rubrum* RR02_01**	Derivada de *R. rubrum* S1 con la producción de pigmentos alterada en microaerobiosis	Colección de laboratorio (Godoy et al., Datos no publicados)
RR 50.4 (V4)	Variante de RR02_01 evolucionada aislada tras un proceso de ALE	Este trabajo
RR 50.6 (V5)	Variante de RR02_01 evolucionada aislada tras un proceso de ALE	Este trabajo

Tabla 4. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

3.2 Medios y condiciones de cultivo

Debido a las diferencias en los medios y condiciones de cultivo de los microorganismos utilizados durante esta Tesis Doctoral, los requisitos específicos de cada uno se encuentran detallados en los apartados correspondientes. En este apartado solo se detalla la metodología común empleada para ambos microorganismos.

De forma general, las células se incubaron a 30 °C en un agitador orbital a 200 revoluciones por minuto (rpm). El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría midiendo la OD a 600 nm (OD_{600}) empleando un espectrofotómetro Ultrospec 10 (Amershan Biosciences, Reino Unido).

Durante periodos inferiores a una semana las cepas se conservaron a 4 °C en placas de Luria-Bertani (LB) o Nutrient-Broth (NB)(Difco™) suplementado con agar bacteriológico (Condalab, España) al 1,5 % (p/v). Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15 % (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

3.2.1 *Cupriavidus necator* H16

El medio rico utilizado para cultivar las células de *C. necator* H16 fue NB. Para los preparar los preinóculos se sembraron células de *C. necator* H16 a partir de una placa de NB sólida en medio rico NB y se crecieron aeróbicamente durante 24 horas a 30 °C en un agitador orbital a 200 rpm.

El medio mínimo empleado para cultivar *C. necator* H16 fue el medio Schlegel modificado (SM) (Schlegel et al., 1961). El medio SM es un medio basal (pH, 7,4) cuya composición para 1L se detalla a continuación: Na_2HPO_4 (9 g), KH_2PO_4 (1,5 g), NH_4Cl (1 g), $MgSO_4$ x 7 H_2O (0,2 g), $CaCl_2$ x 2 H_2O (20 mg) y Fe (III) Citrato (1,2 mg). Este medio se suplementó con la solución de elementos traza SL7 cuya composición 1X es la siguiente: 25% (w/v) HCl (1,3 mL), H_3BO_3 (0,062 g), $CoCl_2$ x 6 H_20 (0,19 g), $CuCl_2$ x 2 H_2O (0,017 g), $MnCl_2$ x 4 H_2O (0,1 g), Na_2MoO_4 x 2 H_2O (0,036 g), $NiCl_2$ x 6 H_2O (0,024 g) y $ZnCl_2$ (0,070 g) en HCl 1M. Los componentes se añadieron de uno en uno para facilitar su disolución y el medio se esterilizó por filtración. Como fuentes de carbono se utilizaron disoluciones de VFAs comerciales (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) de ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico y ácido valérico entre 0,3 y 8 $g \cdot L^{-1}$. Se ajustó el pH a 7 utilizando NaOH 10M. Posteriormente, el medio de cultivo resultante se esterilizó por filtración a través el sistema Steritop de Millipore Sigma (Alemania) con un tamaño de poro de 0,22 µm. Finalmente, los medios de cultivo resultantes se almacenaron en esterilidad a temperatura ambiente.

El medio SM fue también utilizado para diluir cada efluente durante la puesta a punto de la producción de P(3HB) a partir de aguas residuales fermentadas. Para ello, los sustratos S1-S4 fueron diluidos utilizando diferentes proporciones de medio SM en función de la concentración total de cada sustrato. Posteriormente, el pH de cada mezcla se ajustó a 7 utilizando NaOH 10M. Los precipitados resultantes se eliminaron por decantación y filtración utilizando filtros de 0,45 µm de poro cuando fue necesario. Finalmente, todas las mezclas se esterilizaron por filtración utilizando el sistema Steritop de Millipore Sigma (Alemania) con un tamaño de poro de 0,22 µm. Los medios de cultivo resultantes se almacenaron en esterilidad a 4 °C.

Por otro lado, para producir P(3HB-*co*-LA) se utilizó el medio SN (medio SM sin NH_4Cl) y L-lactato de sodio 20 $g \cdot L^{-1}$ (Interchem 14187R o abcr AB179895) como precursor. En las condiciones señaladas a lo largo del Capítulo 2, la concentración de L-lactato de sodio fue modificada entre 5 y 20 $g \cdot L^{-1}$. El medio de producción resultante se esterilizó por filtración a través el sistema Steritop de Millipore Sigma (Alemania) con un tamaño de poro de 0,22 µm. Se conservó en esterilidad a temperatura ambiente.

3.2.2 *Rhodospirillum rubrum*

El medio rico utilizado para cultivar *R. rubrum* fue ATCC (Medio de levaduras de Van Niel) compuesto por: K_2HPO_4 (1 g), $MgSO_4$ (0,5 g) y extracto de levadura (10 g) con un pH final de 7,0-7,2. El medio ATCC se utilizó para los preparar los preinóculos. Para ello se sembraron células de *R. rubrum* a partir de una placa de medio ATCC suplementado con fructosa 2,70 $g \cdot L^{-1}$ (15 mM) y agar bacteriológico (Condalab, España) al 1,5 % (p/v), y se crecieron aeróbicamente durante 72 horas a 30 °C en un agitador orbital a 200 rpm.

El medio mínimo utilizado para la el crecimiento de *R. rubrum* en condiciones fotoheterotróficas fue el medio SYN adaptado del RRNCO (Kerby et al., 1995) siguiendo el protocolo establecido por Revelles et al., 2017. El medio SYN es un medio basal (pH, 7,2) cuya composición para 1L se detalla a continuación: $MgSO_4$ x 7 H_2O (0,250 g), $CaCl_2$ x 2 H_2O (0,132 g), NH_4Cl (1 g), MOPS (2,1 g), extracto de levadura (1 g). Cada litro de medio SYN se suplementó con 10 mL de una solución de quelatos de hierro y molibdeno compuesta por: H_3BO_3 (0,28 g), Na_2EDTA (2 g), $FeSO_4$ (0,4 g) y Na_2MoO_4 (0,1 g). Adicionalmente, para cada litro de medio preparado se añadió: 1 mL de 2,59 $g \cdot L^{-1}$ de $NiCl_2$, 0,47 mL de 0,2 M $KHPO_4$ (pH 7,0) y 2,5 mL de 50 mM $NaHCO_3$ (pH 8,0). Posteriormente, se transfirieron 20 mL de medio SYN en cada botella de vidrio de 100 mL y para eliminar el oxígeno, el medio líquido se desgasificó con nitrógeno manteniendo un flujo continuo durante 20 minutos. Este procedimiento desplaza el oxígeno presente en el recipiente y disuelto en el medio líquido. Las botellas se sellaron con un tapón de goma de 20 mm de espesor (Wheaton® W224100-202) y se esterilizaron mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Las botellas se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la oxidación de los componentes del medio.

Después de la esterilización en autoclave y antes de inocular las células de *R. rubrum*, el medio se complementó con el resto de soluciones anóxicas como agentes reductores (biotina y sulfuro de sodio). Antes de añadirse, cada agente reductor se esterilizó por filtración y se purgó el oxígeno de las botellas que los contenían con nitrógeno. Finalmente se añadió a cada botella 0,2 mL de biotina 100X y 0,2 mL de Na_2S $9H_2O$ 1M en último lugar. Se utilizaron agujas estériles y jeringas para agregar estas soluciones al medio a través del tapón de goma. Además, se añadió cantidad apropiada acetato de sodio o fructosa como fuentes de carbono, en función de las condiciones experimentales.

Para la etapa de adaptación a condiciones anaeróbicas, las células lavadas en solución salina estéril (NaCl 0,9 %) se transfirieron a botellas de medio SYN. Se utilizó fructosa 2,70 $g \cdot L^{-1}$ (15 mM) como fuente de carbono.

Para la fermentación de fuentes de carbono gaseosas, se eliminó el nitrógeno del espacio de cabeza mediante una bomba de vacío (Fisher Scientific Vacuum Pump) y se añadió CO en un volumen variable mediante una jeringa en función de las condiciones experimentales o *syngas* comercial de *AirLiquide* filtrado, tal y como se describe en Revelles et al., 2017. La composición del *syngas* utilizado fue la siguiente: 40 % de CO, 40 % H_2, 10 % de CO_2 y 10 % de N_2. Se añadieron 1,5 bares de presión a cada botella del ensayo desde una bala de *syngas* comercial presurizada a 200 bares. Posteriormente, se añadieron 10 mL de neón como patrón interno mediante una jeringa estanca y desde una botella de neón puro en aquellos cultivos utilizados para el análisis de la composición gaseosa a lo largo de la fermentación.

La presión interna de cada botella se midió mediante un manómetro digital (Mano Leo 1, Keller) iniciando todos los cultivos a 1,5 bares (0,98 atmósferas). Los datos de presión parcial fueron utilizados para calcular los moles de cada gas mediante la ecuación de los gases ideales PV=nRT, donde:

- P= presión (atmósferas)
- V = volumen (litros)
- n = número de moles
- R= constante universal de los gases ideales
- T= temperatura (grados Kelvin)

Los cultivos anaeróbicos fueron incubados bajo una fuente de luz. Mediante una lámpara compacta fluorescente (Ralux Long RX-L 36W/840/2G11) y se aplicó siempre la misma intensidad de luz a lo largo de la fermentación.

En la Figura 18 se muestra un esquema de las diferentes etapas de crecimiento:

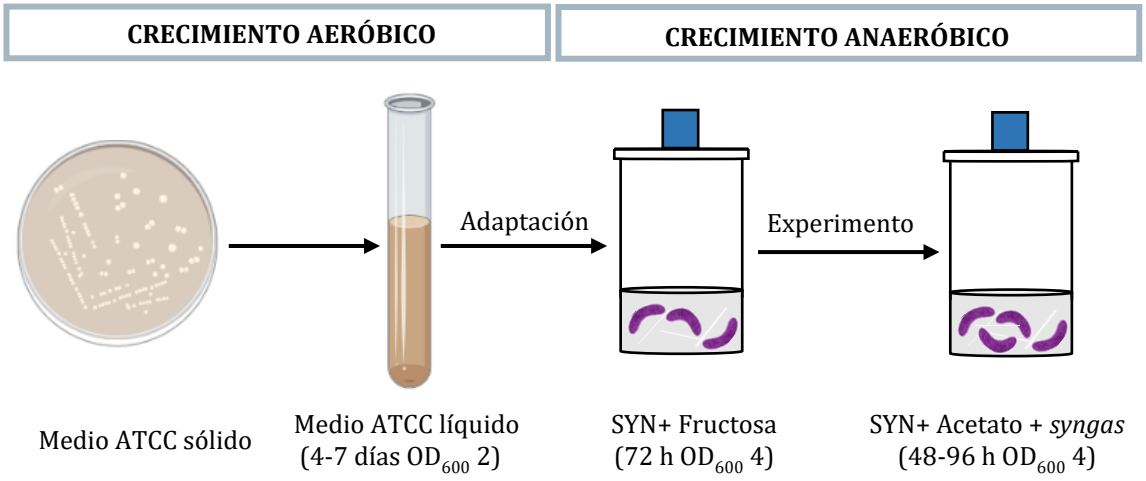


Figura 18. Representación esquemática de las etapas de crecimiento en *R. rubrum* en *syngas*.

3.3 Parámetros de fermentación y control de las condiciones de crecimiento

3.3.1 Evaluación de la viabilidad celular

Cuando fue necesario, el crecimiento fue monitorizado en medio sólido mediante unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU·mL^{-1}). Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-9} en solución salina (NaCl al 0,85 % p/v) y se sembraron tres gotas de 10 µL de las diluciones apropiadas en medio sólido NB para *C. necator* H16, y en medio rico ATCC para *R, rubrum*. Las placas se incubaron durante 48 horas y 4 días, para *C. necator* H16 y *R. rubrum*, respectivamente, a 30 °C y se contaron las CFU·mL^{-1}. Para cada condición, se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes, a partir de los cuales se calculó la media y la desviación estándar.

3.3.2 Cálculo de la biomasa total

Para el cálculo de la biomasa total se centrifugaron 40 mL de medio de cultivo, en tubos Falcon de 50 mL durante 45 min a 3000 × *g* y 4 °C. Los sedimentos celulares se congelaron rápidamente a -80 °C y se liofilizaron en un equipo VirTis BenchTop K (Estados Unidos) durante 24 horas. Finalmente, los tubos se pesaron y las densidades celulares se expresaron en gramos de peso seco (CDW) por litro de cultivo. Por biomasa residual, se hace referencia a la biomasa libre de PHA.

3.3.3 Cálculo de la tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento se calculó a partir de la OD como el valor de la ecuación exponencial ajustada a la zona lineal de la curva de crecimiento bacteriano. Para cada condición, se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes y se calculó la tasa de crecimiento media.

$$\mu = ((\log 10\ OD - \log 10\ OD_{0h}/(t-t0))$$

3.3.4 Cálculo de la tasa de productividad

La tasa de productividad (Y) se calculó a partir de los datos en gramos de los sustratos de fermentación estudiados; es decir, para calcular la tasa de productividad del PHA a partir del acetato, se dividió la cantidad en gramos de PHA acumulado entre los gramos de acetato consumidos en ese mismo periodo de tiempo a partir de la siguiente fórmula matemática:

$$Y_{PHA/Acetato} = \text{gramos de PHA acumulados/ gramos de acetato consumidos}$$

3.3.5 Determinación de amonio y fosfato en medios de cultivo

La cantidad de amonio y fosfato se determinó de forma cuantitativa mediante un método colorimétrico utilizando los kits Spectroquant^{R} de Supelco (Estado Unidos). Se utilizaron patrones comerciales de NH_4^+ y PO_4^{3-} proporcionados por Merck para las rectas de calibrado. Para cada muestra de interés se centrifugaron 5 mL de cultivo a 3000 × *g* durante 20 minutos. Posteriormente, y siguiendo las indicaciones del fabricante, 100 µL del sobrenadante se incubaron durante 5 minutos con los reactivos 1 y 2 del kit. A continuación, se determinó la concentración de amonio midiendo la absorbancia a 695 nm y de fosfato a 660 nm.

3.4 Cultivo de microorganismos en biorreactor

Los cultivos en biorreactor se llevaron a cabo utilizando como sustrato el agua residual fermentada de la producción industrial de caramelos con una concentración inicial de carbono de 6 $g \cdot L^{-1}$. Como se ha comentado anteriormente (ver Apartado 3.2.1), se utilizó medio mineral SM para diluir el sustrato original en función de su concentración total y el pH fue ajustado a 7 utilizando NaOH 10M.

Los experimentos se realizaron en dos equipos diferentes en función del volumen de fermentación deseado. Para las fermentaciones de 1L de caldo de cultivo se utilizó el Bioreactor ez-2 control de Applikon Biotechnology (Estado Unidos) mientras que para las fermentaciones de 2L de utilizó una cuba de 5L en Biostat^{R} B-Benchtop de Sartorius (Alemania). Ambos equipos registraban y controlaban el pH y el oxígeno disuelto (pO_2) mediante un electrodo y una sonda óptica, respectivamente. De forma general, los cultivos fueron agitados con dos turbinas de tipo *rushton* de 6 palas a 325 rpm y 1 volumen de aire por medio (vvm). En los experimentos en los que se fijó un valor consigna de $pO_2 > 20$ %, la agitación y la aireación variaron en función de los requerimientos del sistema. La temperatura se mantuvo constante a 30 °C y el pH a 6,9 mediante la adición automática de HCl 1M. De forma excepcional, para la fermentación con alimentación continua a un volumen de trabajo constante (FAVC) se modificó la cantidad inicial de NH_4Cl aumentando hasta 1 $g \cdot L^{-1}$ de concentración final. El medio de cultivo final se esterilizó por filtración y se introdujo en la cuba de vidrio mediante las bombas peristálticas incluidas en los equipos.

Durante el diseño y la optimización de la producción de PHA usando como materia prima el agua residual S2, se llevaron a cabo diferentes estrategias en biorreactor:

- Fermentación discontinua (*batch*) (D)
- Fermentación semi-continua alimentada por lotes (*fed-batch*) (F)
    - Alimentación por pulsos (FAP): Manualmente en 3 pulsos de 1 $g \cdot L^{-1}$ cada 2 horas a partir de las 8 horas de crecimiento.
    - Alimentación a caudal constante (FAC): Mediante una bomba peristáltica externa de forma continua desde las 8 a las 16 horas de fermentación con un caudal de 30 $mL \cdot h^{-1}$.
    - Alimentación acoplada a la producción de biomasa (FAB): Mediante una bomba peristáltica de forma exponencial desde las 8 a las 30 horas de fermentación con un caudal ascendente a lo largo del tiempo de 10-50 $mL \cdot h^{-1}$.
    - Alimentación acoplada a la producción de biomasa a volumen de trabajo constante (FAVC): Mediante una bomba peristáltica de forma exponencial desde las 8 a las 30 horas de fermentación con un caudal ascendente a lo largo del tiempo de 10-50 $mL \cdot h^{-1}$.

En las fermentaciones semi-continuas (*fed-batch*) se utilizó una solución madre del residuo original a 60 $g \cdot L^{-1}$ pH 6,9 previamente esterilizada por filtración.

3.5 Adaptación evolutiva a escala de laboratorio (ALE)

Las células de *R. rubrum* RR02_01 fueron crecidas en anaerobiosis en 20 mL de medio SYN en botellas selladas de 100 mL con *syngas* a una presión de 1,5 bares y acetato 15 mM a 30 °C y agitación durante 72 horas. Aproximadamente, 500 µL de cultivo fueron transferidos a una botella con medio fresco de forma manual usando una jeringa ajustando la OD_{600} inicial a 0,1. El número de generaciones durante el proceso de adaptación se estimó teniendo en cuenta los eventos de duplicación celular durante cada la curva de crecimiento en las condiciones establecidas al realizar un conteo de viables en los experimentos previos al inicio de la adaptación evolutiva y manteniendo las mismas condiciones de crecimiento.

Después de 50 pases, aproximadamente 200 generaciones, se aislaron diferentes colonias en placas de medio sólido SYN suplementado con fructosa 15 mM y agar bacteriológico (Condalab, España) al 1,5 % (p/v) para llevar a cabo la caracterización fenotípica, la secuenciación del genoma y el análisis del proteoma. Tras el aislamiento en las placas de medio mínimo SYN, las colonias se cultivaron en medio rico ATCC durante 96

horas. El pellet de cada cultivo se recogió mediante centrifugación y las células se congelaron siguiendo el mismo procedimiento descrito ya en el Apartado 3.2 de esta sección. Tras el proceso de congelación, las células nuevamente se crecieron en condiciones aerobias en medio rico ATCC seguido de una etapa de crecimiento anaeróbico en medio mineral SYN con fructosa 15 mM como fuente de carbono. Después de este proceso, se realizó la caracterización de cada variante en función de los datos obtenidos de OD_{600}, producción de pigmentos, PHA, CO_2 e H_2, consumo de acetato y CO descritos a lo largo del Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

3.6 Técnicas de manipulación de DNA

3.6.1 Aislamiento de DNA

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo empleando el sistema *PureLink*™ *Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen de Thermo Fisher Scientific).

La concentración y calidad de las muestras de DNA aislado se analizó con un espectrómetro *NanoPhotometer*® bioNova (Implen) y la concentración final se ajustó a 20 $ng \cdot \mu L^{-1}$. De forma complementaria, la integridad del DNA se confirmó a través de un gel de agarosa.

3.6.2 Secuenciación y análisis de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de las variantes aisladas tras el proceso de ALE, cada cepa se creció en medio rico ATCC. Para evitar cualquier sesgo en el número de copias de los genes debido a variaciones en la fase de crecimiento, las células fueron recolectadas durante la fase estacionaria de crecimiento cuando la OD_{600} fue entre 4,5-5. Para cada cepa, se extrajo el DNA utilizando el kit comercial mencionado en el Apartado 3.6.1. La concentración y calidad obtenida para cada muestra se encuentra en la Tabla 5.

Cepa	ng/µL	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
***R. rubrum* RR02_01**	15	2	1,6
Variante 50.4 (V4)	9,5	1,9	1,5
Variante 50.5 (V5)	20	1,8	1,6

Tabla 5. Concentración y calidad del DNA genómico secuenciado. La relación A_{260}/A_{280} determina la pureza del DNA, estando su valor optimo entre 1,8 y 2. La relación A_{260}/A_{230} sirve para comprobar la presencia de sales o fenoles tras el procedimiento de extracción, teniendo su valor

optimo entre 1,5 y 2,2. Estos valores varían ligeramente en función del tampón en el que haya sido suspendida la muestra.

La secuenciación del genoma fue realizada por MicrobesNG (https://microbesng.com/) mediante tecnología Illumina. Las lecturas de extremos emparejados obtenidas fueron ensambladas con el genoma de referencia de *R. rubrum* S1: NC_007643 y NC_007641 (cromosoma y plásmido) usando *Geneiuos Prime* (v2020-0.3, Biomatters Ltd.). La cobertura final se obtuvo aplicando una sensibilidad media de ensamblado y cinco lecturas mínimas con un 15 % de desviación entre ellas para confirmar cada bloque de nucleótidos. Mediante la herramienta *Find Variation/SNPs* del mismo programa informático, se localizaron las diferencias de hasta un único nucleótido. Se filtraron las variaciones en las que la cobertura fue menor a 10 y con una frecuencia de variación menor al 80 %, al considerarlo como alineamientos de baja fiabilidad. Finalmente, se obtuvo una tabla con las posiciones de las variaciones de cada cepa con respecto al genoma de referencia.

3.7 Técnicas de análisis de proteínas

3.7.1 Extracción del proteoma

En primer lugar, se recuperó la biomasa húmeda de *C. necator* H16 y *R. rubrum* (RR 50.V4 y RR 50.V5) de 5 mL de cultivo en las condiciones establecidas para cada experimento según se detallan en la sección de resultados, descartando el sobrenadante después de un proceso de centrifugación (3800 × *g*, 4 °C, 15 min). Posteriormente, se utilizó BugBuster™ Master Mix (*Protein Extraction Reagent*, Novagen) para obtener el extracto proteico de cada muestra añadiendo 5 mL de reactivo por cada gramo de biomasa húmeda. Adicionalmente, se añadió un inhibidor de proteasas 1X (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) y DNAsa 1 $mg \cdot mL^{-1}$ (Tris-HCl pH 7,5 200 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación (1600 × *g*, 4 °C, 20 minutos), siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, se determinó la concentración de proteínas (Apartado 3.7.2).

3.7.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, usando la solución comercial *Protein Assay Dye Reagent Concentration* (BioRad). Para ello, 10 µL de muestra se mezclaron con 200 µL de reactivo y 790 µL de agua. Esta mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante

5 minutos. Tras medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro UV Mini 1240 (Shimadzu, Japón), la concentración de muestra se calculó a partir de la recta patrón realizada con diluciones de una concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA). De forma adicional, los extractos proteicos se analizaron de forma cualitativa mediante SDS-PAGE 12,5 %.

3.7.3 Análisis del proteoma

El análisis cuantitativo del proteoma fue llevado a cabo a partir de los extractos celulares de *C. necator* H16 y *R. rubrum* (RR 50.V4 y RR 50.V5) en condiciones producción de P(3HB-*co*-LA) y fermentación del *syngas*, respectivamente. Los extractos celulares de 3 réplicas biológicas independientes fueron enviadas al servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), donde se realizó un marcaje isobárico TMT6plex.

Una vez identificadas las proteínas a partir de los péptidos obtenidos con elevada confianza estadística (*p*-valor<0,05), se realizó un análisis cuantitativo en función de la ratio de abundancia expresada en logaritmo en base 2 donde X es la condición experimento e Y la condición control seleccionada:

- Log_*fold_change* = log2(x/y) = Ln(x/y)/Ln(2)
- Conversión a ratio (escala decimal): Ratio x/y = $2^{\text{Log_}fold_change}$
- Recodificación del contraste: log2(y/x) = - log2(x/y)

Posteriormente, se realizó una clasificación de las proteínas reguladas positivamente, negativamente en función de la ratio de abundancia entre 4 y 0,1, -4 y -0,1. Aquellas proteínas con una ratio de abundancia inferior a 0,1 se consideraron como invariables en las condiciones analizadas. A través de la herramienta de búsqueda y conversión de Uniprot (https://www.uniprot.org/uploadlists/) se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de cada bloque de proteínas. Posteriormente, cada bloque de proteínas se sometió a un análisis bioinformático mediante el software de uso libre Blas2GO, donde se realizó la anotación funcional de cada uno de los listados. Además, mediante la asignación automática de códigos para cada una de las enzimas identificadas y la herramienta KEGG Mapper (https://www.genome.jp/kegg/mapper/) se pudieron identificar las rutas metabólicas en las que intervienen proteínas cuya síntesis se activa o reprime de cada experimento.

Para estudiar las secuencias de aminoácidos de las proteínas de interés se utilizó la Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) como herramienta para los alineamientos.

3.8 Técnicas de cromatografía analítica

3.8.1 Análisis del perfil de consumo/producción de gases por GC-TCD

El análisis del perfil de consumo y producción de H_2, CO y CO_2 se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A GC) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas conectadas en serie (80/100 PorapakQ y 70/80 Molesieve 13X), en el Servicio de Cromatografía de Gases del Centro de Investigaciones Biológicas-Margarita Salas. La temperatura inicial de horno fue de 30 °C, la cual se mantuvo con un paso isotérmico de 5 minutos. Posteriormente, se programó una rampa con una frecuencia de 25 °C min^{-1} hasta alcanzar los 180 °C. Las temperaturas del inyector y del detector y del inyector fueron de 150 y 250 °C, respectivamente. Se utilizó helio (*AirLiquide*) como gas portador. Se tomaron muestras de 1 mL del espacio de cabeza de las botellas utilizadas para los cultivos en diferentes momentos de la fermentación usando una jeringa de gas hermética Agilent y se agregaron a viales cerrados de 10 mL (Agilent), previamente purgados con helio. Antes de las mediciones, el analizador de gases se calibró con la misma fase móvil, helio, y se preparó una recta patrón para cada compuesto con cantidades conocidas de *syngas*, helio y nitrógeno mediante la adición con una jeringa graduada. El cálculo de la concentración de gas se llevó a cabo utilizando el software de análisis de datos GC (ChemStation rev. B.04.03-SP1; Agilent Technologies, Inc.) integrando los picos del espectro cromatográfico resultante como se muestra en la Figura 19. La concentración de cada analito se calculó mediante las rectas de calibrado al sustituir en termino correspondiente en la ecuación por el cociente "área del pico del analito/área del pico del patrón interno". Los datos de concentración de gas se muestran en porcentaje sobre el espacio total de la botella y en moles calculados a través de la ecuación de los gases ideales PV=nRT utilizando los valores de presión anotados a través del manómetro.

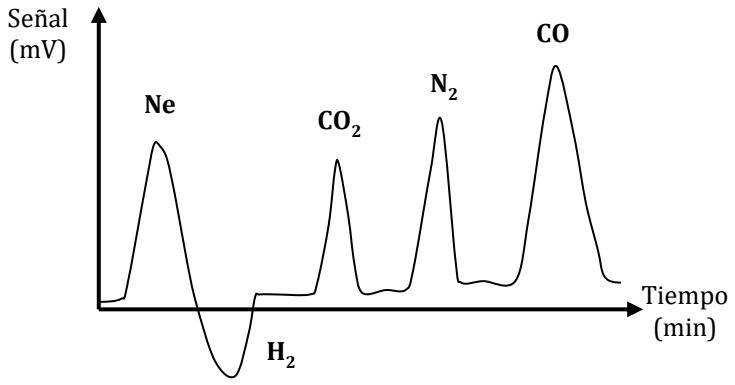


Figura 19. Esquema de un cromatograma obtenido tras el análisis de una muestra de gas de un cultivo de *R. rubrum* durante el crecimiento en *syngas* y acetato.

3.8.2 Cuantificación de PHA y análisis de la composición de los monómeros por GC-MS

Para determinar el contenido y la composición de PHA celular, se utilizaron técnicas estándar de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) previamente descritas en nuestro laboratorio con algunas modificaciones (De Eugenio et al., 2010). Para analizar *scl*-PHA, se suspendieron 2-5 mg de muestra liofilizada (sedimentos de cultivo) en 2 mL de metanol que contenía ácido sulfúrico al 15 % v/v (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) y 2 mL de cloroformo que contenía 0,5 mg·mL^{-1} de ácido 3-metilbenzoico (3MB) como patrón interno (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). Posteriormente, se incubaron usando un tubo de 15 mL de vidrio Pyrex con tapón SVL (Scilabware: Referencia 090479, Reino Unido) a 100 °C durante 4 horas en un termobloque. Después de enfriar los tubos, se añadió 1 mL de agua destilada a la mezcla para extraer la mayoría de los desechos celulares y el ácido sulfúrico restante. Se realizó un proceso de extracción en dos fases eliminando completamente la fase acuosa para evitar el deterioro de la columna de GC. Finalmente, se añadió una pequeña cantidad de polvo de Na_2SO_4 para secar la fase de cloroformo y eliminar los restos de agua. Se verificó la ausencia de residuos de ácido sulfúrico en las muestras comprobando que el pH era 5. A continuación, se analizó por GC-MS la fase orgánica que contenía los ésteres metílicos de monómeros resultantes.

Para los análisis se utilizó una serie 7890A de Agilent (Waldbronn, Alemania) junto con un detector MS 5975C (EI, 70 eV) y un inyector *split-splitless*. Se inyectó una alícuota (1 µL) de fase orgánica en el cromatógrafo de gases en una proporción de división de 1:50. Durante este trabajo se utilizó la columna DB-5HTDB-5HT (400 °C: 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm de espesor de película). Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 0,9 ml min^{-1}. La temperatura del inyector y de la línea de transferencia se estableció en 275 °C y 300 °C respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 2 min, luego de 80°C hasta 175 °C a una velocidad de 5 °C min^{-1}, para una separación eficiente de los picos. Los espectros de masas de EI se registraron en modo de barrido completo (m/z 40–550). Con este programa se detectaron monómeros de C2 a C5. El tiempo de retención para cada monómero es de 2,3 min (C2), 3,8 min (C4), 4,5 min (C5) y 11,2 (3MB, estándar interno).

3.8.3 Identificación y determinación de compuestos orgánicos por HPLC

Para la detección de metabolitos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizó un equipo Agilent 1260 (Estado Unidos) con un detector de índice de refracción (RID) y un detector de ultravioleta (UV). En una columna de intercambio iónico

Aminex HPX-87H (BioRad, España) con ácido sulfúrico 2,5 mM como fase móvil en régimen isocrático a una temperatura de 60 °C, con un caudal de 0,580 mL·min^{-1} y un volumen de inyección de 20 µL se detectaron los siguientes compuestos: ácido cítrico (rt= 8 min/$UV_{214\ nm}$), ácido tartárico (rt= 8,5 min/$UV_{214\ nm}$), ácido láctico (rt= 12,5 min/$UV_{214\ nm}$), ácido fórmico (rt= 13,8 min/$UV_{214\ nm}$), ácido acético (rt= 14,9 min/$UV_{214\ nm}$), ácido propiónico (rt= 17,4 min/$UV_{214\ nm}$), etanol (rt= 20,8 min/RID), ácido butírico (rt= 21,9 min/$UV_{214\ nm}$) y ácido valérico (rt= 29,7 min/$UV_{214\ nm}$). Se utilizaron compuestos de referencia procedentes de Sigma-Aldrich (Merck, Alemania) para la identificación de cada pico y la realización de las curvas patrón para la cuantificación de cada compuesto en gramos por litro.

3.9 Extracción de poliésteres bacterianos

La extracción de polímero se realizó siguiendo el protocolo descrito por Liu y colaboradores (Liu et al., 2011). La biomasa seca resultante después de la centrifugación (3500 × *g*, 30 min, 4 °C) y liofilización de 100 mL de cultivo se extrajo con 10 mL de cloroformo y se agitó mediante una barra magnética a 90 °C durante 4 horas en un balón de destilación. Posteriormente, a través de un paso de filtración, usando filtros Whatman Grado 2 de 8µm de poro (Cat 1002-110), se eliminaron los restos celulares y la fase orgánica se evaporó en una campana extractora hasta obtener un volumen de 5 mL. El polímero se purificó mediante precipitación con 10 volúmenes (50 mL) de metanol frío (-20 °C) con agitación manual. La mezcla se centrifugó a 3000 × *g* durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se recuperó el polímero puro. Los disolventes orgánicos residuales de la muestra se evaporaron de nuevo en una campana extractora durante al menos 16 horas.

3.10 Resonancia magnética nuclear espectroscópica (RMN)

Las estructuras químicas de los polímeros se confirmaron mediante el desplazamiento químico en espectroscopía de RMN-^{1}H. Los análisis de las muestras se realizaron en un espectrómetro Bruker AV 600MHz (Bruker BioSpin GmbH, Alemania). Los espectros de RMN-^{1}H de 600 MHZ se registraron a 25 °C en una solución de $CDCl_3$ de los polímeros extraídos en cada muestra. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como patrón de desplazamiento químico interno (ð). Los espectros fueron analizados en el Servicio de Resonancia Magnética del Centro de Investigaciones Biológicas-Margarita Salas.

3.11 Caracterización de las propiedades térmicas y mecánicas de poliésteres bacterianos

El análisis térmico de los poliésteres bacterianos se llevó a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en las instalaciones de Aimplas (Instituto Tecnológico del Plástico, Valencia) evaluando el efecto de la temperatura sobre la variación de la capacidad calorífica (Cp) de cada muestra con un calorímetro 214 POLYMA (Netzsch-Gerätebau GmbH, Alemania). Los polímeros fueron expuestos a sucesivos ciclos de enfriamiento y calentamiento: un primer ciclo desde -30 a 230 °C at 20 °C/min seguido de una isoterma de 230 °C durante 5 minutos, un ciclo de enfriamiento a 20 °C/min hasta -30 °C, y finalmente, un ciclo de calentamiento desde -30 a 230 °C a 20 °C/min.

La determinación de los pesos moleculares de los poliésteres bacterianos se llevó a cabo en las instalaciones de AIMPLAS utilizando un HPLC con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) acoplado y una columna de permeación en gel (GPC). Para la calibración se usaron diez patrones de poliestireno (PS) con pesos moleculares en el intervalo de 418 a 2.100.000 g mol^{-1}. El cálculo de la distribución del peso molecular de las muestras se realizó mediante el software *Empower* de Waters. Las muestras se disolvieron en cloroformo o hexafluoroisopropanol (HFIP), en función de su naturaleza, a una concentración del 2 % y se filtraron a través de un microfiltro de PTFE (0,22 μm) para eliminar cualquier residuo sólido. Se prepararon dos réplicas de cada muestra y se inyectaron de forma independiente con un caudal de 1 mL·min^{-1} a 25 °C.

3.12 Microscopía

3.12.1 Microscopía óptica

Los cultivos se visualizaron de forma rutinaria con un objetivo de contraste de fases 100 X (Microscopio Nikon) y las imágenes se tomaron con una cámara conectada Leica DFC345 FX.

3.12.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

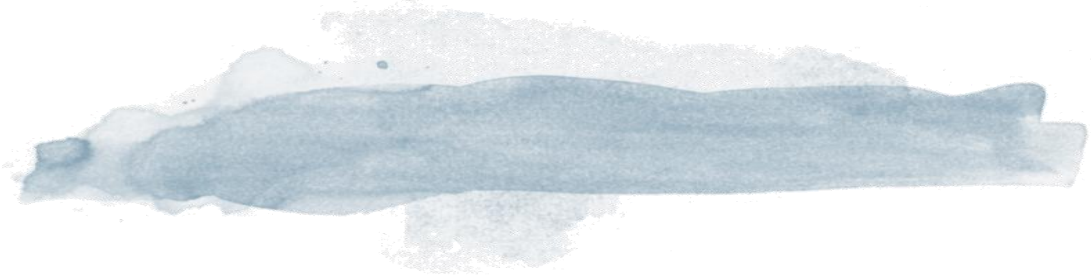
Para en análisis de la producción de gránulos de PHA mediante TEM, se recolectaron células de *C. necator* H16 cultivadas previamente en las condiciones de interés y se lavaron dos veces en 1 X PBS*. Posteriormente, las células se suspendieron en 2,5 % (p/v) de OsO_4 durante 1 hora, se deshidrataron gradualmente en etanol (30, 50, 70, 90 y 100 % (v/v); 30

minutos cada una) y óxido de propileno (1 hora), incrustado en resina Epon 812. Se cortaron secciones ultrafinas (grosor de 70 nm) con un micrótomo usando un cuchillo de diamante Diatome. Las secciones se recogieron con rejillas de cobre de malla 400 recubiertas con una capa de carbono y posteriormente se observaron en un microscopio electrónico Jeol-1230 (Jeol Ltd, Akishima, Japón). La preparación y el análisis de las muestras biológicas fue realizado por los servicios del Centro de Investigaciones Biológicas-Margarita Salas.

3.13 Análisis estadísticos

Los conjuntos de datos se analizaron utilizando Prism 6 (GraphPad Software Inc., EE. UU.) y el software Excel. Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, dependiendo de si se consideraban una o dos variables diferentes, respectivamente. Además, se utilizó el método de Tukey para obtener el estadístico T. En todos los análisis estadísticos realizados, el intervalo de confianza fue del 95%.

Resultados



Capítulo 1.

C. necator H16 como cepa modelo para la síntesis de poliésteres bacterianos a partir de aguas residuales de la industria alimentaria.

RESULTADOS

Capítulo 1. *C. necator* H16 como cepa modelo para la síntesis de poliésteres bacterianos a partir de aguas residuales de la industria alimentaria.

Antecedentes:

En este capítulo se va a abordar la revalorización de aguas residuales de origen industrial del sector alimentario mediante su biotransformación en PHA. Este proceso se ha llevado a cabo en el contexto del proyecto europeo AFTERLIFE (*Advanced Filtration TEchnologies for the Recovery and Later conversIon of relevant Fractions from wastEwater*) del programa Horizonte 2020. A través de una serie de pretratamientos de las aguas residuales, se obtuvieron cuatro sustratos de composición y concentración específica en función de la naturaleza del proceso industrial de origen. En primer lugar, y mediante sistemas de filtración avanzada, se eliminaron los sólidos en suspensión. Posteriormente, en una etapa de extracción se separaron compuestos de interés como las vitaminas y, por último, mediante AD, se obtuvieron cuatro efluentes distintos donde los VFAs fueron los compuestos mayoritarios. En este capítulo se va a abordar la utilización de estos efluentes como precursores de la síntesis de PHA. La información detallada de cada proceso previo a la producción de PHA se puede encontrar en el siguiente enlace: https://afterlife-project.eu/.

RESULTADOS

4.1 Selección de la cepa *C. necator* H16 para la síntesis de PHA a partir de aguas residuales de la industria alimentaria

Los procedimientos de AD llevados a cabo en el proyecto AFTERLIFE dieron lugar a 4 sustratos (S1-S4) derivados de procesos industriales de la elaboración de quesos, caramelos, aceites esenciales y zumos cítricos.

Inicialmente, y con el objetivo de utilizar los VFAs derivados de las aguas residuales fermentadas mencionadas como sustratos para la producción de PHA, se llevó a cabo la caracterización de cada uno de los efluentes de forma cualitativa y cuantitativa mediante HPLC determinando su composición y concentración (Tabla 6).

Compuesto	S1 ($g \cdot L^{-1}$)	S2 ($g \cdot L^{-1}$)	S3 ($g \cdot L^{-1}$)	S4 ($g \cdot L^{-1}$)
Ácido láctico	5,6	43,5	4,6	0,0
Ácido fórmico	0,2	0,0	0,8	0,3
Ácido acético	2,8	5,7	4,7	5,9
Ácido propiónico	2,0	0,0	1,1	2,9
Ácido butírico	5,5	9,4	3,6	1,1
Etanol	1,8	0,0	4,2	0,8
VFAs totales	10,0	15,1	9,5	10,0
Carbono total	17,9	58,6	19,0	11,1

Tabla 6. Caracterización de los sustratos procedentes de aguas residuales fermentadas de origen industrial mediante HPLC. El procedimiento de análisis se detalla en el Apartado 3.8.3 de la sección Materiales y métodos. Los datos mostrados son los correspondientes a la mezcla de los diferentes lotes recibidos de cada sustrato. El carbono total hace referencia a la concentración total de todas las fuentes de carbono presentes en cada sustrato. Abreviaturas: S1 (quesos); S2 (caramelos); S3 (aceites esenciales); S3 (zumos cítricos).

A continuación, se describen las características principales de cada sustrato:

- S1: Agua residual fermentada derivada del proceso de producción industrial de quesos. Los diferentes lotes recibidos tienen una composición homogénea en términos cualitativos, donde el ácido láctico, acético y butírico son los compuestos mayoritarios. Además, contiene trazas de etanol. La composición es estable durante su almacenamiento. El aspecto es translúcido y sin sedimentos, aunque presenta

partículas en suspensión. Requiere de un proceso de filtración por etapas (cada 200 mL) debido a la colmatación de los poros del filtro (Figura 20A).

- S2: Agua residual fermentada derivada del proceso de producción de caramelos y golosinas. Los lotes recibidos tienen una composición heterogénea y una alta concentración en VFAs debido a la conversión de los azúcares durante la AD. Destaca el ácido láctico como compuesto mayoritario en todos los lotes con presencia, además, de ácido acético y ácido butírico. Aspecto transparente y con color en función del colorante utilizado durante el proceso industrial. Presenta precipitados durante su almacenamiento y manipulación, que se eliminan por decantación y filtrado (Figura 20B).
- S3: Agua residual fermentada derivada de la producción de aceites esenciales a partir de cítricos. Los lotes son de composición homogénea y contienen ácido láctico, acético, butírico y etanol, con trazas de ácido propiónico y ácido fórmico. Aspecto oscuro y textura oleosa. Sin sedimentos durante su almacenamiento y manipulación (Figura 20C).
- S4: Agua residual derivada de la producción de zumos de cítricos. Lotes con composición homogénea compuestos por ácido acético y ácido propiónico con trazas de ácido butírico. Presenta partículas en suspensión de tamaño variable (Figura 20D).

A **B**

Sustrato S1 **Sustrato S2**

Figura 20. Aguas residuales fermentadas procedentes de la industria alimentaria utilizadas como sustrato para la producción de PHA. En las fotografías se muestra el aspecto de los sustratos S1-S4 después del proceso de filtración. Abreviaturas: S1 (quesos); S2 (caramelos); S3 (aceites esenciales); S3 (zumos cítricos).

A continuación, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con el fin de identificar una cepa bacteriana robusta con capacidad de producir PHA de forma natural a partir de VFAs con la composición de las aguas residuales fermentadas S1-S4. A través de las bases de datos Scopus y PubMed (https://www.scopus.com) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), y mediante el cribado de las publicaciones relacionadas con la producción de PHA durante los últimos 21 años (7941 artículos), se realizó una comparación entre las especies y géneros bacterianos productores de PHA más estudiadas.

Como se puede observar en la Figura 21, el aumento del número de publicaciones relacionadas con la producción de PHA durante los últimos 10 años ha sido exponencial, marcando un máximo en 2021 con 696 artículos científicos. Relacionadas con la palabra "*waste*" (del castellano, residuo) se identificaron 192 en el año 2021, entre las cuales destacan las publicaciones relacionadas con aguas residuales, suponiendo hasta un 45 % del total de artículos publicados desde el año 2000 (Panel A, Figura 21).

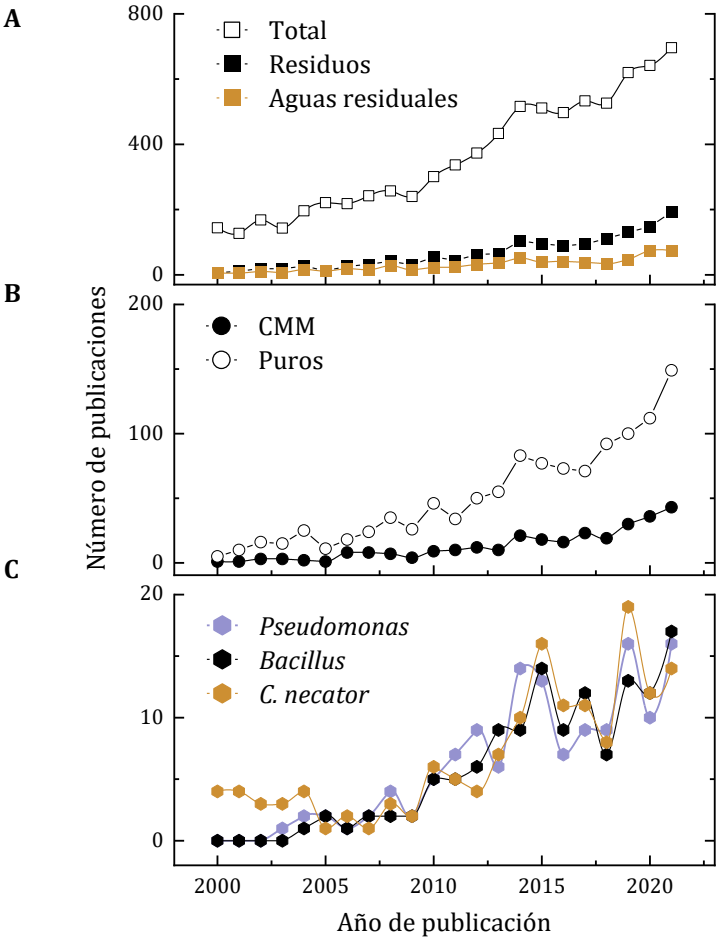


Figura 21. Número de publicaciones basadas en la producción de PHA a partir de residuos durante los últimos 20 años. Fuentes: Scopus y PubMed. Abreviatura: CMM (cultivos microbianos mixtos).

Además, al comparar el volumen de trabajos relacionados con el tipo de cultivo, desde el año 2000 los cultivos puros han sido siempre mayoritarios frente a los CMM (90 % de publicaciones) (Panel B, Figura 21). Por otro lado, al clasificar los artículos en función del microorganismo productor, destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y la especie *C. necator*. De hecho, hay una predominancia clara de los estudios realizados en la cepa *C. necator* H16 con un total de 150 publicaciones, respecto a 130 y 122 de diferentes especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*, respectivamente (Panel C, Figura 21).

De acuerdo a estos resultados, a su elevada capacidad de acumulación de PHA (hasta el 90 % según la literatura) y la gran cantidad de información disponible en la literatura, la cepa seleccionada para el desarrollo del bioproceso a partir de aguas residuales industriales fue *C. necator* H16.

C. necator H16 es una bacteria no patógena quimiolitoautótrofa capaz de producir *scl*-PHA a partir de una infinidad de precursores (ver Apartado 1.5.3, Introducción). Su diversidad metabólica, tolerancia a las fluctuaciones ambientales y capacidad de producción de compuestos de alto valor añadido, han sido las causas por las que ha llegado a ser una de las cepas bacterianas más estudiadas y utilizadas en procesos biotecnológicos. Además, el gran abanico de herramientas genéticas y de ingeniería metabólica disponibles, así como la secuenciación de su genoma, han permitido mejorar el rendimiento de los bioprocesos llegando a utilizarse como microorganismo productor de PHA a escala industrial (Estévez-Alonso et al., 2021; Nygaard et al., 2021).

4.2 Límites de tolerancia a ácidos grasos volátiles

Para determinar los límites de tolerancia y resistencia de *C. necator* H16 a los VFAs se calculó la tasa específica de crecimiento (μ) durante la fase exponencial de crecimiento en el medio rico NB y en el medio mínimo SM en presencia de diferentes concentraciones de ácido acético, butírico, propiónico y valérico a partir de los datos de OD obtenidos (ver detalles en el Apartado 3.3.3, en la sección Materiales y métodos). Los VFAs comerciales se añadieron de forma individual en cada cultivo y a diferentes concentraciones en un rango entre 0,3 y 8 $g \cdot L^{-1}$, para estudiar su efecto de manera independiente.

En general, la tasa de crecimiento fue mayor cuando los VFAs se añadieron al medio rico NB (Figura 22). La μ observada fue similar en todos los VFAs analizados al añadir concentraciones moderadas (entre 0,3 y 3 $g \cdot L^{-1}$). En cambio, al aumentar la concentración hasta 8 $g \cdot L^{-1}$ se observó inhibición del crecimiento en los cultivos con ácido valérico (Figura 22A). Por otro lado, en el medio mínimo SM, el crecimiento disminuyó con respecto al NB (Figura 22B). Mientras que la μ fue similar para todos los ácidos a 0,3 $g \cdot L^{-1}$, tanto a concentraciones moderadas (3 $g \cdot L^{-1}$) como altas (8 $g \cdot L^{-1}$) se detectó una tendencia descendente a medida que aumentaba la concentración de ácido en los cultivos. Además, se detectaron concentraciones inhibitorias, ya que apenas se observó crecimiento en presencia de 8 $g \cdot L^{-1}$ de ácido butírico y ácido valérico.

En este sentido, la toxicidad de los VFAs aumentó proporcionalmente con la longitud de la cadena de los ácidos grasos y la concentración de final de carbono presente en el cultivo.

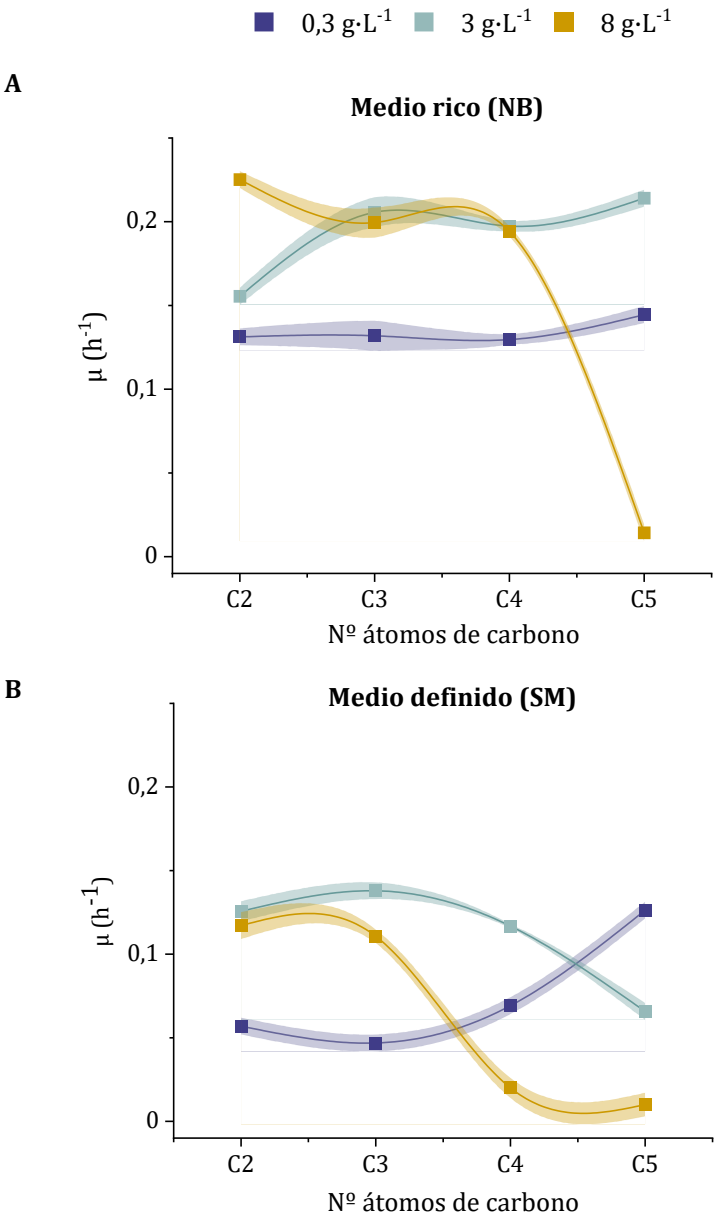


Figura 22. Tasa específica de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de VFAs. A) Crecimiento en medio rico NB. B) Crecimiento en medio mínimo SM. Los cultivos se inocularon a una OD_{600} inicial 0,05 y se incubaron durante 24 horas en un agitador orbital a 200 rpm. En el eje X se representan los ácidos y las concentraciones testadas. La zona sombreada muestra la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Abreviaturas: C2 (ácido acético); C3 (ácido propiónico); C4 (ácido butírico) y C5 (ácido valérico).

La presencia de los gránulos de PHA en el interior celular distorsiona la medida de OD, ya que confiere opacidad a la célula bacteriana (De Eugenio et al., 2010). Por lo tanto, para evaluar la capacidad de utilización de cada sustrato se calculó también el rendimiento específico para cada ácido ($Y_{BIOMASA/VFA}$) (ver detalles en el Apartado 3.3.4, en la sección Materiales y métodos) teniendo en cuenta la biomasa generada y el consumo total del ácido al final del crecimiento (Figura 23).

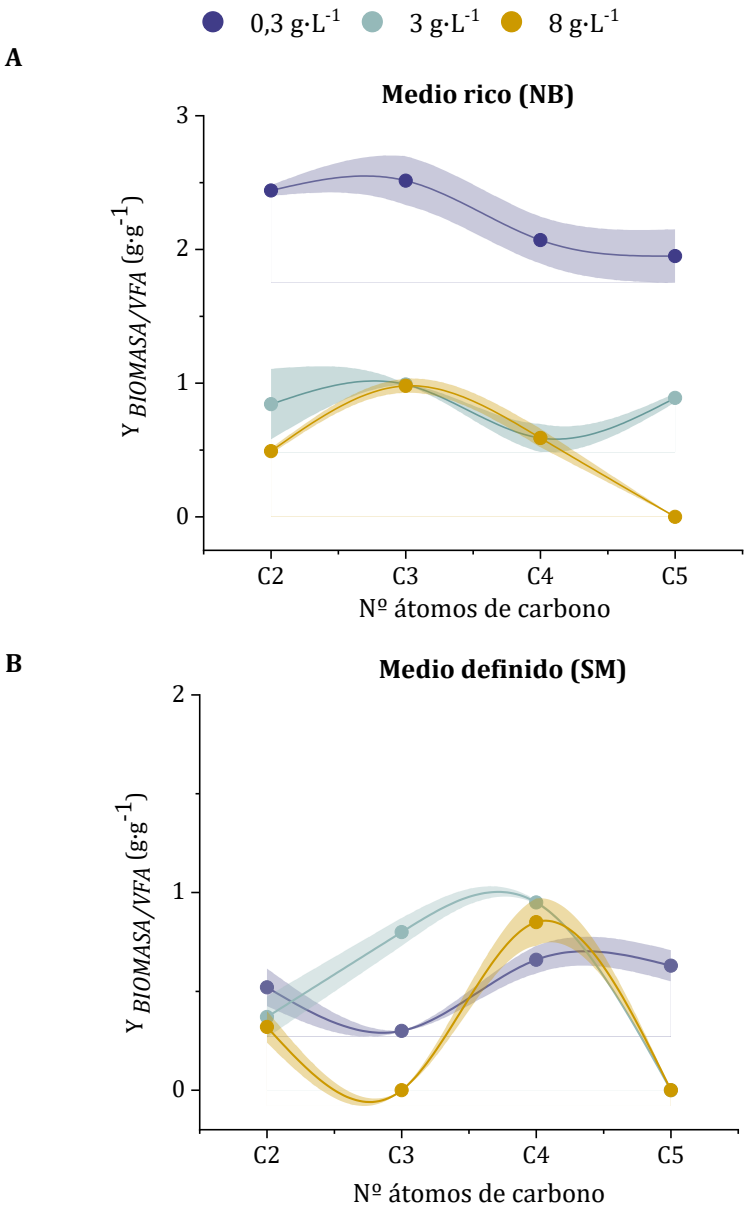


Figura 23. Rendimiento de asimilación específico a concentraciones crecientes de VFAs. A) Datos correspondientes al crecimiento en medio rico NB. B) Datos correspondientes al crecimiento en medio mínimo SM. El eje Y muestra los gramos de biomasa generados a partir de los gramos de VFAs consumidos a las 24 horas de cultivo. En el eje X se representan los ácidos y las concentraciones testadas. La zona sombreada muestra la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Abreviaturas: C2 (ácido acético); C3 (ácido propiónico); C4 (ácido butírico) y C5 (ácido valérico).

De forma general, a medida que la concentración de VFAs aumentó, la producción de biomasa y el consumo disminuyeron dando lugar a valores de rendimientos más bajos. La asimilación de todos los ácidos aumentó cuando *C. necator* H16 creció en NB, generando más biomasa por gramo de VFA añadido con respecto a los cultivos en SM. Las mejores tasas de asimilación se alcanzaron al añadir 0,3 g·L^{-1} de VFA, concentración a la cual *C. necator*

H16 fue capaz de metabolizar prácticamente todo el ácido durante las primeras 24 horas. En relación a los datos de crecimiento obtenidos, se observó como la tasa de asimilación disminuía al utilizar 8 $g \cdot L^{-1}$, indicando que el exceso de VFA afecta al crecimiento y, por lo tanto, a su utilización como fuente de carbono (Figura 23A). Respecto al medio mínimo SM, donde los VFAs son la única fuente de carbono disponible, las tasas de asimilación fueron inferiores a las obtenidas en el medio rico NB. En consonancia a la μ obtenida en medio mínimo, las mejores tasas de asimilación se registraron con 3 $g \cdot L^{-1}$. Además, el ácido butírico mostró rendimientos similares en todas las concentraciones testadas y el ácido valérico mostró una asimilación limitada y fue inhibitorio al añadir 3 y 8 $g \cdot L^{-1}$ (Figura 23B).

Por otro lado, se analizó la cantidad de PHA acumulado en cada una de las condiciones estudiadas. La acumulación de PHA, en términos de % (p/p), aumentó en el medio mínimo SM al añadir ácido butírico. Sin embargo, debido a que la presencia del resto de componentes del medio rico aumentó la generación de biomasa, los mejores datos se obtuvieron en NB con 3 $g \cdot L^{-1}$ de ácido butírico y valérico y, 8 $g \cdot L^{-1}$ de ácido acético (Tablas 7 y 8).

Contenido intracelular de PHA en % (p/p)						
Medio de cultivo	**NB**			**SM**		
Concentración VFA ($g \cdot L^{-1}$)	**0,3**	**3**	**8**	**0,3**	**3**	**8**
Ácido acético	-	14±2	53±4	-	48±4	38±8
Ácido propiónico	-	30±2	41±3	-	13±1	-
Ácido butírico	-	44±1	44±2	7±1	54±4	53±1
Ácido valérico	-	56±4	-	-	-	-

Tabla 7. Contenido intracelular de PHA en *C. necator* H16 en presencia de VFAs a diferentes concentraciones y en función del medio de cultivo utilizado. La biomasa seca fue analizada por GC-MS tras 24 horas de crecimiento en las condiciones de cultivo establecidas. Los datos de producción se muestran en % (p/p) y la concentración de las fuentes de carbono utilizadas (VFAs) se muestran en $g \cdot L^{-1}$. Para las condiciones marcadas con el símbolo (-) no se detectó PHA. Se indica la desviación obtenida en tres réplicas biológicas. Abreviaturas: NB (medio rico); SM (medio mínimo).

Cantidad total de PHA producido (g·L^{-1})						
Medio de cultivo	**NB**			**SM**		
Concentración VFA (g·L^{-1})	**0,3**	**3**	**8**	**0,3**	**3**	**8**
Ácido acético	-	0,21±0,01	1,52±0,2	-	0,25±0,02	0,14±0,02
Ácido propiónico	-	0,57±0,1	0,9±0,01	-	0,05±0,01	-
Ácido butírico	-	1,3±0,1	0,4±0,01	-	0,45±0,01	0,20±0,02
Ácido valérico	-	1,78±0,2	-	-	-	-

Tabla 8. Producción de PHA en *C. necator* H16 en presencia de VFAs a diferentes concentraciones y en función del medio de cultivo utilizado. La biomasa seca fue analizada por GC-MS tras 24 horas de crecimiento en las condiciones de cultivo establecidas. Los datos de producción y concentración de las fuentes de carbono utilizadas (VFAs) se muestran en g·L^{-1}. Para las condiciones marcadas con el símbolo (-) no se detectó PHA. Se indica la desviación obtenida en tres réplicas biológicas. Abreviaturas: NB (medio rico); SM (medio mínimo).

4.3 Síntesis de PHA a escala de laboratorio a partir de residuos de origen industrial.

A continuación, se estudió el crecimiento y la producción de PHA utilizando como sustrato las aguas residuales fermentadas procedentes de los cuatro procesos industriales diferentes mencionadas anteriormente (S1-S4). Teniendo en cuenta los límites de tolerancia (Figuras 22 y 23), los resultados de acumulación de PHA de *C. necator* H16 obtenidos al añadir los VFAs comerciales (Tablas 7 y 8) y la concentración de VFAs detectadas en los sustratos S1-S4 (Tabla 6), se prepararon diluciones de los residuos utilizando el medio mineral SM con el objetivo de aportar los nutrientes indispensables para el crecimiento bacteriano que no estuvieran presentes en los sustratos. La formación de precipitados en algunos residuos, como el S4, impidió evaluar el crecimiento a concentraciones más altas de 1 g·L^{-1} de carbono total.

En primer lugar, se analizó el crecimiento a través de producción la biomasa y el número de células viables en forma de unidades formadoras de colonias (CFU·mL^{-1}) (ver Apartado 3.3.1 en la sección de Materiales y métodos) (Figura 24). La mayor producción de biomasa se obtuvo con el sustrato S3, alcanzando 3,2 g·L^{-1} al usar 6 g·L^{-1} de carbono total y teniendo una tasa de conversión del 54 %. Por otro lado, con los sustratos S1 y S2, se obtuvieron 2,8

y 3 g·L^{-1} de biomasa al usar 9 g·L^{-1} de carbono total, respectivamente, teniendo una tasa de conversión del 31 y el 34 % (Figura 24A). El número de células viables obtenido con los sustratos S1, S2 y S4 fue similar, independientemente de la concentración de carbono total utilizada, poniendo de manifiesto que las diferencias observadas en términos de biomasa podrían corresponderse con la cantidad de polímero intracelular almacenado. Por último, se observó un aumento del número de células viables tras 24 horas de crecimiento con el sustrato S3 en todas las concentraciones analizadas (Figura 24B).

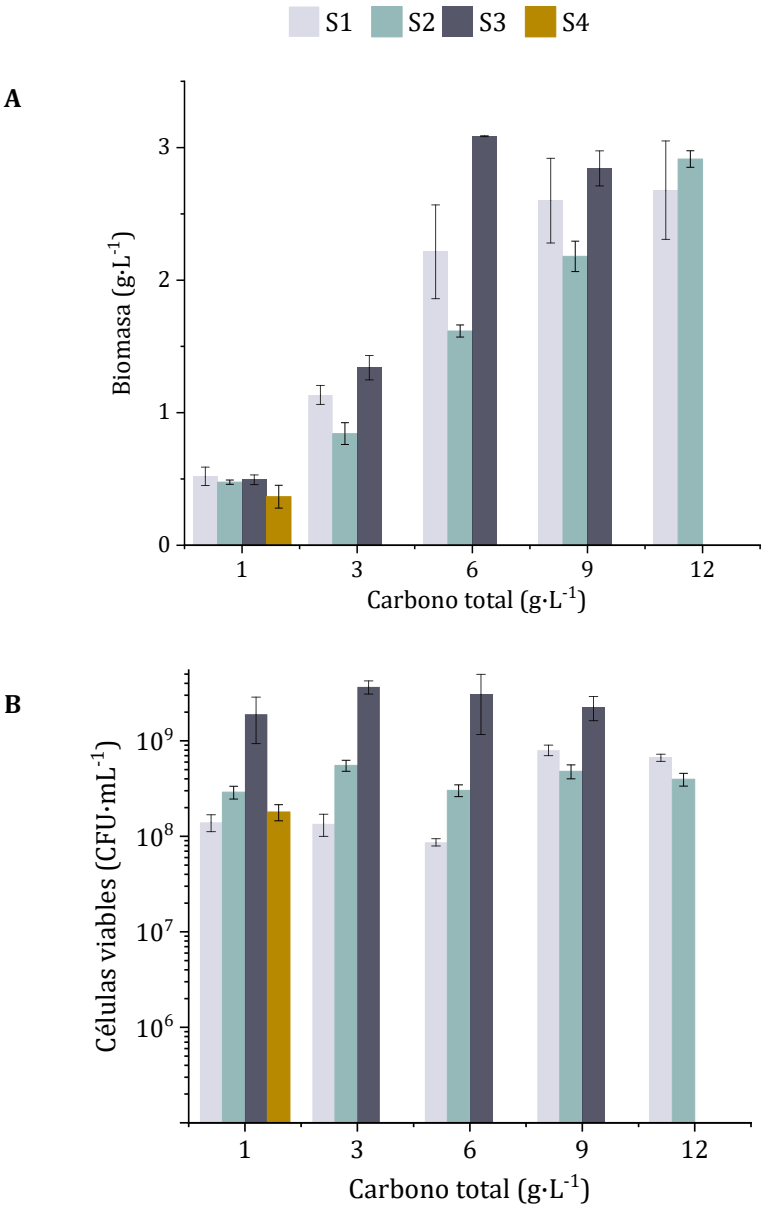


Figura 24. Perfil de producción de biomasa y número de células viables de *C. necator* H16 en función del tipo de sustrato y la cantidad de carbono total en el medio de cultivo. A) Biomasa seca en g·L^{-1} acumulada tras 24 horas de fermentación. B) Número de células viables representado como unidades formadoras de colonia por mililitro de cultivo líquido (CFU·mL^{-1}) a las 24 horas de crecimiento. Las barras de error muestran la desviación obtenida en tres réplicas biológicas.

Para determinar la mejor condición de producción de PHA se cuantificó el contenido intracelular de polímero tras 24 horas de crecimiento. El contenido intracelular en % (p/p) y los resultados de PHA en $g \cdot L^{-1}$ aumentaron proporcionalmente a la concentración de carbono total utilizada (Tabla 9) alcanzando 1,6 y 1,8 $g \cdot L^{-1}$ de PHA al utilizar 9 $g \cdot L^{-1}$ de carbono con los sustratos S2 y S1, respectivamente. A pesar de que los datos de biomasa y número de células obtenidos con el sustrato S3 parecían ser prometedores, no se consiguió acumular más de un 38 % (p/p). Por último, con el residuo S4 se logró una acumulación del 54 % (p/p) con una producción total de 0,1 $g \cdot L^{-1}$.

A

Contenido intracelular de PHA en % (p/p)				
Fuente de Carbono ($g \cdot L^{-1}$)	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**
1	5,1±2,0	24±2,8	3±0,4	54±4,8
3	37±1,9	42±1,8	9±0,9	-
6	41±2,3	60±8,3	36±1,6	-
9	51±2,6	63±2,6	38±3,0	-
12	60±3,8	58±3,8	-	-

B

Cantidad total de PHA producido ($g \cdot L^{-1}$)				
Fuente de Carbono ($g \cdot L^{-1}$)	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**
1	0,03±0,01	0,1±0,02	0,1±0,03	0,1±0,02
3	0,4±0,03	0,3±0,03	0,1±0,02	-
6	0,8±0,06	1,1±0,13	1,1±0,05	-
9	1,2±0,17	1,3±0,14	1,2±0,1	-
12	1,6±0,31	1,7±0,08	-	-

Tabla 9. Producción de PHA tras 24 horas de fermentación en los sustratos de origen industrial caracterizados previamente en *C. necator* H16. Los datos se presentan en forma de % (p/p) sobre el total de la biomasa (A) y en $g \cdot L^{-1}$ (B). La cuantificación del polímero intracelular se llevó a cabo por GC-MS a partir de una reacción de metanólisis de la biomasa seca. Se muestra la desviación obtenida en tres réplicas biológicas. La fuente de carbono hace referencia a la concentración total de los compuestos identificados mediante HPLC.

Por otro lado, se calculó el rendimiento como porcentaje de conversión del carbono total en PHA, con el objetivo de delimitar para cada sustrato la concentración de carbono más adecuada, así como para seleccionar el residuo más susceptible de ser utilizado durante el proceso de optimización a escala de 2L.

Las tasas de conversión más altas se alcanzaron al utilizar 6 g·L^{-1} de carbono total, indicando que 9 y 12 g·L^{-1} no son concentraciones inhibitorias para *C. necator* H16, pero disminuyen la acumulación de PHA (Figura 25).

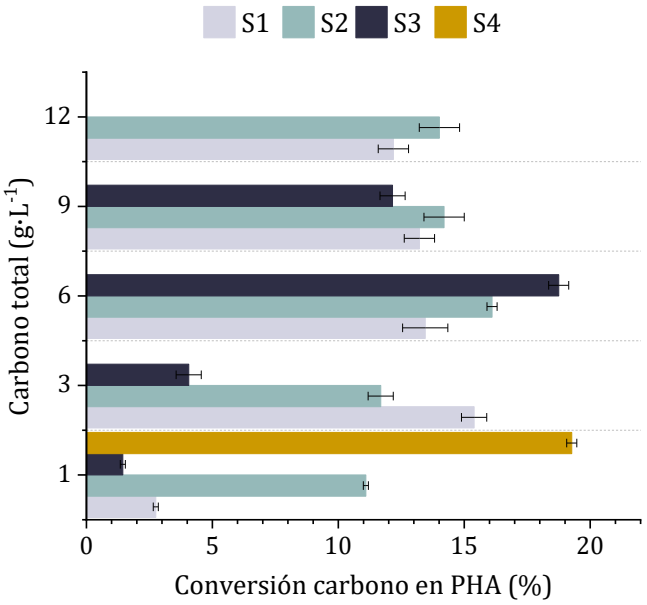


Figura 25. Tasa de conversión del carbono total en PHA con los cuatro sustratos utilizado en *C. necator* H16 a las 24 horas de fermentación. La fuente de carbono hace referencia a la concentración total de los compuestos identificados mediante HPLC. Las barras de error muestran la desviación obtenida en tres réplicas biológicas.

Teniendo en cuenta los resultados de biomasa, producción y tasa de conversión del sustrato en PHA, el agua residual S2 fue seleccionada para la optimización del bioproceso a escala de 2L. Además, la simplificación en las condiciones de operación (un único paso de filtración previo a la fermentación) en comparación con los otros residuos disponibles, fue también un elemento determinante a la hora de hacer la selección.

4.4 Diseño y optimización de la producción de biopolímeros a escala de 2L mediante la fermentación de aguas residuales.

Durante el diseño y la optimización de la producción de PHA usando como materia prima el agua residual S2, se llevaron a cabo las siguientes estrategias en biorreactor:

- Fermentación discontinua (*batch*) (D)
- Fermentación semi-continua alimentada por lotes (*fed-batch*) (F)
    - Alimentación por pulsos (FAP)
    - Alimentación a caudal constante (FAC)
    - Alimentación acoplada a la producción de biomasa (FAB)
    - Alimentación acoplada a la producción de biomasa a volumen de trabajo constante (FAVC)

En la Figura 26 se muestra un esquema resumen de las estrategias aplicadas.

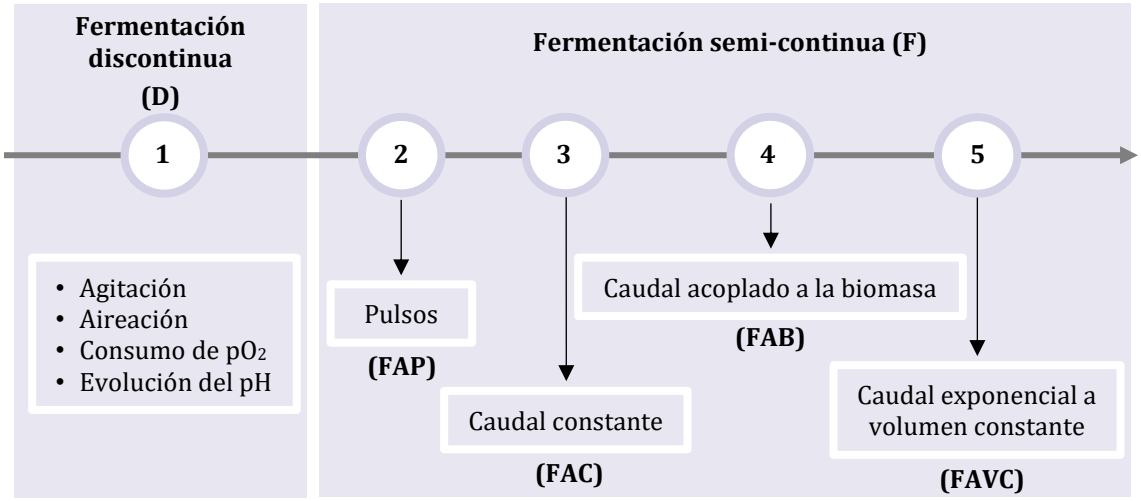


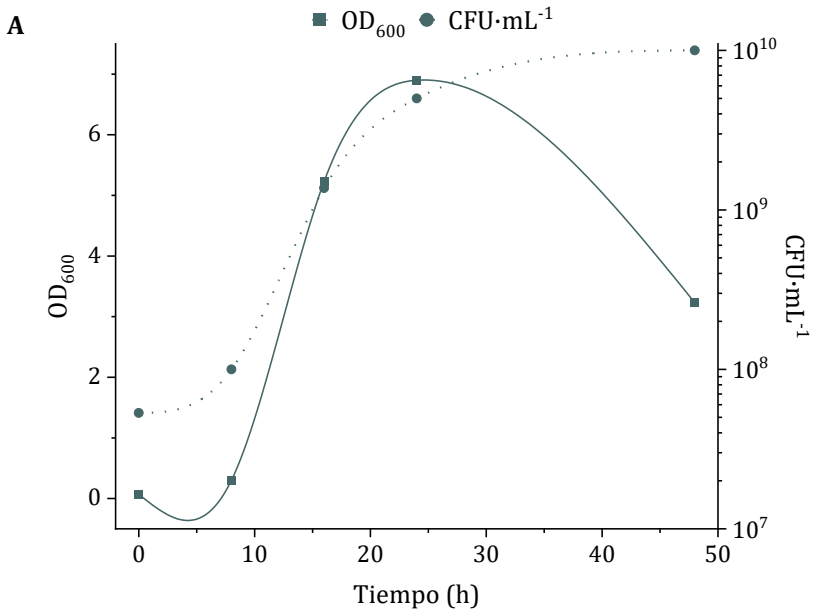
Figura 26. Diagrama de las estrategias de operación aplicadas durante la optimización de la producción de PHA a partir de aguas residuales en *C. necator* H16.

Teniendo en cuenta los límites de tolerancia de *C. necator* H16 observados en los experimentos en matraz, se testaron diferentes modos de operación diluyendo el residuo con medio mineral SM a una concentración final de 6 $g \cdot L^{-1}$. La agitación y la aireación se mantuvieron constantes en todos los experimentos a excepción de la FAVC, donde se configuró el oxígeno en cascada con un valor mínimo del 40 % de oxígeno disuelto (pO_2). La temperatura se mantuvo constante a 30 °C en todas las fermentaciones.

4.4.1 Fermentación discontinua (D)

En primer lugar, se realizó un estudio del crecimiento a través de la monitorización de la OD y la cuantificación de CFU·mL^{-1}, así como la evolución del consumo de oxígeno (pO_2) y el pH a escala de 1L en un biorreactor Bioreactor ez-2 control de *Applikon Biotechnology* (según se indica en el apartado 3.4 de la sección Materiales y métodos). El modo de operación D permite tener una visión global del bioproceso, ya que al tratarse de un sistema cerrado sin adiciones externas, el cambio en la concentración de biomasa y metabolitos se genera como resultado del metabolismo de *C. necator* H16.

Desde el inicio y durante las primeras 8 horas de fermentación se observó una fase de latencia, durante la cual el número de células viables se mantuvo constante, seguida de una fase exponencial de crecimiento que alcanzó su máximo a las 24 horas con una OD_{600} de 6,9 y 5 x 10^9 células·mL^{-1} (Figura 27A). A partir de las 24 horas de fermentación, se produjo una disminución drástica de la OD_{600}, correspondiéndose con un aumento puntual en el consumo de oxígeno antes de entrar en la fase estacionaria (Figura 27B). El descenso en la pO_2 indica un aumento en la actividad metabólica celular, lo que podría marcar el inicio de la hidrólisis del polímero causado por el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo, ya que el número de células de viables se mantiene constante. Por otro lado, el pH aumentó durante la fermentación, llegando a un pH básico cercano a 9,5 (Figura 27B).



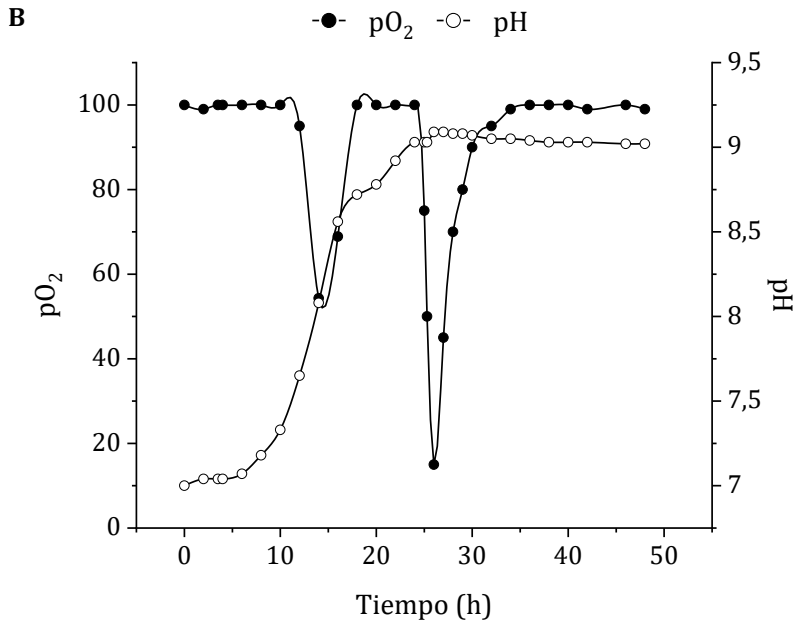


Figura 27. Fermentación discontinua (D) en *C. necator* H16. A) Curva de crecimiento obtenida a través de medidas de densidad óptica (OD_{600}) y contaje del número de células viables ($CFU \cdot mL^{-1}$) a lo largo del tiempo. B) Registro del perfil de consumo de oxigeno (pO_2) y evolución del pH.

4.4.2 Fermentación semi-continua alimentada por lotes (F)

Con el objetivo de alargar la fase exponencial de crecimiento sin aumentar la fase de latencia ni alcanzar concentraciones inhibitorias, se diseñaron varias estrategias de fermentación basadas en la alimentación por lotes o *fed-batch* (F). Se comparó la acumulación de biomasa, producción de PHA, perfil de consumo de las fuentes de carbono disponibles, amonio, fosfato y oxígeno al añadir la alimentación por pulsos (FAP) o de forma continua a partir de la fase exponencial de crecimiento (FAC, FAB y FAVC).

En función de los resultados obtenidos en la fermentación discontinua D (Apartado 4.4.1), la alimentación por pulsos (FAP) se aplicó a partir de la fase exponencial de crecimiento, desde las 16 hasta las 24 horas añadiendo 3 $g \cdot L^{-1}$ de sustrato cada 2 horas.

Como se puede ver en la Figura 28A, tanto la OD_{600} como el número de células viables mantuvieron un aumento constante a partir del inicio de la alimentación y durante todo el tiempo de fermentación. La producción de PHA aumentó exponencialmente a partir de las 16 horas coincidiendo con un cambio en el balance carbono/nitrógeno (C/N) debido a la alta concentración de carbono del sustrato con respecto al nitrógeno, provocando una disminución en la cantidad de amonio (NH_4^+) disponible (Figura 28B). Por otro lado, la

presencia de fosfato (PO_4^{3-}) no pareció tener influencia en el crecimiento ni en la producción de PHA, ya que la concentración disminuye lentamente a medida que se adiciona fuente de carbono y aumenta la biomasa. Además, a través del análisis del perfil de consumo de los compuestos mayoritarios del sustrato utilizado, se observó cómo *C. necator* H16 usaba de forma preferente el ácido láctico y el butírico frente al acético y al etanol (Figura 28C).

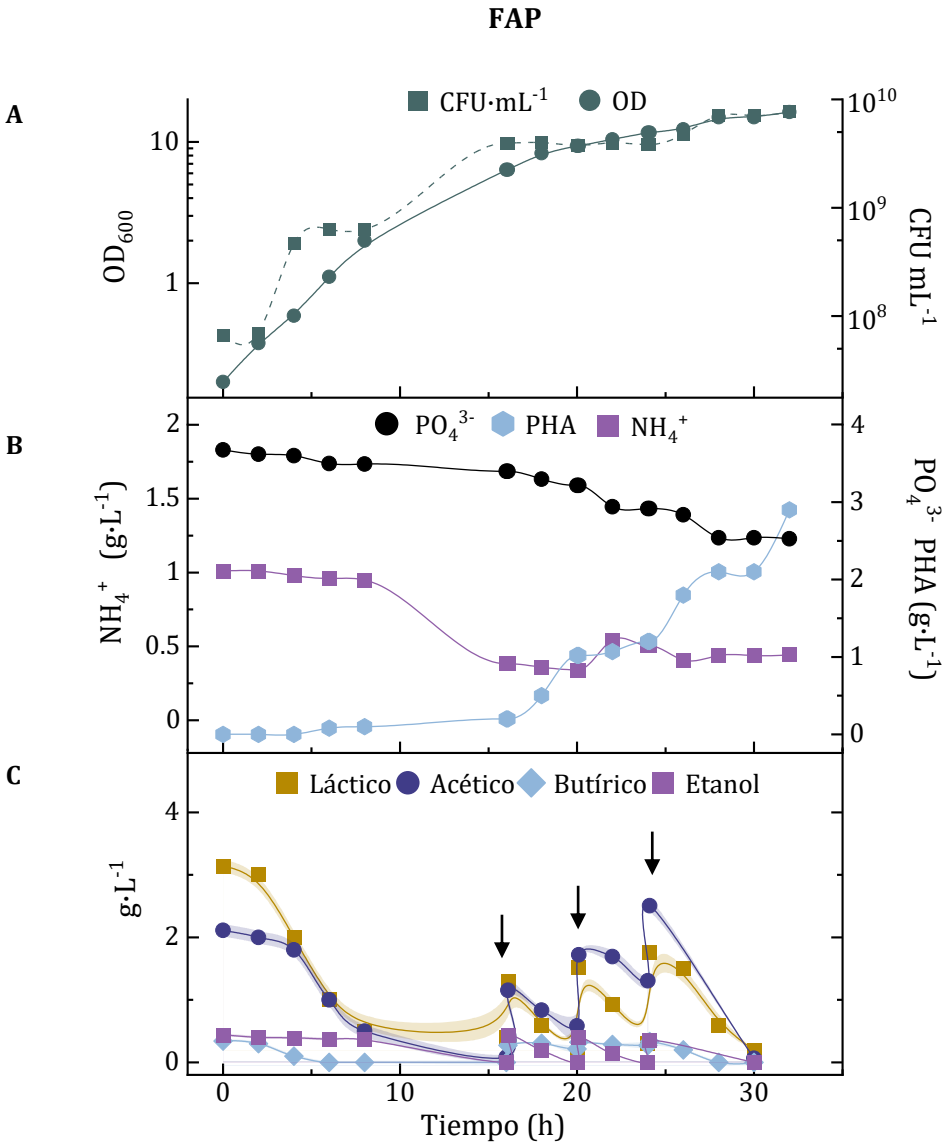


Figura 28. Fermentación semi-continua con alimentación por pulsos (FAP). A) Curva de crecimiento. B) Producción de PHA durante la fermentación y concentración de amonio y fosfato durante el crecimiento. C) Evolución del consumo de los compuestos identificados durante la fermentación mediante el análisis de los sobrenadantes recogidos por HPLC. Las flechas indican el momento de la fermentación en el que se añadieron los pulsos.

Como se puede observar en la Figura 29, el aspecto del caldo de cultivo tras 30 horas de fermentación adquirió un tono blanquecino, característico de los cultivos en condiciones de producción de PHA.

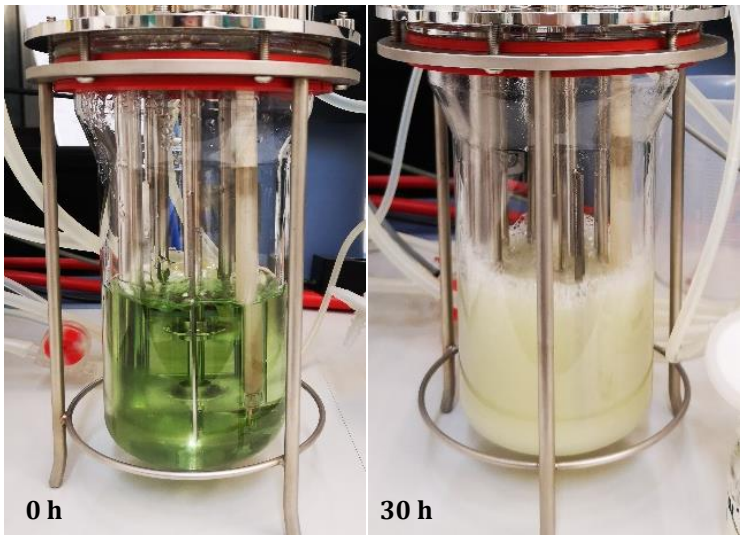


Figura 29. Aspecto del caldo al principio y al final de la fermentación aplicando la estrategia FAP.

A continuación, siguiendo con el modo de operación (F) se aplicó una alimentación continua (FAC) durante 10 horas desde la fase exponencial de crecimiento temprana, a partir de las 8 horas y hasta las 16 horas. El crecimiento observado fue similar al obtenido con la estrategia anterior (Figura 30A). En cuanto al consumo de las fuentes de carbono, se observó el mismo patrón que con la adición por pulsos. Sin embargo, tras 10 horas de alimentación continua se acumularon hasta 6,5 $g \cdot L^{-1}$, indicando que la velocidad de adición del sustrato era superior a la velocidad de consumo específica de las fuentes de carbono que componen la materia prima. El comienzo de la fase estacionaria de crecimiento y la ralentización del metabolismo pudo ser la causa de dicha acumulación (Figura 30B). Aunque la producción de PHA a las 30 horas fue similar a la obtenida a través de la adición de sustrato por pulsos (FAP), la acumulación comenzó de forma simultánea al comienzo de la alimentación al producirse un cambio en el balance C/N (Figura 30C).

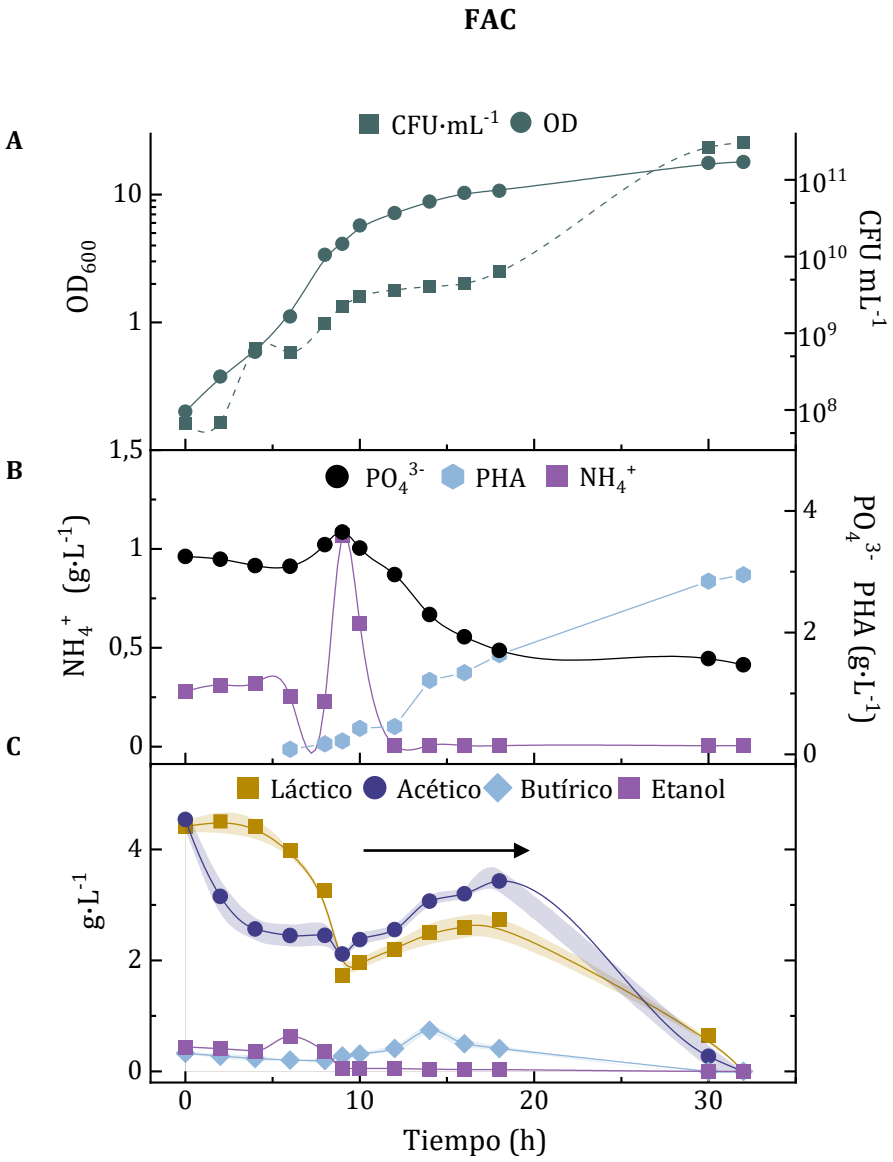


Figura 30. Fermentación semi-continua con alimentación continua (FAC) utilizando como materia prima el sustrato S2. A) Curva de crecimiento. B) Producción de PHA y concentración de amonio y fosfato durante el crecimiento. C) Evolución del consumo de los compuestos identificados durante la fermentación mediante el análisis de los sobrenadantes recogidos por HPLC. La duración de la alimentación se indica con una flecha.

Adicionalmente, con el objetivo de evitar la acumulación de los compuestos que integraban el residuo y basados en los datos obtenidos en la estrategia FAC, se diseñó una estrategia a escala de 2L en un reactor Biostat^{R} B-Benchtop, basada en una alimentación acotada a la velocidad de asimilación de carbono de *C. necator* H16 en estas condiciones (FAB). Para ello, y a partir de los datos obtenidos durante las fermentaciones FAP y FAC se calculó el caudal de alimentación optimo, oscilando entre 0,6-1 g·L^{-1} (Figura 31).

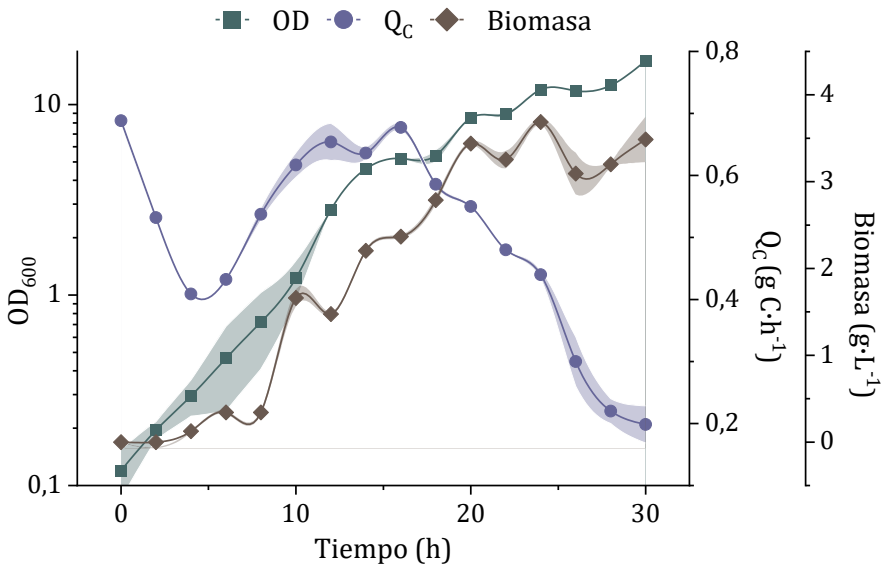


Figura 31. Estudio del rango de alimentación durante la fase exponencial de crecimiento para ser aplicado en una estrategia FAB. Cantidad de carbono consumida por hora (Q_C) durante las estrategias FAP y FAC, biomasa acumulada y OD_{600}. La zona sombreada muestra la desviación de tres réplicas biológicas en las que se basaron los cálculos.

Una vez establecido el rango del caudal de alimentación entre 0,6 y 1 g·L^{-1} de sustrato S2 se llevó a cabo la estrategia FAB. Durante esta estrategia, la OD_{600} y la acumulación intracelular de polímero aumentaron desde el inicio de la alimentación de forma exponencial, alcanzando un 75 % (p/p) y 3,5 g·L^{-1} de PHA en total. Destaca el descenso en la concentración de amonio en el caldo de cultivo a las 10 horas de fermentación, causando una limitación de nitrógeno y, forzando la producción de polímero a la vez que condiciona la división celular y el aumento de biomasa (Figura 32A y 32B). Se observó una disminución en la actividad metabólica a partir de las 36 horas de fermentación, coincidiendo con un agotamiento de las fuentes de carbono disponibles y el fin de la alimentación (Figura 32C).

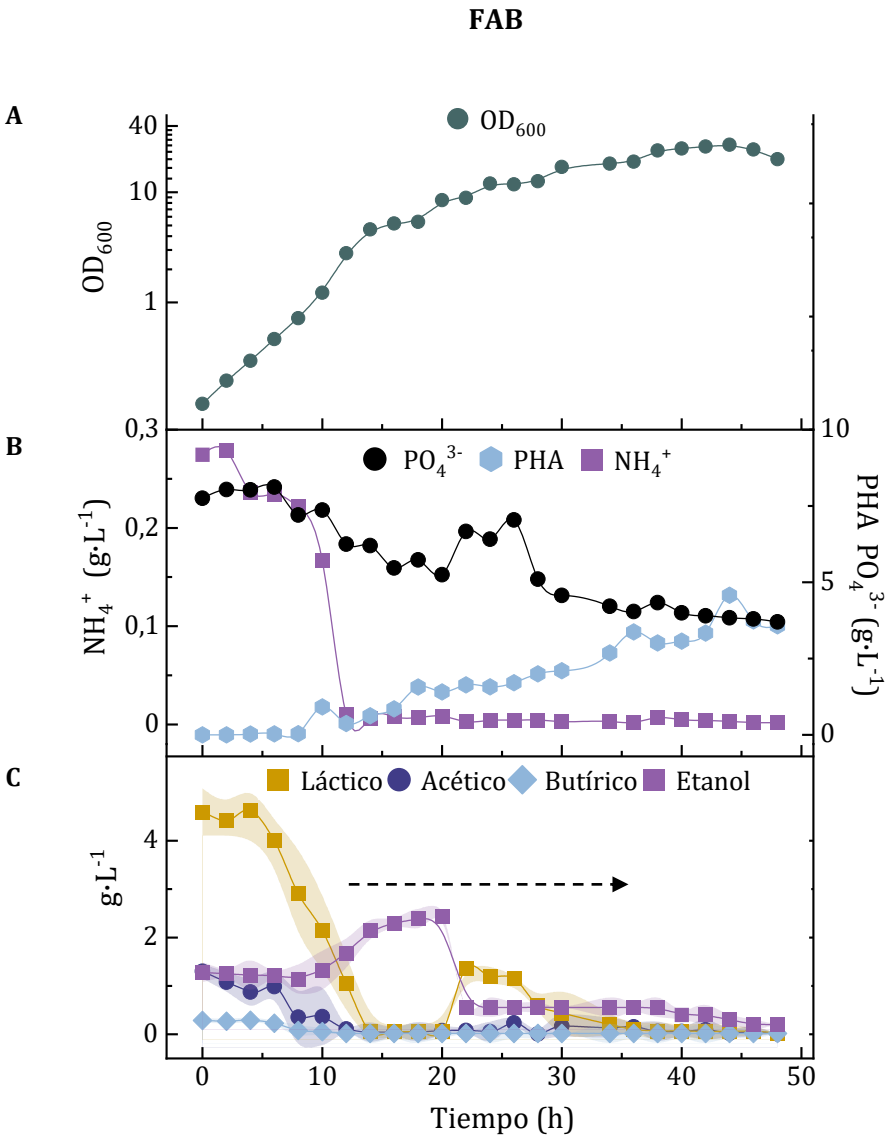


Figura 32. Parámetros del crecimiento, producción de PHA y consumo de sustratos de *C. necator H16* durante la fermentación alimentada (FAB) a caudal exponencial. A) Crecimiento B) Producción de PHA y concentración de amonio y fosfato durante el crecimiento. C) Consumo de las fuentes de carbono identificadas en la materia prima utilizada durante la fermentación. La duración de la alimentación se indica con una flecha discontinua debido a la modificación del caudal a lo largo de la fermentación.

Por último, con la finalidad de aumentar el rendimiento del bioproceso y mantener constantes las velocidades máximas de producción de biomasa y PHA, teniendo como punto de partida los datos obtenidos previamente, se planteó el modo de operación FAVC con una alimentación cuyo caudal estaba acoplado a la producción de biomasa a escala de 2L como siguiente estrategia. Durante este modo de operación se añade un volumen determinado de sustrato retirando la cantidad equivalente. De esta forma, el volumen total de trabajo no aumenta, evitando tanto la acumulación de posibles compuestos con tasas de asimilación más bajas, como la dilución de otros nutrientes indispensables para el crecimiento. Además,

se aumentó la cantidad inicial de NH_4^+ a 1 $g \cdot L^{-1}$ para evitar la limitación temprana de nitrógeno observada en los experimentos anteriores, generando dos situaciones metabólicamente diferenciadas: un aumento de biomasa seguido de un proceso de acumulación de PHA.

Durante una primera etapa, la biomasa creció rápidamente gracias a la mayor disponibilidad de NH_4^+, aumentando exponencialmente hasta las 20 horas de fermentación y alcanzando una OD_{600} de 20 (Figura 33A). A partir de la fase exponencial temprana (8 horas) se aplicó una estrategia similar a la de un cultivo continuo en la que se añadió sustrato con un caudal creciente entre 0,6 y 3 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ de forma simultánea la salida de un volumen de medio similar al añadido. Como se observa en las Figuras 33B y 33C, el sistema alcanza un estado estacionario tras 20 horas de fermentación, que se mantiene aproximadamente durante 10 horas. La producción de PHA se favoreció al aumentar el desequilibrio C/N, alcanzando un máximo a las 34 horas de fermentación con una acumulación del 85 % (p/p) y 16 $g \cdot L^{-1}$ de PHA (Figuras 33B). A partir de las 28 horas se observó un incremento en la cantidad acumulada de ácido láctico, acético, butírico y etanol, así como un consumo total del NH_4^+ y el PO_4^{3-} disponibles (Figuras 33C). La acumulación de VFAs a partir de 28 horas de fermentación no permite mantener el estado estacionario del sistema afectando al crecimiento y la acumulación de PHA.

En la Figura 34 se muestra el aspecto del caldo y las células de *C. necator* H16 tras 20 horas de fermentación aplicando la estrategia FAVC.

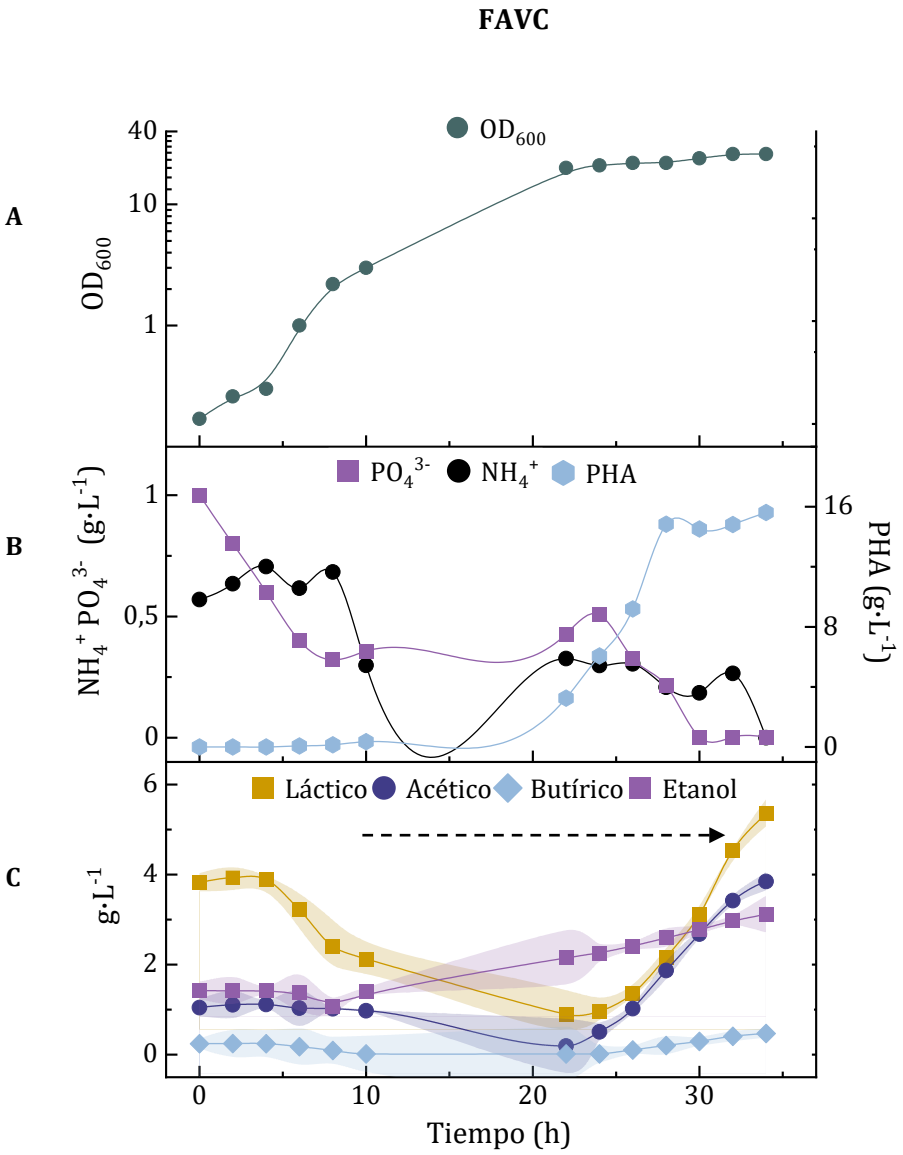


Figura 33. Parámetros del crecimiento, producción de PHA y consumo de sustratos de *C. necator H16* durante la estrategia FAVC. A) Análisis de la OD_{600} durante la fermentación. B) Producción de PHA y concentración de amonio y fosfato durante el crecimiento. C) Consumo de las fuentes de carbono identificadas en la materia prima utilizada durante la fermentación. La duración de la alimentación se indica con una flecha discontinua debido a la modificación del caudal a lo largo de la fermentación.

A

B

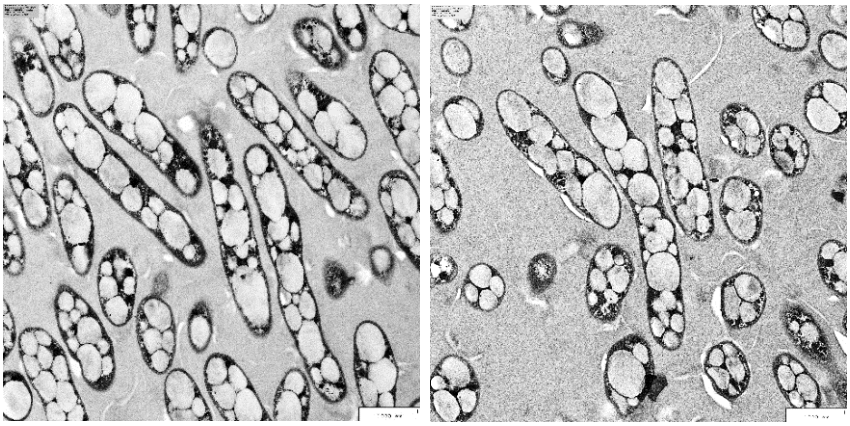


Figura 34. Células de *C. necator H16* durante la fermentación FAVC creciendo en el sustrato S2. A) Aspecto del cultivo al inicio y tras 20 horas de fermentación. B) Fotografía obtenida mediante TEM a las 20 horas de fermentación con una acumulación intracelular del 85 % (p/p).

4.5 Caracterización de los biopolímeros producidos a partir de aguas residuales de origen industrial.

Como se ha comentado en la Introducción (ver Apartado 1.5.3), el tipo de VFAs presentes en el medio de cultivo determina la producción de P(3HB) o P(3HB-*co*-3HV) en *C. necator* H16. Durante los experimentos de producción de PHA utilizando los sustratos S1-S4 se obtuvieron polímeros de diferente composición monomérica en función del tipo de sustrato utilizado durante los cultivos en matraz (Tabla 10).

Sustrato	Polímero	3HB (mol %)	3HV (mol %)
S1	P(3HB-*co*-3HV)	85	15
S2	P(3HB)	100	-
S2	P(3HB)	100	-
S3	P(3HB-*co*-3HV)	88	12
S4	P(3HB-*co*-3HV)	80	20

Tabla 10. Composición de los polímeros obtenidos durante las fermentaciones a escala de matraz con los sustratos S1-S4. Las fermentaciones llevadas a cabo para obtener los polímeros descritos en la tabla se llevaron a cabo utilizando 6 $g \cdot L^{-1}$ con los sustratos S1, S2, S3. Como se ha mencionado anteriormente, con el sustrato S4 solo se pudieron llevar a cabo cultivos diluyendo el residuo a 1 $g \cdot L^{-1}$.

Los polímeros obtenidos durante los ensayos en matraz y optimización del escalado fueron caracterizados en las instalaciones de Aimplast (Instituto Tecnológico del plástico, Valencia). A partir de la biomasa y, tras la extracción y purificación de cada muestra, se realizó un análisis del peso molecular mediante cromatografía por permeación en gel (GPC) y de las propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la Figura 35 se muestra el aspecto de los polímeros obtenidos durante las fermentaciones con los sustratos S2 (FAC y FAVC) y S3 (D).

El peso molecular de un polímero es determinante a la hora de evaluar las propiedades de un polímero. Mediante este valor se obtiene información acerca de la longitud de las cadenas y del grado de polimerización, lo que influye tanto en sus propiedades mecánicas como en la degradación. Como se puede observar en la Tabla 11, los polímeros producidos en matraz mostraron un M_w mayor que los polímeros producidos en biorreactor. Destaca el valor de PDI del polímero acumulado durante la FAC con el sustrato S2, indicando que hay fracciones con diferentes longitudes de cadena.

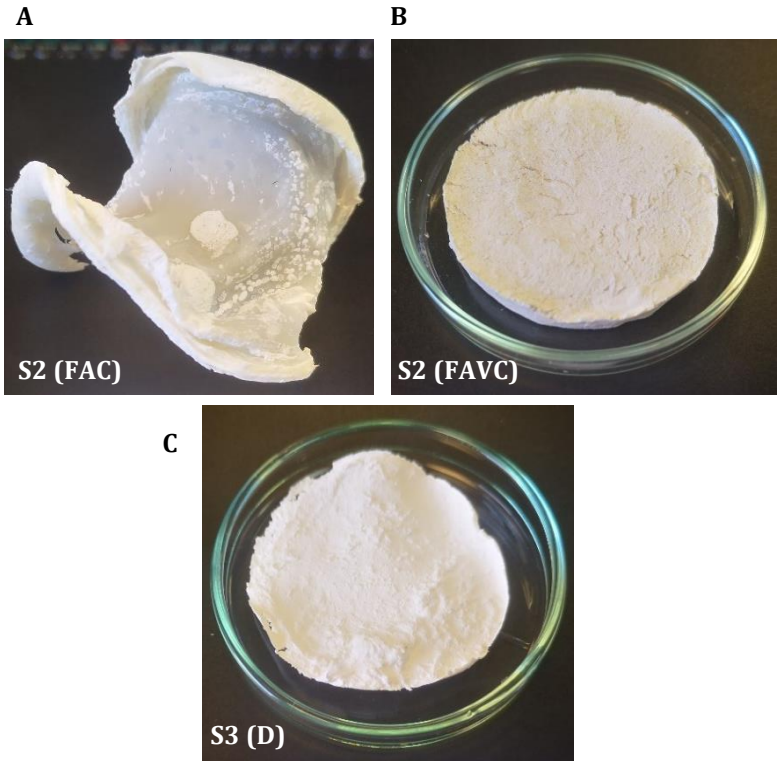


Figura 35. Polímeros producidos por *C. necator* H16 a partir de los sustratos S2 y S3. Los polímeros fueron extraídos y purificados según el protocolo detallado en el Apartado 3.10.4 de la sección Materiales y métodos. A) Muestra de P(3HB) obtenida durante la FAC del sustrato S2. B) Muestra de P(3HB) obtenida durante la FAVC del sustrato S2. C) Muestra de P(3HB-*co*-12%HV) obtenida durante la fermentación D del sustrato S3.

Sustrato	Modo de operación	Polímero	M_n	M_w	PDI
S1	Matraz	P(3HB-*co*-15%HV)	322.107	625.118	1,9
S2	FAC	P(3HB)	72604	359.805	5,6
S2	FAVC	P(3HB)	255.793	565.495	2,2
S3	D	P(3HB-*co*-12%HV)	243.257	543.936	2,2
S4	Matraz	P(3HB-*co*-20%HV)	350.497	751780	2,1

Tabla 11. Propiedades físicas de los polímeros producidos por *C. necator* H16 usando aguas residuales fermentadas como sustrato. Abreviaturas: M_n (peso molecular medio); M_w (peso molecular medio en peso); PDI (índice de polidispersidad); M (cultivos en matraz); FAC (fermentación semi-continua con alimentación continua); FAVC (fermentación semi-continua con alimentación a volumen constante) y D (fermentación discontinua).

El programa de DSC realizado consta de un primer calentamiento, el cual muestra el material tal como se recibe. A continuación, se produce un ciclo de enfriamiento que impone un rastro térmico estándar en el material, y finalmente, un segundo calentamiento que permite comparar los materiales de forma directa entre sí. En la Figura 36 se muestran los termogramas de DSC. Durante el primer calentamiento sólo se detecta un punto de fusión (T_{m1}). Sin embargo, una vez se ha borrado la historia térmica del biopolímero con un enfriamiento controlado, en el segundo calentamiento se obtienen los valores de transición vítrea (T_g), punto de fusión (T_{m2}), temperatura de cristalización (T_c). A partir de estos datos se calcularon la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de transición cristalina (T_c).

Los datos se encuentran resumidos en la Tabla 12.

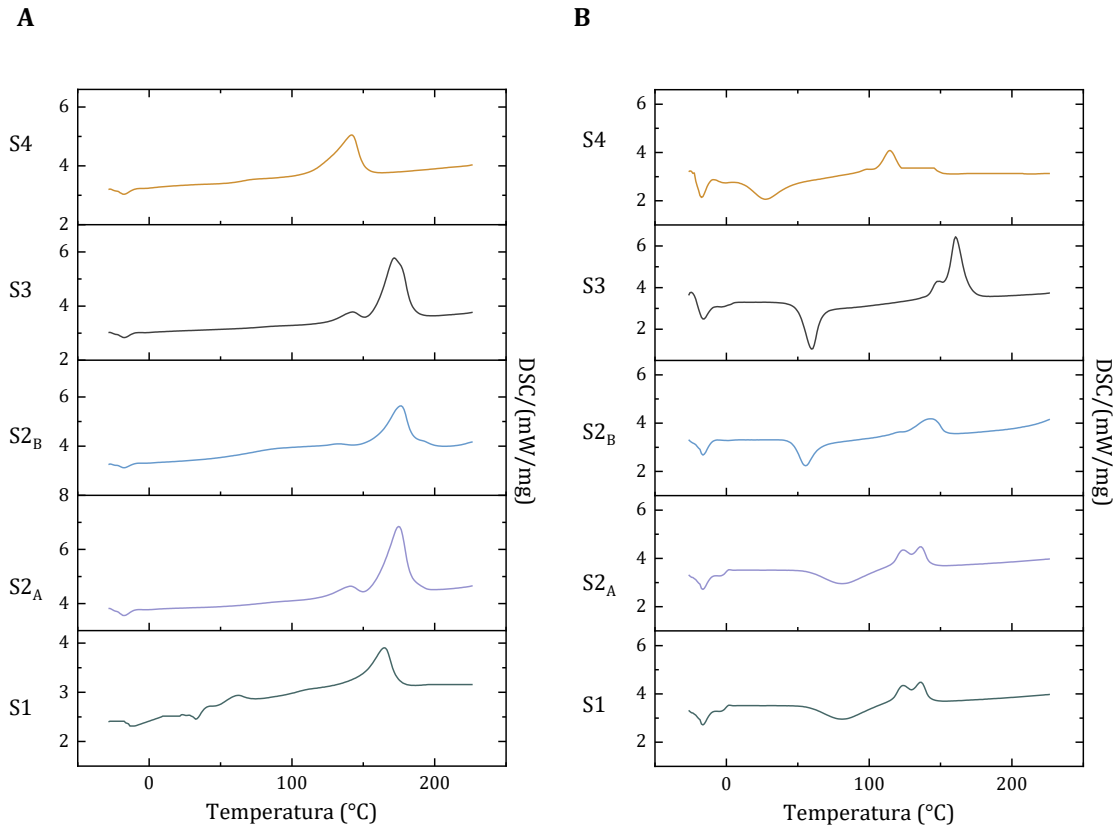


Figura 36. Termogramas de DSC obtenidos para los polímeros producidos a partir de los sustratos S1-S4 por *C. necator* H16. A) Curva correspondiente al primer calentamiento de cada muestra. Se detecta el punto de fusión del material obtenido. B) Curva correspondiente al segundo calentamiento de cada muestra. Se detecta los valores de transición vítrea (T_g), punto de fusión (T_m) y temperatura de cristalización (T_c) una vez se ha borrado la historia térmica del material.

Sustrato	Modo de operación	Polímero	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_g (°C)	T_c (°C)
S1	M	P(3HB-*co*-15%HV)	141±0,4	141±0,4	-0,5	82
S2	FAC	P(3HB)	158±0,1	174±0,1	1,8±0,4	60±1,5
S2	FAVC	P(3HB)	176±0,7	177±0,7	4±0,1	55±2,8
S3	D	P(3HB-*co*-12%HV)	154±0,5	170±0,5	1,4±0,3	65±4,2
S4	M	P(3HB-*co*-20%HV)	164±1,8	163±1,8	-	77

Tabla 12. Propiedades térmicas de los polímeros producidos por *C. necator* H16 a partir de los sustratos S1-S4. Abreviaturas: T_g (temperatura de transición vítrea); T_m (temperatura de fusión); T_c (temperatura de transición cristalina); M (cultivos en matraz); FAC (fermentación semi-continua con alimentación continua); FAVC (fermentación semi-continua con alimentación a volumen constante) y D (fermentación discontinua).

Además, las estructuras químicas de los polímeros P(3HB) y P(3HB-*co*-3HV) se confirmaron mediante el desplazamiento químico en espectroscopía de RMN-^{1}H en el servicio de Resonancia Magnética del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. En la Figura 1 del Anexo, correspondiente al Material suplementario del Capítulo 1, pueden observarse los espectros de RMN-^{1}H en $CDCl_3$ de los polímeros mostrados en la Figura 35A y 35C.

Capítulo 2.

Biosíntesis de polímeros derivados de ácido láctico en la estirpe salvaje *C. necator* H16.

Capítulo 2. Biosíntesis de polímeros derivados de ácido láctico en la estirpe salvaje *C. necator* H16.

Antecedentes

El PLA es el segundo bioplástico más producido a nivel mundial, después de las mezclas de almidón, teniendo un gran potencial para reemplazar a otros polímeros convencionales como el PE, PP y PET, debido a su bajo coste y disponibilidad (Jamshidian et al., 2010). Sin embargo, a día de hoy, gran parte de su proceso de síntesis depende de catalizadores químicos (Mehta et al., 2005). De momento no se han encontrado microorganismos capaces de sintetizar polímeros con monómeros 2-hidroxialcanoatos (2HAs) de forma natural. Sólo se ha conseguido producir PLA y copolímeros derivados en microorganismos recombinantes mediante la construcción de rutas heterólogas a través de herramientas de ingeniería genética (Choi et al., 2020) (ver sección 1.5.5 de la Introducción).

En este capítulo, se aborda el estudio de un resultado no esperado que se detectó durante la puesta a punto de la producción de PHA en *C. necator* H16 utilizando el agua residual procedente de la fabricación de caramelos. Inicialmente, se describe cómo se llegó a esta observación derivada de un consumo preferencial del ácido láctico (LA) con respecto al acetato y la acumulación simultánea de polihidroxibutirato-*co*-lactato (P(3HB-*co*-LA)). El objetivo planteado fue estudiar el crecimiento y los factores influyentes en la síntesis de P(3HB-*co*-LA) para modular la proporción de monómeros del polímero final y, por lo tanto, evaluar sus posibles aplicaciones.

RESULTADOS

4.6 Análisis de la producción de P(3HB-*co*-LA) en aguas residuales fermentadas con altos niveles de lactato

Con el objetivo de diseñar un bioproceso escalable para la producción de PHA utilizando directamente el efluente con VFAs derivado de las aguas residuales de la elaboración de caramelos (referido durante el Capítulo 1 como S2), se realizaron diferentes ensayos de adaptación del sustrato original consistentes en la adición de requerimientos nutricionales que no estuvieran presentes en la materia prima de partida. Teniendo en cuenta las características de los residuos descritas a lo largo del Capítulo 1 y los rendimientos obtenidos, se seleccionaron dos lotes diferentes derivados del sustrato S2 para realizar este estudio, a los que hemos denominado $S2_A$ y $S2_B$.

En primer lugar, los sustratos se analizaron mediante HPLC (ver Apartado 3.8.3 en la sección Materiales y métodos). Como se muestra en la Tabla 13 y en la Figura 37, la composición de ambas muestras fue similar cualitativamente, aunque no cuantitativamente, teniendo ácido láctico, ácido acético y etanol como compuestos mayoritarios, y aumentando de forma significativa la concentración de ácido láctico del sustrato $S2_B$ con respecto al $S2_A$. De forma complementaria, las aguas residuales fermentadas fueron sometidas a un análisis de composición elemental, llevado a cabo en las instalaciones de Fitosoil S.L. Acorde con los datos obtenidos por HPLC, el sustrato $S2_B$ mostró mayor concentración de carbono que el $S2_A$. Destaca concentraciones limitantes de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio en los dos lotes.

	Sustrato $S2_A$		**Sustrato $S2_B$**	
Compuesto	**$g \cdot L^{-1}$**	**%**	**$g \cdot L^{-1}$**	**%**
Ácido láctico	20,6	56	43,6	62
Ácido acético	11,1	30	10	15
Ácido propiónico	0,2	0,6	-	0
Ácido butírico	2,5	7	2,5	0,6
Etanol	0,4	7	0,4	23
Carbono	14,3	41,2	23	40,7

Tabla 13. Caracterización de los lotes $S2_A$ y $S2_B$ Concentración de los compuestos mayoritarios identificados en $g \cdot L^{-1}$ y en % en cada lote. La concentración de carbono se calcula a partir del porcentaje en masa de cada compuesto.

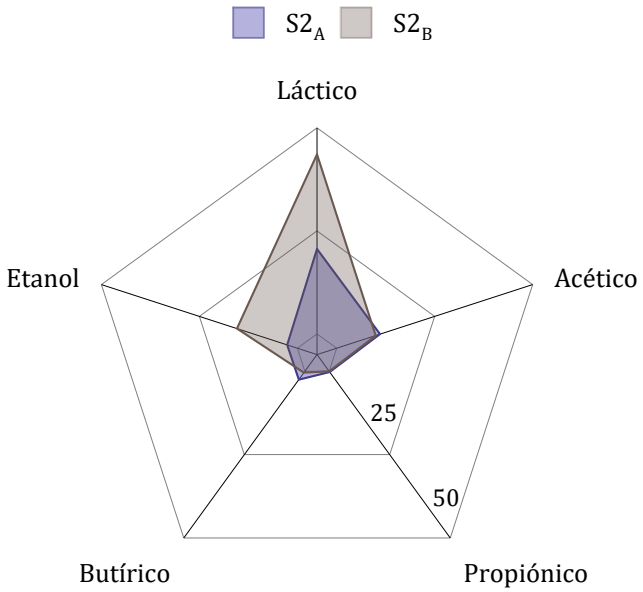


Figura 37. Caracterización de los lotes $S2_A$ y $S2_B$. Representación gráfica comparativa de la composición de los sustratos $S2_A$ y $S2_B$. Las líneas radiales muestran la concentración en $g \cdot L^{-1}$.

A partir de la caracterización de los residuos, y con el objetivo de estudiar el efecto del aporte de nutrientes no detectados tras los análisis y necesarios para el crecimiento bacteriano, se diseñó una estrategia de optimización de cultivos, añadiendo cloruro de amonio (NH_4Cl) y/o una solución enriquecida con vitaminas y elementos traza denominada como SL7 (ver Apartado 3.2.1 en la Materiales y métodos, donde se detalla su composición) al sustrato $S2_A$ crudo dando lugar a los medios de cultivo M1-M6 (Tabla 14).

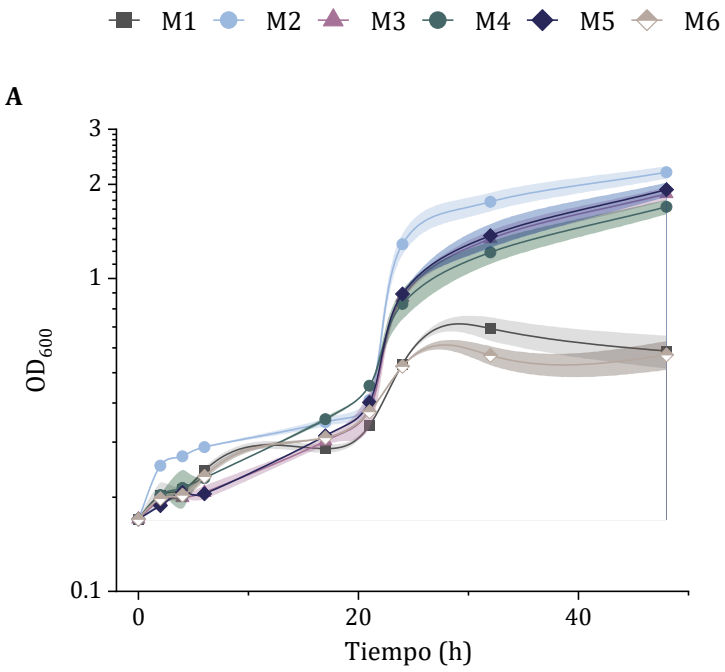
	NH_4Cl ($g \cdot L^{-1}$)	**SL7 ($mL \cdot L^{-1}$)**
M1	-	-
M2	0,5	-
M3	1	-
M4	0,5	1
M5	1	1
M6	-	1

Tabla 14. Condiciones de crecimiento analizadas durante el acondicionamiento del sustrato original $S2_A$. Los códigos M1-M6 hacen referencia a las condiciones de cultivo analizadas con las concentraciones de NH_4Cl ($g \cdot L^{-1}$) y SL7 ($mL \cdot L^{-1}$) indicadas en la tabla.

En primer lugar, se estudió el efecto de la presencia de estos nutrientes en el crecimiento y la producción de PHA en relación a la composición y concentración del sustrato.

Como se observa en la Figura 38A, *C. necator* H16 fue capaz de crecer en todas las condiciones analizadas a pesar de la alta concentración de ácido láctico presente en S2. Tanto la elevada concentración total de carbono de este sustrato como de ácido láctico en específico han sido reportadas previamente en la literatura como inhibitorias (Du et al., 2001; Szacherska et al., 2021). No obstante, el crecimiento de *C. necator* H16 en el sustrato $S2_A$ siguió un modelo diaúxico, caracterizado por dar lugar a una curva de crecimiento con dos fases exponenciales separadas por una fase estacionaria corta. Este comportamiento se produce como consecuencia de la represión catabólica en medios complejos cuando las fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo tienen diferentes tasas de asimilación, usando con preferencia unas respecto a otras. En este sentido, estos resultados están directamente relacionados con los datos expuestos en el Capítulo 1 durante la optimización del escalado con el sustrato S2 (Apartado 4.4, Capítulo 1,), donde se detectó que *C. necator* H16 consumía ácido láctico de forma preferente al ácido acético.

Para evitar distorsión en la medida espectrofotométrica debido a la posible acumulación de PHA, se calculó la μ en la fase exponencial de crecimiento, es decir, entre las 16 y las 24 horas (ver Apartado 3.3.3, en la sección Materiales y métodos). De forma general, la presencia de cloruro de amonio mejoró el crecimiento con respecto a la condición control M1, consistente en el cultivo con el residuo original $S2_A$. La velocidad de crecimiento aumentó en todas las muestras, siendo las condiciones M3 y M5, con 1 $g \cdot L^{-1}$ de amonio, donde se observó la μ más elevada (Figura 38B). No se observó ningún efecto positivo al adicionar los elementos traza SL7 (M6), alcanzando la misma OD y velocidad de crecimiento que la condición control M1.



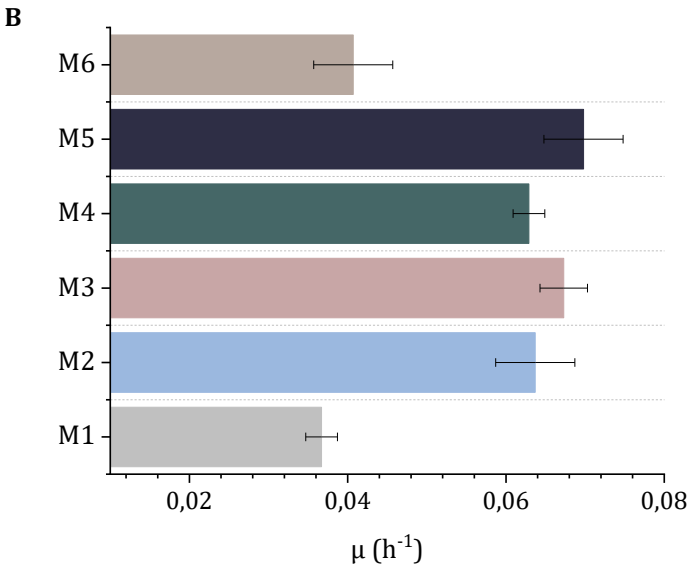


Figura 38. Curvas y tasa de crecimiento de *C. necator* H16. A) Curvas de crecimiento en las condiciones seleccionadas. B) Tasa de crecimiento en las condiciones seleccionadas. La OD_{600} al inicio del crecimiento fue de 0,1 utilizando como inóculo un cultivo de *C. necator* H16 crecido durante 16 horas en el medio rico NB. La zona sombreada y las barras de error muestran la desviación obtenida en dos réplicas biológicas.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de la biomasa derivada de los cultivos M1-M6. Durante el análisis mediante GC-MS (ver Apartado 3.8, sección Materiales y métodos) se detectó una señal inesperada en el minuto 2.3, cuyo espectro de masas era correspondiente al ácido 2-hidroxi-propanoico según la base de datos NIST (https://www.nist.gov/pml/atomic-spectra-database). Para confirmar estos resultados, se sometieron a las mismas condiciones de reacción una muestra de PLA comercial y ácido 2-hidroxibutírico (2HB). Como se puede observar en la Figura 39, donde se muestra el cromatograma del cultivo M6 como ejemplo, el pico identificado en el minuto 2.3 en la muestra de biomasa tiene el mismo tiempo de retención que la muestra de PLA comercial. Además, se comprobó por MS que el espectro de ambos picos era idéntico.

Para comprobar la incorporación de LA en el copolímero se llevó a cabo un análisis por espectroscopía RMN. Para ello se trató de aislar el polímero según el procedimiento detallado en el Apartado 3.9 de la sección Materiales y métodos. Tras varios intentos sin éxito de extracción del polímero, se realizó una reacción de metanólisis de la biomasa en las condiciones descritas en el Apartado 3.8.2 de la sección Materiales y métodos, modificando el protocolo de forma que el cloroformo se reemplazó por cloroformo deuterado, para reducir al mínimo la interferencia entre la muestra y las señales del disolvente y, analizarla directamente por RMN. Además, no se añadió el patrón interno (ácido 3-metilbenzoico, 3MB) para evitar la señal correspondiente en el espectro RMN. Finalmente, la composición

de la fracción obtenida en cloroformo deuterado se analizó por análisis de RMN monodimensional (^{1}H y TOCSY selectivo) y bidimensional (^{1}H-^{1}H) COSY) en el servicio de Resonancia Magnética Nuclear del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, donde se confirmó la presencia de monómeros LA en el polímero producido por *C. necator* H16 en el sustrato $S2_A$ (Ver Figura 2, Anexos).

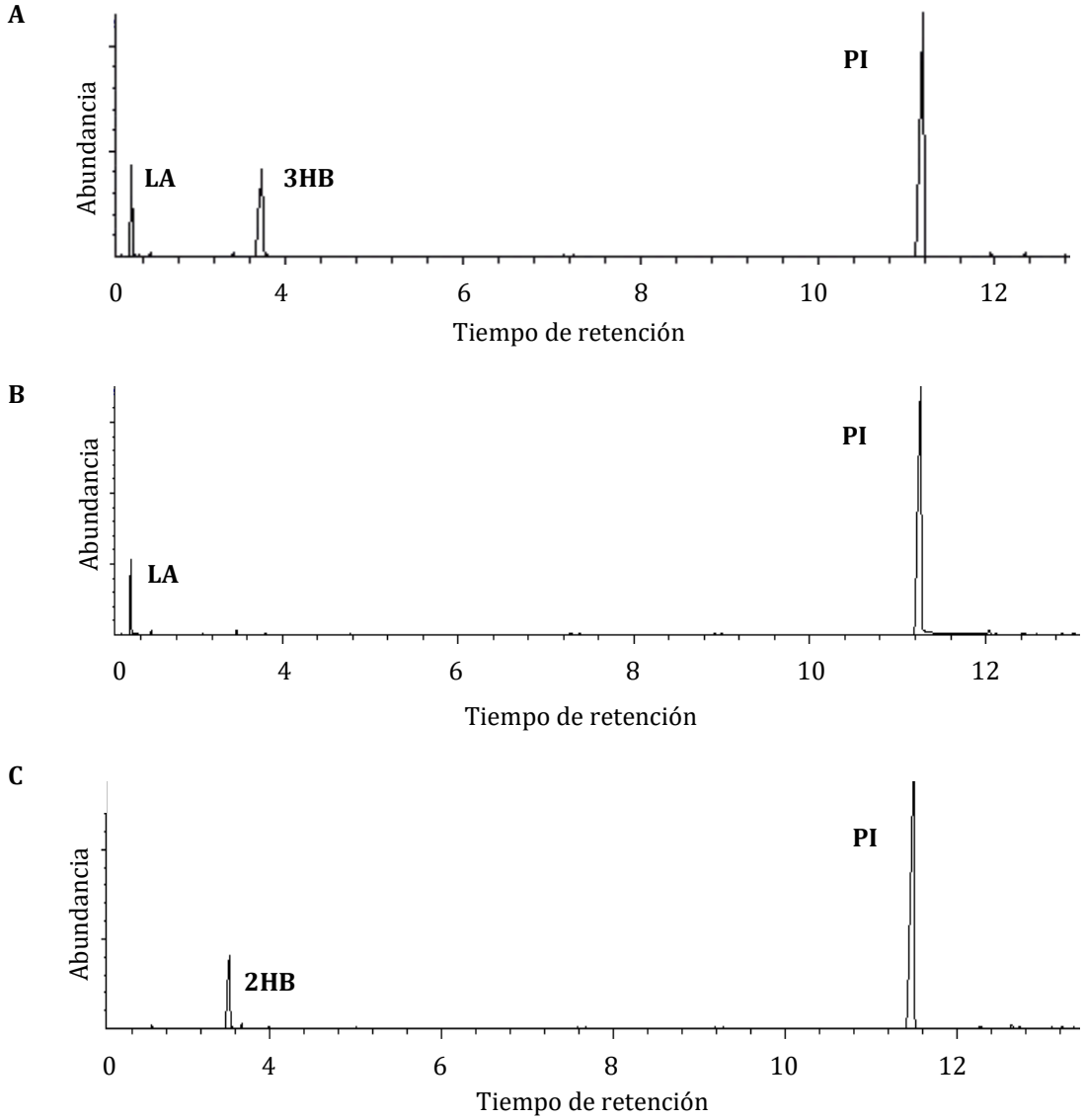


Figura 39. Análisis de la producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16. A) Biomasa liofilizada tras 48 horas de crecimiento en el medio M6. B) PLA comercial. C) 2HB comercial. Abreviaturas: PI (patrón interno); LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico); 2HB (ácido 2-hidroxibutírico).

Una vez confirmada la presencia de monómeros LA en el polímero, se estudió el efecto de la suplementación del residuo fermentado con NH_4Cl y la solución de elementos traza SL7 en el rendimiento del proceso. Acorde a los datos de crecimiento, la adición de NH_4Cl aumentó la biomasa en los cultivos M2-M5, llegando a 1,11 g·L^{-1} al añadir 0,5 g·L^{-1} (M4)

(Figura 40A). Respecto a la producción de PHA, el mayor porcentaje de acumulación intracelular de polímero fue del 65 % (p/p) en los cultivos M5 con 1 $g \cdot L^{-1}$ de NH_4Cl y SL7 (Figura 40A). En relación a la composición, se observó cómo la fracción LA del polímero disminuye de forma proporcional a la cantidad de NH_4Cl añadida. En las condiciones en las que no se modificó la cantidad de nitrógeno del sustrato original (M1 y M6) la fracción LA llegó al 60 % (Figura 40B). Todos los resultados obtenidos se muestran organizados en la Tabla 15.

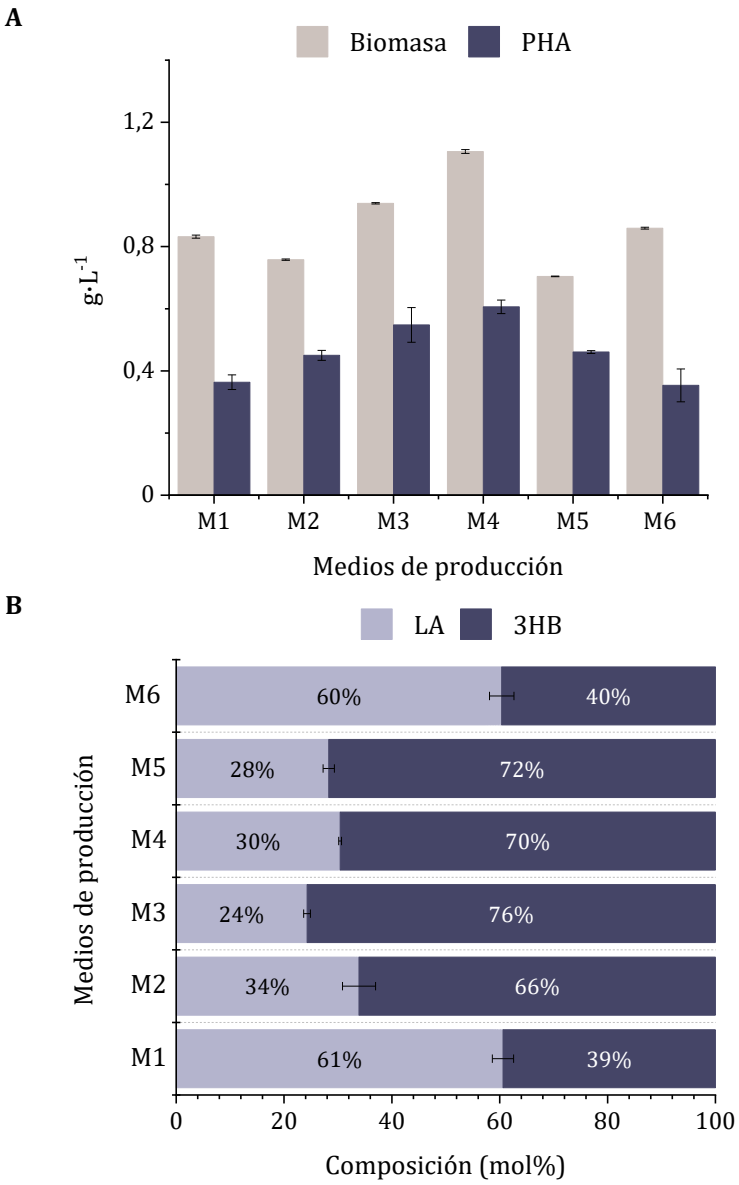


Figura 40. Producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16. A) Análisis de la biomasa tras 48 horas de crecimiento en las condiciones seleccionadas. B) Composición del polímero en mol % calculada a partir de la concentración (mM) de cada muestra tras la reacción de metanólisis. Las barras de error muestran la desviación obtenida en dos réplicas biológicas. Abreviaturas: LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico).

	Biomasa ($g \cdot L^{-1}$)	PHA (%)	PHA ($g \cdot L^{-1}$)	LA (mol %)	3HB (mol %)
M1	0,83	44	0,36	61	39
M2	0,76	60	0,45	34	66
M3	0,94	59	0,55	24	76
M4	1,11	54	0,61	30	70
M5	0,7	65	0,46	28	72
M6	0,86	42	0,35	60	40

Tabla 15. Producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16 tras 48 horas de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos sugieren que la adición de nitrógeno al medio de cultivo favorece la formación de biomasa y la disminución de LA en el polímero. Además, es sabido que la presencia de nitrógeno favorece la hidrólisis del polímero acumulado (Nygaard et al., 2021).

Para estudiar la relación entre la concentración de ácido láctico y nitrógeno en la acumulación y degradación de P(3HB-*co*-LA) se realizó un perfil de producción de PHA durante 96 horas en los sustratos $S2_A$ y $S2_B$ en presencia o ausencia de 0,5 $g \cdot L^{-1}$ NH_4Cl.

En primer lugar, se comprobó cómo *C. necator* H16 es capaz de crecer durante la exposición a elevadas concentraciones de carbono. Con el sustrato $S2_A$, a una concentración total de 34,8 $g \cdot L^{-1}$, se alcanzaron 0,2 $g \cdot L^{-1}$ de biomasa con un 13 % (p/p) de acumulación de P(3HB-*co*-LA) a las 48 horas de fermentación, disminuyendo tanto la biomasa como el contenido intracelular de polímero a la mitad tras 96 horas de crecimiento (Figura 41A). Sin embargo, con el sustrato $S2_B$, a una concentración de 57 $g \cdot L^{-1}$, se observa un patrón diferente, ya que la biomasa aumenta ligeramente hasta las 96 horas cuando se obtienen 0,4 $g \cdot L^{-1}$ (Figura 41B). En cuanto al efecto del nitrógeno sobre la biomasa, solo se detectaron diferencias en el sustrato $S2_B$ a las 96 horas respecto a la misma condición sin nitrógeno (Figura 41B).

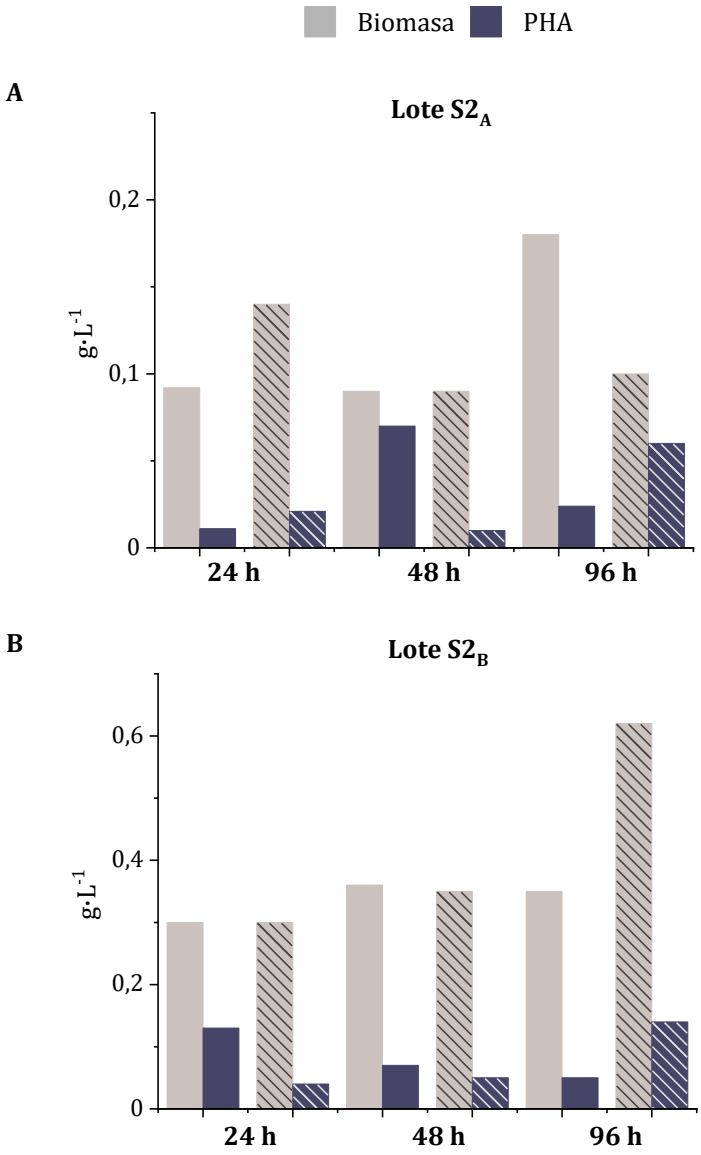


Figura 41. Perfil de producción de biomasa y PHA en los cultivos de *C. necator* H16. A) Sustrato $S2_A$. B) Sustrato $S2_B$. Se marcan con líneas transversales los cultivos suplementados con NH_4Cl 0,5 $g \cdot L^{-1}$.

Por otro lado, el contenido intracelular de polímero no aumentó significativamente a lo largo del tiempo y no parece ser dependiente de la cantidad de nitrógeno disponible en el medio del cultivo. En cambio, la ratio C/N del sustrato modificó la composición monomérica del polímero. En el sustrato $S2_A$, con una relación C/N 14 al añadir 0,5 $g \cdot L^{-1}$ de amonio y una concentración en ácido láctico de 20 $g \cdot L^{-1}$, la proporción de LA disminuye un 10 % con respecto al polímero producido con el sustrato crudo sin nitrógeno (Figura 42A). Además, en el sustrato $S2_B$, con una relación C/N 20 y una concentración en ácido láctico de 44 $g \cdot L^{-1}$, la adición de amonio no tuvo influencia en la proporción de monómeros LA siendo superior al 75 % en todas las condiciones analizadas (Figura 42B).

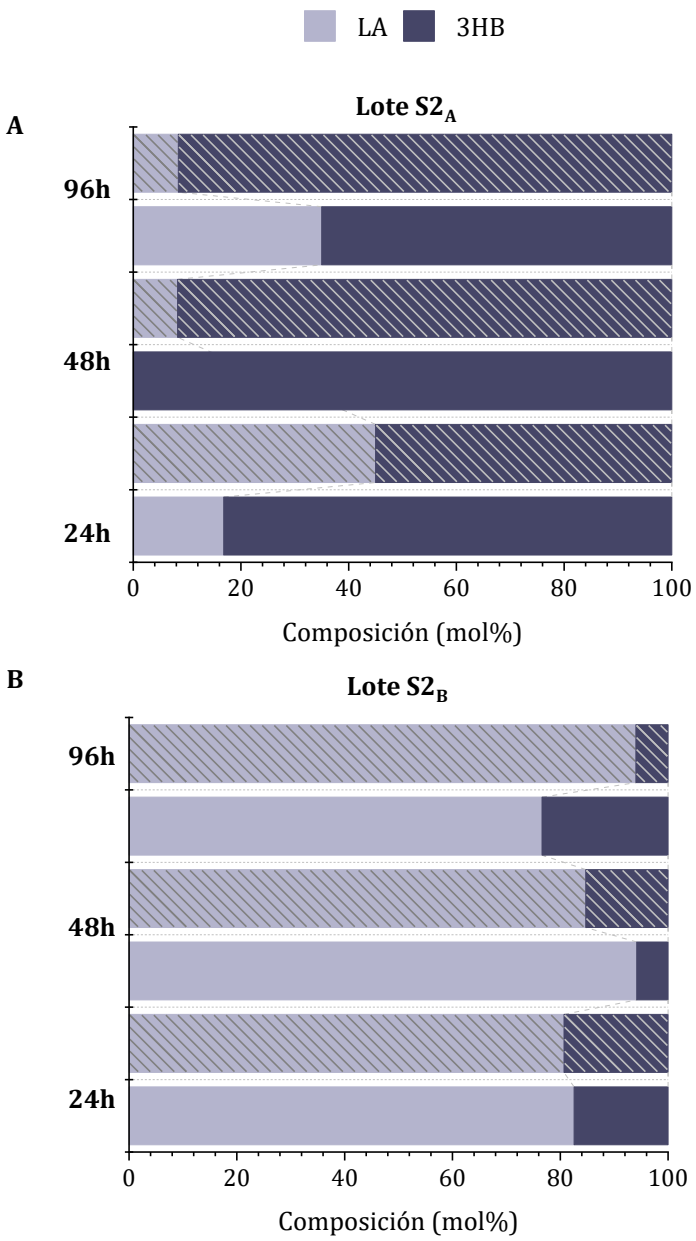


Figura 42. Análisis de la composición monomérica del PHA producido por *C. necator* H16. A) Sustrato $S2_A$. B) Sustrato $S2_B$. Se marcan con líneas transversales los cultivos suplementados con NH_4Cl 0,5 $g \cdot L^{-1}$. La composición en mol % se calculó a partir de la concentración (mM) de cada muestra tras la reacción de metanólisis. Abreviaturas: LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico).

Por tanto, todos estos resultados indican que *C. necator* H16 es capaz de producir P(3HB-*co*-LA) a partir de un residuo cuya concentración en ácido láctico oscila entre 20 y 44 $g \cdot L^{-1}$. Además, la composición del copolímero está determinada por la concentración de ácido láctico presente en el sustrato y la presencia de nitrógeno modifica la ratio C/N reduciendo la incorporación de monómeros LA a la cadena principal. Por otro lado, tras la adición de

elementos traza (SL7) no se observaron efectos sobre el crecimiento y el contenido intracelular de polímero no aumentó significativamente a lo largo del tiempo.

4.7 Generación de P(3HB-*co*-LA) en un medio de producción definido

Para evaluar la influencia de las fuentes de carbono disponibles del residuo en el tipo de polímero producido por *C. necator* H16, se utilizó un método basado en células quiescentes. De esta forma, las células se incubaron en un medio de producción definido similar al medio mínimo Schlegel modificado (SM) pero sin nitrógeno (SN), al que se añadieron VFAs comerciales en diferentes proporciones. En este sentido, la ausencia de nitrógeno impide el crecimiento celular favoreciendo la acumulación del polímero.

Con el objetivo de simular el sustrato S2, se diseñó el medio SNL donde el lactato actúa como componente mayoritario y añadiendo, además, ácido acético y ácido butírico como precursores de P(3HB). Se estudiaron 8 condiciones diferentes en las que se moduló la cantidad de ácido acético y ácido butírico no superando en ningún caso la concentración total del sustrato $S2_B$ (Tabla 16). Además, y con el fin de contar con la biomasa suficiente para aislar el polímero, se analizó la acumulación de P(3HB-*co*-LA) mediante una estrategia de producción en dos etapas; en primer lugar, las células de *C. necator* H16 se crecieron en NB durante 16 horas y, posteriormente, tras un lavado con solución salina, se inocularon en el medio de producción SNL con diferente número de células (OD_{600}: 0,1 y OD_{600}: 1).

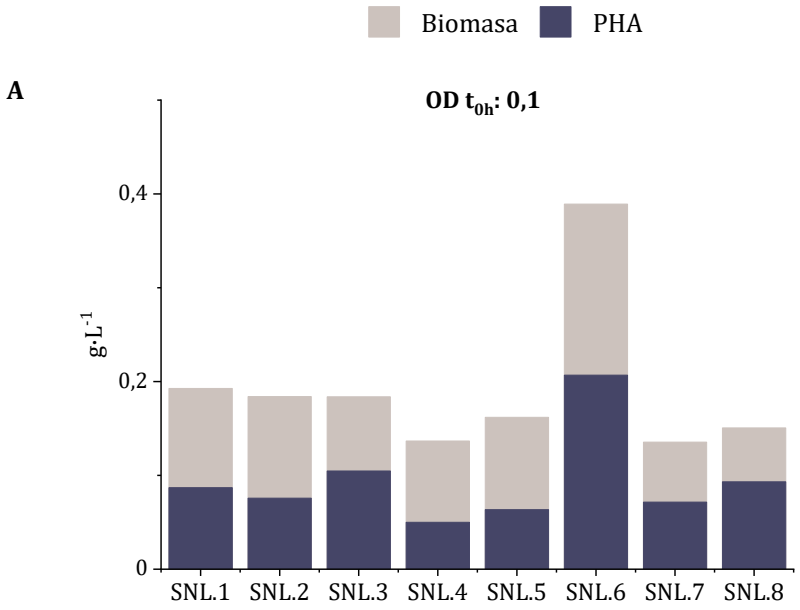
	Lactato	Ac. Acético	Ac. Butírico	Carbono total
SNL.1	20	11	2,5	12,1
SNL.2	20	11	-	10,8
SNL.3	20	-	2,5	7,8
SNL.4	20	2,5	11	13,3
SNL.5	20	5	5	11,1
SNL.6	20	-	-	6,4
SNL.7	20	2,5	2,5	8,7
SNL.8	20	1	1	7,3

Tabla 16. Composición de los medios sintéticos SNL utilizados durante el estudio en $g \cdot L^{-1}$. El carbono total se calculó a partir del porcentaje en masa de carbono en cada compuesto.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 43, la acumulación de PHA no disminuye a medida que aumenta la cantidad total de carbono en la solución SNL y se mantiene en torno al 50 % (p/p) en todas las condiciones. Además, la adición combinada de ácido acético y ácido butírico no aumenta de forma significativa la producción de polímero. Solo se observa un leve aumento de la acumulación de PHA en presencia de butirato (SNL.3, SNL.4, SNL.5 y SNL.7) (Figura 43A).

Respecto a las dos estrategias de producción abordadas, y en contra de la premisa inicial, el porcentaje de PHA intracelular no aumentó en los ensayos inoculados con mayor densidad celular. Sin embargo, debido al aumento de la biomasa inicial, la producción de polímero a las 48 horas fue considerablemente más alta en los cultivos inoculados a mayor OD inicial, llegando a 0,8 g·L^{-1} en la condición SNL.6 donde el lactato fue el único precursor (Figura 43B).

En conclusión, la ausencia de nitrógeno mantiene las células en un estado quiescente, por lo que el aumento de biomasa observado es dependiente del inóculo inicial y no de las condiciones de incubación. Por tanto, bajo estas condiciones de "no crecimiento", la mayor parte de la actividad metabólica se dirige a la producción y acumulación de PHA.



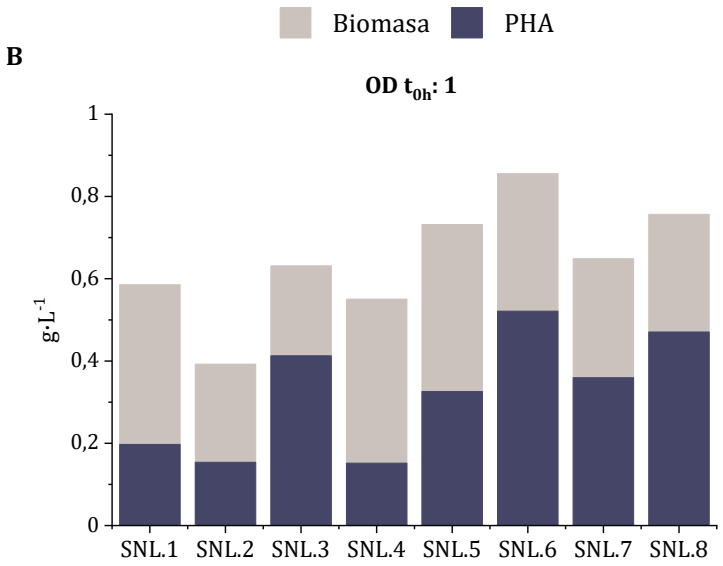


Figura 43. Perfil de biomasa y producción de PHA en *C. necator* H16 tras 48 horas de incubación en el medio SNL. A) Ensayos inoculados a OD_{600} 0,1. B) Ensayos inoculados a OD_{600} 1. Los ejes de cada gráfico se escalan en función de los datos representados.

Por otro lado, el análisis de la composición monomérica del polímero acumulado mostró cómo la mayor proporción de LA se corresponde con los ensayos donde el único precursor es el lactato (Figura 44A). Los cambios en la concentración de ácido acético y ácido butírico no parecen generar un patrón de producción de copolímero P(3HB-*co*-LA) determinado, aumentando o disminuyendo la fracción LA de forma independiente a la relación lactato-acético-butírico. En cambio, la OD del inóculo afectó notablemente a la composición polimérica. Los ensayos inoculados a OD_{600} 1 generaron un polímero cuyo porcentaje en LA no superó el 5 % en ninguna las condiciones analizadas (Figura 44B). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 44, la incorporación de monómeros LA al polímero en los ensayos inoculados con menor cantidad de biomasa inicial (OD_{600} 0,1) aumentó hasta el 80 % (mol %) en el medio de producción SNL.6.

Todos los resultados obtenidos se muestran organizados en la Tabla 17.

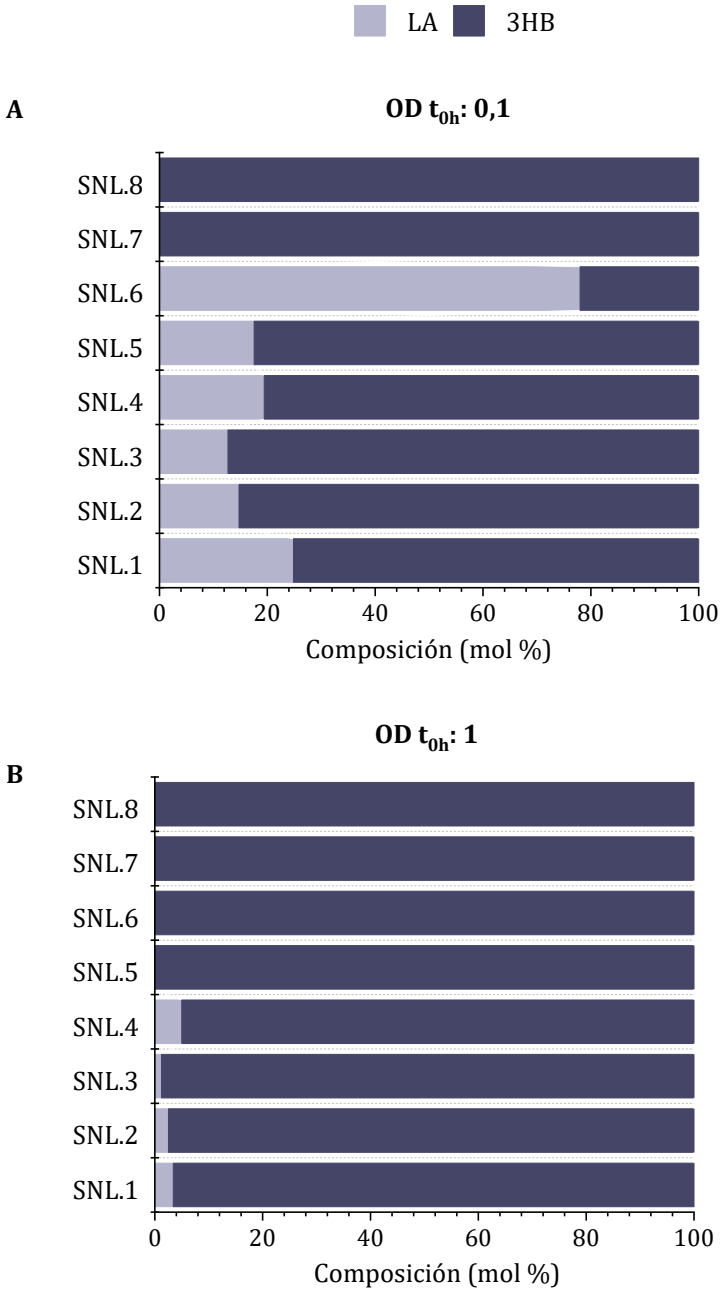


Figura 44. Análisis de la composición monomérica del PHA producido por *C. necator* H16. A) Ensayos inoculados a OD_{600} 0,1. B) Ensayos inoculados a OD_{600} 1. La composición en mol % se calculó a partir de la concentración (mM) de cada muestra tras la reacción de metanólisis. Abreviaturas: LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico).

	Inóculo a OD_{600} 0,1				Inóculo a OD_{600} 1			
	PHA ($g \cdot L^{-1}$)	**PHA (%)**	**LA (mol %)**	**3HB (mol %)**	**PHA ($g \cdot L^{-1}$)**	**PHA (%)**	**LA (mol %)**	**3HB (mol %)**
SNL.1	0,09	45	25	75	0,20	33	4	96
SNL.2	0,08	41	15	85	0,18	40	3	87
SNL.3	0,11	56	13	87	0,41	65	1	98
SNL.4	0,06	36	20	80	0,19	27	5	95
SNL.5	0,07	39	18	82	0,38	44	0	100
SNL.6	0,23	53	78	22	0,56	60	0	100
SNL.7	0,08	52	0	100	0,4	55	0	100
SNL.8	0,11	61	0	100	0,55	62	0	100

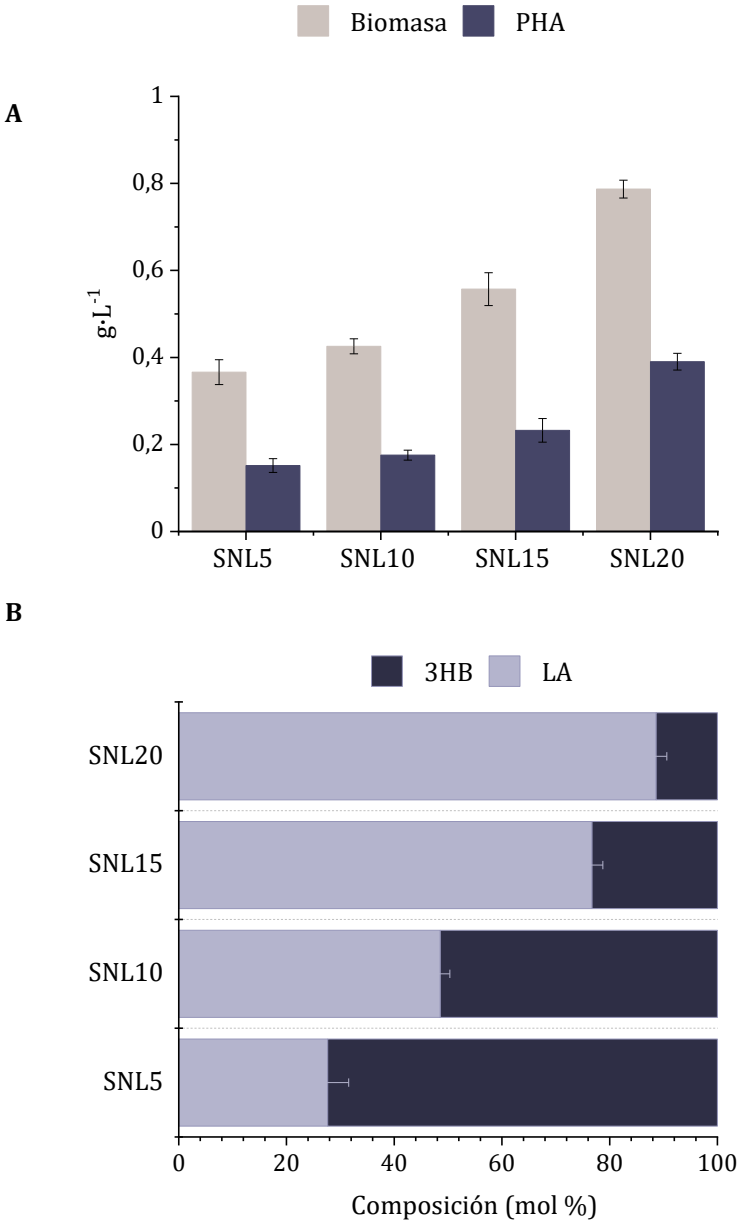
Tabla 17. Composición y distribución de los monómeros en el PHA producido por *C. necator* H16. Abreviaturas: LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico).

En resumen, la presencia de ácido acético y/o butírico no tuvo efectos sobre la cantidad ni la composición de polímero acumulado. Además, al empezar la fase de producción con mayor biomasa y con el objetivo de forzar la acumulación de PHA en vez de la división celular, se consigue una mayor producción total de polímero en términos de $g \cdot L^{-1}$ pero afecta sustancialmente a la incorporación de monómeros LA en el copolímero P(3HB-*co*-LA).

La composición del polímero determina sus características térmicas y mecánicas y, por lo tanto, delimita sus posibles aplicaciones. En este sentido, en la literatura se ha reportado que la incorporación de unidades LA disminuye la T_m y la T_c (Choi et al., 2020). Con el objetivo de modular de forma controlada la proporción de LA incorporando se evaluó la composición del polímero acumulado en *C. necator* H16 modificando la concentración de lactato del medio de producción SNL entre 5, 10, 15 y 20 $g \cdot L^{-1}$ (SNL5, SNL10, SNL15 y SNL20) inoculando los ensayos a una OD_{600} de 0,1.

En la Figura 45A se observa cómo la cantidad de biomasa aumenta de forma proporcional a la concentración de lactato durante las primeras 24 horas de incubación, mientras que la acumulación de polímero se mantiene constante en torno a un 40 % (p/p) independientemente de la concentración de lactato utilizada. Respecto a la composición del polímero, se comprobó que la concentración de lactato determina la tasa de incorporación de monómeros LA al polímero producido. Un aumento en la concentración de lactato de 5 $g \cdot L^{-1}$ supone un aumento del 20 % en la fracción LA del polímero final durante las primeras 24 horas de incubación (Figura 45B).

El análisis de los sobrenadantes por HPLC mostró cómo el consumo de lactato fue similar en todas las condiciones analizadas (Figura 45C). Además, se observó la presencia de acetato tras 24 horas de crecimiento que se excreta al medio de cultivo, ya que el medio de producción inicial tiene únicamente lactato como precursor.



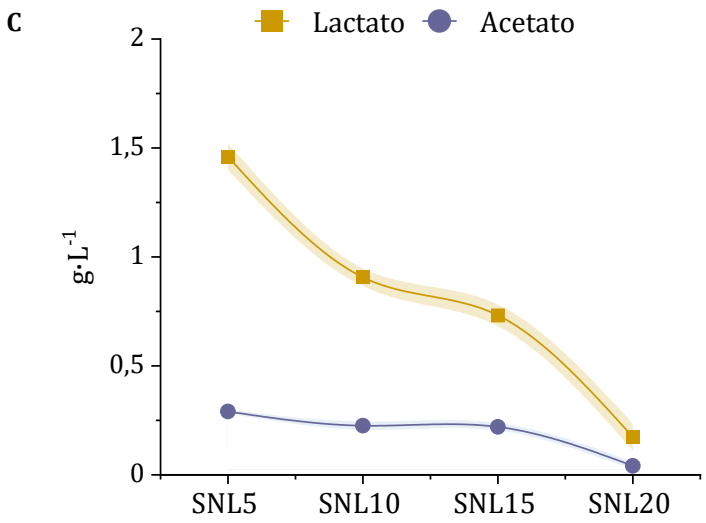
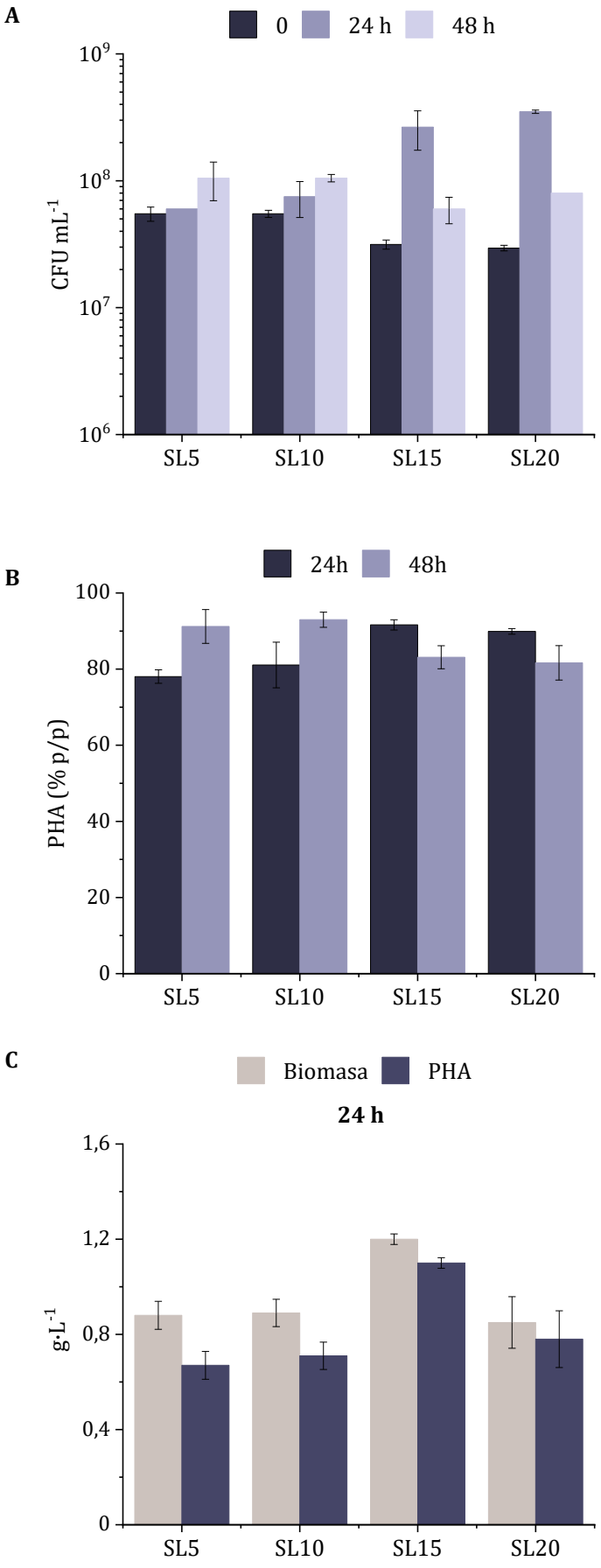


Figura 45. Perfil de biomasa, producción de PHA y análisis del sobrenadante en los ensayos de *C. necator* H16 en el medio SNL5-SNL20 A) Biomasa y cantidad de PHA en los medios SNL a las 24 horas. B) Análisis de la composición del polímero en los medios SNL a las 24 horas. C) Consumo de lactato y producción de acetato detectada mediante HPLC. Todos los ensayos fueron inoculados a una OD_{600} inicial de 0,1. Las barras de error de los paneles A y B, y la zona sombreada del panel C, muestran la desviación obtenida en tres réplicas biológicas. Abreviaturas: LA (ácido láctico); 3HB (ácido 3-hidroxibutírico).

4.8 Impacto del nitrógeno en la producción de P(3HB-*co*-LA)

Para comprobar el efecto de la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo y, por lo tanto, la influencia de la generación de biomasa residual y la división celular sobre la acumulación de P(3HB-*co*-LA), se analizó la producción en un medio mínimo similar al SM al que solo se añadieron 0,1 $g \cdot L^{-1}$ de amonio denominado como SL. De la misma forma que en los experimentos anteriores, la concentración de lactato osciló entre 5 y 20 $g \cdot L^{-1}$. Teniendo como base los resultados obtenidos tras analizar la influencia del tamaño del inóculo en la producción de P(3HB-*co*-LA), los cultivos fueron inoculados a OD_{600} 0,1. Tras 24 horas de crecimiento, se observa como el número de células aumenta ligeramente en los cultivos SL15 y SL20 (Figura 46A) mientras que el porcentaje de PHA se mantiene (Figura 46B). Además, la biomasa aumenta a las 48 horas en las cuatro condiciones analizadas, llegando a 1,2 $g \cdot L^{-1}$ con 15 $g \cdot L^{-1}$ de lactato como única fuente de carbono (Figuras 46C y 46D). El nitrógeno añadido permite la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas indispensables durante el proceso de división celular, alargando la fase de crecimiento y, por lo tanto, el incremento de biomasa. Sin embargo, tras analizar la composición del polímero no se detectó incorporación de monómeros LA, sugiriendo que es necesario un sistema de células quiescentes para la incorporación de LA en el polímero.


A
0
24 h
48 h
CFU mL-1
10^9
10^8
10^7
10^6
SL5
SL10
SL15
SL20
B
24h
48h
PHA (% p/p)
100
80
60
40
20
0
SL5
SL10
SL15
SL20
C
Biomasa
PHA
24 h
g·L-1
1,6
1,2
0,8
0,4
0
SL5
SL10
SL15
SL20

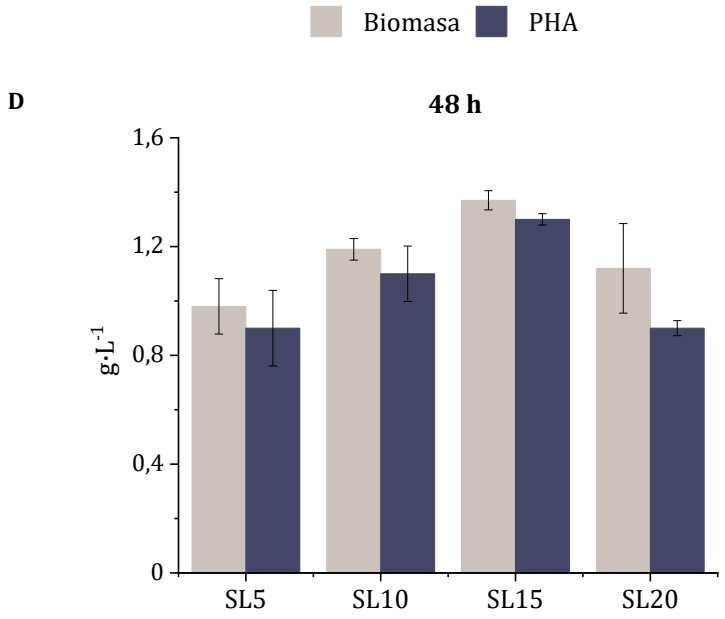


Figura 46. Crecimiento y producción de PHA en *C. necator* H16 en el medio SL con lactato como única fuente de carbono y limitación de nitrógeno. A) Crecimiento en el medio SL. B) Acumulación de PHA en % (p/p) a las 24 y 48 horas. C) Perfil de producción de biomasa y polímero a las 24 horas. D) Perfil de producción de biomasa y polímero a las 48 horas. Las barras de error muestran la desviación obtenida en tres réplicas biológicas.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la presencia de nitrógeno en el medio de producción afecta negativamente a la incorporación de monómeros LA en el polímero final, indicando que *C. necator* H16 produce el copolímero P(3HB-*co*-LA) cuando se encuentra en un estado quiescente en un medio de producción donde el lactato es el principal componente.

4.9 Análisis proteómico *shotgun* en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA)

Los resultados expuestos anteriormente demuestran que la bacteria *C. necator* H16 es capaz de producir un poliéster que contiene monómeros LA sin la necesidad de incorporar rutas heterólogas para generar el precursor lactoil-CoA ni PhaCs modificadas con mayor afinidad por ese sustrato lo que sugiere que, en las condiciones de producción ensayadas, se están utilizando rutas y/o enzimas cuya función hasta el momento no se había descrito. Con el objetivo de identificar estas rutas, se llevó a cabo un estudio proteómico *shotgun* utilizando el medio de producción sintético SNL20 teniendo lactato como único precursor y estableciendo como condición control células incubadas en el medio SN, similar al SNL20 pero en ausencia de lactato.

El análisis de los extractos celulares de *C. necator* H16 en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA) (SNL20) ha permitido identificar un total de 2111 proteínas, entre las cuales se encuentran reguladas diferencialmente 762 proteínas, lo que supone un 36 % de las proteínas identificadas y un 12 % de los 6543 genes codificantes de proteínas predichos en el genoma de *C. necator* H16. Entre las 762 proteínas identificadas, se consideraron reguladas positivamente 416 proteínas y 346 de forma negativa (Figura 47).

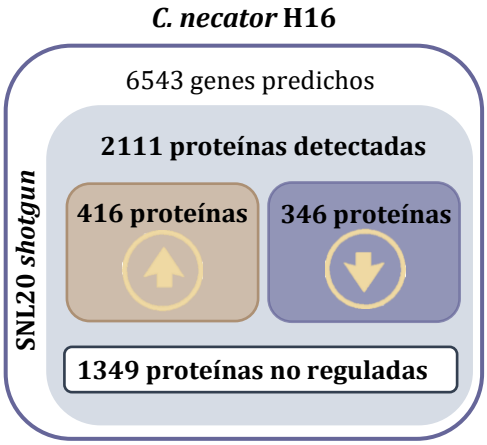


Figura 47. Esquema del número de proteínas detectadas durante el análisis *shotgun* de *C. necator* H16 en condiciones SNL20. Resumen de los datos de activación y represión obtenidos en tres réplicas biológicas. Las proteínas no reguladas se encuentran presentes en ambas condiciones.

4.9.1 Anotación funcional del proteoma

En primer lugar, para estudiar la distribución de las proteínas detectadas, se realizó un diagrama de dispersión tipo volcán. Al evaluar de forma simultánea la magnitud de la regulación (Δ: Log2 *Fold Change*) con el nivel de significación estadístico (*p*-valor) de cada proteína, se obtuvo la Figura 48, donde los *p*-valores más bajos, correspondientes a las diferencias estadísticamente más significativas, se encuentran en la parte superior del gráfico. De esta forma, se detectaron 295 proteínas reguladas positivamente (en color verde) y 266 proteínas reguladas negativamente con un *p*-valor<0,05 (en color rojo). En la Tabla 18 se muestra la identificación de las proteínas con mayor diferencia de producción (Log2 Fold Change ≤ 1 y ≤ -1) obtenidas mediante el análisis del proteoma, correspondientes con los extremos superiores del gráfico de la Figura 48.

Respecto a las proteínas activadas con la expresión diferencial más elevada (Log2 Fold Change ≤ 1) se encontró una glufosinato N- acetiltransferasa (PAT) de la familia GCN5, cuya actividad catalítica consiste en transferir un grupo acetilo a una amina primaria, generalmente usando como sustrato una molécula de acetil-CoA, aunque su función en *C. necator* H16 no se ha determinado por el momento (Dyda et al., 2000); proteínas involucradas en la glucólisis como la fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (FBA), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPH) y la fosfoglicerato quinasa (PGK); y proteínas relacionadas con la síntesis y estabilización del gránulo de PHA como las fasinas PhaP1 y PhaP4. Destacan, también, diferentes transportadores de membrana de las familias PepT, NitT y HAAT, responsables de la movilización de oligopéptidos, nitritos/nitratos y aminoácidos.

En relación a las proteínas reprimidas con la expresión diferencial más alta (Log2 Fold Change ≤ -1), se encuentran dos proteínas relacionadas con la unión y secreción de lipoproteínas (LP1) y nitritos (NarL) al medio extracelular. Despuntan, también, las proteínas ribosomales 30S y 50S que dan lugar al ribosoma 70S encargado de la traducción durante la síntesis de proteínas. Respecto al metabolismo central, resalta la succinil-CoA deshidrogenasa (SUCC) que cataliza la conversión de 2-oxoglutarato en succinil-CoA en el TCA, un transportador de membrana de tricarboxilatos (familia TTT) y un transportador de aminoácidos.

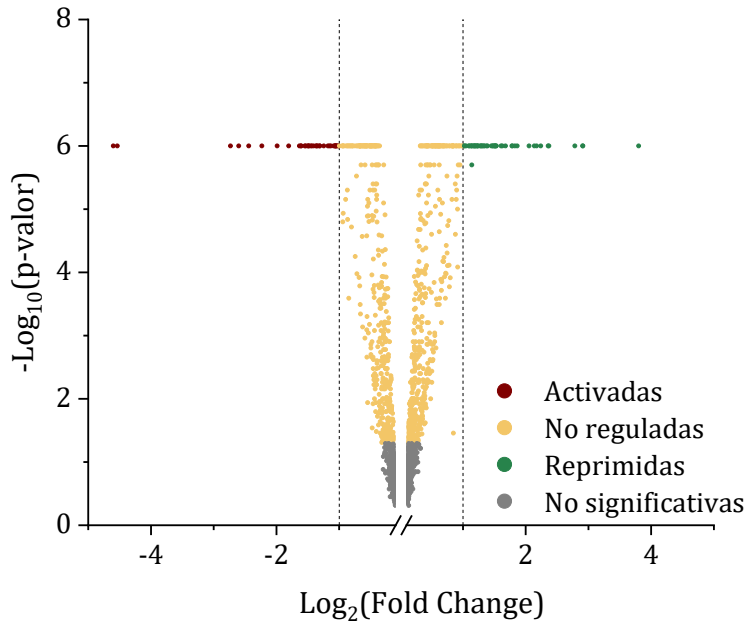


Figura 48. Distribución de las proteínas producidas en *C. necator* H16 tras 24 horas de crecimiento en el medio SNL20. El eje X permite seleccionar visualmente las proteínas con mayor activación o represión, y el eje Y permite distinguir en función de la mayor significación estadística.

Código	Proteína	Δ	Péptidos	Función
Proteínas con Δ≥1				
Q0K5S7	PAT	3,8	2	N-acetiltransferasa
Q59100	FBA	2,9	3	Fructosa bifosfato aldolasa
Q59101	FBA	2,8	2	Fructosa bifosfato aldolasa
Q0K572	CynS	2,4	1	Cianato hidratasa
P42721	RuBisCO	2,4	1	Ribulosa bifosfato carboxilasa
Q0KCQ5	UrtA	2,2	9	Transportador de urea (familia HAAT)
Q0KBL7	AmD	2,1	1	Amidasa
Q0KBL2	MppA	2,1	2	Transportador de membrana (familia PepT)
Q0KER1	NrtA	1,9	10	Transportador de membrana (familia NitT)
Q0KBV4	PhaP1	1,7	12	Fasina
P19923	CfxP	1,6	2	Fosforibuloquinasa
P50319	PGK	1,6	1	Fosfoglicerato quinasa
Q0K4Z7	-	1,5	2	Proteína de membrana externa
P50320	PGK	1,5	1	Fosfoglicerato quinasa
Q0KF96	DsbA	1,5	1	2-hidroxichromene-2-carboxilato isomerasa
Q0K1F3	ClpC2	1,5	13	Proteasa dependiente de ATP
P50322	GAPH	1,5	2	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
Q0K525	-	1,5	3	Fe-S oxidoreductasa
Q0JYN2	FliC	1,4	11	Flagelina
Q0KBR2	IbpA2	1,3	6	Chaperona (familia HSP20)
Q0K853	DLH	1,3	3	Dienelactona hidrolasa
Q0KCQ4	UrtA	1,3	5	Transportador de urea (familia HAAT)
Q0JZM1	PhaP4	1,3	1	Fasina
Q0K0J0	ADH	1,3	8	Alcohol deshidrogenasa
Q0KER3	NrtCD	1,2	1	Transportador de membrana (familia NitT)
Q0KEU9	AmtB	1,2	1	Transportador de amonio
Q0K527	NifA	1,2	3	Proteína de unión a hierro
Q0KE10	TETR2	1,2	2	Regulador transcripcional (familia TetR/AcrR)
Q0K1E0	RuBisCO	1,2	12	Ribulosa bifosfato carboxilasa
Q0KBJ3	ALDDH	1,2	1	Aldehído deshidrogenasa
Q0JZ70	NifB	1,1	1	Proteína de unión a hierro
Q0KBT9	TctC	1,1	1	Receptor de membrana externa
Q0K7P0	ManC2	1,1	5	Manosa 1-fosfato guanililtransferasa
Q0KEV0	GglnK	1,1	4	Proteína reguladora de nitrógeno
Q0K7T3	GST	1,1	4	Glutatión transferasa
Q0KCP3	UreG	1,0	2	Ureasa
Q0K5M4	AtpH	1,0	2	ATP sintasa

Código	Proteína	Δ	Péptidos	Función
Proteínas con Δ≤-1				
Q0JYT7	LP1	-2,6	9	Lipoproteína periplásmica
Q0JYQ2	NarL	-2,4	8	Transportador de membrana (familia NarL)
Q7WXQ3	NFH1	-1,8	2	NiFe hidrogenasa
Q0K8I8	RpsU	-1,6	2	Proteína ribosomal 30S
Q0JYP0	NheJ	-1,6	7	3-fosfoesterasa
Q0K5W5	PorG	-1,5	14	Piruvato oxidoreductasa
Q0K609	RpsL	-1,5	5	Proteína ribosomal 30S
Q0K5B8	RpmH	-1,5	1	Proteína ribosomal 50S
Q0JYP5	HisK	-1,5	1	Histidina quinasa
Q0JZI0	CoxM	-1,5	4	Citrocromo oxidasa
Q0K4H5	GSDH	-1,4	2	Glucosa deshidrogenasa
Q7WXQ4	NFH2	-1,4	2	NiFe hidrogenasa
Q0JZY1	EFG	-1,4	12	Factor de elongación
Q0JZR2	TPP	-1,4	2	Piruvato ferredoxin oxidoreductasa
Q0JYQ3	ADH	-1,3	3	Deshidrogenasa
Q0KBZ1	RpmI	-1,3	1	Proteína ribosomal 50S
Q0K520	YbaK	-1,3	2	Proteína de unión a tRNA
P52993	SUCC	-1,2	1	Succinil deshidrogenasa
Q0K5E7	YflP	-1,2	12	Transportador (familia TTT)
Q0JZJ1	DUF	-1,2	5	Proteína del complejo DUF
Q0K6J1	PaaB1	-1,1	1	Enoil-CoA hidratasa
Q0KAG7	CysK2	-1,1	2	Cisteína sintasa
Q0KF44	PnpLA	-1,1	1	αβ-hidrolasa
Q0K5K9	BP1	-1,1	6	Transportador de aminoácidos
Q0K878	PiriC	-1,1	1	Proteína nuclear
P39185	NapA	-1,0	12	Nitrato reductasa
Q0K781	RpsT	-1,0	5	Proteína ribosomal 30S
Q0K636	RpsE	-1,0	10	Proteína ribosomal 30S

Tabla 18. Identificación de las proteínas con mayor expresión diferencial (Log2 *Fold Change* Δ≥1; Δ≤-1) durante el crecimiento de *C. necator* H16 en el medio SNL20. La columna "Péptidos" hace referencia al número de péptidos detectados para inferir la proteína. La columna "Δ" hace referencia a la ratio de expresión detectado en cada proteína entre la condición SNL20 y la condición control. La anotación automática se realizó usando el software Blas2GO (ver Apartado 3.7.3 en la sección Materiales y métodos).

Debido al elevado número de datos se realizó un estudio a gran escala mediante anotación automática. La anotación permite categorizar los genes en clases funcionales y tener un enfoque global para comprender el significado biológico de un elevado número de secuencias y detectar las diferencias entre grupos. En este sentido, la ontología génica (GO, de *Gene Ontology*) proporciona un marco adecuado para el análisis global del proteoma en una condición determinada como es la producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16. La anotación funcional de las proteínas pertenecientes a cada uno de los grupos obtenidos se realizó como se describe en el Apartado 3.7.3 de la sección Materiales y métodos.

Mediante un análisis de enriquecimiento, donde se comprueba la sobre-representación estadística de una lista de genes de interés en una lista de referencia, y una clasificación funcional, se obtuvo una visión global de las proteínas activas en *C. necator* H16 durante la producción de P(3HB-*co*-LA) (Figura 49). Como referencia se utilizó el proteoma completo de *C. necator* H16 (ID: UP000008210) para llevar a cabo una comparación en base a la abundancia de las proteínas clasificadas como activas, reprimidas o no reguladas en los grupos funcionales en los que se enmarcan según la GO.

Respecto a las proteínas activadas, destacan las categorías relacionadas con el catabolismo y transporte, con un total de hasta 80 proteínas (Figura 49A). El medio SNL20 se caracteriza por tener una elevada concentración de lactato y una restricción total de fuente de nitrógeno, por lo que la presencia de proteínas catabólicas se podría relacionar con el estado quiescente de las células donde se priorizan las reacciones degradativas de macromoléculas para obtener los metabolitos necesarios para mantener el metabolismo basal frente a los procesos de división celular. Por otro lado, predominan las proteínas relacionadas con el transporte, los mecanismos de unión a sustrato y proteínas del citoplasma, relacionadas con la organización de la membrana, por ejemplo.

En cuanto a las proteínas reguladas de forma negativa (Figura 49B), se distinguen aquellas relacionadas con la biosíntesis de ribosomas, unión a RNA ribosomal y traducción, con un total de 42 proteínas detectadas. La falta de nitrógeno en el medio de producción impide la división celular, ya que la síntesis de nuevos componentes celulares y la generación de biomasa requiere necesariamente de este elemento. Por último, el análisis de las proteínas no reguladas (Figura 49C) aporta información sobre los procesos celulares activos durante la producción de P(3HB-*co*-LA). Destacan también las proteínas de organización del citoplasma, metabolismo de aminoácidos y actividades enzimáticas específicas entre las que se encuentran transferasas, isomerasas, ligasas y liasas.

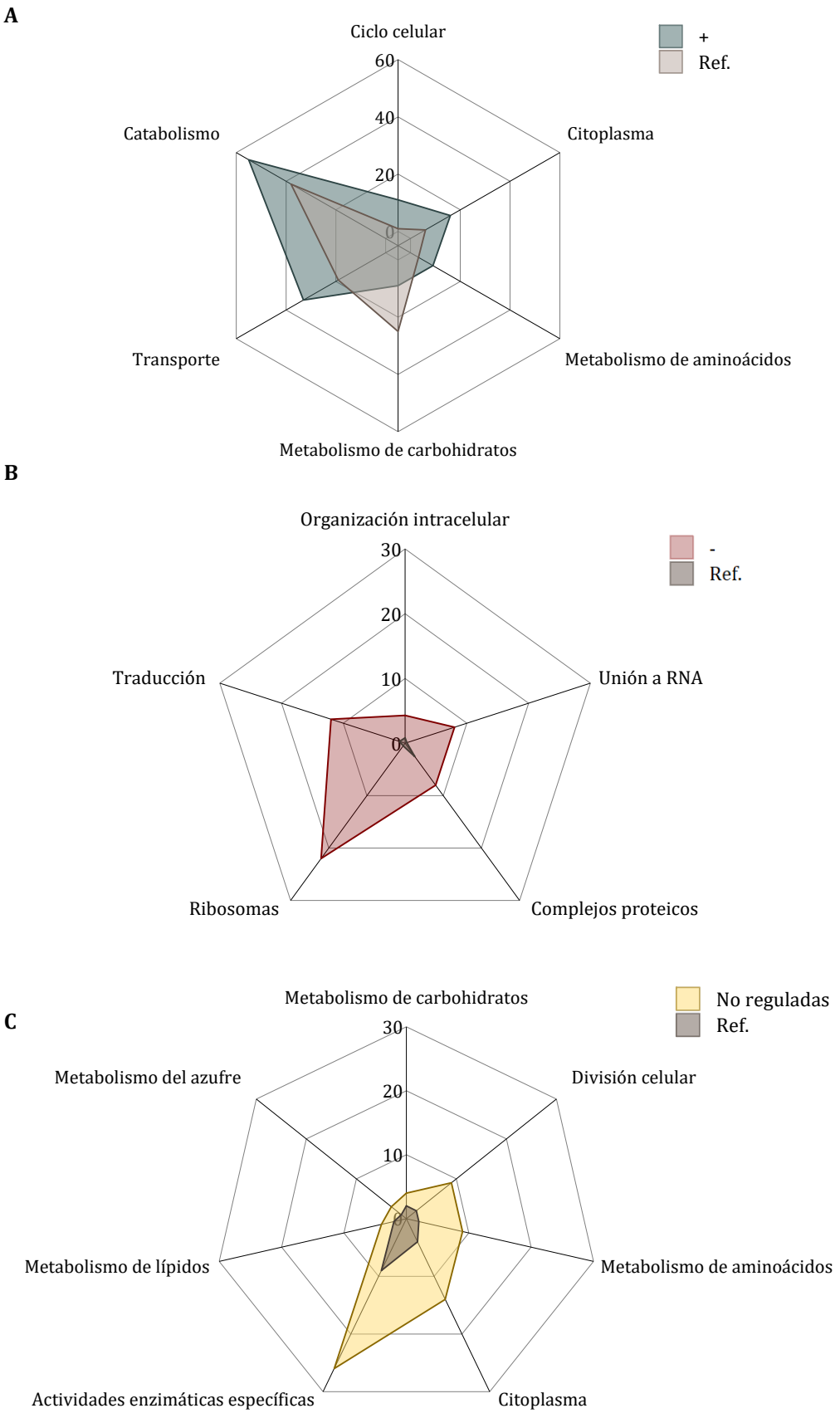


Figura 49. Clasificación funcional de los grupos mayoritarios de las proteínas reguladas y no reguladas. Se utilizó el proteoma completo de *C. necator* H16 como referencia.

4.9.2 Análisis funcional del proteoma

Para analizar con precisión las rutas metabólicas en las que se encuentran las proteínas reguladas se utilizó la herramienta KEGG *mapper* (ver Apartado 3.7.3 de la sección Materiales y métodos).

Se encontraron 28 proteínas implicadas en el metabolismo central, incluyendo la glucólisis, la PPP, el CBB y la vía ED (Tabla 19). Estas vías generan de NADH/NADPH para satisfacer la demanda energética y apoyar la biosíntesis de componentes celulares como aminoácidos y lípidos. Los niveles de expresión de las enzimas implicadas en estas rutas describen los posibles flujos de producción de los metabolitos necesarios para la producción de PHA cuando las células de *C. necator* H16 se incuban en condiciones SNL20.

Abreviatura	Descripción	Δ
Glucólisis		
FPB	Fructosa 1,6 bifosfatasa	0,8
FBA	Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa	2,9
GAPH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	1,5
PGK	Fosfoglicerato quinasa	0,8
PGM	2,3-bifosfoglicerato mutasa	-0,7
ENO	Enolasa	0
PYK	Piruvato quinasa	0
PES	Fosfoenolpiruvato sintasa	0,4
PDH	Piruvato deshidrogenasa	0,8
AcoC	Dihidrolipolisina-acetil transferasa	0,8
Ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA)		
PECK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	0,2
PC	Piruvato carboxilasa	0,1
ACONT	Aconitato hidratasa	0,3
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa	0
AKGDH	Isocitrato deshidrogenasa	0,2
SUCC	Succinil deshidrogenasa	-1,2
PPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	-0,6
LDHA	L-lactato deshidrogenasa	-0,4
β-Oxidación		
ACCD	Acetil-CoA sintasa	0,6
FadB	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	0,6
FadD	Acetil coenzima A sintasa	0
PhaJ	Enoil-CoA hidratasa	0,3

Continuación Tabla 19.

Abreviatura	Descripción	Δ
Ciclo de Calvin-Benson (CBB)		
RuBisCO	Ribulosa bifosfato carboxilasa	1,2
PRUK	Fosforibuloquinasa	1,5
Vía de las pentosas fosfato (PPP)		
RPE	Ribulosa fosfato 3-epimerasa	0,2
TKT	Transcetolasa	0,4
TAL	Transaldolasa	0
PGI	Glucosa 6-fosfato isomerasa	0,2
Vía de Enter-Doudoroff (ED)		
PGL	6-fosfogluconolactonasa	0
G8PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	0,7
EDD	Fosfogluconato deshidratasa	0,8
EDA	2,3 fosfogluconato aldolasa	0,5

Tabla 19. Organización de las proteínas reguladas en las principales rutas del metabolismo central de *C. necator* H16. Para cada proteína se muestra la abreviatura, descripción, ratio de expresión entre la condición SNL20 y la condición control (Δ) y la ruta metabólica en la que se encuentran implicadas.

Tras el análisis del proteoma se detectaron 17 proteínas que podrían estar relacionadas con las rutas de síntesis y degradación del P(3HB-*co*-LA) (Tabla 20). En primer lugar, se encontraron reguladas positivamente dos enzimas implicadas en la producción de P(3HB) desde acetil-CoA: la β-cetotiolasa (BtkB; H16_A1445), que cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA; y la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB; H16_A2171) que reduce el acetoacetil-CoA usando NADPH para generar 3-HB-CoA. También, se identificaron las fasinas PhaP1 (H16_A1381), PhaP3 (H16_A2172) y PhaP4 (H16_B2021) con regulación positiva. Además, se detectaron la PHA polimerasa (PhaC; H16_A1437) y la acetil-CoA acetiltransferasa (PhaA; H16_A1438) en el proteoma aunque su concentración fue similar en ambos casos a la del control. Como se ha mencionado en la Introducción (ver Apartado 1.5.4), *C. necator* H16 tiene diferentes mecanismos implicados en la regulación de la producción de P(3HB) por lo que una concentración mayor o menor de polimerasa no implica mayor o menor acumulación de polímero. Por último, se identificó la proteína PhaM (H16_A0141), con regulación negativa, que actúa como un activador de PhaC con capacidad de unión a DNA por su extremo C-

terminal y está involucrada en la segregación de los gránulos de PHA durante la división celular.

Respecto a la degradación del polímero, la PHA despolimerasa principal de *C. necator* H16 (PhaZ1; H16_A1150) mostró niveles de regulación basal y las proteínas PhaY1 (H16_A2251) y BdHA (H16_A1334) con actividad hidrolasa, se encontraron reguladas de forma negativa. Asimismo, las proteínas Spot1 (H16_A0955) y PtsI (H16_A0326), que actúan como alarmonas del sistema PTS reprimiendo la hidrólisis del polímero (Mitra et al., 2021), se encontraron reguladas positivamente, indicando que en estas condiciones de incubación se favorece la acumulación del polímero.

Proteína	Descripción/Actividad	Etiqueta de posicionamiento	Δ
Llp2	L-lactato permeasa	H16_ B0090	1
PhaA	Acetil-CoA acetiltransferasa	H16_A1438	0
BtkB	β-cetotiolasa	H16_A1445	0,3
PhaB	Acetoacetil-CoA reductasa	H16_A2171	0,3
PhaC	PHA polimerasa	H16_A1437	0
PhaZ1	PHA despolimerasa intracelular	H16_A1150	0
PhaY1	D-(-)-3-hidroxibutirato hidrolasa	H16_A2251	-0,2
BdhA	3-hidroxibutirato deshidrogenasa	H16_A1334	0
LdH	L-lactato deshidrogenasa	H16_A0666	-0,5
Pct	Propionil-CoA transferasa	H16_A2718	0
PhaR	Regulador transcripcional de fasinas	H16_A1440	0
PhaM	Proteína asociada al gránulo	H16_A0141	-0,6
PhaP1	Fasina	H16_A1381	1,7
PhaP3	Fasina	H16_A2172	0,9
PhaP4	Fasina	H16_B2021	1,3
Spot1	GTP pirofosfoquinasa	H16_A0955	0,4
PtsI	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa	H16_A0326	0,4

Tabla 20. Posibles proteínas involucradas en la producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16. Para cada proteína se muestra la abreviatura, descripción, localización en el genoma a través de la etiqueta de posicionamiento (A: cromosoma 1; B: cromosoma 2) y la ratio de expresión entre la condición SNL20 y la condición control (Δ).

De forma interesante, se encontró incrementada una proteína anotada como una L-lactato permeasa (Llp2; H16_B0090), que podría estar involucrada en el transporte de lactato desde el medio extracelular, aunque la actividad de esta proteína en *C. necator* H16 no ha sido demostrada experimentalmente. Pertenece a una familia de permeasas de lactato entre las que se encuentran otras enzimas lactato permeasas de *E. coli* (LldP y GlcA), *Bacillus subtilis* (LutP y IctP) y diferentes especies del género *Pseudomonas* con las que tiene hasta 70 % de identidad (Chai et al., 2009; Gao et al., 2012; Núñez et al., 2002). Por último, se identificó una proteína anotada como L-lactato deshidrogenasa (LdH; H16_A0666) responsable de la oxidación del lactato a piruvato con regulación negativa sugiriendo que en las condiciones estudiadas la asimilación del lactato no está relacionada con esta ruta .

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que *C. necator* H16 es capaz de producir P(3HB-*co*-LA) a partir de lactato como único precursor. Sin embargo, en los estudios publicados hasta la fecha, la producción de PLA solo se ha conseguido en microorganismos recombinantes (Choi et al., 2020). Como se ha mencionado en el Apartado 1.5.5 de la Introducción, una de las principales estrategias abordadas para producir PLA a partir de bacterias, ha sido redirigir los flujos metabólicos hacia la acumulación de polímero e incluir las actividades enzimáticas necesarias donde destaca la conversión de lactato en lactoil-CoA tras la incorporación de una propionil-CoA transferasa (Pct) de *Clostridium propionicum* o *Megaspharea elsdenii* (Shozui et al., 2011; Yang et al., 2010).

Teniendo como referencia la Pct de *C. propionicum* (Q9L3F7) y *M. elsdenii* (A0A140JTF0), Lindenkamp y colaboradores identificaron un gen codificante de una Pct en el genoma de *C. necator* H16 (Pct_{CN}; H16_A2718) cuya deleción no genera un cambio fenotípico con respecto a la estirpe salvaje (Lindenkamp et al., 2010). Tras verificar experimentalmente su actividad como CoA-transferasa, este mismo grupo propuso tres enzimas homólogas a la Pct_{CN} en el genoma de *C. necator* H16 aunque compuestas por dos subunidades; una succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasa (H16_A1331, H16_A1332) y dos 3-oxoadipato-CoA transferasas (H16_B0198, H16_B0199 y PHG388 ,PHG389) (Lindenkamp et al., 2013; Volodina et al., 2014).

Tras analizar el proteoma de *C. necator* H16 en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA), se identificaron reguladas positivamente las proteínas Q0KC00 (H16_A1331; 0,2), Q0KBZ9 (H16_A1332; 0,2) y Q0K4S5 (H16_B0198; 0,3) cuya identidad en referencia a la Pct_{CN} (Q0K874; H16_A2718) según el algoritmo *Clustal Omega*, que tiene en cuenta la secuencia completa de la proteína, es del 32, 28 y 32 %, respectivamente (Tabla 21) (ver alineamientos de las secuencias de aminoácidos en los Anexos).

Aunque a día de hoy, la actividad propionil-CoA transferasa de las proteínas Q0KC00, Q0K4S5 y Q0KBZ9 solo ha sido propuesta por la similitud de sus secuencias por Volodina et al., en 2014, y hasta la fecha, no se ha demostrado su actividad *in vivo,* la activación de la succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasa, probablemente compuesta por la subunidad α (Q0KC00) y β (Q0KBZ9), en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA) puede ser un indicio de su implicación en la generación de lactoil-CoA a partir de lactato. De esta forma, el lactoil-CoA actuaría como precursor de la sintasa de PHA responsable de la polimerización del copolímero P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16.

Descripción	Etiqueta	Proteína	Δ	Identidad (%)
Propionil-CoA transferasa	H16_A2718	Q0K874	0,05	100
Succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasa subunidad α	H16_A1331	Q0KC00	0,2	32
Succinil-CoA:3-oxoácido-CoA transferasa subunidad β	H16_A1332	Q0KBZ9	0,2	28
3-oxoadipato-CoA transferasas subunidad α	H16_B0198	Q0K4S5	0,3	23
3-oxoadipato-CoA transferasa subunidad β	H16_B0199	Q0K4S4	-	24
3-oxoácido-CoA transferasa subunidad α	PHG387		-	25
3-oxoácido-CoA transferasa subunidad β	PHG388	Q7WWV4	-	34

Tabla 21. Análisis de las proteínas propuestas en la literatura con actividad propionil-CoA transferasa (Pct) en el proteoma de *C. necator* H16 durante la producción de P(3HB-*co*-LA). Para cada proteína identificada se muestra la descripción, localización en el genoma a través de la etiqueta (A: cromosoma 1; B: cromosoma 2; PHG: megaplásmido), la ratio de expresión entre la condición SNL20 y la condición control (Δ) y el porcentaje de identidad respecto a la secuencia completa de la propionil-CoA transferasa de *C. necator* H16 (H16_A218). Ver alineamientos en los Anexos.

En la Figura 50 se muestra una posible ruta de producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16 a partir de los resultados obtenidos tras el estudio del proteoma.

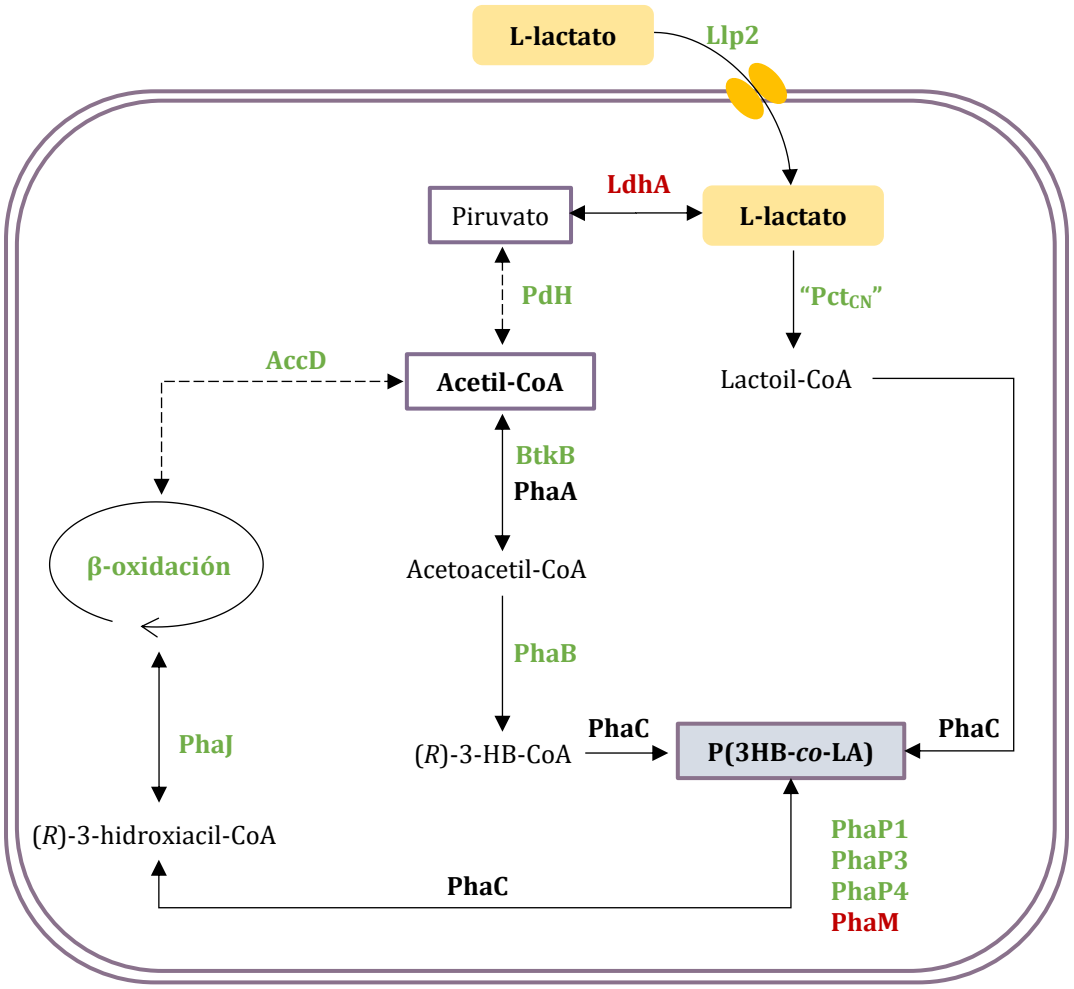


Figura 50. Posible ruta metabólica implicada en la producción de P(3HB-*co*-LA) en *C. necator* H16. Las proteínas reguladas positivamente se marcan en color verde y las proteínas reguladas negativamente en rojo. Las proteínas con el mismo nivel de expresión entre la condición SNL20 y la condición control se indican en color negro. Las flechas discontinuas hacen referencia a reacciones metabólicas no mostradas. Las abreviaturas son: Llp2 (L-lactato permeasa), LdhA (L-lactato deshidrogenasa) AccD (acetil-coenzima A carboxilasa), PdH (piruvato deshidrogenasa), PhaA (acetil-coA reductasa), PhaB (acetoacetil-CoA reductasa) BtkB (β-cetotiolasa), PhaC (PHA sintasa), PhaJ (enoil-CoA hidratasa), PhaM (activador de PhaC1), PhaP (fasinas), Pct_{CN} (posible proteína con actividad propionil-CoA transferasa) y (*R*)-3-HB-CoA ((*R*)-3-hidroxibutiril-CoA).

Capítulo 3.

Adaptación evolutiva de *R. rubrum* para mejorar la síntesis de productos de alto valor añadido a partir de la fotofermentación del *syngas*.

Capítulo 3. Adaptación evolutiva de *R. rubrum* para mejorar la síntesis de productos de alto valor añadido a partir de la fotofermentación del *syngas*.

Antecedentes

Los residuos orgánicos procedentes de la agricultura o la alimentación son fácilmente revalorizados por los microorganismos mediante procesos de biotransformación como la AD. Sin embargo, ciertos residuos más recalcitrantes como los plásticos u otros residuos sólidos urbanos, requieren procesos más complejos como la pirólisis o gasificación que permiten la generación de *syngas* como una alternativa para su valorización (Beneroso et al., 2014a). Aproximadamente, un 40 % del *syngas* corresponde al monóxido de carbono (CO), pudiendo ser transformado en productos de alto valor añadido por ciertas bacterias (Köpke et al., 2011). Dentro de este grupo de microorganismos, *R. rubrum* es capaz de utilizar el CO como fuente de carbono y energía en condiciones anaerobias (Karmann et al., 2019). Además, la presencia de un co-sustrato, como el acetato, y de una fuente de energía adicional, como la luz, favorecen la acumulación de P(3HB) (Karmann et al., 2017; Revelles et al., 2016). En cambio, su gran versatilidad metabólica tiene efectos negativos sobre su velocidad de crecimiento, mostrando una fase de latencia prolongada al cambiar las condiciones ambientales. Por este motivo, y como alternativa a la modificación genética por medio de técnicas de biología molecular, en este capítulo se lleva a cabo un proceso de adaptación evolutiva a escala de laboratorio (ALE) con el fin de reducir el tiempo de respuesta durante la exposición al CO como una presión medioambiental.

La cepa parental utilizada como punto de partida en el proceso de ALE es un derivado de laboratorio de la cepa *R. rubrum* S1 denominada en esta Tesis Doctoral como *R. rubrum* RR02_01.

RESULTADOS

4.10 Diseño experimental y establecimiento de las condiciones de fotofermentación del *syngas*

Desde una perspectiva de economía circular, la obtención de *syngas* a partir de sustancias de desecho y su posterior conversión en bioplásticos e hidrógeno a través de microorganismos como *R. rubrum* (ver apartado 1.5.3 de la Introducción), es de gran interés biotecnológico. En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación y durante el estudio de las mejores condiciones de producción de P(3HB) a partir de *syngas* en *R. rubrum*, se observó que el acetato es una fuente de carbono adicional necesaria para soportar el crecimiento y que la luz actúa como una fuente alternativa de energía en condiciones anaerobias (Revelles et al., 2016). También se observó que en algunas condiciones de crecimiento esta bacteria era capaz de incorporar monómeros de (*R*)-3-hidroxivalerato (HV) al polímero en una proporción muy baja, por lo que a lo largo de este capítulo se va hacer referencia a la producción de PHA.

En este contexto, se realizó en primer lugar un estudio del crecimiento de *R. rubrum* en condiciones fotoheterotróficas utilizando *syngas* y acetato como fuentes de carbono. Tal y como se detalla en el Apartado 3.2.2 de la sección Materiales y métodos, el medio rico de crecimiento utilizado para el inóculo fue ATCC, mientras que el medio mínimo donde se llevaron a cabo los cultivos en *syngas* fue el medio SYN. La composición del *syngas* utilizado fue: 40 % de CO, 40 % H_2, 10 % de CO_2 y 10 % de N_2. La concentración de *syngas* adicionada en las botellas selladas se determinó al medir la presión con un manómetro antes y después de introducir el gas. Se añadieron 1,5 bares de presión a cada botella del ensayo desde una bala de *syngas* comercial presurizada a 200 bares.

Como se puede observar en la Figura 51, las primeras 24 horas se corresponden con una fase de latencia, seguida de una fase exponencial de crecimiento hasta las 60 horas donde se alcanza una OD_{600} de 2.

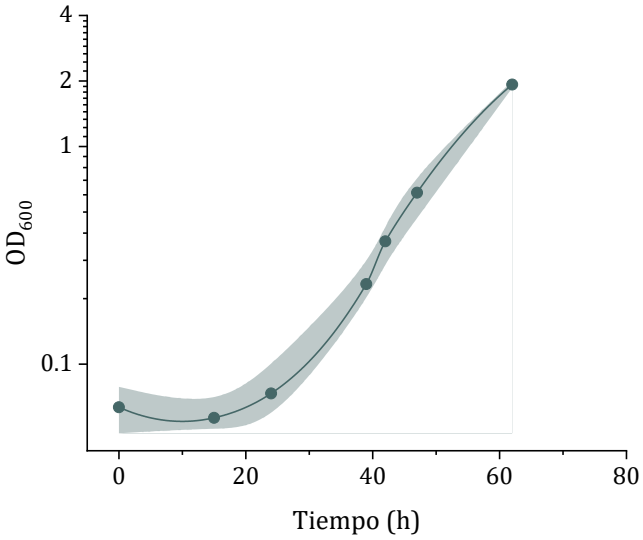


Figura 51. Curva de crecimiento de *R. rubrum* bajo condiciones fotoheterotróficas con *syngas* y acetato. La zona sombreada muestra la desviación estándar obtenida en tres réplicas biológicas.

Con el objetivo de acelerar la aclimatación de *R. rubrum* a la fermentación del *syngas* y reducir la fase de latencia, se llevó a cabo un proceso de ALE donde se utilizó la exposición a una concentración máxima de CO como mecanismo de presión selectiva. Para ello, primeramente, se determinó la concentración de CO óptima para el ensayo, es decir que permitiera el crecimiento sin ejercer un efecto tóxico sobre el microrganismo.

4.10.1 Determinación de la concentración de CO para el proceso de ALE

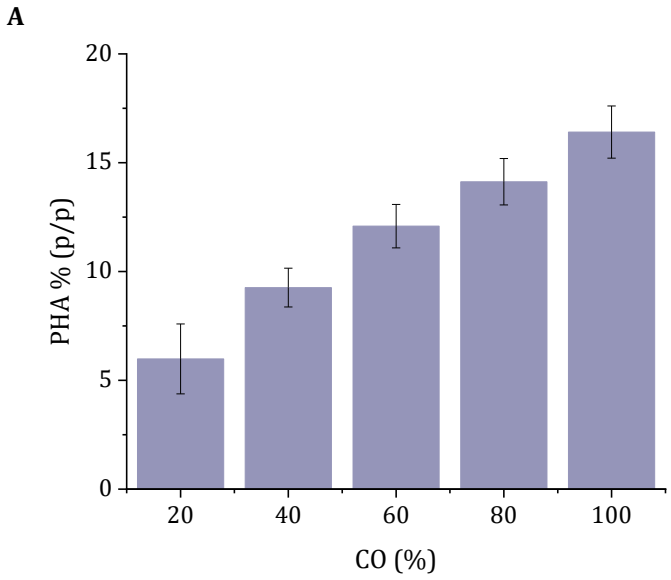
Inicialmente, se estableció un rango entre el 40 y el 100 % de CO (CO_{40}-CO_{100}) en el espacio de cabeza de las botellas anaerobias añadiendo diferentes volúmenes de CO, como único gas, a las botellas de cultivo mediante una jeringa estanca a través del tapón de goma e igualando la presión a 1,5 bares con nitrógeno en todas las condiciones (ver Apartado 3.2.2 en la sección Materiales y métodos). A continuación, se analizó la duración de la fase de latencia mediante la variación de la OD_{600} del cultivo durante las primeras 24 horas (Δ OD $_{0\text{-}24\ h}$ = OD $_{t0\ h}$/ OD $_{t24\ h}$), la velocidad de crecimiento (μ) durante la fase exponencial y la OD_{600} máxima alcanzada en cada condición.

Los resultados obtenidos mostraron que *R. rubrum* fue capaz de crecer en todas las condiciones estudiadas, incluyendo los cultivos CO_{100}. Sin embargo, el aumento de OD_{600} en las primeras 24 horas (Δ OD $_{0\text{-}24h}$) y la OD_{72h} más elevados se consiguieron en los cultivos CO_{40} (Tabla 22).

CO (%)	Δ OD $_{0\text{-}24h}$	μ (h^{-1})	OD_{600} 72h
40	3,4	0,06 ± 0,002	6,8 ± 0,7
60	2,9	0,05 ± 0,009	5,6 ± 0,9
80	2,3	0,05 ± 0,001	5,1 ± 0,1
100	2,0	0,02 ± 0,004	0,6 ± 0,09

Tabla 22. Parámetros del crecimiento analizados durante la exposición de *R. rubrum* a diferentes concentraciones de CO en condiciones fotoheterotróficas. Para cada resultado se muestra la desviación obtenida en las tres réplicas biológicas utilizadas en el experimento.

Respecto a la producción de biomasa y la acumulación de PHA, se distinguieron dos tendencias opuestas. Mientras que el contenido de polímero intracelular aumentó de forma proporcional a la concentración de CO añadida, la biomasa disminuyó a partir del 40 % de CO, obteniendo, finalmente, resultados similares en términos de rendimiento de producción de PHA en $g \cdot L^{-1}$ (Figura 52A y 52B). Los cultivos CO_{100} mostraron una producción de PHA inferior a 0,1 $g \cdot L^{-1}$ (Figura 52B).



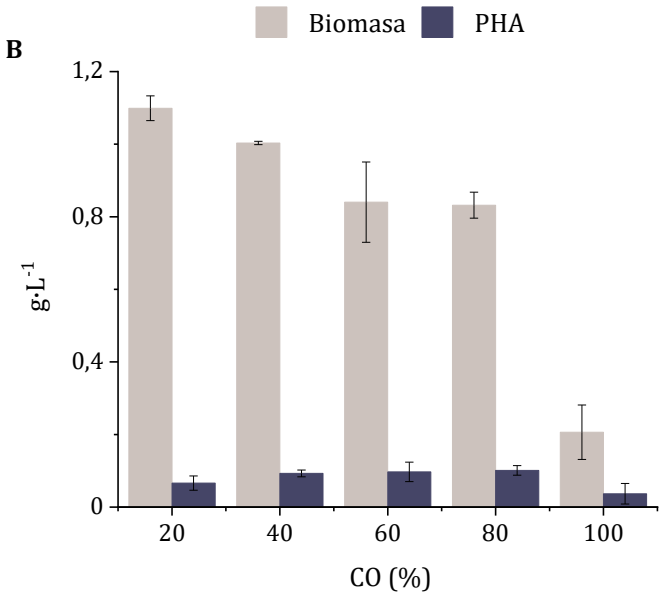


Figura 52. Análisis de la producción de biomasa y PHA. A) Acumulación de PHA en % (p/p) a las 72 horas de fermentación. B) Biomasa y producción de PHA en $g \cdot L^{-1}$ en cada condición a las 72 horas de fermentación. Las barras de error muestras la desviación estándar de las tres réplicas biológicas.

Por otro lado, se analizó el perfil de consumo del acetato y el CO a lo largo del tiempo mediante HPLC y cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica (GC-TCD), respectivamente (ver apartado 3.8 en la sección Materiales y métodos). Como se puede observar en la Figura 53A, el consumo de acetato siguió un modelo diaúxico en dos fases en los cultivos CO_{60} y CO_{80}, ralentizándose entre las 24 y 48 horas con respecto a los cultivos CO_{40}. Con una cantidad inicial de acetato de 35mM, el consumo de esta fuente de carbono a las 72 horas no superó el 50 %, quedando una concentración de hasta 20 mM de acetato en el sobrenadante. Este comportamiento fue similar en todas las condiciones estudiadas a excepción de los cultivos CO_{100} donde se detectó en el sobrenadante la totalidad de la cantidad de acetato inicial añadida (Figura 53B).

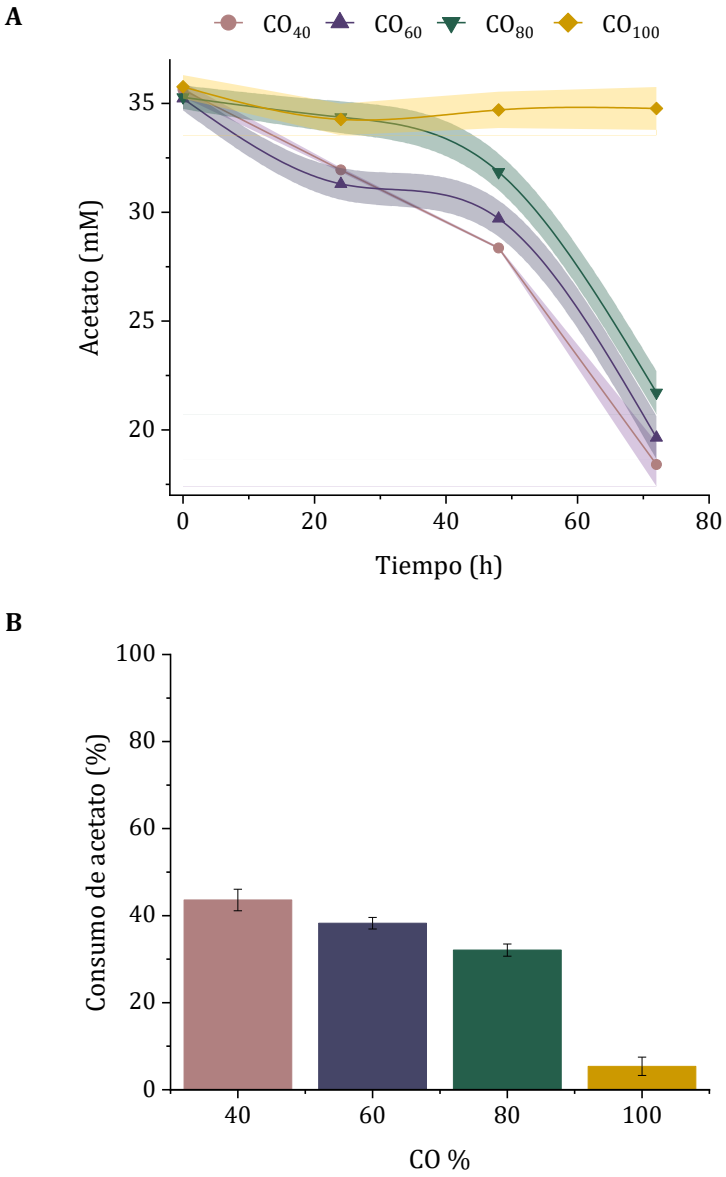
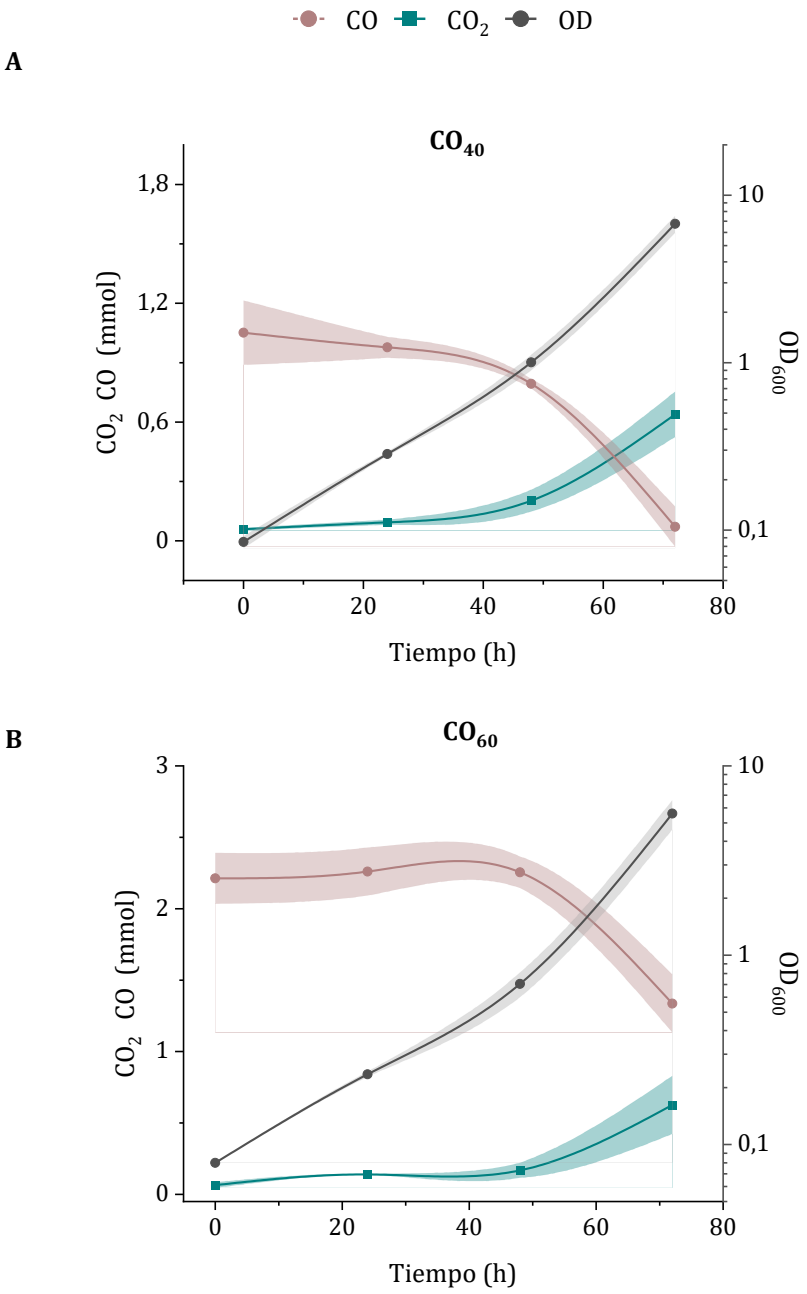


Figura 53. Perfil de consumo del acetato durante el crecimiento de *R. rubrum* en CO mediante HPLC. A) Análisis de la concentración del acetato del medio de cultivo mediante HPLC a lo largo del tiempo. La desviación entre las tres réplicas biológicas se muestra sombreada. B) Consumo de acetato en función de la concentración de CO. Las barras de error muestran la desviación obtenida en tres réplicas biológicas.

Respecto al consumo de CO, se observó un aumento del número de horas desde que se inicia el crecimiento hasta que *R. rubrum* empieza a utilizar este sustrato, a medida que aumenta la concentración de CO a la que se expone al microorganismo. El análisis de la fracción gaseosa de los cultivos, permitió observar cómo, durante las primeras 24 horas de crecimiento, el acetato es la fuente de carbono preferencial, manteniéndose estable la concentración de CO. En los cultivos CO_{40}, el consumo simultáneo de las dos fuentes de carbono disponibles en el medio de cultivo se produjo a partir de las 24 horas de

crecimiento, coincidiendo con la fase exponencial y dando lugar a lugar a un aumento en la producción de biomasa relacionado con un aumento en la OD_{600} (Figura 54A). A partir del 60 % de CO, aunque no se observan diferencias significativas en la OD_{600} final con respecto a los cultivos CO_{40}, la velocidad de consumo del CO se ralentiza a partir de las 48 horas (Figura 54B y 54C). Por último, la exposición a un 100 % de CO inhibe el crecimiento, impidiendo la utilización del CO disponible (Figura 54D).



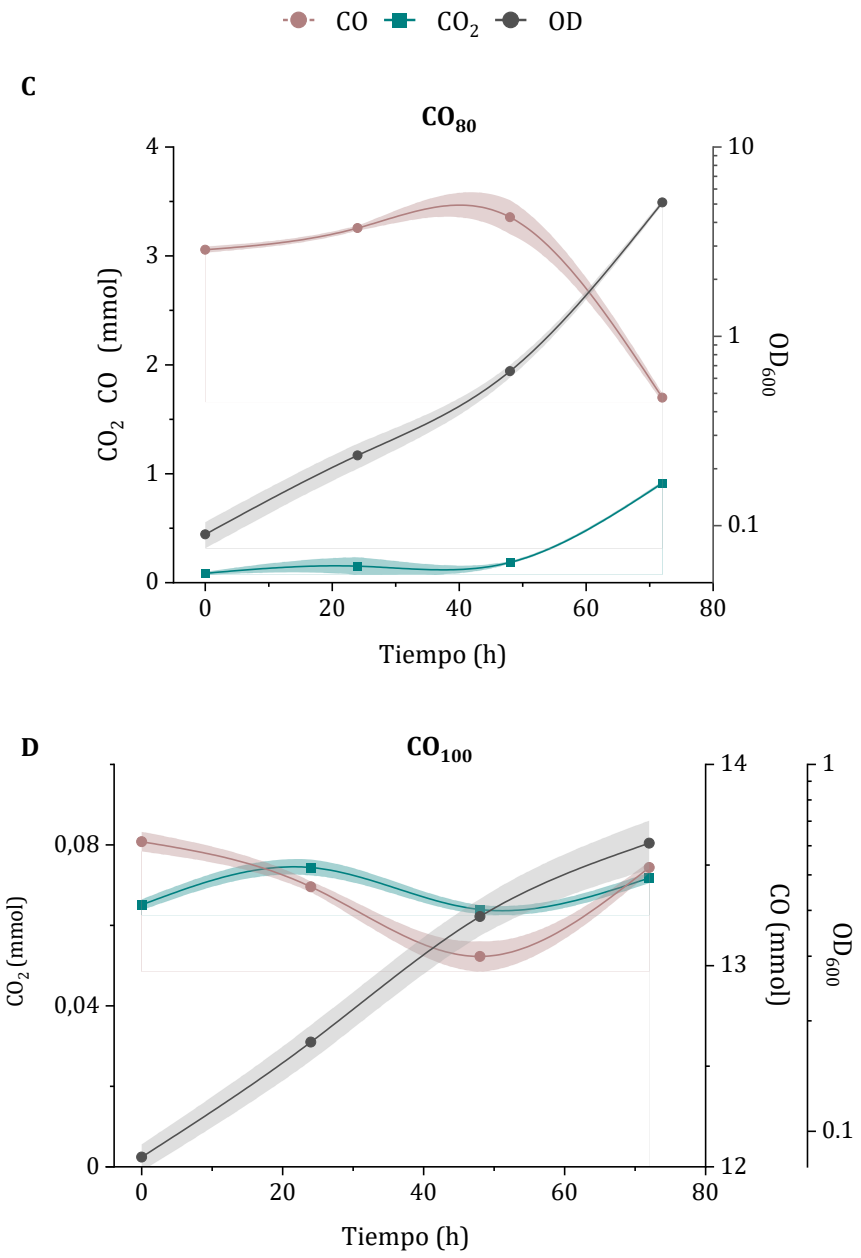
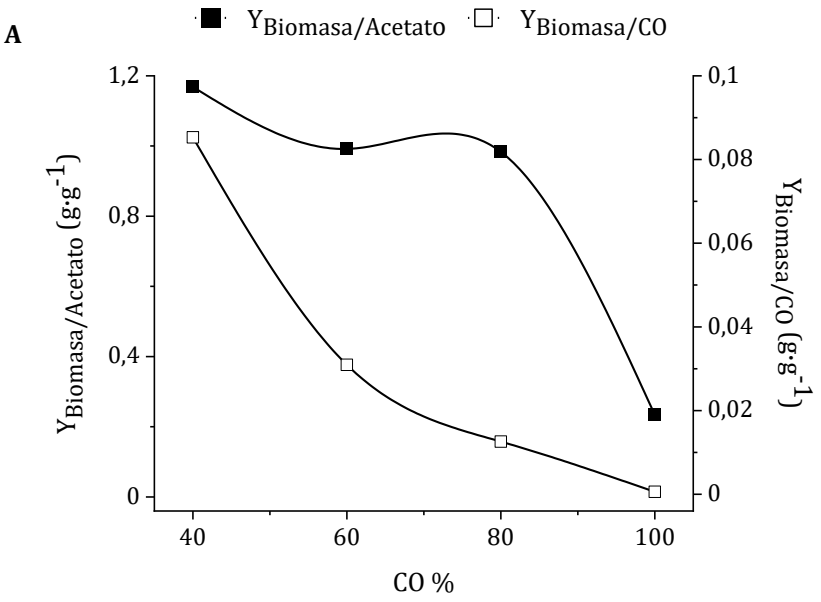


Figura 54. Análisis del consumo de CO acoplado a la producción de CO_2 durante el crecimiento de *R. rubrum* mediante GC-TCD. A) CO_{40}. B) CO_{60}. C) CO_{80}. D) CO_{100}. Los valores del eje Y que representan la concentración de CO y CO_2 a lo largo del tiempo varían en función de la concentración inicial de CO utilizada. La zona sombreada muestra la desviación obtenida en tres réplicas biológicas.

Adicionalmente, la producción de CO_2 observada es una consecuencia de la actividad metabólica de *R. rubrum*. Durante la fermentación de ácidos orgánicos, como el acetato, y, debido a la conversión del CO en CO_2 por medio de la CODH deshidrogenasa, se acumula CO_2, aumentando conforme la velocidad de consumo del acetato y del CO es superior. En este contexto, la mayor producción de CO_2 se observa en los cultivos CO_{40} donde el consumo de ambas fuentes de carbono fue prácticamente completo (Figura 54A), a diferencia de los

cultivos CO_{100} donde la concentración de CO_2 detectada en el espacio de cabeza de las botellas de cultivo no aumenta debido a la inhibición del crecimiento de *R. rubrum* en estas condiciones (Figura 54D).

Para determinar en qué condiciones se obtenía mayor productividad en relación a la utilización de sustratos y al resto de parámetros de crecimiento, se calculó la tasa de producción de biomasa y PHA en función del carbono aportado al inicio de la fermentación (ver apartado 3.3.4 de la sección Materiales y métodos). Teniendo en cuenta que la cantidad inicial de acetato fue la misma en todas las condiciones (35 mM), las diferencias en la tasa de conversión del carbono en biomasa y/o polímero se relacionan directamente con la concentración de CO (Figura 55). La tasa de asimilación del acetato de los cultivos con una concentración de CO mayor al 80 % disminuyó drásticamente, ya que la cantidad de biomasa producida en relación a la cantidad de acetato y CO inicial de los cultivos fue hasta un 80 % menor en los cultivos CO_{100} con respecto a los cultivos CO_{40} (Figura 55A). Estos datos se relacionan directamente con los datos de crecimiento obtenidos (ver Tabla 22), en los que se observa un aumento de la fase de latencia y disminución de la velocidad de crecimiento en los cultivos CO_{100} limitando, por lo tanto, el uso de las fuentes de carbono disponibles. Respecto a la producción de PHA, se observa una disminución de la cantidad de carbono utilizado cuando la concentración supera el 40 % de CO (Figura 55B).



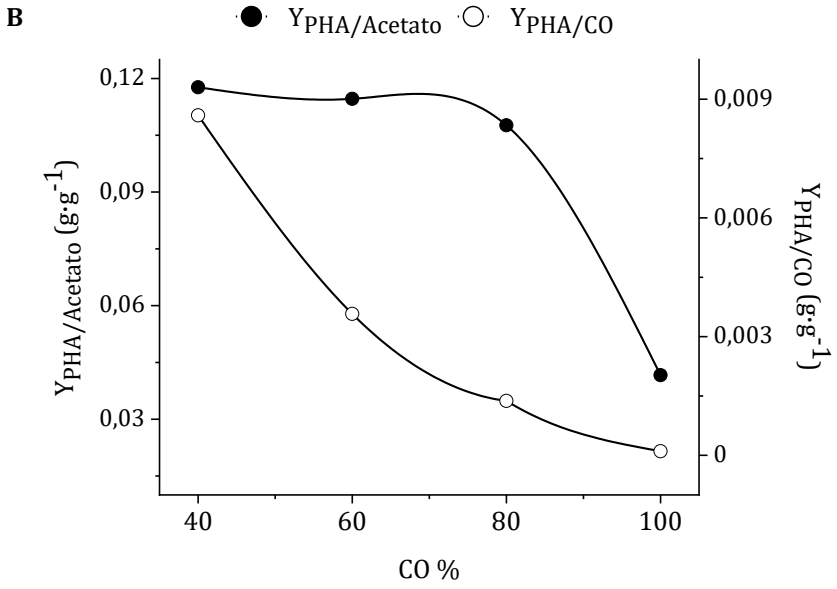


Figura 55. Rendimientos de producción de biomasa y PHA de *R. rubrum* a diferentes concentraciones de CO. A) Producción de biomasa en función del acetato y el CO aportados al inicio del crecimiento. B) Producción de PHA en función del acetato y el CO aportados al inicio del crecimiento.

A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que en los cultivos CO_{40} se alcanza un equilibrio entre el CO aportado y, la biomasa y el PHA producidos, se estableció como condición de crecimiento de presión selectiva una concentración de CO del 40 % para el proceso de ALE con el objetivo de mejorar el crecimiento de *R. rubrum* en *syngas*.

4.10.2 Determinación del tiempo de crecimiento para el proceso de ALE

Una vez determinada la concentración adecuada de CO, se realizó un estudio del crecimiento para finalizar la optimización del diseño experimental, ya que, tanto el estado metabólico de las células como el tamaño del inóculo en los sucesivos pases tienen influencia sobre el proceso de evolución. Para ello, se inocularon células frescas de *R. rubrum* en el medio mínimo SYN en condiciones anaerobias teniendo acetato 15 mM y una concentración de CO del 40 % como fuentes de carbono, según se explica en el Apartado 3.2.2 de la sección Materiales y métodos. Se observó un aumento de la OD_{600} hasta las 72 horas de fermentación, a partir de las cuales el crecimiento bacteriano entró en fase estacionaria (Figura 56A). De forma similar, la acumulación de PHA, tanto en términos de contenido intracelular como en mg·L^{-1}, tuvo su punto máximo a las 72 horas, mostrando después un abrupto descenso (Figura 56B).

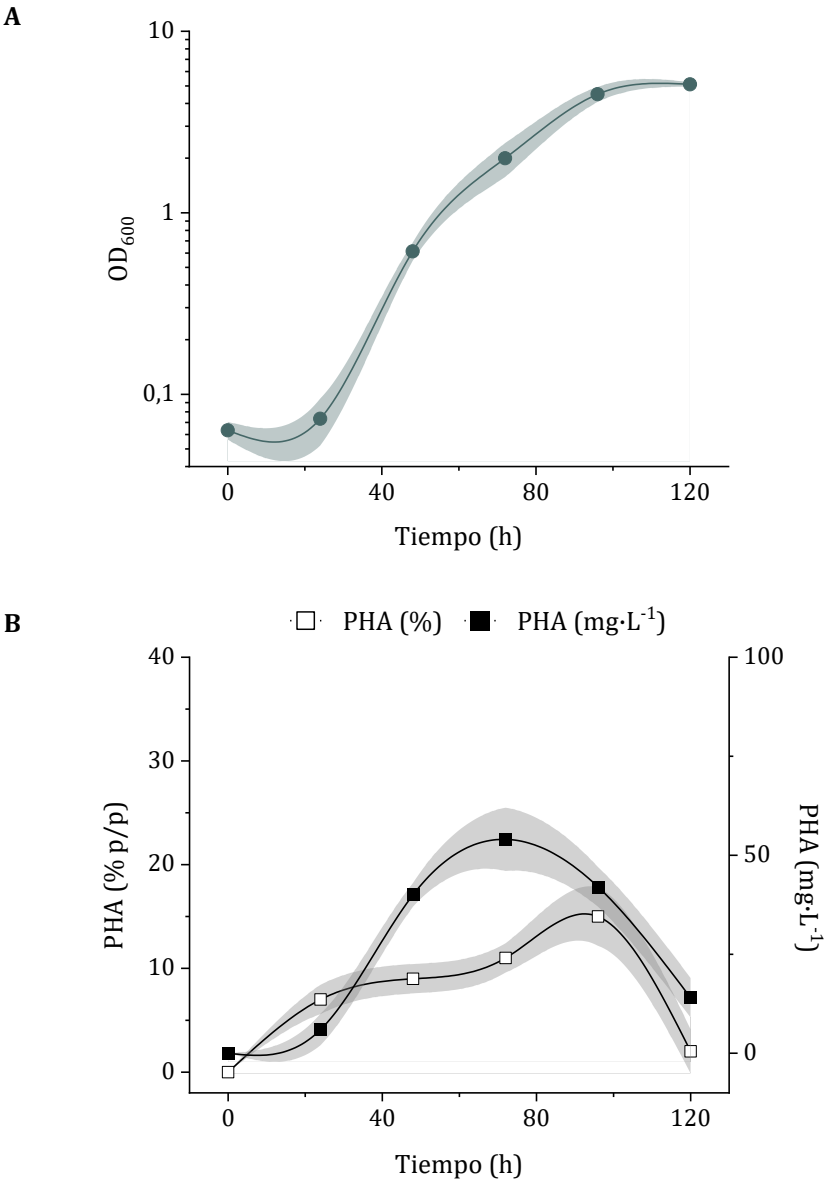


Figura 56. Crecimiento y producción de PHA durante la fotofermentación del CO en presencia de acetato en *R. rubrum*. A) Curva de crecimiento en función de la OD_{600}. B) Producción y acumulación de PHA a lo largo del crecimiento analizada por GC-MS. La zona sombreada muestra la desviación de tres réplicas biológicas.

Por lo tanto, con el objetivo de enfocar la selección en mejoras metabólicas con respecto a la acumulación de biopolímero, se estableció el comienzo de la fase estacionaria (72 horas) como el tiempo para dar los pases e inocular las células en un medio de cultivo fresco.

4.11 Adaptación evolutiva y aislamiento de las variantes con capacidades metabólicas mejoradas para el crecimiento en *syngas*

Como se ha mencionado anteriormente, bajo la premisa de favorecer la adaptación y, por lo tanto, mejorar la capacidad metabólica de *R. rubrum* durante el crecimiento en *syngas*, se realizaron pases cada 72 horas inoculando células del pase anterior en medio mineral fresco. Cada 10 pases se realizó el seguimiento del crecimiento a través de la densidad óptica para identificar los posibles cambios en la velocidad de crecimiento y la acumulación de biomasa (Tabla 23).

Después de 200 generaciones (50 pases), calculadas a partir de los eventos de duplicación celular durante las curvas de crecimiento, se observó la reducción de la fase de latencia (Δ $OD_{0\text{-}24h}$) (Figura 57). Además, también se observó un aumento del 22 % en la velocidad de crecimiento y del 60 % en la OD_{600} y la biomasa a las 72 horas tras el proceso de ALE se observó.

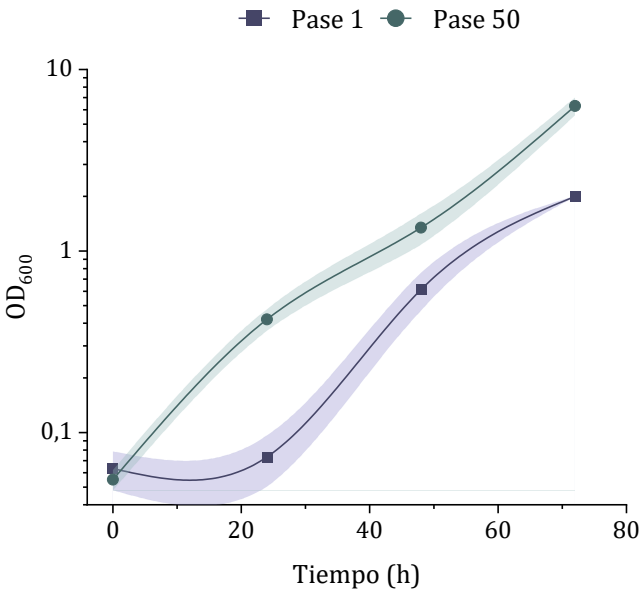


Figura 57. Curvas de crecimiento de *R. rubrum* antes y después del proceso de ALE. Se muestran los datos obtenidos en el Pase 1 y en el Pase 50. La desviación entre las tres réplicas biológicas se muestra sombreada.

Pase (nº)	Δ OD $_{0-24h}$	μ (h^{-1})	OD_{600}	Biomasa ($g \cdot L^{-1}$)
1	1,9 ± 0,1	0,039 ± 0,006	1,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1
10	1,8 ± 0,1	0,045 ± 0,002	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1
20	2,2 ± 0,1	0,046 ± 0,001	2,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
30	4,2 ± 0,1	0,046 ± 0,001	3,6 ± 0,9	0,9 ± 0,2
40	4,4 ± 0,1	0,048 ± 0,001	4,7 ± 1,6	1,0 ± 0,1
50	4,3 ± 0,1	0,050 ± 0,004	4,9 ± 0,9	1,2 ± 0,1

Tabla 23. Parámetros del crecimiento recogidos durante el proceso de ALE en *R. rubrum*. Se muestran los datos obtenidos cada 10 pases y la desviación estándar obtenida entre las tres réplicas biológicas con las que se llevó a cabo el proceso. Los datos de OD_{600} y biomasa se muestran a las 72 horas de crecimiento.

Para realizar un estudio detallado del crecimiento de una posible variante de *R. rubrum* con capacidades metabólicas mejoradas respecto a la fermentación del *syngas*, se aislaron cinco colonias diferentes. Para ello se creció 1 mL de cada replica biológica del Pase 50 en diferentes placas Petri de medio mínimo SYN sólido usando fructosa como fuente de carbono como se puede ver en la Figura 58.

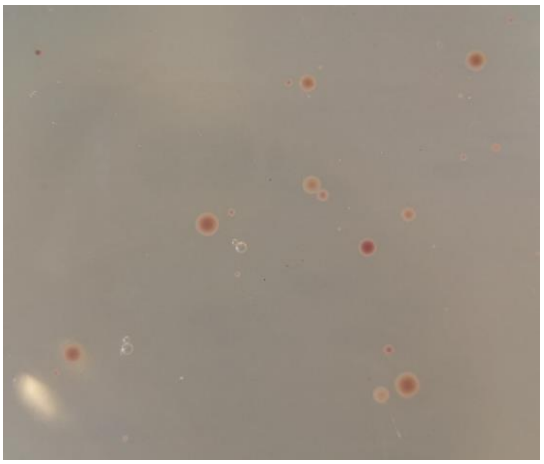


Figura 58. Colonias aisladas de *R. rubrum* tras el proceso de ALE 200 generaciones después. Se utilizó medio mínimo SYN-agar y fructosa 15 mM como fuente de carbono.

En primer lugar, con el objetivo de comprobar si los cambios fisiológicos observados se mantenían a nivel fenotípico o genotípico, las colonias aisladas se cultivaron por separado y en diferentes condiciones de crecimiento después de un periodo de congelación (ver Apartado 3.2, en la sección Materiales y métodos). Posteriormente, se realizó un estudio del fenotipo mediante una caracterización fisiológica completa en las mismas condiciones que las establecidas para la adaptación evolutiva.

4.12 Caracterización fenotípica de las variantes con capacidades metabólicas mejoradas para el crecimiento en *syngas*

Durante la caracterización fenotípica se estudiaron diferentes parámetros como el grado de pigmentación de las membranas citoplasmáticas o la tasa de crecimiento, la producción de biomasa, consumo de acetato y CO, y la producción de PHA en las cinco posibles variantes evolucionadas (V1-V5) con respecto de la cepa parental *R. rubrum* RR02_01 (RR).

En primer lugar, se estudió el contenido de pigmentos fotosintéticos en las membranas intracelulares para ver si el aumento en la velocidad de crecimiento de las variantes adaptadas estaba relacionado con la tolerancia a la exposición a la luz como se ha reportado en estudios previos (Bayon-Vicente et al., 2020, 2018). El grado de pigmentación se calculó a partir de los datos espectrofotométricos obtenidos como la relación OD_{880}/OD_{600} que describe la cantidad de pigmentos por unidad de biomasa, relacionándose de forma directa con la producción de las membranas fotosintéticas (Grammel & Ghosh, 2008). Como se puede observar en la Figura 59, el grado de pigmentación fue diferente entre variantes y, de forma general aumentó hasta las 120 horas en las cepas V4 y V5 de la misma forma que en la cepa parental RR. Por el contrario, en las variantes V1, V2 y V3 el contenido disminuye a lo largo de la fermentación.

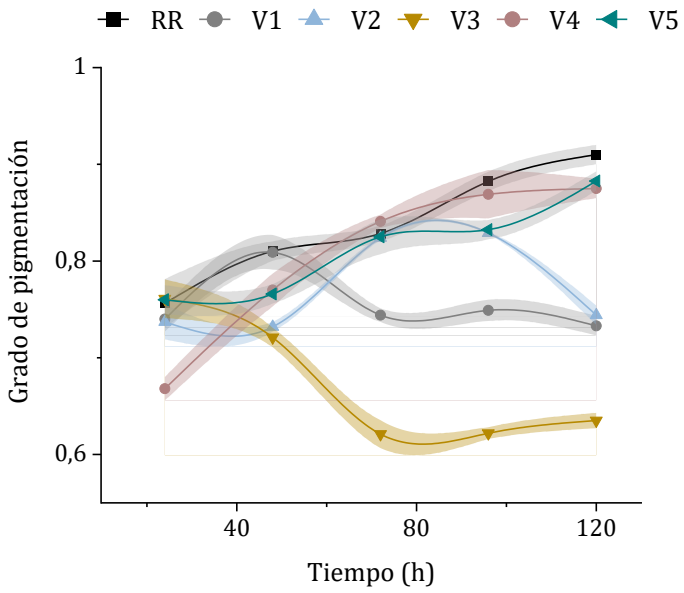


Figura 59. Grado de pigmentación de las membranas intracitoplasmáticas de *R. rubrum* y las variantes adaptadas. Datos cualitativos obtenidos mediante espectrofotometría a través de la relación OD_{880}/OD_{600}. La zona sombreada muestra la desviación entre las muestras de seis réplicas biológicas.

Como se ha comentado en las secciones anteriores, en condiciones fotoheterotróficas, *R. rubrum* se caracteriza por tener una fase de latencia de, al menos, 24 horas. Para detectar un cambio en la velocidad de aclimatación a estas condiciones de cultivo, se llevó a cabo un estudio del crecimiento. Además, de forma complementaria, se realizó un análisis de datos para determinar si las diferencias entre las variantes eran estadísticamente significativas.

En la Figura 60 se observa cómo el crecimiento en las variantes V1y V2 fue ligeramente más rápido que en la cepa parental RR. Destacan las variantes V4 y V5 en las que no se detectó una fase de latencia alcanzando la misma densidad óptica 60 horas antes que el resto de variantes estudiadas. Respecto a RR, cabe mencionar que se percibe un crecimiento en dos etapas diferenciadas a partir de las 48 horas donde comienza la fase exponencial.

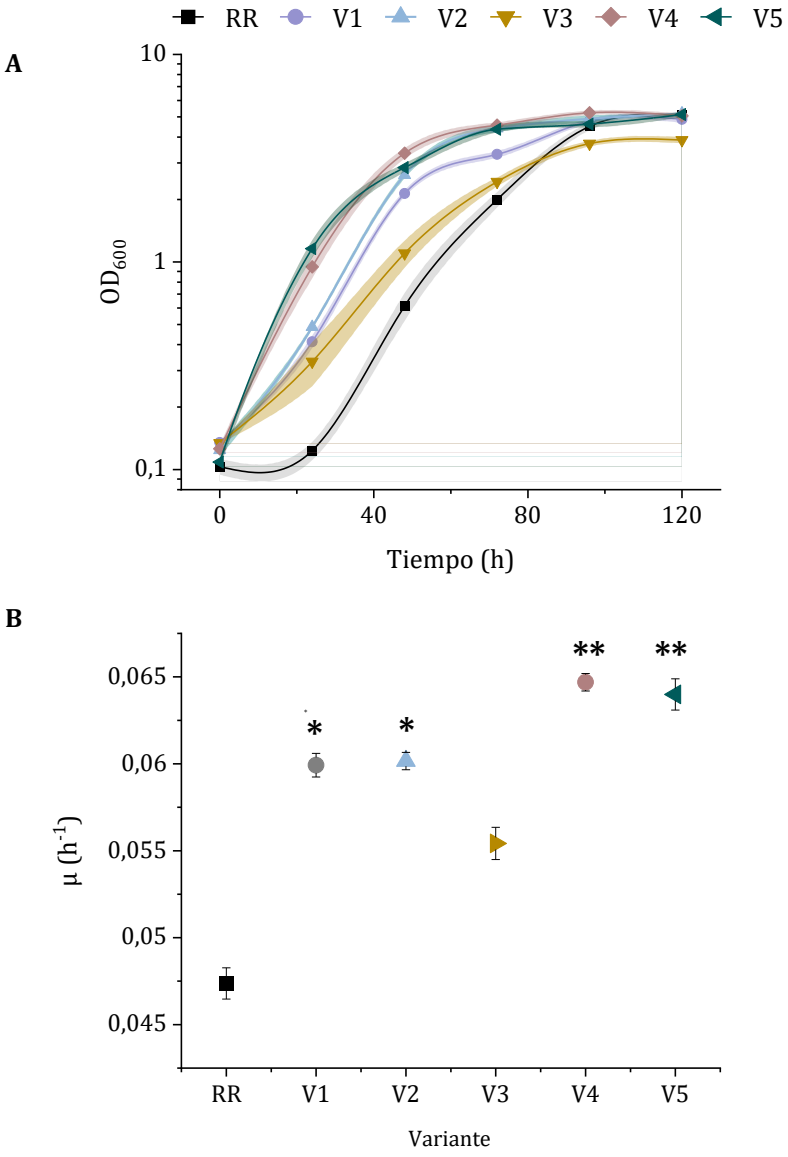


Figura 60. Crecimiento de las variantes de *R. rubrum* seleccionadas durante la fotofermentación del *syngas* con acetato. A) Curvas de crecimiento. B) Tasa de crecimiento

calculada durante la fase exponencial. Se muestran las diferencias significativas obtenidas mediante un análisis estadístico T (*, p<0,05; **, p<0,01). La zona sombreada representa la desviación obtenida en seis réplicas biológicas.

La producción de biomasa y PHA, tanto en porcentaje por peso seco como en $mg \cdot L^{-1}$, se analizó para cada cultivo y en cinco puntos diferentes a lo largo de la fermentación, cada 24 horas, para confirmar esta tendencia y tener una imagen global del crecimiento (Tabla 1 del Material suplementario del Capítulo3 en Anexos).

De forma general, la biomasa aumenta de forma lineal hasta las 120 horas de cultivo, alcanzando la fase estacionaria temprana en diferentes tiempos en función de la variante. Por ejemplo, las variantes V2, V4 y V5 sobrepasan los 800 $mg \cdot L^{-1}$ de biomasa a las 72 horas, mientras que la cepa parental RR y las variantes V1 y V3 alcanzan la misma producción 48 horas más tarde. Los cambios más significativos se observan a partir de las 24 horas de fermentación, cuando la biomasa de las variantes V4 y V5 aumenta con respecto a la cepa parental RR y al resto de variantes, alcanzando 186 y 275 $mg \cdot L^{-1}$, respectivamente. Este aumento tiene un valor del 50 % en el caso de la variante V4 y del 100% en V5 con respecto a RR en las mismas condiciones de crecimiento.

Por otro lado, la acumulación intracelular de PHA sigue una tendencia en aumento en todas las cepas hasta las 48 horas, punto a partir del cual disminuye drásticamente hasta las 120 horas de seguimiento. No se observan diferencias significativas entre las variantes y la cepa parental RR al comparar cantidad de polímero intracelular en relación al peso seco. No obstante, como la cantidad total de PHA depende tanto de la biomasa como del porcentaje de acumulación intracelular, la variante V4 es capaz de acumular hasta un 74 % más de PHA total a las 48 horas de fermentación, seguida de la variante V5 con hasta un 40 %.

De forma resumida, en la Figura 61A y 61B se muestra la comparación de la producción de biomasa y PHA de las variantes con mejores significativas respecto a la cepa parental RR, V4 y V5.

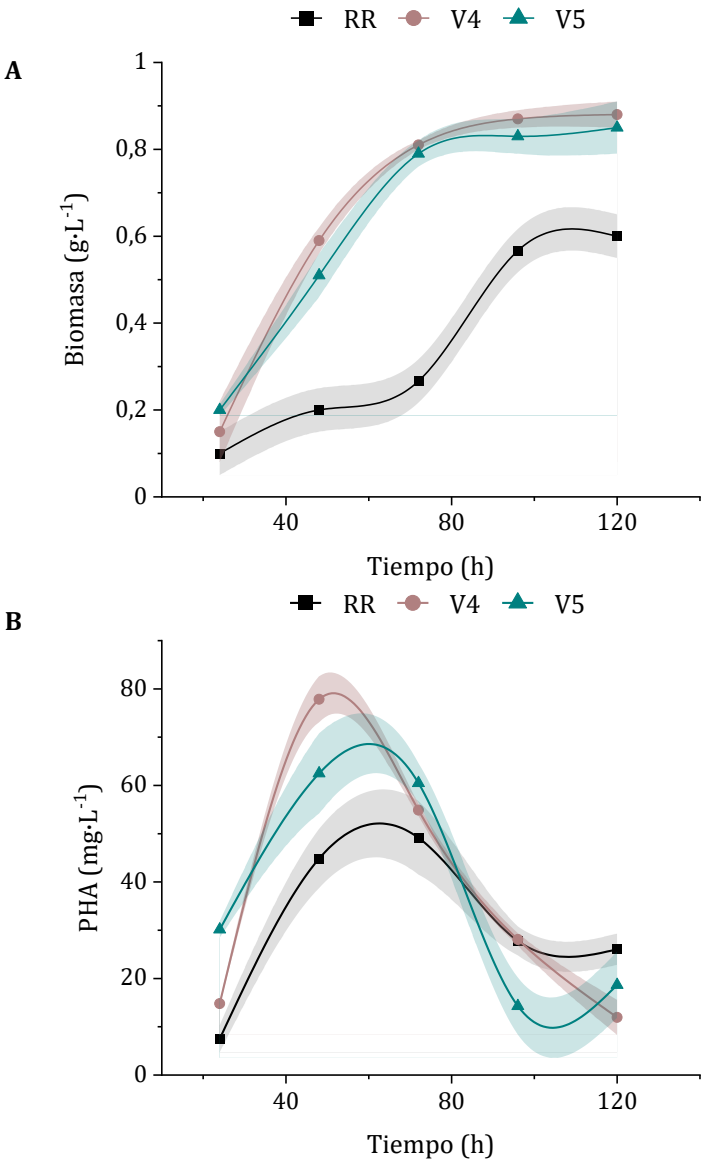


Figura 61. Producción de biomasa y PHA de las variantes V4 y V5 respecto a *R. rubrum*. A) Biomasa total. B) Producción de PHA. La zona sombreada muestra la desviación estándar obtenida en seis réplicas biológicas.

Con el objetivo de estudiar la relación entre el aumento en la velocidad de crecimiento y el consumo de las fuentes de carbono disponibles en el medio de cultivo, se realizó un análisis en dos fases al obtener datos tanto de la concentración de acetato de la fase líquida de los cultivos, como de la cantidad y composición de los gases del espacio de cabeza de las botellas de todas las variantes. Además, como *R. rubrum* es capaz de producir hidrógeno por medio de dos rutas diferentes: mediante la fotofermentación de ácidos orgánicos como el acetato y/o a través de la reducción del CO en presencia de agua, se realizó un análisis detallado de la composición gaseosa de las botellas (CO, CO_2, H_2 y N_2) para estudiar el metabolismo bajo estas condiciones de crecimiento.

Respecto a la fase líquida y, de forma similar a lo observado en los datos de crecimiento, todas las variantes aisladas mostraron una velocidad de consumo del acetato mayor que la cepa parental RR, agotando completamente esta fuente de carbono entre 72 y 96 horas (Figura 62). Las variantes V2, V4 y V5 destacan por empezar a consumir el acetato desde el inicio del crecimiento a diferencia de las cepas V1, V3 y RR en las que se observa un comportamiento diaúxico.

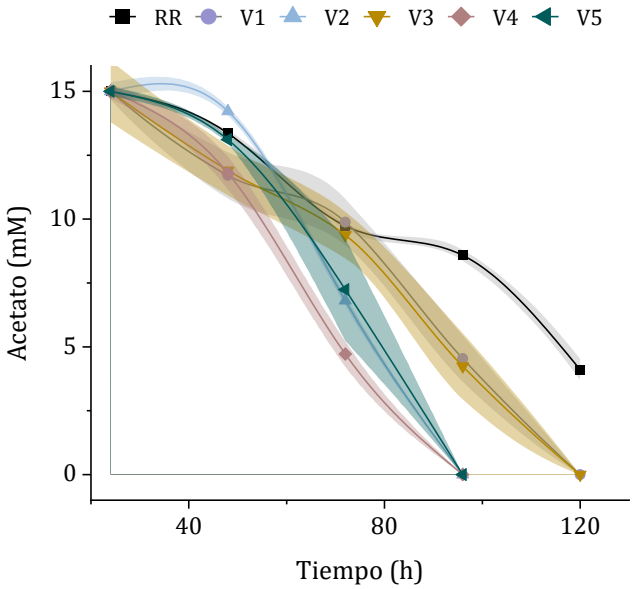
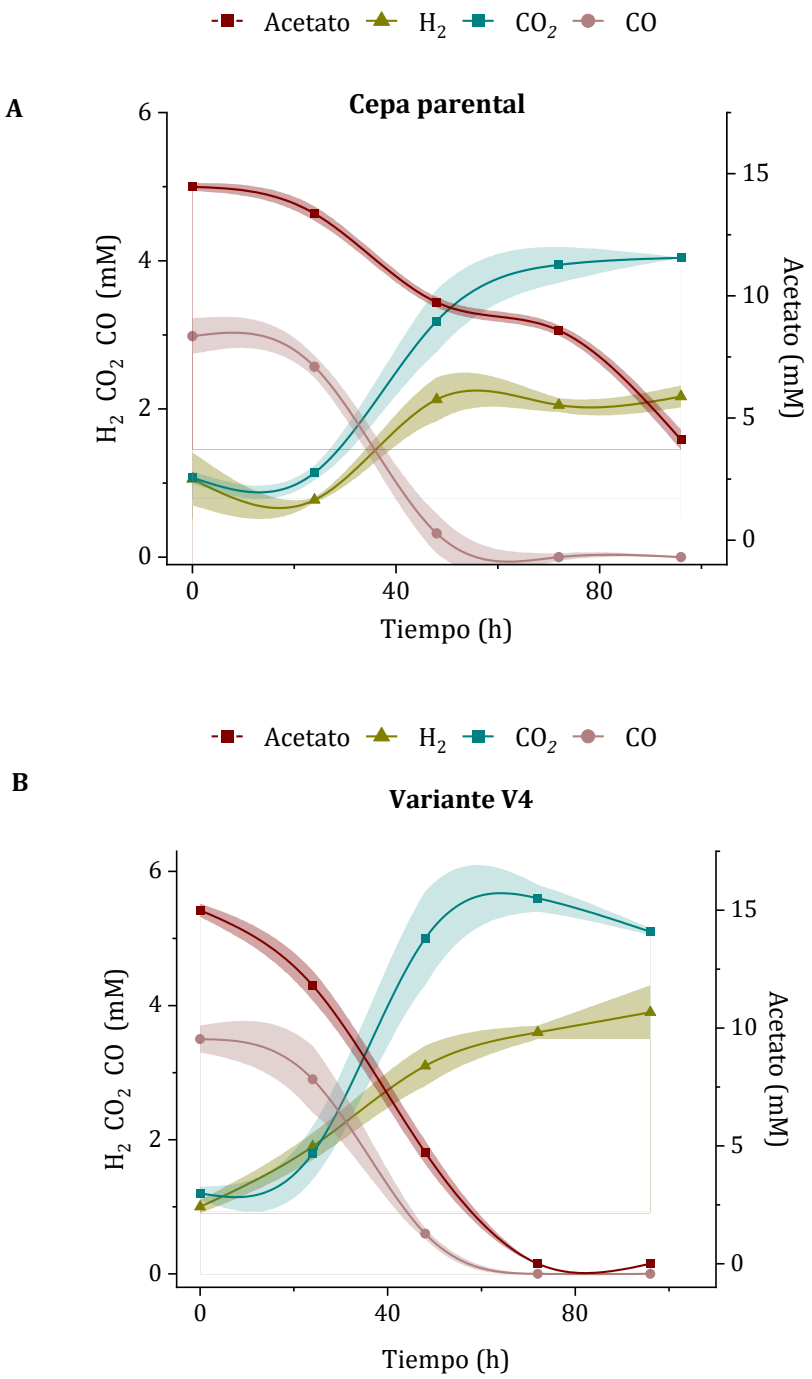


Figura 62. Análisis del consumo de acetato a lo largo de la fermentación. Evolución de la concentración de acetato en la fracción líquida del medio de cultivo mediante HPLC. La zona sombreada representa la desviación obtenida en seis réplicas biológicas.

El CO, CO_2 y H_2 fueron, también, monitorizados a lo largo de la curva de crecimiento. El perfil se realizó analizando el espacio de cabeza de las botellas a tiempo cero, justo después de añadir el *syngas*, y cada 24 horas mediante GC-TCD (ver Apartado 3.8.1 en la sección Materiales y métodos). Las diferencias en la composición y concentración de cada gas fueron obtenidas para las cepas RR, V4 y V5 (Figura 63). El consumo del acetato y la reducción del CO ocurren de forma paralela desde el inicio del crecimiento, alcanzando un máximo a las 48 horas en el caso de las variantes V4 y V5, cuando se observa un consumo completo de ambas fuentes de carbono. Además, la producción de H_2 en las variantes V4 y V5 se mantiene lineal tras el agotamiento del CO y el acetato mientras que en la cepa parental RR no aumenta pese a tener acetato tras 96 horas de fermentación. Por otro lado, aunque el CO_2 producido puede ser fijado en *R. rubrum* a través del CBB, el TCA y la ruta del EM-CoA, como se ha comentado en la Introducción, la acumulación de CO_2 es significativamente mayor en las variantes adaptadas, mostrando un metabolismo más activo y rápido que en la cepa parental.


A
Acetato
H2
CO2
CO
Cepa parental
H2 CO2 CO (mM)
Acetato (mM)
Tiempo (h)
0
2
4
6
0
5
10
15
0
40
80
B
Acetato
H2
CO2
CO
Variante V4
H2 CO2 CO (mM)
Acetato (mM)
Tiempo (h)
0
2
4
6
0
5
10
15
0
40
80

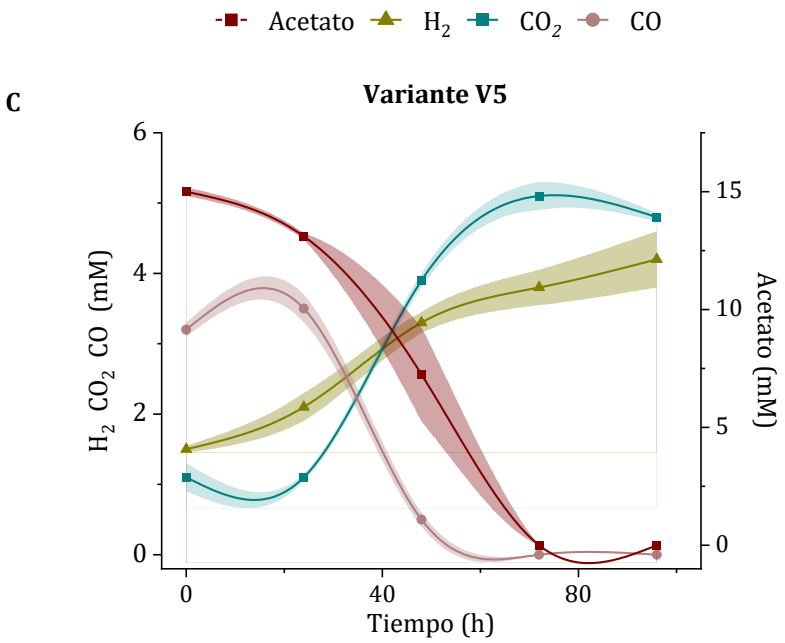


Figura 63. Evolución de la composición de gases del espacio de cabeza. Análisis de la fracción gaseosa de las botellas de cultivo a lo largo del tiempo mediante HS-TCD. A) *R. rubrum*. B) Variante V4. C) Variante V5. La zona sombreada representa la desviación obtenida en dos réplicas biológicas.

Por último, para determinar la influencia del tipo de fuente de carbono en el crecimiento y la producción de PHA, se realizó un balance de materia en dos fases (líquida y gaseosa) a partir de los datos de la composición del caldo de cultivo (concentración de acetato, polímero y biomasa producidos) y del espacio de cabeza de las botellas de cultivo (CO consumido y, CO_2 e H_2 producidos) (Tabla 24).

	H_2/CO	**CO_2/CO**	**PHA/CO**	**PHA/Acet.**	**Biomasa/CO**	**Biomasa/Acet.**
RR	0,7	1,3	0,001	0,03	0,01	0,68
V4	1,0	1,5	0,001	0,07	0,01	0,72
V5	1,1	1,4	0,001	0,09	0,01	0,69

Tabla 24. Balance de materia en dos fases. Las unidades que se muestran son: mol·mol^{-1} para las relaciones H_2/CO y CO_2/CO; y g·g-1 para las relaciones PHA/CO, PHA/Acetato, Biomasa/CO y Biomasa/Acetato. Abreviaturas: RR (*R. rubrum* RR02_01); V4 (Variante 4 obtenida tras el proceso de ALE) y V5 (Variante 5 obtenida tras el proceso de ALE).

La ratio equimolar 1:1 se mantiene en las variantes adaptadas en el caso del H_2, mientras que la cepa parental RR no es capaz de completar el consumo de CO tras 96 horas de cultivo (ver Apartado 5.1, Introducción). Los datos obtenidos para la relación CO_2/CO indican que el CO_2 se produce en exceso y no puede ser totalmente fijado en forma de carbón orgánico en ninguna de las tres cepas estudiadas. Respecto a la producción de PHA y de biomasa, el flujo de carbono principal se obtiene a partir del acetato y no del CO. En condiciones fotoheterotróficas, el acetato actúa como factor limitante en la acumulación de polímero, comenzando a hidrolizarse mediante la actividad enzimática de las despolimerasas en el momento que el acetato se agota para obtener nuevamente carbono y energía. Las variantes adaptadas V4 y V5 mejoran el rendimiento de producción de PHA a partir del acetato de forma significativa con respecto a la cepa parental RR.

4.13 Análisis del genoma de las variantes evolucionadas: reordenamiento, alineamiento e identificación de polimorfismos

Para dilucidar la base genética relacionada con las mejoras en el crecimiento y los cambios fenotípicos, se secuenció el genoma de las cepas evolucionadas V4 y V5, y la cepa parental RR. La secuenciación del genoma completo se llevó a cabo por MicrobesNG (https://microbesng.com/).

En primer lugar, se realizó el ensamblaje de los fragmentos generados en *contigs* ordenados y orientados utilizando como genoma de referencia el genoma de *R. rubrum* S1: NC_007643 y NC_007641 (cromosoma y plásmido). Para llevar a cabo este proceso se utilizó el software *Geneious Prime* (v11.0.9, Biomatters Ltd.). Posteriormente, los genomas cerrados en un solo *contig* se alinearon utilizando el algoritmo *progressive*Mauve (*Multiple Genome Alignment*) para detectar las zonas conectadas y los bloques colineares (LCBs, de *local colinear blocks*) (Darling et al., 2010). Los LCBs son regiones homólogas compartidas entre las secuencias que no contienen ningún reordenamiento. Como se puede observar en la Figura 64, los genomas se dividen en un único conjunto mínimo, lo que significa que los genomas de las variantes V4 y V5 no muestran regiones invertidas o delecionadas asemejándose al genoma referencia *R. rubrum* S1 y a la cepa de partida *R. rubrum* RR02_01 (ver Tabla 4 en la sección Materiales y métodos).

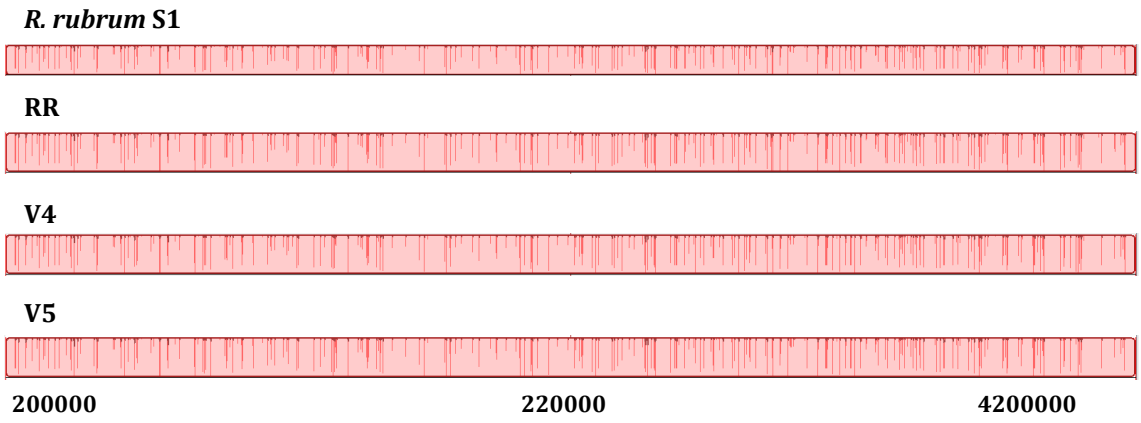


Figura 64. Análisis global de los genomas de *R. rubrum* RR02_01 (RR) y las variantes evolucionadas V4 y V5 frente al genoma de referencia *R. rubrum* S1. Cada secuencia de bloques del mismo color representa un conjunto lineal de regiones coincidentes (LCB). Las líneas verticales de color oscuro se corresponden con áreas no alineadas, generalmente correspondientes a elementos de la secuencia específicos en cada genoma.

Respecto a la identificación de posibles variaciones o SNPs (de *single nucleotide polymorphism*), se realizó tras ensamblar las lecturas obtenidas con el genoma de referencia de *R. rubrum* S1 fijando un mínimo de 30 lecturas y un porcentaje de frecuencia de variación superior a 80 (ver Apartado 3.6.2 en la sección Materiales y métodos). En primer lugar, se identificaron los polimorfismos de la cepa RR con respecto al genoma anotado en la base de datos del NCBI con el objetivo de determinar las mutaciones de la cepa parental antes del proceso de ALE. A continuación, se detectaron los polimorfismos específicos de cada una de las variantes que no estuvieran presentes ni en la cepa parental RR ni en la cepa anotada *R. rubrum* S1. Tras el análisis de las variaciones identificadas se descartaron aquellas que tenían baja fiabilidad. Los SNPs detectados fuera de las regiones codificantes se analizaron mediante los predictores de secuencias promotoras en procariotas Genome 2D y BPROM.

Se encontraron 13 SNPs en la cepa parental RR con respecto al genoma de *R. rubrum* S1 anotado en la base de datos del NCBI (Godoy et al., Datos no publicados). Además, en los genomas de las variantes evolucionadas se detectaron 4 SNPs comunes correspondientes a las regiones codificantes del regulador transcripcional Fis (*Rru*_A0626), la proteína multi-anti extrusión MatE (*Rru*_A0697), una proteína periplásmica de unión a putrescina PotF (*Rru*_A1018) y la enzima glutamato deshidrogenasa GDH (*Rru*_A3663) (Figura 65). Por otro lado, para los SNPs detectados fuera de las regiones codificantes no se encontró ninguna zona susceptible de pertenecer a una región promotora. En la Tabla 25 se muestra la información ampliadas de los SNPs identificados en cada variante.

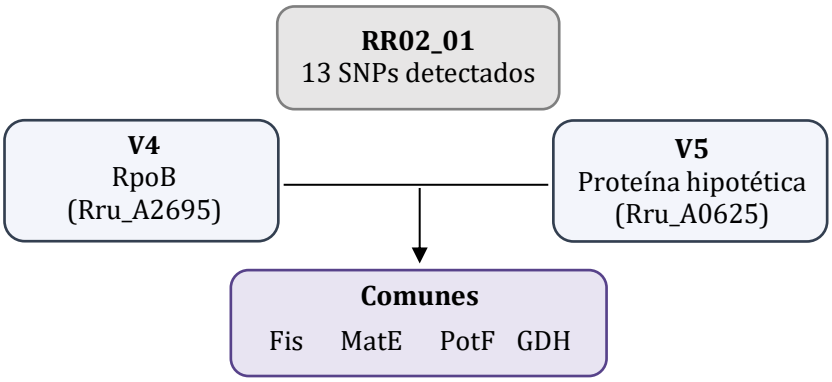


Figura 65. Esquema de los SNPs identificados en cada variante tras el proceso de ALE con respecto a la cepa parental *R. rubrum* RR02_01.

	Proteína	Posición	Localización	CB	FV	Efecto
RR02_01	Chaperona molecular (DnaJ)	254438	Rru_A0205	62	98	D
	Proteína flagelar (FliF)	642101	Rru_A0545	86	90	I
	Proteína hipotética	742958	Rru_A0625	50	100	D
	Transportador de Na^+	757532	Rru_A0635	42	100	S
	Fosfoenolpiruvato quinasa	1508413	Rru_A1280	47	100	S
	Acetato permeasa (ActP)	1638596	Rru_A1387	43	95	S
	Histidina quinasa	1698166	Rru_A1436	63	100	S
	Proteína de membrana (OmpA)	2142735	Rru_A1843	55	100	S
	Proteína hipotética	3267637	Rru_A2835	47	100	D
	Proteína hipotética	3332982	Rru_A2888	52	100	S
	Histidina quinasa	3785453	Rru_A3288	72	100	S
	Chaperona de secreción (SecB)	4150262	Rru_A3610	56	100	S
	Proteína de membrana	4270719	Rru_A3720	70	100	I
Comunes (V4-V5)	Regulador transcripcional Fis	744866	Rru_A0626	32	100	DML
	Proteína anti-extrusion (MatE)	826816	Rru_A0697	44	100	DML
	Unión a putrescina (PotF)	1207010	Rru_A1018	36	100	D
	Glutamato deshidrogenasa (GDH)	4207913	Rru_A3663	51	100	D
V4	RNA-polimerasa (RpoB)	3119027	Rru_A2695	37	81	S
V5	Proteína hipotética	742958	Rru_A0625	40	100	D

Tabla 25. Mutaciones puntuales encontradas en los genomas de las variantes adaptadas. Las mutaciones comunes detectadas en ambas variantes muestran coinciden tanto en la posición como en el tipo de polimorfismo. Abreviaturas: CB (cobertura); FV (frecuencia de variación); D (deleción); DML (desplazamiento del marco de lectura) y S (sustitución). Las deleciones y sustituciones por tripletes no generan un desplazamiento en el marco de lectura.

4.14 Análisis del proteoma en condiciones de crecimiento fotoheterotrófico

Se realizó un análisis comparativo del proteoma en condiciones de crecimiento fotoheterotróficas con el objetivo de estudiar las rutas metabólicas implicadas en la disminución de la fase de latencia y el aumento del rendimiento en la producción de PHA de las variantes de *R. rubrum* obtenidas tras el proceso de ALE para evaluar el efecto de las mutaciones indentificadas sobre la expresión génica y, por lo tanto, en la síntesis proteica.

El análisis de los extractos celulares obtenidos tras 48 horas de fermentación en *syngas* y acetato ha permitido identificar las proteínas reguladas en cada variante. Las dos variantes mostraron un total de 1996 proteínas identificadas, lo que supone un 52 % de las proteínas predichas en el genoma de *R. rubrum* S1 incluidas las 50 proteínas codificadas por los genes localizados en el plásmido. Se encontraron 86 y 25 proteínas reguladas en la variante V4 y V5, respectivamente (Figura 66A). Además, se identificaron proteínas coincidentes en ambas variantes: 6 con regulación positiva y 13 con regulación negativa (Figura 66B y Tabla 26).

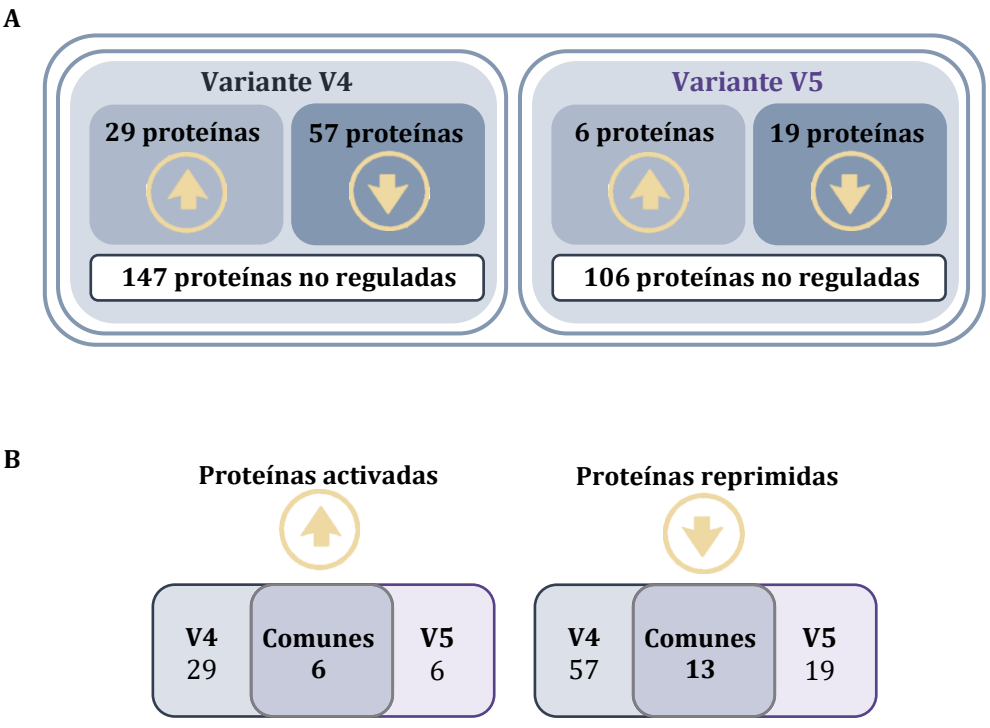


Figura 66. Esquema del número de proteínas detectadas durante el análisis del proteoma de las variantes V4 y V5. A) Resumen de las proteínas identificadas en cada variante. B) Contraste de las proteínas reguladas en cada variante.

Abreviatura	Etiqueta	Descripción	Δ_{V4}	Δ_{V5}	P
Activadas					
NifDK	Rru_A1193	Subunidad FeM de la nitrogenasa	3,3	3,2	1/1
-	Rru_A1698	Proteína secretora de cationes	2,6	2,7	2/2
UspA	Rru_A2612	Proteína universal de respuesta a estrés	1,4	1,5	8/8
-	Rru_B0037	Hemolisina de unión a calcio	0,7	0,7	6/7
Q	Rru_A1192	Coenzima Q-citocromo c reductasa	0,7	0,6	5/6
PepSY	Rru_A2912	Propéptido peptidasa M4	0,4	1,1	7/7
Reprimidas					
RpmD	Rru_A2670	Proteína L30 (Subunidad ribosomal 50S)	-1,2	-1	4/4
MadL	Rru_A1329	Transportador de malonato	-1	-0,8	2/2
YbeY	Rru_A3772	Endoribonucleasa	-0,9	-1	7/1
MadD	Rru_A1325	Malonato descarboxilasa (subunidad γ)	-0,8	-1	18/18
RmpE	Rru_A1072	Proteína L31 (Subunidad ribosomal 50S)	-0,8	-0,5	1/7
PccA	Rru_A1328	Proteína de unión a biotina	-0,7	-1,1	3/3
MadA	Rru_A1322	Malonato descarboxilasa (subunidad α)	-0,7	-0,9	36/36
MadM	Rru_A1330	Transportador simporte de malonato	-0,6	-0,5	4/4
MadB1	Rru_A1323	Malonato descarboxilasa (subunidad Δ)	-0,6	-0,7	11/11
MadB2	Rru_A1324	Malonato descarboxilasa (subunidad β)	-0,6	-0,9	21/21
MadB3	Rru_A1320	Malonato descarboxilasa	-0,6	-0,8	3/3
RuBisCO	Rru_A2400	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa	-0,5	-0,8	24/24
TbdT	Rru_A0488	Receptor de membrana TonB	-0,4	-0,5	24/24

Tabla 26. Proteínas comunes con regulación diferencial identificadas en las variantes V4 y V5. Se muestra la abreviatura, la etiqueta de posicionamiento en el genoma, función, ratio de expresión entre la cepa parental RR y las variantes (Δ_{V4} y Δ_{V5}), y el número de péptidos (P) con los que se ha inferido cada proteína en cada variante.

Como se muestra en la Tabla 26, dentro del conjunto de proteínas reguladas positivamente, destacan la subunidad FeM de la nitrogenasa (Nif) que actúa como el centro activo de la enzima responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico N_2 en amonio, dos proteínas implicadas en la secreción de cationes y la proteína PepSY, que actúa inhibiendo la lisis celular. Además, se identificaron la proteína UspA, que actúa como sensor regulando el metabolismo para adaptarse a la situación ambiental en la que se encuentran las células y la coenzima Q, tercer complejo de la cadena de transporte de electrones que interviene en la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Por otro lado, respecto a las proteínas con regulación negativa, se identificó el complejo malonato descarboxilasa dependiente de biotina (MadL, MadD, MadA, MadM, MadB1, MadB2 y MadB3) involucrado en la conversión de acetato y CO_2 a malonato, una proteína de unión a

biotina (PccA), un receptor TonB (TbdT), la RuBisCO y dos proteínas de la subunidad ribosomal 50S en ambas variantes.

Las diferencias observadas en el número de proteínas reguladas entre la variante V4 y V5 pueden estar asociadas a las pequeñas diferencias en la velocidad de asimilación del acetato y producción de PHA observadas durante la caracterización fenotípica y el momento del crecimiento en el que ha sido realizado en análisis del proteoma. Tras 48 horas de crecimiento, la variante V5 mostró un consumo de acetato, producción de PHA y acumulación de biomasa ligeramente menor que la variante V4 (ver Tabla 1 en el Anexo). Además, se confirmó que todas las proteínas detectadas en el proteoma de la variante V5 se encontraban presentes en el proteoma de la variante V4. Por este motivo, se utilizó el proteoma de la variante V4 para realizar un estudio metabólico más exhaustivo.

Durante el crecimiento en condiciones fotoheterotróficas, la producción de metabolitos intermediarios se obtiene mediante el ciclo del TCA. Sin embargo, como se ha comentado en la Introducción, la ausencia de la isocitrato liasa (Icl) en el genoma de *R. rubrum*, que cataliza la conversión de isocitrato en glioxilato y succinato, impide la producción de malato y oxalacetato de forma directa (Leroy et al., 2015). Estudios previos han propuesto dos rutas alternativas para asimilación de acetato: el ciclo del citramalato y la ruta del EM-CoA (De Meur et al., 2020; Leroy et al., 2015). Por lo tanto, el primer paso fue identificar las proteínas involucradas en las rutas metabólicas descritas previamente.

En el ciclo del citramalato, el acetato es asimilado mediante la condensación del acetil-CoA en piruvato por la acción de la citramalato sintasa (Rru_A0695) y actúa como un intermediario en la síntesis de aminoácidos. En esta ruta alternativa, el citramalato se convierte en 2-oxobutanoato por la acción del complejo 3-isopropilmalato/(*R*)-2-metilmalato deshidratasa codificado por los genes *leu*C (Rru_A1189), *leu*D (Rru_A1190) y *leu*B (Rru_A1191). A pesar de identificar la citramalato sintasa y la acetolactato sintasa (Rru_A468), el resto de proteínas involucradas no se encontraron diferencialmente reguladas en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, respecto a la ruta del EM-CoA, se encontró regulada positivamente la L-Malil-CoA/β-metilmalil-CoA liasa (Rru_A0217) que cataliza la formación de glioxilato a partir de metilmalonil-CoA, indicando que bajo nuestras condiciones de crecimiento (acetato y *syngas*) esta vía metabólica está involucrada en la asimilación de acetato. Como se ha comentado anteriormente, *R. rubrum* carece de una enzima isocitrato liasa funcional, por lo que la conversión de metilmalonil-CoA en glioxilato actúa como un mecanismo eficiente para la producción de oxoglutarato.

Relacionadas con el metabolismo central también se identificaron 3 proteínas de la β-oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa (Rru_A1308), la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Rru_A1309) y la acetil-CoA aciltransferasa (Rru_A1310) reguladas de forma positiva. Entre las proteínas reguladas negativamente, se identificaron una acetato-CoA transferasa (Rru_A1927), que cataliza la conversión de acetato en acetil-CoA, las dos primeras reacciones del TCA, mediadas por la citrato sintasa (Rru_A1600) y una aconitasa (Rru_A3511); la succinil-CoA sintasa (Rru_A1927), responsable de la conversión de succinil-CoA en succinato, la carboxibiotin descarboxilasa (Rru_A1320) que cataliza la producción de piruvato a partir de oxalacetato, y dos propionil-CoA carboxilasas (Rru_A0051 y Rru_A0052). Estos datos sugieren que, bajo estas condiciones de crecimiento, el TCA no actúa en la generación de precursores para el resto de rutas biosintéticas que conforman el metabolismo central en *R. rubrum*.

Como se ha comentado anteriormente, la coenzima Q o succinato deshidrogenasa (Rru_A1192) mostró una regulación positiva en ambas cepas. Esta enzima está involucrada en la generación de ATP en la fosforilación oxidativa y conecta el TCA con la cadena transportadora de electrones catalizando la conversión de succinato a fumarato mediante la generación de $FADH_2$. Adicionalmente y respecto al metabolismo relacionado con el *syngas*, se identificaron tanto el regulador transcripcional que activa el sistema de oxidación del CO (CooA; Rru_A1245) y la CO deshidrogenasa (Rru_A1824), implicada en la conversión de CO a CO_2 con regulación positiva. Asimismo, se observó activada la bacterioclorofila reductasa BchY (Rru_A2979), proteína incluida en la ruta de síntesis de las clorofilas, indicando que en estas condiciones la producción de pigmentos fotosintéticos se mantiene activa, y se identificó un transportador de membrana simporte (Rru_A0635) muy similar (con un 70 % de identidad) a una enzima acetato permeasa (ActP) de *E. coli* regulado positivamente en ambas cepas.

En cambio, al realizar un análisis de la ruta biosintética del P(3HB) no se encontró ninguna proteína relacionada con regulación diferencial. La PHA sintasa (Rru_A2413), las fasinas (Rru_A2817 y Rru_A3283), la acetil-CoA transferasa (Rru_A0274), la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Rru_A3079) y la PHA despolimerasa (Rru_A3356) mostraron niveles basales tanto en la variante V4 como en la cepa parental RR.

Por último, entre las proteínas con regulación negativa, se identificaron en la variante V4, 21 proteínas ribosomales de las subunidades 30S y 50S, un factor de iniciación de la traducción y 5 ligasas de tRNA involucradas en la formación de los enlaces que conectan los aminoácidos específicos con el triplete anticodón embebido en el tRNA, indicando un

posible inicio de la fase estacionaria de crecimiento donde se reduce la división celular y, por lo tanto, todos los procesos implicados en la síntesis de proteínas (Tabla 27).

Abreviatura	Localización	Descripción	Δ	Péptidos
Activadas				
-	Rru_A1306	Deshidrogenasa	0,4	13
-	Rru_A1308	Acil-CoA deshidrogenasa	0,6	23
-	Rru_A1309	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	0,5	29
-	Rru_A1310	Acetil-CoA aciltransferasa	0,4	6
-	Rru_A0217	L-Malil-CoA/β-metilmalil-CoA liasa	0,4	21
CooA	Rru_A1431	Regulador transcripcional del sistema de oxidación de CO (Familia Crp/Fnr)	0,9	10
BchY	Rru_A2979	Bacterioclorofila reductasa	0,3	10
Reprimidas				
-	Rru_A1927	Acetil-CoA hidrolasa	-0,4	28
-	Rru_A1600	Citrato sintasa	-0,6	20
-	Rru_A3511	Aconitasa	-0,4	43
-	Rru_A1927	Succinil-CoA sintasa	-0,4	28
-	Rru_A0052	Propionil-CoA carboxilasa	-0,3	30
-	Rru_A0051	Propionil-CoA carboxilasa	0,5	7
-	Rru_A1320	Carboxibiotin descarboxilasa	-0,6	3
ArgG	Rru_A3751	Argininosuccinato sintasa	-0,4	22
AlaS	Rru_A2818	Alanina tRNA ligasa	-0,4	31
ProS	Rru_A1576	Prolina tRNA ligasa	-0,4	13
ThrS	Rru_A3487	Treonina tRNA ligasa	-0,3	21
MetG	Rru_A1701	Metionina tRNA ligasa	-0,4	17
RpmI	Rru_A3521	Proteína L35 (50S)	-0,9	2
RpmE	Rru_A1072	Proteína L31 (50S)	-0,8	7
RpmG	Rru_A3205	Proteína L33 (50S)	-0,7	7
RplB	Rru_A2685	Proteína L2 (50S)	-0,6	17
RplD	Rru_A2687	Proteína L4 (50S)	-0,6	13
RplP	Rru_A2681	Proteína L16 (50S)	-0,6	6
RplN	Rru_A2678	Proteína L14 (50S)	-0,5	7
RplV	Rru_A2683	Proteína L22 (50S)	-0,5	9
RplC	Rru_A2688	Proteína L3 (50S)	-0,5	17
RplM	Rru_A2152	Proteína L13 (50S)	-0,4	8
RplS	Rru_A1188	Proteína L19 (50S)	-0,4	13
RpmB	Rru_A0210	Proteína L28 (50S)	-0,6	6
RpmA	Rru_A1241	Proteína L27 (50S)	-0,5	4

RplR	Rru_A2672	Proteína L18 (50S)	-0,4	10
RplF	Rru_A2673	Proteína L6 (50S)	-0,3	16
RpsK	Rru_A2665	Proteína S11 (30S)	-0,5	9
RpsD	Rru_A0701	Proteína S4 (30S)	-0,5	20
RpsU	Rru_A1043	Proteína S21 (30S)	-0,5	4
RpsG	Rru_A2692	Proteína S7 (30S)	-0,5	15
RpsJ	Rru_A2689	Proteína S10 (30S)	-0,5	5
RpsT	Rru_A3802	Proteína S20 (30S)	-0,4	5
RpsQ	Rru_A2679	Proteína S17 (30S)	-0,4	8
RpsB	Rru_A1586	Proteína S2 (30S)	-0,4	16
InfB	Rru_A3781	Factor de iniciación de la traducción IF-2	-0,4	45

Tabla 27. Anotación de las proteínas reguladas identificadas en la variante V4 durante el análisis del proteoma. Se muestra la abreviatura, localización en el genoma, función, ratio de expresión entre la cepa RR y la variante V4 (Δ) y el número de péptidos con los que se ha inferido cada proteína.

En la Figura 67 se muestra un esquema de las proteínas identificadas y las rutas metabólicas en las que se encuentran involucradas en *R. rubrum*.

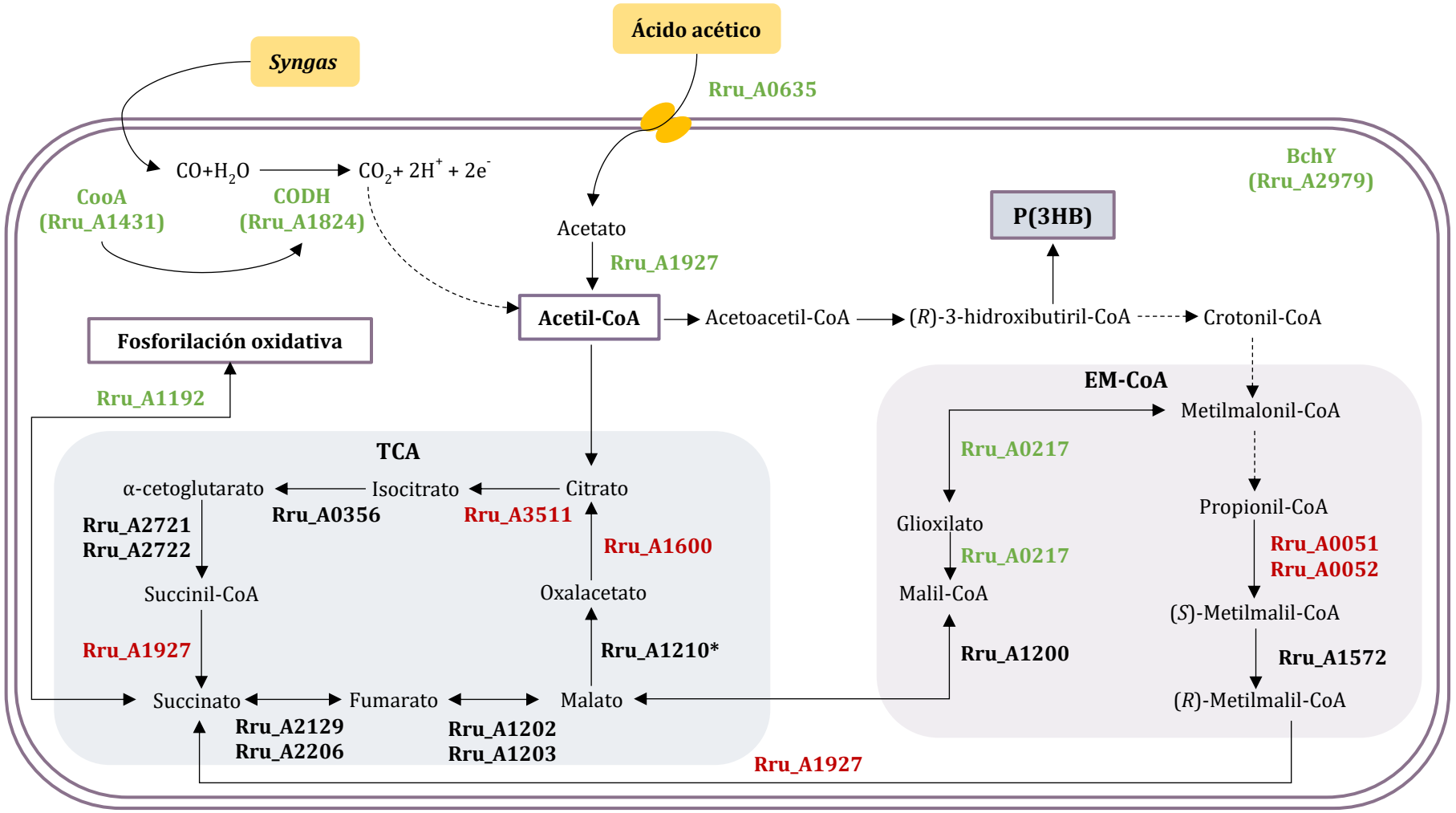


Figura 67. Representación esquemática de las rutas metabólicas reguladas basada en el análisis del proteoma de la variante V4. Los colores indican el rango de regulación (color verde: proteínas activadas; color rojo: proteínas reprimidas; color negro: sin regulación. Se marcan con (*) las proteínas no detectadas en el proteoma. Abreviaturas: P(3HB) (polihidroxibutirato), TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos) y EM-CoA (vía del etilmalonil-CoA).

Discusión

DISCUSION

A lo largo de su evolución y diversificación, la economía industrial ha mantenido un modelo lineal basado en el consumo de recursos, donde las industrias productoras utilizan la materia prima de partida, aplican la energía necesaria para fabricar un producto y lo venden a un consumidor que lo descarta cuando considera que ya no sirve para cumplir el propósito para el que fue creado. En nuestra sociedad, la calidad está asociada a la novedad, e incluso el uso a largo plazo de un producto nos parece poco atractivo. En la economía lineal, la utilización de recursos naturales es la base para la generación de nuevos productos, ya que no contempla estrategias de reutilización o reciclado. En este contexto, la economía circular surge como una alternativa al sistema de producción lineal con el objetivo de conseguir un crecimiento económico sostenible al modificar los sistemas de producción y su diseño para que los productos se obtengan a través de métodos limpios, y sean fáciles de reutilizar y reciclar (Ellen MacArthur Foundation, 2013; Stahel, 2016). Sin embargo, a pesar de que se conocen los problemas asociados al crecimiento lineal y de que se han firmado grandes acuerdos a favor del clima y el medio ambiente por parte de diferentes instituciones gubernamentales a nivel mundial, todavía no existen acuerdos globales basados en la aplicación estrategias de economía circular (Barreiro-Gen & Lozano, 2020; Geng et al., 2019).

Los procesos de producción biotecnológicos basados en economía circular buscan ahorrar materias primas, disminuir la generación de residuos, el gasto energético y la emisión de contaminantes. Basados en los ciclos naturales, como el del agua o de los nutrientes, donde los desechos de unos se convierten en recursos para otros, utilizar los residuos como materias primas al ingresar de nuevo en el sistema productivo tiene un beneficio doble. Por un lado, se disminuye su acumulación en vertederos y zonas no controladas, y por otro, se utilizan como materiales de partida evitando la extracción de nuevos recursos naturales. Durante los últimos años, los métodos de valorización de residuos basados en procesos biotecnológicos que implican el uso de enzimas y/o microorganismos han ganado relevancia, muy especialmente en el sector de los bioplásticos (Blanco et al., 2021).

Algunos procesos industriales generan residuos enriquecidos en un componente principal, como por ejemplo el glicerol en el caso de la fabricación del biodiesel (Rodrigues et al., 2017). El hecho de que sólo haya un componente mayoritario facilita su utilización en procesos biotecnológicos mediante la identificación del catalizador adecuado para la biotransformación del sustrato enriquecido. Sin embargo, la valorización de residuos

complejos ricos en materia orgánica de diferente composición requiere un pretratamiento que bien, facilite la disponibilidad de los componentes (e.g mediante sacarificación de polisacáridos como la celulosa), o los transforme en sustratos más sencillos y susceptibles de ser catabolizados por microorganismos (e.g. AD, pirolisis, etc.). Entre los principales grupos de residuos complejos que requieren un pretratamiento para ser utilizados como materia prima en un proceso biotecnológico para producir bioplásticos se pueden destacar los residuos de origen agro-alimentario, las aguas residuales derivadas de procesos industriales y el gas de síntesis o *syngas*, que se obtiene a través de la pirólisis o gasificación de los residuos sólidos orgánicos (Blanco et al., 2021; Nikodinovic-Runic et al., 2013).

Durante los últimos 20 años y debido a la necesidad de introducir los bioplásticos en el mercado a precios competitivos en comparación con los plásticos basados en combustibles fósiles, se ha producido un aumento en el número de estudios sobre producción de PHA a partir de materiales de desecho. Aunque la tendencia inicial era reducir los costes de operación al integrar la producción de PHA en otros procesos industriales, últimamente las líneas de investigación están orientadas a aumentar el rendimiento al implementar procesos continuos, aumentar el espectro de sustratos a utilizar, reducir el consumo de energía y optimizar los procesos de extracción y purificación de los polímeros después de su producción (Rodriguez-Perez et al., 2018). En este sentido, aunque la producción de bioplásticos a partir residuos se considera actualmente una estrategia viable a nivel industrial, tanto el tipo de residuo como el tipo de polímero que se quiera obtener son factores determinantes a tener cuenta para obtener un buen rendimiento durante el proceso de producción.

Durante esta Tesis Doctoral se ha optimizado la producción de poliésteres biológicos a partir de aguas residuales de origen industrial que, tras un pretratamiento y un proceso de AD para obtener un efluente rico en VFAs, se han utilizado como sustrato para la producción de P(3HB) en *C. necator* H16. Además, se ha conseguido producir P(3HB-*co*-LA) usando un efluente original rico en ácido láctico sin modificar las enzimas nativas de *C. necator* H16 y modular la composición del poliéster al modificar las condiciones del medio de producción. Asimismo, utilizando un residuo complejo como el *syngas* y mediante una estrategia de ALE, se ha conseguido aislar una variante de *R. rubrum* capaz de asimilar el *syngas* y el acetato de forma concomitante, logrando una producción de P(3HB) más rápida y eficiente.

5.1 *C. necator* H16, un catalizador robusto para la valorización de efluentes derivados de la AD de aguas residuales.

Tanto la composición del posible sustrato, como la concentración y la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento y/o partículas en suspensión, son características determinantes a la hora de seleccionar un residuo. En las plantas de tratamiento, la fracción orgánica de un residuo se estabiliza mediante un procedimiento de AD y/o compostaje, siendo la fermentación acidogénica el paso de la AD a través del cual los monómeros solubles se convierten, principalmente, en VFAs. El rendimiento de producción de los VFAs depende directamente de la composición y calidad de la materia prima, así como de las condiciones operativas durante la fermentación, incluida la temperatura, el pH, la concentración de nitrógeno amoniacal y la comunidad microbiana (Strazzera et al., 2018). El impacto de cada uno de los factores y su interacción con el rendimiento, y la concentración de cada ácido en la mezcla resultante son líneas de investigación que están actualmente en curso. Sin embargo, la temperatura y el pH son los dos parámetros clave durante la fermentación acidogénica debido a que su influencia en el metabolismo microbiano se relaciona directamente con el rendimiento de conversión y la composición de la mezcla de VFAs resultante. Valores de pH neutros (6-7) dan lugar a mezclas ricas en ácido acético y butírico, mientras que cuando el pH alcanza valores básicos (>8) predomina el ácido propiónico (Sukphun et al., 2021). Por otro lado, las temperaturas entre 35-45 °C aumentan la proporción de VFAs más largos como el ácido valérico y el ácido caproico, mientras que los modos de operación basados en condiciones termofílicas (<55 °C) dan lugar a mezclas ricas en ácido acético y ácido butírico (Fernández-Domínguez et al., 2020). Todos estos parámetros se relacionan directamente con la población utilizada durante las condiciones de operación.

Como primer paso en la optimización de un bioproceso para la producción de PHA basado en la utilización de VFAs procedentes de aguas residuales de origen industrial, se llevó a cabo la caracterización cualitativa y cuantitativa de los cuatro efluentes residuales disponibles (S1-S4). Se detectaron ácido acético y ácido butírico como compuestos comunes a los cuatro sustratos, y ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiónico y etanol como elementos complementarios presentes en diferentes concentraciones. Los sustratos S1, S3 y S4 mostraron una concentración total de carbono inferior a 20 $g \cdot L^{-1}$ mientras que el sustrato S2 alcanzó los 58 $g \cdot L^{-1}$, destacando notablemente el ácido láctico respecto al resto de componentes de la muestra (Tabla 6, Capítulo 1).

Durante los últimos años el número de publicaciones relacionadas con la producción de PHA mediante CMM, que conlleva la utilización de la comunidad microbiana natural del efluente, ha seguido una tendencia ascendente debido, principalmente, a la reducción en los costes de operación derivados de la tolerancia a las fluctuaciones entre lotes y de no requerir ambientes estériles durante el proceso (Oliveira et al., 2017; Serafim et al., 2008). Sin embargo, la selección de las cepas productoras de PHA dentro de una población compleja y el tiempo necesario hasta conseguir la maduración del inóculo, son dos factores negativos que siguen inclinando la balanza hacia la producción de PHA con cultivos puros (Szacherska et al., 2021). A partir de los resultados de la caracterización de los sustratos y de los datos obtenidos tras realizar una búsqueda bibliográfica, la cepa *C. necator* H16 fue seleccionada como biocatalizador para la producción de biopolímeros utilizando los sustratos S1-S4. Según la literatura, este microorganismo tiene una capacidad de acumulación de *scl*-PHA de hasta un 90 % sobre su peso seco y, además, es capaz de asimilar de forma eficiente los VFAs presentes en los sustratos que actúan como precursores directos en la síntesis de PHA (Chemoautotroph Cupriavidus Necator as a Potential Game-Changer for Global Warming and Plastic Waste Problem: A Review, 2021).

Los ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético, butírico o propiónico, son activados tras su trasporte al interior celular por las acil-CoA sintasas. Posteriormente pueden catabolizarse mediante el metabolismo central o actuar como precursores de PHA (Yu & Si, 2004). Mientras que el ácido acético y el ácido butírico son precursores directos del P(3HB) al convertirse en (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA, la presencia de ácido propiónico y/o valérico en el medio de cultivo genera propionil-CoA y (*R*)-3-hidroxivaleril-CoA, dando lugar a la producción del copolímero P(3HB-*co*-3HV) (Figura 12, Introducción) (Riedel et al., 2014; Yu et al., 2002). No obstante, a concentraciones no muy elevadas, estos compuestos pueden ser tóxicos inhibiendo el crecimiento (Yang et al., 2010). En este sentido, los límites de tolerancia de *C. necator* H16 a los VFAs han resultado ser dependientes de la longitud de cadena del VFA utilizado (Figuras 22 y 23, Capítulo 1), aumentando proporcionalmente al número de carbonos y a la concentración total del ácido. *C. necator* H16 fue capaz de metabolizar todo el ácido añadido durante las primeras 24 horas de crecimiento a una concentración de VFA comercial de 3 $g \cdot L^{-1}$. Al relacionar estos datos con la producción de PHA, se llegó a la conclusión de que, en medio NB suplementado con VFAs comerciales, los valores óptimos de acumulación se observaron al añadir 3 $g \cdot L^{-1}$ de ácido propiónico, butírico y valérico, y 8 $g \cdot L^{-1}$ de ácido acético. De acuerdo con los datos reportados previamente en la literatura, la producción de P(3HB) en *C. necator* se favorece en presencia de concentraciones moderadas (inferiores a 5 $g \cdot L^{-1}$) de ácido butírico y/o

propiónico, mientras que el ácido acético aumenta la biomasa, entrando directamente en el metabolismo central a través del acetil-CoA (Lee et al., 2009; Yun et al., 2013).

A pesar de que durante los estudios preliminares se identificó 8 $g \cdot L^{-1}$ como una concentración inhibitoria, los sustratos S3 y S4 estaban compuestos mayoritariamente por ácido acético. Por este motivo, la tolerancia de *C. necator* H16 a estas mezclas aumentó hasta 12 $g \cdot L^{-1}$, aunque las tasas de conversión en PHA más altas (de 12, 15 y 20 %, con los sustratos S1, S2 y S3 respectivamente) se obtuvieron con una concentración de VFAs de 6 $g \cdot L^{-1}$. Estos resultados demuestran que la tolerancia a los VFAs en esta bacteria es superior en mezclas complejas. Además de la concentración del sustrato en el efluente, un punto muy relevante por su impacto en el coste del proceso, cuando se utilizan cultivos puros, es la esterilización y el acondicionamiento previo a la fermentación. Por este motivo, se seleccionó el sustrato S2 para la optimización del bioproceso a escala de 2L, ya que este efluente sólo requería un paso de filtración previo al cultivo, mientras que los S1, S3 y S4 requerían varios pasos y mostraban precipitados nuevamente tras un periodo de almacenamiento. Es importante mencionar que la composición del S2, donde destaca el ácido láctico como componente mayoritario, no se ha utilizado en la literatura como un sustrato común para la producción de PHA en *C. necator* H16, por lo que la composición del polímero resultante no era predecible.

Como el modo de operación determina en gran medida el rendimiento final del bioproceso, se llevó a cabo un estudio de la producción de PHA en *C. necator* H16 utilizando el sustrato S2 en diferentes estrategias. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos en matraz, se diluyó el residuo S2 con el medio mineral SM a una concentración final de 6 $g \cdot L^{-1}$. Durante una primera fase, se monitorizó el crecimiento a través de la densidad óptica, el número de células viables ($CFU \cdot mL^{-1}$), el consumo de oxígeno (pO_2) y la evolución del pH en un sistema cerrado (D). A pesar de que se observó una fase de latencia corta, correspondiente a la adaptación de las células, a partir de las 8 horas de fermentación la biomasa aumentó exponencialmente hasta las 24 horas, momento a partir del cual el crecimiento se detuvo por el agotamiento de los nutrientes, provocando un aumento en la pO_2 (Figura 27, Capítulo 1). Se observó un aumento constante del pH desde el inicio de la fermentación, llegando a valores básicos cercanos a 9,5. Esta observación ha sido descrita previamente por otros autores, donde el consumo de ácidos grasos en *C. necator* aumenta el pH del medio de cultivo sin dar lugar a ningún subproducto detectable por HPLC (Wang & Yu, 2001; Yang et al., 2010). Además, al analizar el caldo de cultivo y cuantificar la concentración de cada una de las fuentes de carbono que componían el residuo, se detectó un consumo preferente del ácido láctico con respecto al ácido acético y

al ácido butírico. Como se ha comentado anteriormente, a pesar de que el ácido láctico no es un sustrato común en la literatura para producir PHA en *C. necator*, son varios los estudios que reportan una asimilación rápida y completa de este fuente de carbono en comparación con otros VFAs como el ácido acético, propiónico o butírico (Panchali Chakraborty et al., 2012; Huschner et al., 2015; Tsuge et al., 2001).

Con el objetivo de alargar la fase exponencial de crecimiento sin aumentar la fase de latencia ni alcanzar concentraciones inhibitorias, se diseñaron varias estrategias de alimentación por lotes (FAP, FAC, FAB y FAVC) en las que el control de pH fue determinante para evitar la formación de precipitados en el medio de cultivo. En primer lugar, se aplicó una alimentación por pulsos (FAP) durante la fase exponencial de crecimiento. La producción de PHA aumentó a partir de las 16 horas, coincidiendo con un cambio en el balance C/N debido a la alta concentración de carbono aportada por el sustrato y el agotamiento del amonio aportado por el medio mineral SM (Figura 28, Capítulo 1). Posteriormente, aplicando una alimentación con caudal constante (FAC) se observó la acumulación de las fuentes de carbono que componían el residuo, indicando que la velocidad de adición era superior a la de asimilación. Por este motivo, se diseñó una alimentación acotada a la velocidad de asimilación de carbono (FAB), es decir, en paralelo a la producción de biomasa. A pesar de que, desde el inicio de la alimentación, la acumulación de polímero fue creciente, la ausencia de nitrógeno a partir de las 10 horas condicionó la división celular y, por lo tanto, la generación de biomasa (Figura 30, Capítulo 1). Por último, teniendo como base los datos obtenidos en las estrategias anteriores, y con el objetivo de mantener constantes las velocidades máximas de producción de biomasa y PHA, se planteó una estrategia de alimentación exponencial con un volumen de trabajo constante (FAVC). Además, se aumentó la cantidad inicial de amonio para provocar la generación de dos situaciones metabólicas diferentes: una primera etapa de acumulación de biomasa, seguida de una segunda etapa de acumulación de PHA. Tras 32 horas de fermentación se consiguió una producción de 16 $g \cdot L^{-1}$ y una productividad de 6 $g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$ (Figura 33, Capítulo 1).

En la Tabla 28 se muestra un resumen de los datos obtenidos con cada modo de operación.

Tipo de estrategia	Modo de operación	Adición del sustrato S2	PHA ($g \cdot L^{-1}$)	Productividad ($g \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$)
D	D	-	0,3	0,3
FAP	SC	3 pulsos cada 2 horas	3	3
FAC	SC	Caudal constante (10 horas)	2,8	2,6
FAB	SC	Caudal exponencial (8-32 horas)	3,5	2,5
FAVC	SC	Caudal exponencial (8-32 horas)	16	6

Tabla 28. Producción de PHA en *C. necator* H16 en función del modo de operación establecido utilizando el sustrato S2. Abreviaturas: D (Fermentación discontinua); FAP (Fermentación alimentada por pulsos); FAC (Fermentación alimentada con caudal constante); FAB (Fermentación con alimentación acoplada a la producción de biomasa); FAVC (Fermentación con alimentación acoplada a la producción de biomasa a volumen de trabajo constante) y SC (Semi-continua).

El desarrollo secuencial de los diferentes modos de operación ha permitido calcular la velocidad de asimilación de una mezcla compleja, así como identificar los factores clave para aumentar la producción de PHA, dando lugar a una estrategia de adición del sustrato acoplada a la producción de biomasa, que aumenta el rendimiento del proceso, donde se mantiene constante la velocidad máxima de producción de biomasa y PHA durante 10 horas. Además, teniendo en cuenta la composición del sustrato S2, donde el ácido láctico supone un 72 % sobre el total de los ácidos orgánicos que componen el residuo, la ausencia de nitrógeno, fosforo, potasio o magnesio, que se compensa al utilizar el medio mineral SM para diluir el sustrato a concentraciones no inhibitorias, y los datos reportados con hasta la fecha en *C. necator* H16 a escala de biorreactor (Tabla 29), los resultados obtenidos son el punto de partida para el establecimiento de una fermentación continua que permita maximizar aún más este bioproceso.

Tal y como se ha observado durante el desarrollo del bioproceso, las estrategias de fermentación semi-discontinua con alimentación, reportadas en la literatura (Tabla 29), permiten aumentar el rendimiento de producción de PHA en *C. necator*, siendo el aceite de colza y propanol y una mezcla de ácidos orgánicos, los tipos de materia prima que a partir de los cuales la producción de PHA aumenta considerablemente.

Materia prima utilizada	Modo de operación	Polímero	PHA ($g \cdot L^{-1}$)	Productividad ($g \cdot L^{-1}$ $día^{-1}$)	Referencia bibliográfica
Aceite de colza y propanol	FP	P(3HB-*co*-3HV)	105	1,46	(Obruca et al., 2010)
Aceite de posos de café	FP	P(3HB)	50	1,33	(Obruca, Petrik, et al., 2014)
Aceite de jatrofa	D	P(3HB)	16	0,26	(Mohidin Batcha et al., 2014)
Aceite de colza	D	P(3HB)	28	0,96	(Obruca, Benesova, et al., 2014)
Aceite de canola y fructosa	FP	P(3HB-*co*-3HV)	44	0,47	(Rathinasabapathy et al., 2014)
Ácidos orgánicos	FP	P(3HB-*co*-3HV)	94	2,13	(Huschner et al., 2015)
Grasas animales (sebo)	D	P(3HB)	24	0,3	(Brigham & Riedel, 2019)
Aceite de semilla y propionato	FP	P(3HB-*co*-3HV)	6,8	0,094	(Bhubalan et al., 2008)
Restos alimenticios	FC	P(3HB)	1,2	0,028	(Hafuka et al., 2011)
Aceite de fritura	D	P(3HB)	10	-	(Benesova et al., 2017)
Fructosa y aguacate	FP	P(3HB)	4	0,007	(Flores-Sánchez et al., 2017)
Restos de pasto	FP	P(3HB)	8,6	6,48	(Schwarz et al., 2018)
Vino de arroz	FP	P(3HB)	24,1	7,92	(Gang et al., 2019)
Restos de licor	FP	P(3HB)	4,5	1,92	(M. Li & Wilkins, 2020)
Suero de leche	FP	P(3HB-*co*-3HV)	10,6	4,8	(Domingos et al., 2018)

Tabla 29. Principales resultados obtenidos durante la producción de PHA a escala industrial usando *C. necator* H16. Abreviaturas: FP (Fermentación semi-continua (*fedbatch*)); D (Fermentación discontinua (*batch*)) y FC (Fermentación continua).

Para estudiar las posibles aplicaciones de los polímeros obtenidos con los diferentes sustratos utilizados, se llevó a cabo una caracterización de sus propiedades mediante técnicas químicas como GPC y DSC.

A través de GPC es posible obtener la distribución de los pesos moleculares. Así, M_w representa la distribución estadística de los pesos de las diferentes moléculas que forman la estructura. Este parámetro es uno de los factores más importantes, ya que da información acerca de la longitud de las cadenas y del grado de polimerización, el cual influye en las propiedades mecánicas y de degradación. Generalmente, la biodegradación en polímeros con pesos moleculares bajos suele ser más rápida que en polímeros de alto peso molecular. Además, hay que tener en cuenta que algunas moléculas, las que tienen mayor peso, contribuyen en mayor extensión al peso de la estructura. Por otro lado, el M_n nos da idea el número de moléculas que tienen un determinado peso molecular, contribuyendo todas las moléculas por igual al peso (Rivera-Briso & Serrano-Aroca, 2018).

El M_w del PHA abarca un amplio rango debido a su variedad estructural, que da como resultado pesos moleculares muy variables, desde 50 a 2000 kDa, con valores de PDI entre 1 y 6 dependiendo del valor del M_n (Tan et al., 2014). Estos parámetros se ven influidos por el tipo de microorganismo, el modo de operación y el protocolo de extracción usado, tal y como se puede observar en la Tabla 30. Al igual que en los datos reportados, si analizamos los resultados de la obtenidos en los polímeros producidos (Tabla 11, Capítulo 1), observamos una gran variabilidad en el peso molecular y la polidispersidad de los polímeros. Esto se debe al modo de crecimiento, ya que se ha utilizado mezclas de VFAs como fuente de carbono y el mismo método de extracción en todas las estrategias analizadas. Los pesos moleculares de los polímeros obtenidos en matraz a partir de los sustratos S1 y S4, son superiores a los descritos en literatura para copoliésteres de P(3HB-*co*-3HV) producidos por *C. necator* H16 (M_w, 254000 – 395000 Da) (Doi et al., 1990), pero se encuentran dentro del amplio rango de M_w descrito para la familia de PHAs. Además, los valores de PDI se encuentran en torno a 2, dentro de lo habitual para estos polímeros. Respecto a los polímeros obtenidos en biorreactor con el sustrato S2 (FAVC) y S3 (D), se encuentran, también, dentro del rango descrito para el PHA. En cambio, al cambiar el modo de operación con el sustrato S2 a FAC, se obtiene un polímero con una alta PDI, indicando que existen fracciones con diferentes longitudes o pesos en la estructura y pudiendo estar directamente relacionado con la concentración intracelular de PhaC que determina el modo de operación elegido (Tsuge, 2016; Zher-Neoh et al., 2022).

Sustrato	Polímero	Microorganismo	M_n (Da)	M_w (Da)	PDI	Referencia
Residuos agroindustriales	P(3HB)	*Alcaligenes* sp.	123000	282000	2,29	(Tripathi et al., 2019)
	P(3HB)	*Alcaligenes latus*	313000	528000	1,69	(Yezza et al., 2007)
	P(3HB)	*P. cepacia*	137000	537000	3,90	(Aremu et al., 2010)
	P(3HB)	*Bacillus thuringenesisR 1*	58500	104000	1,.77	(Rohini et al., 2006)
	P(3HB	*Bacillus megaterium ATCC 674*)	91000	177000	1,47	(Chaijamrus & Udpuay, 2008)
Glucosa y ácido levulínico	P(3HB)	*Wautersia eutropha*	187000	-	2,4	(G. G. Choi et al., 2004)
	P(3HB-*co*-17%HV)	*Alcaligenes* sp. MT-16	145000	-	3,5	"
	P(3HB-*co*-23%HV)	*Alcaligenes* sp. MT-16	148000	-	3,5	"
	P(3HB-*co*-36%HV)	*Alcaligenes* sp. MT-16	249000	-	2,5	"
	P(3HB-*co*-60%HV)	*Alcaligenes* sp. MT-16	198000	-	2,6	"
CO_2	P(3HB)	*C.necator* DSM 545	308000	625000	2,03	(Garcia-Gonzalez et al., 2015)
CO_2 y glicerol	P(3HB)	*C.necator* DSM 545	549000	749000	1,36	"
Glicerol	P(3HB)	*C.necator* DSM 545	624000	992000	1,59	"
CO_2 y glucosa	P(3HB)	*C.necator* DSM 545	744000	1222000	1,64	"
Glucosa	P(3HB)	*C.necator* DSM 545	1235000	1457000	1,18	"

Tabla 30. Comparación del peso molecular de PHA producido por microorganismos productores en biorreactor. Abreviaturas: M_n (peso molecular medio en número); M_w (peso molecular medio en peso) y PDI (índice de polidispersidad).

Por otro lado, mediante DSC se analizan las diferencias entre la cantidad de calor absorbido o desprendido entre una substancia y una referencia en función de la temperatura, cuando ambas son sometidas a un calentamiento a velocidad constante. Mediante esta técnica, se pueden determinar las transiciones térmicas de un polímero como la T_g, la T_c y la T_m. Al observar los datos de la bibliografía, vemos con los valores de T_m, T_g y T_c son muy variables, oscilando desde 60 °C – 77 °C, -50 °C – 4 °C y 227 °C -256 °C, respectivamente (Tabla 31).

Polímero	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)
P(3HB-*co*-5%HV)	3,3 ± 0,8	61,5 ± 1,4	171,9 ± 1,4
P(3HB-*co*-10%HV)	2,7 ± 0,5	49,1 ± 1,7	171,3 ± 1,7
P(3HB-*co*-20%HV)	1,8 ± 0,6	73,4 ± 1,1	171,1 ± 1,1
P(3HB)	3,5	54,3	165,4
P(3HB)	6	-	180
P(3HB)	-8	90	176
P(3HB-*co*-3HV)	8	123	165

Tabla 31. Propiedades térmicas de los polímeros producidos en biorreactores por *C. necator* (Nygaard et al., 2021)**.** Abreviaturas: T_g (temperatura de transición vítrea); T_c (temperatura de degradación térmica) y T_m (temperatura de fusión).

Al comparar las propiedades térmicas de los polímeros producidos en el Capítulo 1 (Tabla 12), observamos que todos los valores se encuentran dentro de los rangos publicados para PHA. El valor de la T_g está determinado principalmente por la flexibilidad de la cadena polimérica y, por lo tanto, por la estructura química. Tanto el P(3HB) como P(3HB-*co*-3HV) están compuestos por enlaces C-C y C-O, que aportan flexibilidad disminuyendo los valores de T_g conforme aumenta la proporción de HV en el polímero. Respecto a la T_m, podemos concluir, que los valores más altos se obtienen para el P(3HB), y que disminuye al mismo tiempo que se incrementa la proporción de HV en el polímero. Uno de los problemas del P(3HB) es que su elevada T_m es muy cercana a la de degradación, lo que impide realizar un procesamiento sin que se pierdan sus propiedades. Sin embargo, al incorporar HV en su estructura, esta temperatura disminuye permitiendo un procesamiento menos agresivo. En cuanto a la T_c, aumenta si el polímero contiene HV en su estructura, disminuyendo su valor conforme esta contribución desaparece.

5.2 Valorización de efluentes enriquecidos en ácido láctico para la síntesis de copoliésteres de PLA

El PLA es uno de los bioplásticos más producidos a nivel mundial, después de las mezclas de almidón, representando hasta un 14 % de la producción total. Como se ha comentado en la Introducción, el material de partida utilizado para su síntesis química es el LA, a partir del cual se generan monómeros de lactida con alta pureza que se condensan mediante un proceso conocido como ROP, dando lugar al poliéster. Su alta disponibilidad y maleabilidad lo han convertido en el bioplástico compostable más barato del mercado, con gran potencial para sustituir a los plásticos convencionales de origen petroquímico, tales como PE, PP, PS y PET (Naser et al., 2021). A pesar de que el LA se produce generalmente mediante la fermentación bacteriana de carbohidratos por especies del género *Lactobacillus*, la producción a nivel industrial del polímero es totalmente química. Sin embargo, el gran mercado del PLA y los avances en biotecnología han promovido un aumento en la investigación para desarrollar nuevos procesos de base biológica que permitan sintetizar directamente PLA (Choi et al., 2020).

Hasta el desarrollo de esta Tesis doctoral, la capacidad de un microorganismo para producir copoliésteres de LA se había demostrado solo en cepas recombinantes de *E. coli* y *C. necator* (Guo et al., 2021). La incorporación de LA en un PHA depende de dos factores: (I) la síntesis intracelular del LA-CoA como sustrato y (II) la producción de PhaCs aceptoras de LA-CoA capaces de incorporarlo en el polímero (Choi et al., 2020). La síntesis de LA-CoA requiere, esencialmente, la transferencia de un grupo CoA desde un donador, que generalmente es el acetil-CoA. Algunos microorganismos como *C. propionicum*, *M. elsdenii*, *Bacteroides rumicola* o *C. homopropionicum* pueden convertir LA en LA-CoA usando una enzima con actividad Pct, siendo las Pcts de *C. propionicum* y *M. elsdenii* las más utilizadas en la literatura (Park et al., 2012; Taguchi et al., 2008; Yang et al., 2010). No obstante, como las PHA sintasas pueden determinar las características generales del PHA producido, incluyendo el tipo de monómero, el peso molecular y la polidispersidad, la mayoría de las estrategias de ingeniería genética abordadas están relacionadas con el diseño de PhaCs modificadas mediante ingeniería de proteínas para ampliar el rango de sustrato y mejorar la utilización del LA-CoA. El nombre con el que se denomina a estas enzimas es LPEs (de *lactate polimerizing enzyme*). En concreto, se han realizado mutaciones en los residuos 392, 420 y 477 de la PhaC de *Pseudomonas* sp. 61-3, modificando la especificidad de sustrato a monómeros más pequeños que una unidad de 3-HB-CoA y potenciando su actividad (Matsumoto et al., 2006; Yamada et al., 2010). Respecto a la PhaC nativa de *C. necator*

($PhaC_{CN}$), solo se ha reportado la incorporación de LA *in vitro* al mutar los residuos 348 y 510, lo que facilitó el reconocimiento del LA-CoA (Ochi et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado la incorporación de monómeros LA al polímero en la cepa salvaje *C. necator* H16. Durante la optimización de la producción de PHA usando como materia prima el efluente S2 rico en ácido láctico (Capítulo 1), se observó un consumo preferencial de esta fuente de carbono respecto a otros VFAs componentes del sustrato como el ácido acético o el ácido butírico. Con el objetivo de reducir la manipulación del residuo y usando directamente el sustrato sin diluir, se diseñó una estrategia basada en el aporte de elementos indispensables para el desarrollo bacteriano no detectados durante su caracterización como el nitrógeno. En primer lugar, se observó un crecimiento diaúxico (Figura 38) como consecuencia de la represión catabólica que se suele producir en medios complejos cuando las fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo tienen diferentes tasas de asimilación, usando con preferencia unas respecto a otras. En segundo lugar, al analizar la biomasa de los cultivos por GC-MS, se detectó una señal inesperada en el minuto 2.3, cuyo espectro de masas era correspondiente al ácido 2-hidroxi-propanoico según la base de datos NIST. Tras comprobar la incorporación de LA en el copolímero por espectroscopia RMN (ver Material suplementario del Capítulo 2 en Anexos), se realizó un estudio más exhaustivo de las condiciones de producción. Se comprobó cómo la cantidad de nitrógeno presente en el medio de cultivo afectaba negativamente a la proporción de monómeros LA en el polímero, así como que, al aumentar la concentración de ácido láctico, *C. necator* H16 era capaz de producir un copolímero con un 95 % de LA tras 96 horas de incubación en un sistema de células quiescentes (Figura 42, Capítulo 2). Estos resultados no han sido reportados previamente la literatura, ya que ni el ácido láctico es un precursor utilizado de forma habitual para la producción de PHA ni las concentraciones detectadas en el sustrato habían sido testadas en *C. necator* H16.

Para reducir los posibles efectos derivados de la composición compleja del residuo y comprobar que la acumulación de P(3HB-*co*-LA) estaba directamente relacionada con la presencia del ácido láctico, se diseñó un sistema de células quiescentes en el medio de producción SN (sin nitrógeno) al que se adicionaron lactato, ácido acético y ácido butírico como precursores principales. Además, se testó el efecto del tamaño del inóculo en la producción de P(3HB-*co*-LA). No se observaron efectos derivados de la presencia o ausencia de ácido acético y/o butírico. Sin embargo, de forma sorprendente, la fracción de LA incorporada al polímero disminuyó drásticamente en los cultivos inoculados con mayor densidad celular (Figura 44, Capítulo 2). Como la composición del polímero determina sus características térmicas y mecánicas y, por lo tanto, delimita sus posibles aplicaciones, se

intentó modular la composición del polímero a través de la concentración de lactato en el medio de producción. La acumulación intracelular de polímero se mantuvo constante en torno al 40 % (p/p), independientemente de la concentración de lactato utilizada. En cambio, se comprobó que la concentración de lactato determinaba la tasa de incorporación de monómeros LA al polímero producido, ya que un aumento en la concentración de lactato de 5 $g \cdot L^{-1}$ supone un aumento del 20 % en la fracción LA del polímero final (Figura 45B, Capítulo 2). Por último, con el objetivo de aumentar la biomasa y así obtener mayor cantidad de polímero, se analizó el efecto de la presencia de nitrógeno (0,1 $g \cdot L^{-1}$ de amonio) sobre la acumulación de P(3HB-*co*-LA). Tras analizar la composición del polímero aislado en estas condiciones de producción no se detectó incorporación de monómeros LA (Figura 46).

Estos resultados no solo suponen una aproximación a la producción biológica de PLA a partir de la revalorización de residuos o medios sintéticos ricos en precursores de bajo coste como el LA, sino que, el copolímero P(3HB-*co*-LA) mejora las propiedades que ambos polímeros tienen de forma individual. Como se muestra en la Tabla 32, la presencia de monómeros LA en el polímero disminuye la T_g, aumentado la flexibilidad, y reduce la T_m, pudiendo aplicar estrategias de procesamiento menos agresivas que no afecten las propiedades finales del material.

Polímero	T_g (°C)	T_m (°C)	Referencia
P(3HB)	0	140-180	(Jamshidian et al., 2010)
P(3HB-*co*-3HV)	0-30	100- 190	(Jamshidian et al., 2010)
PLA	40-70	130-180	(Clarinval and Halleux, 2005)
P(3HB-*co*-30%LA) *	−8-25	141-158	(Yamada et al., 2010)

Tabla 32. Comparación de las propiedades térmicas de diferentes polímeros biodegradables. * Polímero sintetizado biológicamente por una cepa recombinante de *E. coli* a partir de glucosa. Abreviaturas: T_g (temperatura de transición vítrea) y T_m (temperatura de fusión).

Como se ha mencionado anteriormente, a través de diferentes estrategias de ingeniería metabólica, se ha conseguido producir P(3HB-*co*-LA) mediante la expresión heteróloga de algunos genes identificados como responsables del proceso de producción, utilizando *E. coli* como hospedador en la mayoría de los estudios (Tabla 33). Por ejemplo, al expresar en *E. coli* la Pct optimizada de *C. propionicum* ($Pct540_{Cp}$) y PhaC modificada de diferentes cepas de *Pseudomonas*, se consigue acumular un 62 % de polímero intracelular con una composición en LA entre el 30 y el 60 % usando glucosa como sustrato (Yang et al., 2011). Por otro lado, al mantener la $Pct540_{Cp}$ y expresar los genes *pha*AB de *C. necator* H16 y la

sintasa optimizada de *Pseudomonas* sp. (PhaC1310), se consiguió producir hasta 43 % de P(3HB-*co*-40%LA) al alimentar un biorreactor con glucosa (Jung & Lee, 2011). Sin embargo, cuando *C. necator* se utilizó como hospedador para expresar la $Pct540_{Cp}$ y la versión PhaC1437 de sintasa optimizada de *Pseudomonas* sp., los rendimientos obtenidos disminuyeron. Al incubar las células en un medio sin nitrógeno y a base de glucosa, se consiguió producir P(3HB-*co*-6%LA) y P(3HB-*co*-34%LA) usando 2HB o lactato como co-sustratos, respectivamente (Park et al., 2013).

En consonancia con los rendimientos de producción reportados en la literatura para *C. necator*, en este estudio se ha conseguido producir P(3HB-*co*-60%LA) a partir de aguas residuales de origen industrial ricas en ácido láctico y P(3HB-*co*-30%LA) en un medio de producción mineral utilizando lactato como único precursor en la estirpe salvaje *C. necator* H16 (Tabla 33).

Microorganismo	**LA (mol %)**	**PHA (% p/p)**	**PHA ($g \cdot L^{-1}$)**	**Sustrato**
***E. coli* (R)**	49	62	-	20 $g \cdot L^{-1}$ glucosa + 2 $g \cdot L^{-1}$ 3HB
***E. coli* (R)**	8	50	-	20 $g \cdot L^{-1}$ glucosa + 2 $g \cdot L^{-1}$ lactato
***E. coli* (R)**	40	43	8	20 $g \cdot L^{-1}$ glucosa
***C. necator* (R)**	6	65	0,57	20 $g \cdot L^{-1}$ glucosa + 4 $g \cdot L^{-1}$ 2HB
***C. necator* (R)**	34	50	0,26	20 $g \cdot L^{-1}$ glucosa + 5 $g \cdot L^{-1}$ lactato
***C. necator* (R)**	22	20	0,37	20 $g \cdot L^{-1}$ sacarosa
C. necator* H16	60	42	0,35	44 $g \cdot L^{-1}$ VFAs ($S2_B$)
C. necator* H16	30	60	0,30	20 $g \cdot L^{-1}$ lactato

Tabla 33. Producción de P(3HB-*co*-LA) a partir de cepas recombinantes (R) y *C. necator* H16 (esta Tesis). Se indican con (*) los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Abreviaturas: 3HB (3-hidroxibutirato); 2HB (2-hidroxibutirato); LA (ácido láctico).

A pesar de que los rendimientos de producción no son, por ahora, escalables a nivel industrial, suponen un punto de partida para conocer los mecanismos naturales implicados en la síntesis del poliéster P(3HB-*co*-LA) previamente no reportados. Con el objetivo de dilucidar dichos mecanismos se realizó un análisis del proteoma en condiciones de producción del copolímero. El análisis de los extractos celulares permitió identificar un total de 2111 proteínas, entre las cuales se encontraron reguladas diferencialmente 762 proteínas. Mediante la anotación funcional de las secuencias y la asignación automática de códigos GO, se realizó un estudio global del proteoma. Tras un análisis de enriquecimiento, donde se contrastó la abundancia de cada grupo funcional en las proteínas reguladas

diferencialmente con respecto al genoma completo de *C. necator* H16, se establecieron las categorías principales. Respecto a las proteínas activadas, destacaron las categorías relacionadas con el catabolismo y los mecanismos de unión a sustrato, tales como los transportadores UrtA, MppA, NrtA, NrtCD o AmtB. En cuanto a las proteínas reguladas negativamente, prevalecían las relacionadas con la síntesis de ribosomas y procesos de división, como por ejemplo RpsU, RpsL o YbaK (Figura 49 y Tabla 18, Capítulo 2). Estos resultados concuerdan con las hipótesis planteadas. La falta de nitrógeno en el medio de producción impide la división celular, ya que la síntesis de nuevos componentes celulares y la generación de biomasa requiere necesariamente de este elemento. Además, el medio SNL20 se caracteriza por una elevada concentración de lactato, por lo que la presencia de proteínas catabólicas se podría relacionar con el estado quiescente de las células donde se priorizan las reacciones degradativas de macromoléculas para obtener los metabolitos necesarios para mantener el metabolismo basal.

A nivel del metabolismo central, se encontraron reguladas positivamente todas las enzimas implicadas en la glucólisis (FBP, FBA, GAPDH y PGK), vía de ED (PGI, G8PDH, EDD y EDA) y TCA (ACONT, ICDH y AKGDH), mientras que la L-lactato deshidrogenasa (LDHA) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) se encontraron reprimidas. Adicionalmente, se encontraron sobreexpresadas las proteínas responsables de la degradación de ácidos grasos durante la β-oxidación (FadB, FadD, ACCD y PhaJ) donde se generan productos como acetil-CoA, ATP, $NADH^+$ y CO_2. En este sentido, un aumento en la concentración de NADPH, procedente de las reacciones enzimáticas derivadas de la glucólisis y, la acumulación de acetil-CoA derivada de la activación de la β-oxidación, estimulan la producción de PHA en *C. necator* H16 actuando como un sumidero para reducir el exceso de equivalentes del citoplasma.

Respecto a la producción de P(3HB-*co*-LA), tras el análisis del proteoma se detectaron 17 posibles proteínas implicadas (Tabla 20 y Figura 50, Capítulo 2). A parte de la β-cetotiolasa (BtkB), que cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA y la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) que reduce el acetoacetil-CoA usando NADPH para generar 3-HB-CoA (Figura 11, Introducción), se identificaron las fasinas PhaP1, PhaP3 y PhaP4 con regulación positiva, implicadas en la formación y mantenimiento de la estructura del gránulo de PHA. Por otro lado, la proteína PhaM se detectó como una proteína con producción reprimida en estas condiciones. PhaM tiene un dominio con capacidad de unión a DNA en su extremo C-terminal y está involucrada en la segregación de los gránulos de PHA durante la división celular, por lo que la represión durante estas condiciones de incubación con células quiescentes concuerda con los datos

esperados. Además, la activación de la β-oxidación podría explicar el suministro de 3-HB-CoA al polímero gracias a la actividad enoil-CoA hidratasa de la PhaJ cuando las células son incubadas únicamente en presencia de lactato (Matsumoto et al., 2009). Por último, algunas proteínas relacionadas con la hidrólisis del polímero, como PhaZ1, PhaY1 y BdhA, se encontraron en niveles basales mientras que Spot1 y PtsI, que actúan como alarmonas del sistema PTS reprimiendo la degradación, se encontraron reguladas positivamente, indicando que en estas condiciones se favorece la acumulación del polímero.

El análisis del proteoma llevado a cabo en esta Tesis Doctoral ha permitido sugerir la implicación de varias proteínas no relacionadas hasta la fecha con la producción de PHA a partir de lactato en *C. necator* H16. A pesar de que estudios previos han propuesto la incorporación de la actividad propionil-CoA transferasa para generar lactoil-CoA a partir de lactato como estrategia para producir PLA en microorganismos recombinantes, la Pct_{CN}, descrita en el genoma de *C. necator* H16 (H16_A2718), no se encontró regulada de forma diferencial durante la producción de P(3HB-*co*-LA) en el medio SNL20. Sin embargo, se identificaron con regulación positiva tres proteínas propuestas previamente en la literatura como subunidades de dos enzimas cuya actividad podría ser similar a la Pct_{CN}: Q0KC00 (H16_A1331), Q0KBZ9 (H16_A1332), Q0K4S5 (H16_B0198). Aunque a día de hoy la actividad propionil-CoA transferasa de las proteínas mencionadas solo ha sido inferida por la similitud con la Pct_{CN}, en el estudio de Volodina et al., 2014 estas proteínas se sugieren como posibles subunidades de una CoA-transferasa de tipo I, donde la subunidad α estaría codificada por los genes H16_A1131 y H16_B0198, y la subunidad β por el gen H16_A1332 y H16_B0199, aunque la proteína que codifica este último gen no se ha detectado como activada en nuestros análisis. Adicionalmente, se detectó una proteína anotada como L-lactato permeasa (Llp2; H16_B0090) posiblemente involucrada en el transporte de lactato desde el medio extracelular.

Estos resultados sugieren que, cuando las células de *C. necator* H16 se incuban en el medio SNL20, el lactato exógeno es transportado hacia el interior celular a través de Llp2, donde la Pct_{CN} es la enzima responsable de la generación *in vivo* de LA-CoA, presumiblemente utilizando el acetil-CoA generado a través de la β-oxidación, que actuaría como precursor de la sintasa de PHA responsable de la polimerización del copolímero P(3HB-*co*-LA) (Figura 50, Capítulo 2). Lo que nuestros resultados sugieren, también, es que la polimerasa nativa de *C. necator* H16, sin ninguna optimización en su estructura primaria, es capaz de polimerizar sustratos LA-CoA. Es importante resaltar que la secuencia del gen *phaC* ha sido comprobada en las células quiescentes tras el proceso de producción para

verificar que no tenía ninguna modificación con respecto a la estirpe salvaje (datos no mostrados).

Estos resultados podrían ser el punto de partida para optimizar la producción de P(3HB-*co*-LA) utilizando tanto promotores como enzimas nativas presentes en el genoma de *C. necator* H16 al reducir los problemas asociados a la expresión heteróloga de proteínas como la optimización de codones, un mal plegamiento o la necesidad de cofactores no presentes en la célula.

5.3 Domesticación de *R. rubrum* para la producción de PHA a partir de *syngas* y ácido acético

Los residuos sólidos urbanos, los residuos agrícolas y los lodos de depuradora de las plantas de tratamiento de agua contienen una elevada fracción de carbono susceptible de ser revalorizada. En este contexto, las técnicas de conversión termoquímica, como la gasificación y la pirólisis, descomponen los desechos complejos generando tres fracciones: el gas de síntesis o *syngas* (Beneroso et al., 2014a), el carbón vegetal o *char* y el *tar*, compuesto por una mezcla de hidrocarbonos aromáticos. El *syngas*, que está compuesto principalmente de CO, H_2 y CO_2, se puede utilizar como materia prima transformándose en otros productos mediante catálisis química o biológica. A pesar de que, actualmente, el mercado mundial del *syngas* está dominado por la industria del amoniaco y la producción de hidrógeno y metanol para refinerías, la tendencia está tornando hacia el uso de biocatalizadores como los microorganismos (Drzyzga et al., 2015). De hecho, el uso de microorganismos como biocatalizadores tiene una serie de ventajas sobres los catalizadores minerales tradicionales, tales como: temperaturas y presiones de operación similares a las condiciones ambientales, tolerancia a fluctuaciones en la composición del gas y a la presencia de trazas, y producción directa de compuestos de alto valor añadido como los PHAs (Drzyzga et al., 2015). A pesar de que se han identificado más de 300 microorganismos productores de PHA, solo algunos pueden utilizar compuestos de un solo carbono como el CO y el CO_2 que componen el *syngas*. Entre ellos destacan *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii* y *R. rubrum*, teniendo este último la tasa de asimilación de CO más alta entre todas las bacterias analizadas (Beneroso et al., 2014b; Sun et al., 2019). A pesar su gran versatilidad metabólica, uno de los retos a la hora de escalar la producción de PHA a partir de la fermentación del *syngas* usando a *R. rubrum* es el rendimiento del proceso, ya que no solo la baja productividad es una limitación, sino que se requiere otro sustrato, como el acetato, para mejorar el crecimiento y la producción de

P(3HB) (Revelles et al., 2016). Además, tiene un periodo de latencia de al menos 24 horas por lo que, durante esta Tesis Doctoral se planteó la adaptación evolutiva (AE) como estrategia para optimizar este microorganismo mediante un proceso de mutación aleatoria aplicando presión selectiva.

Aunque la AE surgió hace más de 100 años con William Dallinger (Bennett & Hughes, 2009), ha ganado relevancia durante las últimas décadas llegando a ser una técnica habitual dentro de la ingeniería metabólica. Se usa, principalmente, para identificar las bases genéticas de la adaptación en función de la presión selectiva, activar rutas latentes, aislar poblaciones mejoradas y aumentar la tolerancia a estreses ambientales (Portnoy et al., 2011). Durante un proceso de ALE, los microorganismos son cultivados en condiciones controladas durante largos periodos de tiempo (desde meses a años) promoviendo modificaciones fenotípicas o genotípicas beneficiosas que se mantienen a lo largo de las generaciones (Bruijning et al., 2020; Dragosits & Mattanovich, 2013). A pesar de la simplicidad de la metodología, hay muchos factores que pueden afectar los resultados. Por ejemplo, el tamaño de la población y la tasa de mutación determinan la complejidad de la estructura poblacional entre las que se producen fenómenos de interferencia clonal, provocando la pérdida de ciertos linajes si no se aíslan en el periodo de tiempo adecuado (LaCroix et al., 2017). Sin embargo, entre otras de sus ventajas, destaca que la mayoría de microorganismos pueden ser cultivados bajo condiciones controladas y de manera simultánea con sus ancestros control, lo que permite analizar la adaptación de manera cuantitativa. En definitiva, la AE permite la replicación de las cepas estudio generando gran heterogeneidad y permite la selección de aquella población que haya respondido positivamente a las condiciones ambientales establecidas.

Durante la AE se producen 4 fases claramente diferenciadas (McDonald, 2019): al principio los diferentes individuos de la población muestran mutaciones en los mismos genes. Las mutaciones más estables evolucionarán generando una mezcla de ecotipos donde cada uno está adaptado a un factor ambiental determinado. Tras un periodo de tiempo, el ecotipo cuyas mutaciones sean más beneficiosas con respecto a la presión selectiva aplicada destacará del resto de la población aumentando en número de individuos, que mediante un proceso competitivo desplazarán a los individuos no evolucionados. Una vez que el ecotipo evolucionado ha sido aislado, el análisis del genoma mediante técnicas de secuenciación masiva del DNA o NGS (de *massive next-generation DNA sequencing*) permite detectar los cambios genéticos responsables de la mejora. Por un lado, se pueden encontrar SNPs, inserciones y deleciones, así como movimientos de elementos transponibles o IS (de *insertion sequence*) y amplificación de grandes regiones genómicas. Todos ellos contribuyen

a aumentar o disminuir la función de los genes modificados y los patrones regulatorios (Levis & Pfennig, 2020).

Tras determinar la mejor condición de presión selectiva (fermentación de *syngas* con un 40 % de CO en condiciones fotoheretróficas utilizando el acetato como co-sustrato y la luz como fuente de energía), se llevó a cabo un proceso de ALE. Tras aproximadamente 200 generaciones (50 pases, 4 generaciones por pase con un total de 200 días), se observó una reducción total de la fase de latencia, un aumento del 22 % en la velocidad de crecimiento y una acumulación de biomasa superior hasta en un 60 % al final de la fermentación en comparación con la cepa parental RR.

A continuación, para hacer un estudio detallado del ecotipo evolucionado se realizó un análisis de distintos parámetros fisiológicos durante el crecimiento en *syngas* en condiciones fotoheterotróficas de cinco colonias aisladas. En primer lugar, se estudió el contenido de pigmentos fotosintéticos en las membranas intracelulares para ver si el aumento en la velocidad de crecimiento de las variantes adaptadas estaba relacionado con la tolerancia a la exposición a la luz, ya que estudios previos han relacionado la aclimatación con la tolerancia al desequilibrio intracelular del balance redox producido por la luz (Bayon-Vicente et al., 2020; Leroy et al., 2015). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de pigmentos de las variantes adaptadas con respecto a la cepa parental RR que pudieran explicar la reducción en la fase de latencia tras el proceso de ALE.

Respecto a la producción de biomasa y PHA, se observaron dos variantes (V4 y V5) capaces de producir hasta un 100 % más biomasa que la cepa parental, generando, por lo tanto, un aumento en la cantidad total de polímero acumulado. Para determinar la relación entre el aumento en la velocidad de crecimiento, la acumulación de biomasa y las fuentes de carbono disponibles, se realizó un análisis del consumo del *syngas* y el acetato en las variantes V4 y V5 respecto a la cepa parental RR. Se observó cómo la fotofermentación del acetato y la reducción del CO ocurren de forma paralela desde el inicio del crecimiento y cómo la asimilación de acetato fue más rápida y completa en las variantes adaptadas con respecto la cepa parental RR (Figura 63, Capítulo 3). Destaca un aumento en la producción de CO_2 e H_2 en las variantes adaptadas derivado de un metabolismo del acetato más activo y una mayor transformación del CO. Además, al comparar el balance de materia en dos fases (fase líquida y fase gaseosa) se observó cómo el CO_2, que se produce en exceso, no puede ser totalmente fijado en forma de carbón orgánico en ninguna de las tres cepas estudiadas y, que el flujo de carbono aumenta principalmente a partir del acetato en las variantes V4 y V5. En este contexto, las variantes evolucionadas V4 y V5 muestran una mejora metabólica

significativa con respecto a la cepa parental RR, actuando como un catalizador eficiente en la generación de bioproductos como el PHA o el H_2 que podría ser, aún más, optimizado mediante modelos cinéticos en oscuridad (Rodríguez et al., 2021).

Para dilucidar la base genética relacionada con las mejoras en el crecimiento y los cambios fenotípicos, se secuenció el genoma de las cepas evolucionadas V4 y V5, y la cepa parental RR. Tras realizar el ensamblaje de los fragmentos generados en *contigs* ordenados y orientados utilizando como referencia el genoma de *R. rubrum* S1 (NC_007643 y NC_007641), no se detectaron regiones invertidas, delecionadas o insertadas en las variantes V4 y V5, asemejándose la secuencia tanto al genoma de referencia como a la cepa de partida utilizada para el proceso de ALE. Aunque De Meur y colaboradores observaron un fenómeno de amplificación y duplicación de genes relacionado con experimentos de adaptación en *R. rubrum* durante el crecimiento en acetato (De Meur, Deutschbauer, et al., 2018), no se observaron eventos de reorganización génica similares en las variantes V4 y V5. Estos autores, detectaron la duplicación de un fragmento de 62 kb que contenía hasta tres copias de la región Rru_A3037-Rru_A3092 donde se encuentran localizados los genes codificantes de las enzimas involucradas en el ciclo del EM-CoA, implicando a esta ruta metabólica en la asimilación del acetato y reduciendo la fase de latencia al gestionar rápidamente el desequilibrio en el balance redox dirigiendo el flujo de equivalentes por esta vía.

En las variantes V4 y V5, se conservaron las mutaciones ya detectadas en la cepa parental RR con respecto al genoma anotado de *R. rubrum* S1 y 4 SNPs comunes correspondientes a las regiones codificantes del regulador transcripcional Fis (Rru_A0626), la proteína multi-anti extrusión MatE (Rru_A0697), una proteína periplásmica de unión a putrescina PotF (Rru_A1018) y la enzima glutamato deshidrogenasa GDH (Rru_A3663) (Figura 65, Capítulo 3).

Para estudiar los posibles efectos biológicos de las mutaciones observadas en la estructura y funcionalidad de las proteínas comunes entre las cepas evolucionadas, así como analizar las unidades transcripcionales, se utilizó la base de genomas global BioCyc (https://biocyc.org/) y la base de interacciones entre proteínas String (https://string-db.org). El regulador Fis (Rru_A0626) se localiza aguas arriba del gen que codifica la bacterioclorofila sintasa (Rru_A0627) y la proteína PucC (Rru_A0628), cuyo papel es crucial para el desarrollo de la antena fotosintética. A su vez, el regulador Fis es responsable de modular la transcripción de los genes *bch*B (Rru_A0614), *bch*C (Rru_A2981) y del operon *puh*A (Rru_A0617, Rru_A0616, Rru_A0615), que codifica los genes necesarios para la formación del centro de reacción de la antena fotosintética. La deleción de un nucleótido en

la posición 780 del gen *fis*, respecto al codón de iniciación de la transcripción, da lugar a un cambio de una glicina por una prolina en la posición 260 de la proteína, modificando a su vez el marco de lectura y generando un codón de stop antes de la terminación de la secuencia nativa. Como se ha comentado anteriormente, aunque no se detectaron cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos, la ausencia del regulador podría ser una estrategia para disminuir la fotoreducción del NAD+ en NADH en las futuras generaciones como estrategia de adaptación o en posibles ecotipos más evolucionados no aislados durante nuestros experimentos. Además, es importante mencionar que la cepa de referencia utilizada en esta Tesis Doctoral (RR02_01) es un mutante espontáneo de la cepa *R. rubrum* S1 y que contiene una mutación en el gen Rru_0625, localizado en una región génica responsable de la síntesis de fotomembranas en este microorganismo. Estudios no publicados realizados en nuestro grupo de investigación ha atribuido a esta mutación un cambio del fenotipo dando lugar a una variante sin pigmentación en algunas condiciones de crecimiento. Hasta el momento no se ha determinado la relación entre el gen Rru_0625 y el regulador transcripcional Fis, pero la presencia de mutaciones en la misma región del genoma en ambas cepas sugiere que podría estar relacionado con la eficiencia energética.

Por otro lado, la proteína MatE (Rru_A0697) tiene una localización transmembrana cuya función es la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de la célula hacia el medio externo. La inserción de un nucleótido en la posición 571, respecto al codón de iniciación de la transcripción, genera un cambio en el marco de lectura dando lugar a un codón de stop en la posición 1200 que impide la transcripción y traducción de los siguientes 204 pares de bases que comprenden la región codificante. La ausencia de un transportador secundario inespecífico como MatE no se puede relacionar directamente con ninguno de los cambios fenotípicos observados, ya que el genoma de *R. rubrum* contiene 99 transportadores responsables de la movilización de diferentes compuestos, y hasta tres copias de MatE que podrían complementar la función afectada. La proteína PotF, codificada por el gen *pot*F (Rru_A1018) actúa como un transportador de unión a la putrescina que se localiza en el periplasma. Junto con los genes *por*G (Rru_A1017), *por*H (Rru_A1016) y *por*I (Rru_A1015), con los que forma una unidad transcripcional putativa, es responsable de metabolizar este compuesto alifático. Además, a nivel proteico interacciona directamente con las proteínas PotD (Rru_A3035), PotC (Rru_A3012), PotB (Rru_A3013) y PotA (Rru_A3014), implicadas en la formación de poros transmembrana. La deleción de seis nucleótidos en la posición 1207, respecto al codón de iniciación de la transcripción, no altera el marco de lectura, pero genera la pérdida de dos aminoácidos cuyo efecto sobre la actividad catalítica no se ha dilucidado en esta Tesis Doctoral.

Por último, la enzima glutamato deshidrogenasa o GDH (Rru_A3663) cataliza reacciones relacionadas con el metabolismo energético. En concreto, interviene en el metabolismo del nitrógeno a través de la reacción "L-glutamato + NAD^+ + H_2O <=> 2-oxoglutarato + amonio" y en el metabolismo de los aminoácidos cuando la reacción es favorable hacia la producción de L-glutamato para producir alanina, aspartato, arginina o taurina. Respecto a la organización génica, el gen Rru_A3662 parece formar parte de un conjunto de tres genes que codifican una proteína cuya función no es conocida y un transportador MFA, de la familia UMF1, involucrado en el tráfico de pequeñas moléculas como los nitratos. La deleción de los tres nucleótidos no supone una modificación en el marco de lectura. Asimismo, la eliminación de una glicina en la posición 625, respecto al codón de iniciación, no coincide con una zona conservada de la proteína según los alineamientos realizados con otras proteínas de la misma familia, por lo que no se puede sugerir de manera fehaciente que este cambio afecte a la actividad de la enzima. Sin embargo, no se puede descartar que la modificación impacte en el plegamiento de la proteína modificando su estructura.

Para dilucidar el efecto de las mutaciones puntuales observadas en el genoma en el perfil de expresión proteica, se realizó un análisis comparativo del proteoma en condiciones de crecimiento fotoheterotróficas (acetato y *syngas*) a las 48 horas de crecimiento entre las variantes adaptadas (V4 y V5) y la cepa parental RR. Mientras que, a partir de otras técnicas de análisis masivo, como el RNA-seq, se mide la expresión génica estimando la producción de las proteínas, la proteómica nos da información veraz sobre la colección de proteínas de una célula bajo un conjunto de condiciones ambientales determinadas. La proteómica basada en espectrometría de masas es una poderosa herramienta de alto rendimiento que permite identificar y cuantificar dentro de una mezcla compleja el número exacto de péptidos que infieren una proteína gracias al marcaje con isótopos estables y a la anotación de las secuencias mediante herramientas bioinformáticas (Chalkley et al., 2005; Mastroleo, 2009).

Las variantes V4 y V5 mostraron un total de 1996 proteínas identificadas, entre las cuales se encontraron 86 y 25 proteínas reguladas en la variante V4 y V5, respectivamente (Figura 66, Capítulo 3). El número de proteínas detectadas fue considerablemente mayor al estudio proteómico realizado en condiciones de oscuridad por Mastroleo en 2009, donde se identificaron 932 proteínas, y se encontró dentro del mismo de rango de los estudios realizados por otros autores para identificar las rutas de asimilación del acetato, los efectos de la exposición al CO y a variaciones de luz, con 1725, 1823 y 1572 proteínas, respectivamente (Leroy et al., 2015, Bayon-Vicente et al., 2018, Bayon-Vicente et al., 2020 y Cavazza et al., 2022). En primer lugar, se exploraron las proteínas relacionadas con el

metabolismo central de carbono, el metabolismo del PHA, la asimilación de CO y el aparato fotosintético, principales actores involucrados en el crecimiento de *R. rubrum* bajo condiciones fotoheterotróficas. El estudio se centró en la variante V4, ya que presentó un mayor número de proteínas reguladas posiblemente relacionado con un ligero aumento en la velocidad de crecimiento detectado durante la caracterización fenotípica. Además, todas las proteínas identificadas en la variante V5 se encontraron diferencialmente reguladas en la variante V4, lo que permite extrapolar las conclusiones tras el análisis.

Respecto al metabolismo central del carbono, se encontró regulada positivamente la L-Malil-CoA/β-metilmalil-CoA liasa (Rru_A0217) indicando que bajo nuestras condiciones de crecimiento el ciclo del EM-CoA está involucrado en la asimilación de acetato vía crotonil-CoA reductasa (Ccr; Rru_A3063). Además, se identificaron tres proteínas de la β-oxidación: la acil-CoA deshidrogenasa (Rru_A1308), la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Rru_A1309) y la acetil-CoA aciltransferasa (Rru_A1310), mostrando que, en este momento del crecimiento, donde el acetato comienza a ser un sustrato limitante (ver Figura 62), la β-oxidación puede utilizarse para la obtención de metabolitos necesarios para el mantenimiento celular. Aunque se identificaron diferentes enzimas relacionadas con la glucólisis (Rru_A2398, Rru_A2465, Rru_A2956, Rru_A1878, Rru_A1880 y Rru_A1879) no mostraron una expresión diferencial en las variantes evolucionadas. En concreto, la movilización del glucógeno a través de la glucólisis, mediada por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PFOR; Rru_A2398), ha sido descrita previamente en *R. rubrum* como una estrategia de adaptación (Bayon-Vicente et al., 2020; Leroy et al., 2015) y como una posible vía de fijación de CO_2 (Revelles et al., 2016). Sin embargo, en el punto del crecimiento en el que fue analizado el proteoma no se detectaron niveles significativamente altos de ninguna de las proteínas involucradas en estas rutas metabólicas.

Por otro lado, y en relación con el metabolismo del PHA, no se encontró ninguna proteína regulada diferencialmente entre las variantes y la cepa parental RR, pudiendo indicar que, o bien la capacidad de acumulación de PHA es similar tras el proceso de ALE o que en el momento en el que fue realizado el análisis no se observan diferencias. Futuros experimentos que describan la expresión de las proteínas a lo largo del crecimiento ayudarán a dilucidar estas hipótesis.

Por último, la coenzima Q (Rru_A1192), involucrada en la generación de ATP en la fosforilación oxidativa, y la proteína BchY (Rru_A2979), relacionada con la síntesis de bacterioclorofilas, se mostraron reguladas positivamente, pudiendo relacionarse con un aumento en la actividad fotosintética a partir de las 48 horas de fermentación. Aunque el crecimiento de *R. rubrum* no es estrictamente dependiente de la luz, sí se han observado

efectos positivos asociados a esta fuente de energía en la generación de biomasa y la tasa de crecimiento (Najafpour & Younesi, 2007). Adicionalmente, se identificaron con expresión positiva el regulador transcripcional CooA (Rru_A1245), que activa el sistema de oxidación del CO, y la CO deshidrogenasa (Rru_A1824), involucrada en la conversión del CO a CO_2 mediante la reacción $CO + H_2O \rightarrow H_2 + CO_2$ (ver Apartado 1.5.3.2, Introducción). La asimilación de carbono procedente del CO en biomasa o PHA, así como la fijación del CO_2 generado durante la oxidación del CO, se producen de forma concomitante cuando se utiliza acetato como co-sustrato (Revelles et al., 2016). Teniendo en cuenta que el acetato solo se puede utilizar como fuente de carbono, la asimilación del CO es indispensable para obtener energía. Por último, destaca la regulación negativa de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO; Rru_A2400), indicando, como en otros estudios previos, que durante la fermentación del *syngas* en presencia de acetato, el CBB no parece estar implicado en la asimilación de carbono o al menos no es ruta preferencial (Bayon-Vicente et al., 2020; Revelles et al., 2016). Se necesitan datos de la abundancia de esta proteína a partir del agotamiento del acetato en el medio de cultivo para poder establecer una relación entre la fijación de CO_2 y el ciclo CBB. De la misma forma, la represión del complejo malonato carboxilasa dependiente de biotina, identificada en las cepas adaptadas, no ha podido ser explicada en nuestras condiciones a pesar de haber sido propuesta por otros autores como una posible nueva ruta involucrada en la asimilación de acetato (Cabecas-Segura et al., 2021; De Meur et al., 2018).

En definitiva, a lo largo de esta Tesis Doctoral se han abordado diferentes estrategias de biotecnología microbiana con el objetivo de optimizar la producción de bioplásticos a partir de residuos complejos, tales como las aguas residuales de origen industrial o el gas de síntesis derivado de la pirólisis y/o gasificación de los residuos sólidos urbanos. Mediante la selección de un catalizador robusto, como *C. necator* H16, el diseño de un bioproceso adaptado a los límites de tolerancia a VFAs como principales componentes de los sustratos utilizados, y a los requerimientos nutricionales de este microorganismo, se ha conseguido maximizar la producción de P(3HB). Además, al disminuir la manipulación del sustrato, con el objetivo de reducir los costes de operación, se ha conseguido producir el copolímero P(3HB-*co*-LA) y dilucidar, mediante un análisis del proteoma en condiciones de acumulación, posibles proteínas involucradas en el proceso no reportadas previamente en la literatura en este microorganismo. Por otro lado, mediante una estrategia de ALE se ha conseguido optimizar el metabolismo de la cepa *R. rubrum* RR02_01 durante la fotofermentación del *syngas* utilizando el acetato como co-sustrato y la luz como fuente de energía. Tras 200 generaciones, las variantes adaptadas mostraron un aumento de hasta el

60 % de la producción total de PHA. Además, tras secuenciar el genoma y determinar las posibles adaptaciones a nivel genómico responsables de los cambios fenotípicos observados en las variantes adaptadas, se realizó el estudio de su proteoma para dilucidar las rutas metabólicas involucradas en el metabolismo mejorado.

Todos estos resultados constituyen un ejemplo de cómo la biotecnología microbiana combinada con tecnologías ómicas puede contribuir al desarrollo e implementación de procesos sostenibles para la revalorización de residuos para la producción de bioplásticos siguiendo las pautas de economía circular.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la producción de bioplásticos a partir de residuos complejos en base a los principios de la economía circular mediante una estrategia de biotecnología microbiana. Los resultados han permitido aumentar el conocimiento del proceso y establecer las bases para su optimización. Las principales conclusiones que de forma específica se deducen de este trabajo son:

1. Los derivados VFAs de la digestión anaerobia de las aguas residuales de origen industrial utilizadas en esta Tesis doctoral son sustratos aptos para la producción de PHA en *C. necator* H16. La composición y concentración de los VFAs en los sustratos utilizados determina el rendimiento del proceso de producción de PHA.
2. La concentración en carbono óptima para la producción de P(3HB) en *C. necator* H16 en el medio de cultivo derivado del agua residual fermentada procedente de la producción industrial de caramelos es de 6 $g \cdot L^{-1}$. Además, el modo de operación influye en el rendimiento del bioproceso, así como en las propiedades finales del polímero.
3. A través de una estrategia de alimentación continua acoplada a la producción de biomasa se alcanzó una productividad de 0,8 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, dando lugar a un polímero de mayor peso molecular y temperatura de fusión que al aplicar modos de operación discontinuos.
4. La estirpe salvaje *C. necator* H16 es capaz de producir P(3HB-*co*-60%LA) usando agua residual fermentada derivada de la producción industrial de caramelos cuando se utiliza directamente el sustrato sin diluir.
5. Células quiescentes de *C. necator* H16 son capaces de producir el copolímero P(3HB-*co*-LA) usando L-lactato como único precursor en un medio mineral en ausencia de nitrógeno. Además, la incorporación de monómeros LA al polímero es proporcional a la concentración de L-lactato utilizada, lo que permite modular la composición final del poliéster y sus propiedades.
6. El análisis del proteoma de *C. necator* H16 en condiciones de producción de P(3HB-*co*-LA) ha permitido identificar, por similitud entre secuencias, tres proteínas putativas: un transportador de membrana Llp2 y dos posibles propionil-CoA transferasas (Pct_{CN}) que podrían estar involucradas en la síntesis del copolímero.

7. La bacteria *R. rubrum* produce PHA a partir del *syngas* pero muestra una fase de latencia de aproximadamente 24 horas, que aumenta en función de la concentración de CO. En condiciones fotoheterotróficas, la concentración de CO óptima en el espacio de cabeza para la generación de biomasa y acumulación de P(3HB) es del 40 % (v/v).
8. Tras un proceso de ALE en condiciones de fotofermentación del *syngas* la velocidad de crecimiento de las variantes evolucionadas de *R. rubrum* aumentó un 22 %. Además, la acumulación de PHA mejoró un 60 % con respecto a la cepa parental.
9. Aunque la fotofermentación del ácido acético y la reducción del CO ocurren de forma simultánea desde el inicio del crecimiento, a partir de un balance de materia se deduce que el aumento en la formación de PHA y biomasa deriva principalmente del catabolismo del ácido acético.
10. El análisis del proteoma de las variantes evolucionadas respecto a la cepa parental en condiciones de crecimiento fotoheterotróficas, ha permitido sugerir la ruta del EM-CoA como vía principal a través de la cual se metaboliza el ácido acético en esta cepa.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, S. (2020). Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a Microplastic-Free Environment. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *221*(6), 2000017. https://doi.org/10.1002/macp.202000017

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 Research*, *44*(11), 3419–3433. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.021

Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 161–174. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069

Arcos-Hernandez, M. V., Pratt, S., Laycock, B., Johansson, P., Werker, A., & Lant, P. A. (2013). Waste activated sludge as biomass for production of commercial-grade polyhydroxyalkanoate (PHA). *Waste and Biomass Valorization*, *4*(1), 117–127. https://doi.org/10.1007/s12649-012-9165-z

Arrieta, M. P., Samper, M. D., Aldas, M., & López, J. (2017). On the use of PLA-PHB blends for sustainable food packaging applications. *Materials*, *10*(9), 1–26. https://doi.org/10.3390/ma10091008

Avérous, L. (2008). Polylactic acid: Synthesis, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 433–450. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1

Barreiro-Gen, M., & Lozano, R. (2020). How circular is the circular economy? Analysing the implementation of circular economy in organisations. *Business Strategy and the Environment*, *29*(8), 3484–3494. https://doi.org/10.1002/bse.2590

Battista, F., Frison, N., Pavan, P., Cavinato, C., Gottardo, M., Fatone, F., Eusebi, A. L., Majone, M., Zeppilli, M., Valentino, F., Fino, D., Tommasi, T., & Bolzonella, D. (2019). Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *November 2018*. https://doi.org/10.1002/jctb.6096

Bayon-Vicente, G., Onderwater, R., Leroy, B., & Wattiez, R. (2018). *New insight on the photo-acclimation of Rhodospirillum rubrum*. *March*, 4–5.

Bayon-Vicente, G., Wattiez, R., & Leroy, B. (2020). Global Proteomic Analysis Reveals High Light Intensity Adaptation Strategies and Polyhydroxyalkanoate Production in Rhodospirillum rubrum Cultivated With Acetate as Carbon Source. *Frontiers in Microbiology*, *11*(March), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00464

Beneroso, D., Bermúdez, J. M., Arenillas, A., & Menéndez, J. A. (2014a). Integrated microwave drying, pyrolysis and gasification for valorisation of organic wastes to syngas. *Fuel*, *132*, 20–26. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.064

Beneroso, D., Bermúdez, J. M., Arenillas, A., & Menéndez, J. A. (2014b). Comparing the composition of the synthesis-gas obtained from the pyrolysis of different organic residues for a potential use in the synthesis of bioplastics. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *111*, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.12.011

Benesova, P., Kucera, D., Marova, I., & Obruca, S. (2017). Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by Cupriavidus necator on waste frying oils. *Letters in Applied Microbiology*, *65*(2), 182–188. https://doi.org/10.1111/lam.12762

Bennett, A. F., & Hughes, B. S. (2009). Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *297*(1), R17–R25. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90562.2008

Berwig, K. H., Baldasso, C., & Dettmer, A. (2016). Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by Alcaligenes latus using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresource Technology*, *218*, 31–37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.067

Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S. K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., & Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by Haloferax mediterranei. *AMB Express*, *2*(1), 34. https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-34

Bhubalan, K., Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y., & Sudesh, K. (2008). Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, *93*(1), 17–23. https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2007.11.004

Blanco, F. G., Hernández, N., Rivero-Buceta, V., Maestro, B., Sanz, J. M., Mato, A., Hernández-Arriaga, A. M., & Prieto, M. A. (2021). From residues to added-value bacterial biopolymers as nanomaterials for biomedical applications. *Nanomaterials*, *11*(6), 1–41. https://doi.org/10.3390/nano11061492

Brigham, C. (2019). Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO 2 and H 2 using Ralstonia eutropha and other 'Knallgas' bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(5), 2113–2120. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09636-y

Brigham, C., & Riedel, S. (2019). The potential of polyhydroxyalkanoate production from food wastes. *Applied Food Biotechnology*, *6*(1), 7–18. https://doi.org/10.22037/afb.v6i1.22542

Bruijning, M., Metcalf, C. J. E., Jongejans, E., & Ayroles, J. F. (2020). The Evolution of Variance Control. *Trends in Ecology and Evolution*, *35*(1), 22–33. https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.005

Bustamante, D., Segarra, S., Tortajada, M., Ramon, D., Del Cerro, C., Auxiliadora Prieto, M., Iglesias, J. R., & Rojas, A. (2019). In silico prospection of microorganisms to produce polyhydroxyalkanoate from whey: Caulobacter segnis DSM 29236 as a suitable industrial strain. *Microb Biotechnol*, *12*(3), 487–501. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13371

Cabecas-Segura, P., De Meur, Q., Tanghe, A., Onderwater, R., Dewasme, L., Wattiez, R., & Leroy, B. (2021). Effects of Mixing Volatile Fatty Acids as Carbon Sources on Rhodospirillum rubrum Carbon Metabolism and Redox Balance Mechanisms. *Microorganisms*, *9*(9), 1996. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091996

Campanari, S., Francisca, A., Bertin, L., & Villano, 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. *International Journal of Biological Macromolecules*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.006

Cavazza, C., Collin-Faure, V., Pérard, J., Diemer, H., Cianférani, S., Rabilloud, T., & Darrouzet, E. (2022). Proteomic analysis of Rhodospirillum rubrum after carbon monoxide exposure reveals an important effect on metallic cofactor biosynthesis. *Journal of Proteomics*, *250*(April 2021). https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104389

Chai, Y., Kolter, R., & Losick, R. (2009). A Widely Conserved Gene Cluster Required for Lactate Utilization in Bacillus subtilis and Its Involvement in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, *191*(8), 2423–2430. https://doi.org/10.1128/JB.01464-08

Chaijamrus, S., & Udpuay, N. (2008). Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by Bacillus megaterium ATCC 6748. *Agricultural Engineering International*, *10*, 7–30.

Chakraborty, P., Gibbons, W., & Muthukumarappan, K. (2009). Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by Ralstonia eutropha. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 1996–2005. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04158.x

Chakraborty, Panchali, Muthukumarappan, K., & Gibbons, W. R. (2012). PHA Productivity and Yield of Ralstonia eutropha When Intermittently or Continuously Fed a Mixture of Short Chain Fatty Acids. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2012/506153

Chalkley, R. J., Hansen, K. C., & Baldwin, M. A. (2005). *Bioinformatic Methods to Exploit Mass Spectrometric Data for Proteomic Applications* (pp. 289–312). https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02009-4

Chaudhry, W. N., Jamil, N., Ali, I., Ayaz, M. H., & Hasnain, S. (2011). Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Annals of Microbiology*, *61*(3), 623–629. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0181-6

Cheung, H. N. B., Huang, G. H., & Yu, H. (2010). Microbial-growth inhibition during composting of food waste: Effects of organic acids. *Bioresource Technology*, *101*(15), 5925–5934. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.062

Choi, D., 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*. *160*(4), 1032–1046. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8560-9

Choi, G. G., Kim, H. W., & Rhee, Y. H. (2004). Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by Alcaligenes sp. MT-16. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *42*(4), 346–352. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650693

Choi, S., Park, S., Kim, W., Yang, J., Lee, H., Shin, J., & Lee, S. (2016). One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in Escherichia coli. *Nature Biotechnology*, *34*(4), 435–440. https://doi.org/10.1038/nbt.3485

Choi, Y., Rhie, M. N., Kim, H. T., Joo, J. C., Cho, I. J., Son, J., Jo, S. Y., Sohn, Y. J., Baritugo, K.-A., Pyo, J., Lee, Y., Lee, S. Y., & Park, S. J. (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, *58*(February 2019), 47–81. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.009

Cramm, R. (2008). Genomic view of energy metabolism in Ralstonia eutropha H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *16*(1–2), 38–52. https://doi.org/10.1159/000142893

Dadak, A., Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Younesi, H., & Najafpour, G. (2016). Exergy-based sustainability assessment of continuous photobiological hydrogen production using anaerobic bacterium Rhodospirillum rubrum. *Journal of Cleaner Production*, *139*, 157–166. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.020

Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, *5*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147

De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J. L., & Prieto, M. A. (2010). The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in Pseudomonas putida KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environmental Microbiology*, *12*(1), 207–221. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02061.x

De Meur, Q., Deutschbauer, A., Koch, M., Bayon-Vicente, G., Cabecas Segura, P., Wattiez, R., & Leroy, B. (2020). New perspectives on butyrate assimilation in Rhodospirillum rubrum S1H under photoheterotrophic conditions. *BMC Microbiology*, *20*(1), 126. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01814-7

De Meur, Q., Deutschbauer, A., Koch, M., Wattiez, R., & Leroy, B. (2018). Genetic Plasticity and Ethylmalonyl Coenzyme A Pathway during Acetate Assimilation in Rhodospirillum rubrum S1H under Photoheterotrophic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(3). https://doi.org/10.1128/AEM.02038-17

De Meur, Q., Moulin, C., Wégia, G., Leroy, B., & Wattiez, R. (2018). *Photoheterotrophic metabolism of volatil fatty acids in Rhodospirillum rubrum*.

Den, W., Sharma, V. K., Lee, M., Nadadur, G., & Varma, R. S. (2018). Lignocellulosic biomass transformations via greener oxidative pretreatment processes: Access to energy and value added chemicals. *Frontiers in Chemistry*, *6*(APR), 1–23. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00141

Desouky, S. E., Abdel-Rahman, M. A., Azab, M. S., & Esmael, M. E. (2017). Batch and fed-batch production of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by Bacillus flexus Azu-A 2. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*, *4*(3), 55–66.

Doi, Y., Kanesawa, Y., & Kunioka, M. (1990). Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *26 Macromolecules*, *23*, 26–31. https://doi.org/0024-9297/90/2223-0026802.50/0

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. *Chemical Engineering Journal*, *336*, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.024

Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64

Drzyzga, O., Revelles, O., Durante-Rodríguez, G., Díaz, E., García, J. L., & Prieto, A. (2015). New challenges for syngas fermentation: towards production of biopolymers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *90*(10), 1735–1751. https://doi.org/10.1002/jctb.4721

Du, G., Si, Y., & Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by Ralstonia eutropha. *Biotechnology Letters*, *23*(19), 1613–1617. https://doi.org/10.1023/A:1011916131544

Dyda, F., Klein, D. C., & Hickman, A. B. (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: A structural overview. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *29*, 81–103. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.81

Eggers, J., & Steinbuchel, A. (2013). Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in Ralstonia eutropha H16 Is Mediated Stereoselectively to (S)-3-Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, *195*(14), 3213–3223. https://doi.org/10.1128/JB.00358-13

Elain, A., Le, A., Corre, Y., Le, M., Hachet, N., Le, V., Loulergue, P., Audic, J., & Bruzaud, S. (2016). Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops & Products*, *80*, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.052

Ellen MacArthur Foundation. (2013). Towards the circular economy. *Journal of Industrial Ecology*, *1*.

Estévez-Alonso, Á., Pei, R., van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R., & Werker, A. (2021). Scaling-up microbial community-based polyhydroxyalkanoate production: status and challenges. *Bioresource Technology*, *327*(February). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124790

Farghaly, A., Enitan, A. M., Kumari, S., Bux, F., & Tawfik, A. (2017). Polyhydroxyalkanoates production from fermented paperboard mill wastewater using acetate-enriched bacteria. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *19*(4), 935–947. https://doi.org/10.1007/s10098-016-1286-9

Fernández-Domínguez, D., Astals, S., Peces, M., Frison, N., Bolzonella, D., Mata-Alvarez, J., & Dosta, J. (2020). Volatile fatty acids production from biowaste at mechanical-biological treatment plants: Focusing on fermentation temperature. *Bioresource Technology*, *314*, 123729. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123729

Fernández, D., Rodríguez, E., Bassas, M., Viñas, M., Solanas, A. M., Llorens, J., Marqués, A. M., & Manresa, A. (2005). Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain Pseudomonas aeruginosa NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *26*(2–3), 159–167. https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.022

Ferronato, N., Rada, E. C., Gorritty Portillo, M. A., Cioca, L. I., Ragazzi, M., & Torretta, V. (2019). Introduction of the circular economy within developing regions: A comparative analysis of advantages and opportunities for waste valorization. *Journal of Environmental Management*, *230*(April 2018), 366–378. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.095

Flores-Sánchez, A., López-Cuellar, M. D. R., Pérez-Guevara, F., Figueroa López, U., Martín-Bufájer, J. M., & Vergara-Porras, B. (2017). Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by Cupriavidus necator ATCC 17699 Using Mexican Avocado (Persea americana) Oil as a Carbon Source. *International Journal of Polymer Science*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/6942950

Follonier, S., Riesen, R., & Zinn, M. (2015). Pilot-scale Production of Functionalized mcl-PHA from Grape Pomace Supplemented with Fatty Acids. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *29*, 113–121. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2251

Gang, S., Lee, W., Kwon, K., Kim, T., Kim, J. S., & Chung, C. W. (2019). Production of Polyhydroxybutyrate from Ralstonia eutropha H-16 Using Makgeolli Lees Enzymatic Hydrolysate. *Journal of Polymers and the Environment*, *27*(10), 2182–2188. https://doi.org/10.1007/s10924-019-01508-w

Gao, C., Hu, C., Zheng, Z., Ma, C., Jiang, T., Dou, P., Zhang, W., Che, B., Wang, Y., Lv, M., & Xu, P. (2012). Lactate Utilization Is Regulated by the FadR-Type Regulator LldR in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *194*(10), 2687–2692. https://doi.org/10.1128/JB.06579-11

Garcia-Gonzalez, L., Mozumder, M. S. I., Dubreuil, M., Volcke, E. I. P., & De Wever, H. (2015). Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO2 using a two-stage cultivation system. *Catalysis Today*, *257*(Part 2), 237–245. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.025

Geng, Y., Sarkis, J., & Bleischwitz, R. (2019). Globalize the circular economy. *Nature*, *565*(7738), 5–7.

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, *3*(7), 25–29. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782

Girotto, F., Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, *45*, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008

Grammel, H., & Ghosh, R. (2008). Redox-State Dynamics of Ubiquinone-10 Imply Cooperative Regulation of Photosynthetic Membrane Expression in Rhodospirillum rubrum. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *190*(14), 4912–4921. https://doi.org/10.1128/JB.00423-08

Guo, P., Luo, Y., Wu, J., & Wu, H. (2021). Recent advances in the microbial synthesis of lactate-based copolymer. *Bioresources and Bioprocessing*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/s40643-021-00458-3

Hädicke, O., Grammel, H., & Klamt, S. (2011). Metabolic network modeling of redox balancing and biohydrogen production in purple nonsulfur bacteria. *BMC Systems Biology*, *5*. https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-150

Hafuka, A., Sakaida, K., Satoh, H., Takahashi, M., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2011). Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by Cupriavidus necator. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3551–3553. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.018

Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J., & Xiang, H. (2010). Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(23), 7811–7819. https://doi.org/10.1128/AEM.01117-10

He, Y., Hu, Z., Ren, M., Ding, C., Chen, P., Gu, Q., & Wu, Q. (2014). Evaluation of PHBHHx and PHBV/PLA fibers used as medical sutures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *25*(2), 561–571. https://doi.org/10.1007/s10856-013-5073-4

Heinrich, D., Raberg, M., Fricke, P. M., Kenny, S. T., Morales-Gamez, L., Babu, R. P., O'Connor, K. E., & Steinbüchel, A. (2016). Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Engineered Rhodospirillum rubrum. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(20), 6132–6140. https://doi.org/10.1128/AEM.01744-16.Editor

Heng, K.-S., Hatti-Kaul, R., Adam, F., Fukui, T., & Sudesh, K. (2017). Conversion of rice husks to polyhydroxyalkanoates (PHA) via a three-step process: optimized alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, and biosynthesis by Burkholderia cepacia USM (JCM 15050). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *92*(1), 100–108. https://doi.org/10.1002/jctb.4993

Hermida, É. (2011). Capítulo 9: Polímeros. In *Colección Materiales y materias primas.* (Vol. 2, p. 70).

Hickman, D., & Frenkel, A. (1959). The Structure of Rhodospirillum rubrum. *The Journal of Biophysical and …*, *6*(18), 277–284.

Huschner, F., Grousseau, E., Brigham, C. J., Plassmeier, J., Popovic, M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2015). Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of Ralstonia eutropha H16 from organic acids and their salts. *Process Biochemistry*, *50*(2), 165–172. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.004

Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 552–571. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x

Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, *16*(8), 2357–2373. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356

Jin, H., & Nikolau, B. J. (2014). Evaluating PHA productivity of bioengineered Rhodosprillum rubrum. *PLoS ONE*, *9*(5), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096621

Juengert, J. R., Patterson, C., & Jendrossek, D. (2018). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) polymerase PhaC1 and PHB depolymerase PhaZa1 of Ralstonia eutropha are phosphorylated in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(13). https://doi.org/10.1128/AEM.00604-18

Jung, Y. K., Kim, T. Y., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2010). Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(1), 161–171. https://doi.org/10.1002/bit.22548

Jung, Y. K., & Lee, S. Y. (2011). Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, *151*(1), 94–101. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.009

Kamilah, H., Al-Gheethi, A., Yang, T. A., & Sudesh, K. (2018). The Use of Palm Oil-Based Waste Cooking Oil to Enhance the Production of Polyhydroxybutyrate [P(3HB)] by Cupriavidus necator H16 Strain. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *43*(7), 3453–3463. https://doi.org/10.1007/s13369-018-3118-1

Kantachote, D., Torpee, S., & Umsakul, K. (2005). The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology*, *8*(3), 314–323. https://doi.org/10.2225/vol8-issue3-fulltext-8

Kantesh, B., Verma, V., Agarwal, A., & Narayan, R. (2015). Physical, Thermal, and Mechanical Properties of Polymers. *Biosurfaces*, 329–344. https://doi.org/10.1002/9781118950623.app1

Karmann, S., Follonier, S., Egger, D., Hebel, D., Panke, S., & Zinn, M. (2017). Tailor-made PAT platform for safe syngas fermentations in batch, fed-batch and chemostat mode with Rhodospirillum rubrum. *Microbial Biotechnology*, *10*(6), 1365–1375. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12727

Karmann, S., Panke, S., & Zinn, M. (2019). Fed-Batch Cultivations of Rhodospirillum rubrum Under Multiple Nutrient-Limited Growth Conditions on Syngas as a Novel Option to Produce Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(APR), 1–11. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00059

Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., & Woerden, F. Van. (2018). *What a waste 2.0*.

Kenar, H., Kose, G. T., & Hasirci, V. (2010). Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *21*(3), 989–997. https://doi.org/10.1007/s10856-009-3917-8

Kerby, R. L., Ludden, P. W., & Roberts, G. P. (1995). Carbon monoxide-dependent growth of Rhodospirillum rubrum. *Journal of Bacteriology*, *177*(8), 2241–2244. https://doi.org/10.1128/jb.177.8.2241-2244.1995

Klask, C., Raberg, M., Heinrich, D., & Steinbüchel, A. (2015). Heterologous expression of various PHA synthase genes in Rhodospirillum rubrum. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *29*(2), 75–85. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2249

Koller, M. (2019). Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? *The EuroBiotech Journal*, *3*(1), 32–44. https://doi.org/10.2478/ebtj-2019-0004

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, *37*, 24–38. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001

Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F. M., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., & Simpson, S. D. (2011). 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(15), 5467–5475. https://doi.org/10.1128/AEM.00355-11

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. *Bioengineering*, *4*(4), 55. https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of Bacillus megaterium. *J Biosci Bioeng*, *107*(3), 240–245. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006

Kutralam-Muniasamy, G., & Peréz-Guevara, F. (2018). Genome characteristics dictate poly-R-(3)-hydroxyalkanoate production in Cupriavidus necator H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(6), 1–23. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2460-5

LaCroix, R., Palsson, B., & Feist, A. (2017). A model for designing adaptive laboratory evolution experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(8), 1–14.

Lagoa-Costa, B., Abubackar, H. N., Fernández-Romasanta, M., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2017). Integrated bioconversion of syngas into bioethanol and biopolymers. *Bioresource Technology*, *239*, 244–249. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.019

Lee, A., & Fitzsimons, J. (1976). Motility in Normal and Filamentous Forms of Rhodospirillum rubrum. *Journal of General Microbiology*, *93*(2), 346–354. https://doi.org/10.1099/00221287-93-2-346

Lee, S. E., Li, Q. X., & Yu, J. (2009). Diverse protein regulations on PHA formation in Ralstonia eutropha on short chain organic acids. *International Journal of Biological Sciences*, *5*(3), 215–225. https://doi.org/10.7150/ijbs.5.215

Lemoigne, M. (1926). Products of dehydration and of polymerization of β-hydroxybutyric acid. *Bull Soc Chem Biol*, *8*, 770–782.

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*(2), 351–360. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1301-5

Leroy, B., De Meur, Q., Moulin, C., Wegria, G., & Wattiez, R. (2015). New insight into the photoheterotrophic growth of the isocytrate lyase-lacking purple bacterium Rhodospirillum rubrum on acetate. *Microbiology*, *161*(5), 1061–1072. https://doi.org/10.1099/mic.0.000067

Levis, N. A., & Pfennig, D. W. (2020). Plasticity-led evolution: A survey of developmental mechanisms and empirical tests. *Evolution and Development*, *22*(1–2), 71–87. https://doi.org/10.1111/ede.12309

Li, M., & Wilkins, M. (2020). Fed-batch cultivation and adding supplements to increase yields of polyhydroxybutyrate production by Cupriavidus necator from corn stover alkaline pretreatment liquor. *Bioresource Technology*, *299*, 122676. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122676

Li, Z., Yang, J., & Loh, X. J. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*, *8*(4), 1–20. https://doi.org/10.1038/am.2016.48

Lin, L., Xu, F., Ge, X., & Li, Y. (2019). Biological treatment of organic materials for energy and nutrients production—Anaerobic digestion and composting. In *Advances in Bioenergy* (1st ed.). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.04.002

Lindenkamp, N., Peplinski, K., Volodina, E., Ehrenreich, A., & Steinbüchel, A. (2010). Impact of Multiple β-Ketothiolase Deletion Mutations in Ralstonia eutropha H16 on the Composition of 3-Mercaptopropionic Acid-Containing Copolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(16), 5373–5382. https://doi.org/10.1128/AEM.01058-10

Lindenkamp, N., Schürmann, M., & Steinbüchel, A. (2013). A propionate CoA-transferase of Ralstonia eutropha H16 with broad substrate specificity catalyzing the CoA thioester formation of various carboxylic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(17), 7699–7709. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4624-9

Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. R., & Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β-oxidation pathway inhibited Pseudomonas putida. *Metabolic Engineering*, *13*(1), 11–17. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004

López-Cuellar, M. R., Alba-Flores, J., Rodríguez, J. N. G., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, *48*(1), 74–80. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016

Lu, J., Brigham, C. J., Li, S., & Sinskey, A. J. (2016). Ralstonia eutropha H16 as a Platform for the Production of Biofuels, Biodegradable Plastics, and Fine Chemicals from Diverse Carbon Resources. In *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*. Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00012-1

Luque, R., Menéndez, J. A., Arenillas, A., & Cot, J. (2012). Microwave-assisted pyrolysis of biomass feedstocks: the way forward? *Energy Environ. Sci.*, *5*(2), 5481–5488. https://doi.org/10.1039/C1EE02450G

Mannina, G., Presti, D., Montiel-jarillo, G., Carrera, J., & Suárez-ojeda, E. (2019). Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater : A review. *Bioresource Technology*, 122478. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478

Markl, E. (2018). PHB - Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, *2*(5), 206–209. https://doi.org/10.31031/ntnf.2018.02.000546

Martin, D. P., & Williams, S. F. (2003). Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*, *16*(2), 97–105. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00040-8

Mastroleo, F. (2009). *Molecular characterization of the life support bacterium Rhodospirillum rubrum S1H cultivated under space related environmental conditions*. Université de Mons-Hainaut.

Matsumoto, K., Aoki, E., Takase, K., Doi, Y., & Taguchi, S. (2006). In vivo and in vitro characterization of Ser477X mutations polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase 1 from Pseudomonas sp. 61-3: Effects of beneficial mutations on enzymatic activity, substrate specificity, and molecular weight of PHA. *Biomacromolecules*, *7*(8), 2436–2442. https://doi.org/10.1021/bm0602029

Matsumoto, K., & Taguchi, S. (2010). Enzymatic and whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: Toward the complete biological production of polylactate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(4), 921–932. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2374-0

Matsumoto, K., Takase, K., Yamamoto, Y., Doi, Y., & Taguchi, S. (2009). Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from ralstonia eutropha and aeromonas caviae enhances production of PHAs in recombinant escherichia coli. *Biomacromolecules*, *10*(4), 682–685. https://doi.org/10.1021/bm801386j

McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, *12*(12), 1–20. https://doi.org/10.3390/polym12122908

McDonald, M. J. (2019). Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Reports*, *20*(8), 1–14. https://doi.org/10.15252/embr.201846992

Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H., & Upadhyay, S. N. (2005). Synthesis of poly(lactic acid): A review. *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*, *45*(4), 325–349. https://doi.org/10.1080/15321790500304148

Meischel, M., Eichler, J., Martinelli, E., Karr, U., Weigel, J., Schmöller, G., Tschegg, E. K., Fischerauer, S., Weinberg, A. M., & Stanzl-Tschegg, S. E. (2016). Adhesive strength of bone-implant interfaces and in-vivo degradation of PHB composites for load-bearing applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *53*, 104–118. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.004

Mitra, R., Xu, T., Chen, G., Xiang, H., & Han, J. (2021). An updated overview on the regulatory circuits of polyhydroxyalkanoates synthesis. *Microbial Biotechnology*, 1751-7915.13915. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13915

Mohidin Batcha, A. F., Prasad, D. M. R., Khan, M. R., & Abdullah, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by Cupriavidus necator H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(5), 943–951. https://doi.org/10.1007/s00449-013-1066-4

Moretto, G., Russo, I., Bolzonella, D., Pavan, P., Majone, M., & Valentino, F. (2020). An urban biorefinery for food waste and biological sludge conversion into polyhydroxyalkanoates and biogas. *Water Research*, 115371. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115371

Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Cirne, D., Karabegovic, L., Gerardin, F., Johansson, P., Karlsson, A., Magnusson, P., Alexandersson, T., Bengtsson, S., Majone, M., & Werker, A. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, *69*(1), 177–184. https://doi.org/10.2166/wst.2013.643

Morgan-Sagastume, Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P., Werker, A., Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P., & Werker, A. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Research*, *44*(18), 5196–5211. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.043

Najafpour, G. D., & Younesi, H. (2007). Bioconversion of synthesis gas to hydrogen using a light-dependent photosynthetic bacterium, Rhodospirillum rubrum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(2), 275–284. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9225-2

Narancic, T., Cerrone, F., Beagan, N., & O'Connor, K. E. (2020). Recent advances in bioplastics: Application and biodegradation. *Polymers*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/POLYM12040920

Naser, A. Z., Deiab, I., & Darras, B. M. (2021). Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Advances*, *11*(28), 17151–17196. https://doi.org/10.1039/d1ra02390j

Navarro, R. R., Otsuka, Y., Nojiri, M., Ishizuka, S., Nakamura, M., Shikinaka, K., Matsuo, K., Sasaki, K., Sasaki, K., Kimbara, K., Nakashimada, Y., & Kato, J. (2018). Simultaneous enzymatic saccharification and comminution for the valorization of lignocellulosic biomass toward natural products. *BMC Biotechnology*, *18*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12896-018-0487-1

Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A. U., Walsh, M. K., & Miller, C. D. (2017). Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology*, *10*(6), 1338–1352. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12776

Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S. T., Babu, R., Werker, A., & O'Connor, K. E. (2013). Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 84). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407673-0.00004-7

Núñez, M. F., Kwon, O., Wilson, T. H., Aguilar, J., Baldoma, L., & Lin, E. C. C. (2002). Transport of -Lactate, -Lactate, and Glycolate by the LldP and GlcA Membrane Carriers of Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(2), 824–829. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6255

Nygaard, D., Yashchuk, O., Noseda, D. G., Araoz, B., & Hermida, É. B. (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type Cupriavidus necator from fructose. *Heliyon*, *7*(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05979

Obruca, S., Benesova, P., Oborna, J., & Marova, I. (2014). Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by Cupriavidus necator. *Biotechnology Letters*, *36*(4), 775–781. https://doi.org/10.1007/s10529-013-1407-z

Obruca, S., Marova, I., Snajdar, O., Mravcova, L., & Svoboda, Z. (2010). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Cupriavidus necator from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, *32*(12), 1925–1932. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0376-8

Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5883–5890. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5653-3

Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, *36*(3), 856–870. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006

Ochi, A., Matsumoto, K., Ooba, T., Sakai, K., Tsuge, T., & Taguchi, S. (2013). Engineering of class i lactate-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthases from Ralstonia eutropha that synthesize lactate-based polyester with a block nature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(8), 3441–3447. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4231-9

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. *New Biotechnology*, *37*, 69–79. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.008

Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., & Luengo, J. M. (2010). *Unusual PHA Biosynthesis* (Issue March 2016). https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_7

ONU Medio Ambiente. (2018). *El estado de los plásticos: Una hoja de ruta para la sostenibilidad.* 20.

Pais, J., Serafim, L. S., Freitas, F., & Reis, M. A. M. (2016). Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Haloferax mediterranei. *New Biotechnology*, *33*(1), 224–230. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.06.001

Park, S. J., Jang, Y.-A., Lee, H., Park, A.-R., Yang, J. E., Shin, J., Oh, Y. H., Song, B. K., Jegal, J., Lee, S. H., & Lee, S. Y. (2013). Metabolic engineering of Ralstonia eutropha for the biosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*, *20*, 20–28. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.002

Park, S. J., Lee, S. Y., Kim, T. W., Jung, Y. K., & Yang, T. H. (2012). Biosynthesis of lactate-containing polyesters by metabolically engineered bacteria. *Biotechnology Journal*, *7*(2), 199–212. https://doi.org/10.1002/biot.201100070

Pellicer, E., Nikolic, D., Sort, J., Baró, M. D., Zivic, F., Grujovic, N., Grujic, R., & Pelemis, S. (2017). Advances in applications of industrial biomaterials. *Advances in Applications of Industrial Biomaterials*, 1–214. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62767-0

Plastics Europe. (2020). Plastics: the Facts 2020. *PlasticEurope*, 16.

Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium Ralstonia eutropha H16. *Nature Biotechnology*, *24*(10), 1257–1262. https://doi.org/10.1038/nbt1244

Portnoy, V. A., Bezdan, D., & Zengler, K. (2011). Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(4), 590–594. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.007

Povolo, S., Toffano, P., Basaglia, M., & Casella, S. (2010). Polyhydroxyalkanoates production by engineered Cupriavidus necator from waste material containing lactose. *Bioresource Technology*, *101*(20), 7902–7907. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.029

Pramanik, A., Mitra, A., Arumugam, M., Bhattacharyya, A., Sadhukhan, S., Ray, A., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., & Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by Haloarcula marismortui. *Folia Microbiologica*, *57*(1), 71–79. https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3

Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., & Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in Pseudomonas putida. *Environmental Microbiology*, *18*(2), 341–357. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760

Ramos-Suarez, M., Zhang, Y., & Outram, V. (2021). Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 439–478). https://doi.org/10.1007/s11157-021-09566-0

Rathinasabapathy, A., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., & Pérez-Guevara, F. (2014). A feeding strategy for incorporation of canola derived medium-chain-length monomers into the PHA produced by wild-type Cupriavidus necator. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(4), 1409–1416. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1563-2

Reinecke, F., & Steinbüchel, A. (2008). Ralstonia eutropha strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *16*(1–2), 91–108. https://doi.org/10.1159/000142897

Revelles, Calvillo, I., Prieto, A., & Prieto, A. (2017). Syngas fermentation for polyhydroxyalkanoate production in Rhodospirillum rubrum. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols - Springer Protocols Handbooks* (pp. 105–119). https://doi.org/10.1007/8623_2015_168

Revelles, O., Tarazona, N., García, J. L., & Prieto, M. A. (2016). Carbon roadmap from syngas to polyhydroxyalkanoates in R hodospirillum rubrum. *Environmental Microbiology*, *18*(2), 708–720. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13087

Riaz, S., Fatima, N., Rasheed, A., Riaz, M., Anwar, F., & Khatoon, Y. (2018). Metabolic engineered biocatalyst: A solution for PLA based problems. *International Journal of Biomaterials*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/1963024

Riedel, S. L., Lu, J., Stahl, U., & Brigham, C. J. (2014). Lipid and fatty acid metabolism in Ralstonia eutropha: Relevance for the biotechnological production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(4), 1469–1483. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5430-8

Rivera-Briso, A. L., & Serrano-Aroca, Á. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. *Polymers*, *10*(7), 1–28. https://doi.org/10.3390/polym10070732

Rodrigues, A., Bordado, J. C., & Santos, R. G. dos. (2017). Upgrading the Glycerol from Biodiesel Production as a Source of Energy Carriers and Chemicals—A Technological Review for Three Chemical Pathways. *Energies*, *10*(11), 1817. https://doi.org/10.3390/en10111817

Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A. A., & Alonso-Fariñas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*, *205*, 215–230. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083

Rodríguez, A., Hernández-Herreros, N., García, J. L., & Auxiliadora Prieto, M. (2021). Enhancement of biohydrogen production rate in Rhodospirillum rubrum by a dynamic CO-feeding strategy using dark fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s13068-021-02017-6

Rohini, D., Phadnis, S., & Rawal, S. (2006). Synthesis and characterization of Poly-β-hydroxybutyrate from Bacillus thuringiensis R1. *Indian Journal of Biotechnology*, *5*(3), 276–283.

Salvador López, J. M., & Van Bogaert, I. N. A. (2021). Microbial fatty acid transport proteins and their biotechnological potential. *Biotechnology and Bioengineering*, *118*(6), 2184–2201. https://doi.org/10.1002/bit.27735

SAPEA Science Advice for Policy by European Academies. (2020). Biodegradability of Plastics in the Open Environment. In *Evidence Review Report* (Issue 8). https://doi.org/10.26356/biodegradabilityplastics

Schwarz, D., Schoenenwald, A. K. J., Dörrstein, J., Sterba, J., Kahoun, D., Fojtíková, P., Vilímek, J., Schieder, D., Zollfrank, C., & Sieber, V. (2018). Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate from grass silage by a two-stage fermentation process based on an integrated biorefinery concept. *Bioresource Technology*, *269*, 237–245. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.064

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(4), 615–628. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1757-y

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. *Biotechnology and Bioengineering*, *87*(2), 145–160. https://doi.org/10.1002/bit.20085

Serrano-Ruiz, J. C., Luque, R., Campelo, J. M., & Romero, A. A. (2012). Continuous-Flow Processes in Heterogeneously Catalyzed Transformations of Biomass Derivatives into Fuels and Chemicals. *Challenges*, *3*(2), 114–132. https://doi.org/10.3390/challe3020114

Shen, L., Hu, H., Ji, H., Cai, J., He, N., Li, Q., & Wang, Y. (2014). Production of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) from waste organics by the two-stage process: Focus on the intermediate volatile fatty acids. *Bioresource Technology*, *166*(422), 194–200. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.038

Shishatskaya, E. I., Kamendov, I. V., Starosvetsky, S. I., Vinnik, Y. S., Markelova, N. N., Shageev, A. A., Khorzhevsky, V. A., Peryanova, O. V., & Shumilova, A. A. (2014). An in vivo study of osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *42*(5), 344–355. https://doi.org/10.3109/21691401.2013.816312

Shozui, F., Matsumoto, K., Motohashi, R., Sun, J., Satoh, T., Kakuchi, T., & Taguchi, S. (2011). Biosynthesis of a lactate (LA)-based polyester with a 96mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation. *Polymer Degradation and Stability*, *96*(4), 499–504. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.01.007

Chemoautotroph Cupriavidus necator as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review, 340 Bioresource Technology 125693 (2021). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693

Stahel, W. R. (2016). The circular economy. *Nature*, *531*(7595), 435–438. https://doi.org/10.1038/531435a

Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, *226*, 278–288. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039

Sukphun, P., Sittijunda, S., & Reungsang, A. (2021). Volatile Fatty Acid Production from Organic Waste with the Emphasis on Membrane-Based Recovery. *Fermentation*, *7*(3), 159. https://doi.org/10.3390/fermentation7030159

Sun, X., Atiyeh, H. K., Huhnke, R. L., & Tanner, R. S. (2019). Syngas fermentation process development for production of biofuels and chemicals: A review. *Bioresource Technology Reports*, *7*, 100279. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100279

Szacherska, K., Oleskowicz-Popiel, P., Ciesielski, S., & Mozejko-Ciesielska, J. (2021). Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*, *13*(3), 1–21. https://doi.org/10.3390/polym13030321

Taguchi, S., Yamada, M., Matsumoto, K., Tajima, K., Satoh, Y., Munekata, M., Ohno, K., Kohda, K., Shimamura, T., Kambe, H., & Obata, S. (2008). A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(45), 17323–17327. https://doi.org/10.1073/pnas.0805653105

Tamisa, J., Luzkov, K., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C., Kleerebezem, R., Tamis, J., Luˇ, K., Jiang, Y., Loosdrecht, M. C. M. Van, & Kleerebezem, R. (2014). Enrichment of Plasticicumulans acidivorans at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *J Biotechnol*, 161–169. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.022

Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, *6*(3), 706–754. https://doi.org/10.3390/polym6030706

Tripathi, A. D., Raj Joshi, T., Kumar Srivastava, S., Darani, K. K., Khade, S., & Srivastava, J. (2019). Effect of nutritional supplements on bio-plastics (PHB) production utilizing sugar refinery waste with potential application in food packaging. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *49*(6), 567–577. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591982

Tsang, Y. F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y. S., Song, H., Kim, K. H., Kwon, E. E., & Jeon, Y. J. (2019). Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*, *127*(March), 625–644. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076

Tsuge, T. (2016). Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal*, *48*(11), 1051–1057. https://doi.org/10.1038/pj.2016.78

Tsuge, T., Tanaka, K., & Ishizaki, A. (2001). Development of a novel method for feeding a mixture of L-lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of Ralstonia eutropha for poly-D-3-hydroxybutyrate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*(6), 545–550. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80171-7

Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., & Majone, M. (2019). Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Combined Treatment of Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Sewage Sludge [Research-article]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *58*(27), 12149–12158. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01831

Volodina, E., Raberg, M., & Steinbüchel, A. (2016). Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of Ralstonia eutropha H16 for applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(6), 978–991. https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1079698

Volodina, E., Schürmann, M., Lindenkamp, N., & Steinbüchel, A. (2014). Characterization of propionate CoA-transferase from Ralstonia eutropha H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(8), 3579–3589. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5222-1

Wallen, L., & Rohwedder, W. (1974). *Poly-β-hydroxyalkanoate from activated.pdf*.

Wang, J, & Yu, J. (2001). Kinetic analysis on formation of poly(3-hydroxybutyrate) from acetic acid by Ralstonia eutropha under chemically defined conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *26*(3), 121–126. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000097

Wang, Jin, Yue, Z. B., Sheng, G. P., & Yu, H. Q. (2010). Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by Cupriavidus necator with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. *Biochemical Engineering Journal*, *49*(3), 422–428. https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.005

Xu, X. Y., Li, X. T., Peng, S. W., Xiao, J. F., Liu, C., Fang, G., Chen, K. C., & Chen, G. Q. (2010). The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials*, *31*(14), 3967–3975. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.132

Yamada, M., Matsumoto, K. N. I., Shimizu, K., Uramoto, S., Nakai, T., Shozui, F., & Taguchi, S. (2010). Adjustable Mutations in Lactate (LA)-Polymerizing Enzyme for the Microbial Production of LA-Based Polyesters with Tailor-Made Monomer Composition. *Biomacromolecules*, *11*(3), 815–819. https://doi.org/10.1021/bm901437z

Yang, T. H., Jung, Y. K., Kang, H. O., Kim, T. W., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2011). Tailor-made type II Pseudomonas PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(2), 603–614. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3077-2

Yang, T., Kim, T., Kang, H., Lee, S.-H., Lee, E. J., Lim, S.-C., Oh, S. O., Song, A.-J., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2010). Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(1), 150–160. https://doi.org/10.1002/bit.22547

Yang, Y. H., Brigham, C. J., Budde, C. F., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by Ralstonia eutropha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(6), 2037–2045. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2699-8

Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., & Hawari, J. (2007). Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by Alcaligenes latus from maple sap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(2), 269–274. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1158-7

Yu, J., & Si, Y. (2004). Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in Ralstonia eutropha on short chain fatty acids. *Biotechnology Progress*, *20*(4), 1015–1024. https://doi.org/10.1021/bp034380e

Yu, J., Si, Y., Keung, W., & Wong, W. K. R. (2002). Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by Ralstonia eutropha. *Process Biochemistry*, *37*(7), 731–738. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00264-3

Yu, J., & Stahl, H. (2008). Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*, *99*(17), 8042–8048. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.071

Yun, J. H., Sawant, S. S., & Kim, B. S. (2013). Production of polyhydroxyalkanoates by Ralstonia eutropha from volatile fatty acids. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *30*(12), 2223–2227. https://doi.org/10.1007/s11814-013-0190-9

Zhang, H., Wei, W., Zhang, J., Huang, S., & Xie, J. (2018). Enhancing enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by combinatorial pretreatment and Tween 80. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1313-7

Zher-Neoh, S., Fey Chek, M., Tiang Tan, H., Linares-Pastén, J. A., Nandakumar, A., Hakoshima, T., & Sudesh, K. (2022). Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.002

Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., & Xiao, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, *3*(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002

Zhu, H., Wakayama, T., Asada, Y., & Miyake, J. (2001). *Hydrogen production by four cultures with participation by anoxygenic phototrophic bacterium and anaerobic bacterium in the presence of NH4+*. *26*(11), 1149–1154. https://doi.org/10.1016/S0360-3199(01)00038-6

Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advances Drug Delivery Reviews*, *53*(1), 5–21. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6

Zumstein, M. T., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H. P. E., McNeill, K., & Sander, M. (2018). Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO2 and microbial biomass. *Science Advances*, *4*(7). https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9024

Anexos

8. ANEXOS

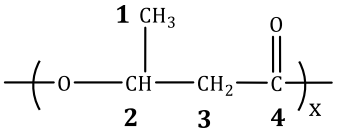
Material suplementario del Capítulo 1

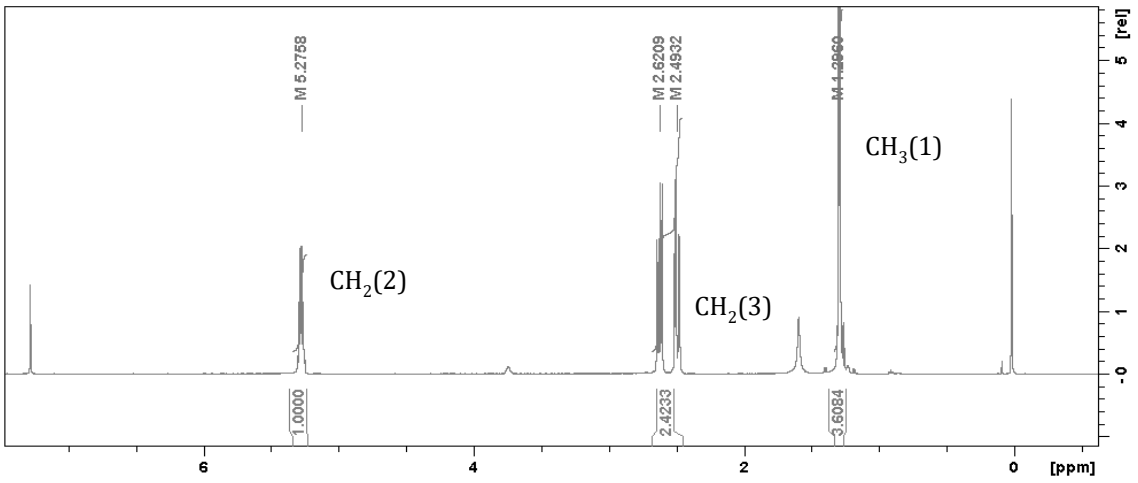
En la Figura 1 se muestran los espectros de RMN-^{1}H en $CDCl_3$ de los polímeros mostrados en la Figura 33A y 33C del Capítulo 1.

En la Figura 1A se observa cómo los protones del metilo (–CH_3 (1)) de la cadena lateral 3-HB se corresponden con un doblete a 1.3 ppm. La presencia de los protones de metileno (–CH_2 (3)) de la cadena principal de 3-HB se asignan mediante dos multipletes observados a aproximadamente 2.55 ppm. El metilo (–CH (2)) de la cadena principal del 3-HB correspondió a un multiplete observado en aproximadamente 5.2 ppm.

Por otro lado, el espectro de RMN-^{1}H mostrado en la Figura 1B, los protones de metilo (–CH_3 (1)) de la cadena lateral de 3-HB se corresponden con el doblete a 1.3 ppm, mientras que los protones de metilo (–CH_3 (5)) de la cadena lateral de 3-HV está representado por el triplete a 0.9 ppm. Los protones de metileno (–CH_2 (6)) de la cadena lateral 3-HV se corresponden con el multiplete a 1.6 ppm, y la presencia de protones de metileno (–CH_2 (3 y 8)) de la cadena principal de 3-HB y 3-HV se muestra mediante dos multipletes observados a aproximadamente 2.55 ppm. Los metinos (–CH (2 y 7) de la cadena principal de 3-HB y 3-HV se corresponden con dos multipletes, que se observaron a aproximadamente 5.2 ppm.

A





B

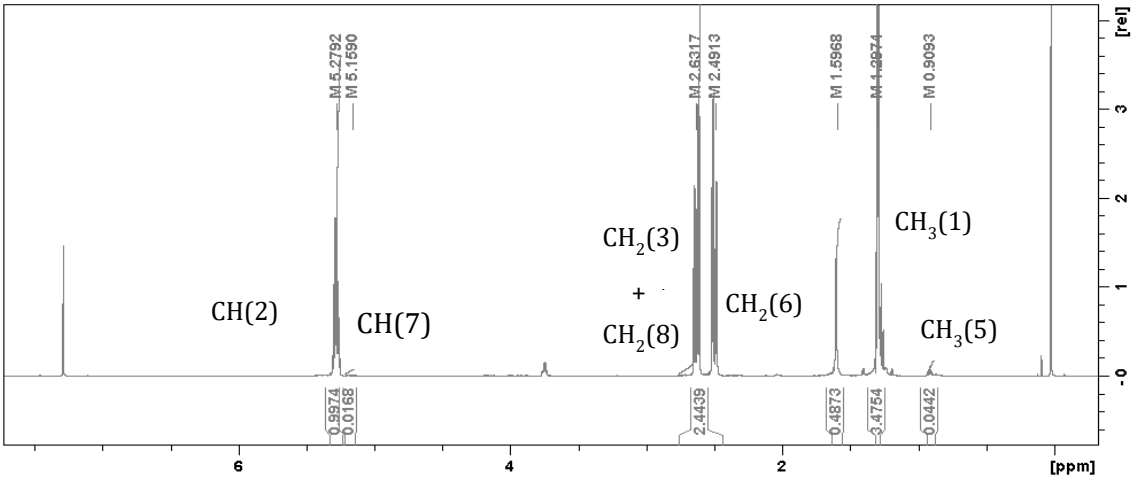


Figura Anexos 1. Espectros RMN-^{1}H de los polímeros obtenidos con los sustratos S2 y S3 en $CDCl_3$. El protocolo detallado se encuentra en el Apartado 3.10.6 de la sección Materiales y métodos. A) Polímero producido por *C. necator* H16 durante la FAC con el sustrato S2. b) Polímero producido por *C. necator* H16 durante la fermentación discontinua (D) con el sustrato S3.

Material suplementario del Capítulo 2

A continuación, se muestran los espectros de RMN obtenidos durante la caracterización del copolímero P(3HB-*co*-LA) producido por *C. necator* H16 llevado a cabo en el servicio de Resonancia Magnética del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas.

En el ^{1}H RMN (Figura 2A) se observan los desplazamientos correspondientes a los dos metil ésteres que componen el polímero: hidroxibutirato de metilo y lactato de metilo. Las asignaciones completas del espectro de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ serían los que se muestran en la Figura 24A. Los protones de metilo y de metileno de 3HB se asignan en δ1,2 y δ2,4 ppm, respectivamente, mientras que los protones del metino de 3HB encuentra en δ4,2 ppm. En el caso de los protones de metilo y metino de LA se asignan δ1,4 y δ4,3 ppm, respectivamente. Por otro lado, la Figura 24B muestra el espectro COSY y destaca la correlación entre enlaces de los protones que forman los monómeros. La señal ① muestra el acoplamiento entre el protón de metino de 3HB y los protones de metilo de 3HB la cual aparece en δ4,2 ppm / 1,2 ppm. El acoplamiento ② entre los protones de metileno y el metino de 3HB puede asignarse al pico que aparece a δ4,2 ppm / 2,4 ppm. El acoplamiento ③ entre el protón de metino y los protones de metilo de LA puede verse en el pico a δ4,3 ppm / 1,4 ppm.

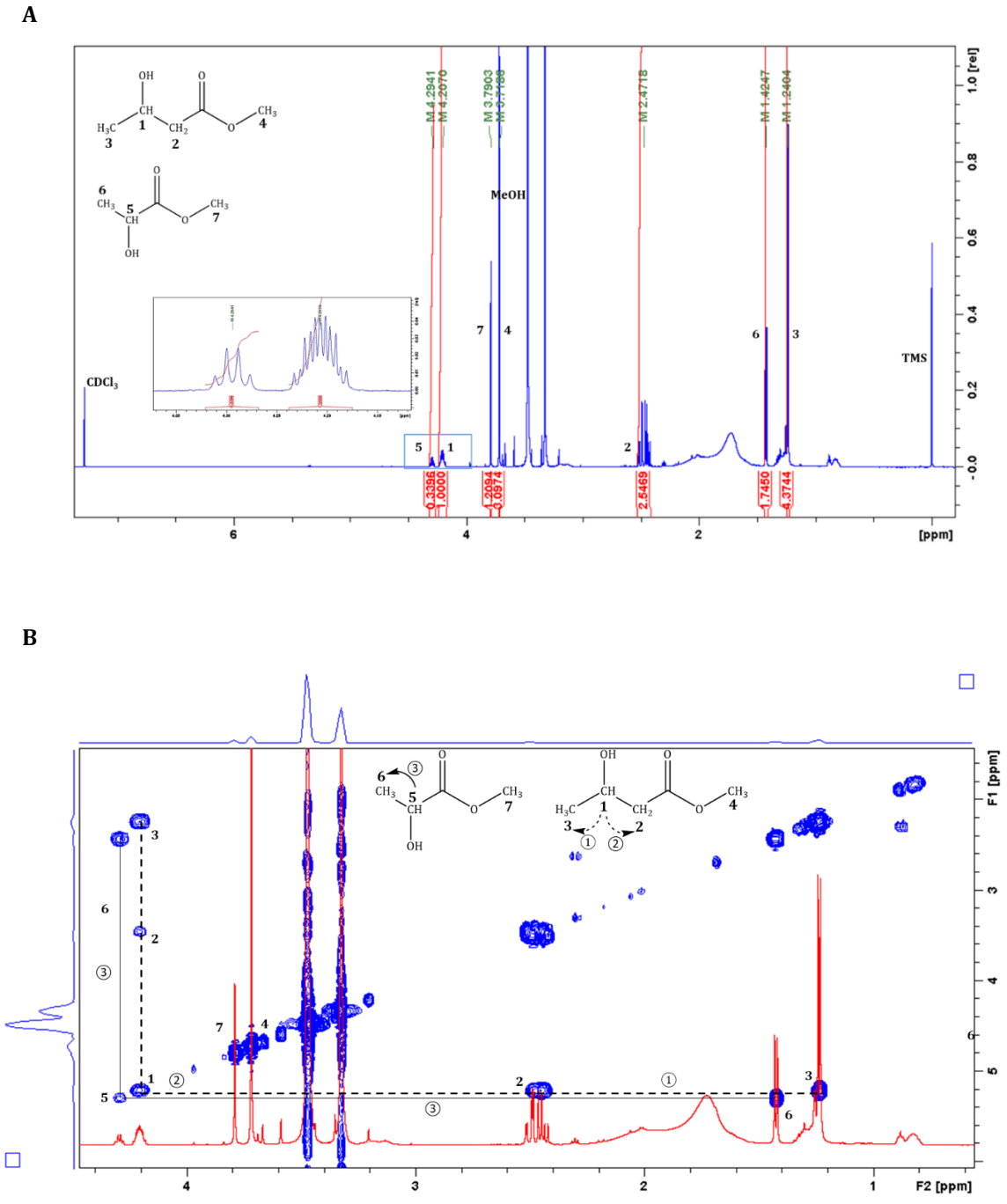


Figura Anexos 2. Análisis de la estructura del P(3HB-*co*-LA) producido por *C. necator* H16. A) ^{1}H RMN de la biomasa tras la reacción de metanólisis. B) Espectro ^{1}H–^{1}H COSY.

En la Figura 3 se muestran los espectros de TOCSY selectivos a una determinada frecuencia. En el caso (A) observamos que al seleccionar la frecuencia 4,3 ppm, la señal con la que correlaciona es la correspondiente al metilo del LA (1,4 ppm). En el caso (B) se selecciona la frecuencia 4.2 ppm, y en este caso la correlación de este protón es con el metileno (2,4 ppm) y los protones del metilo de 3HB (1,2 ppm).

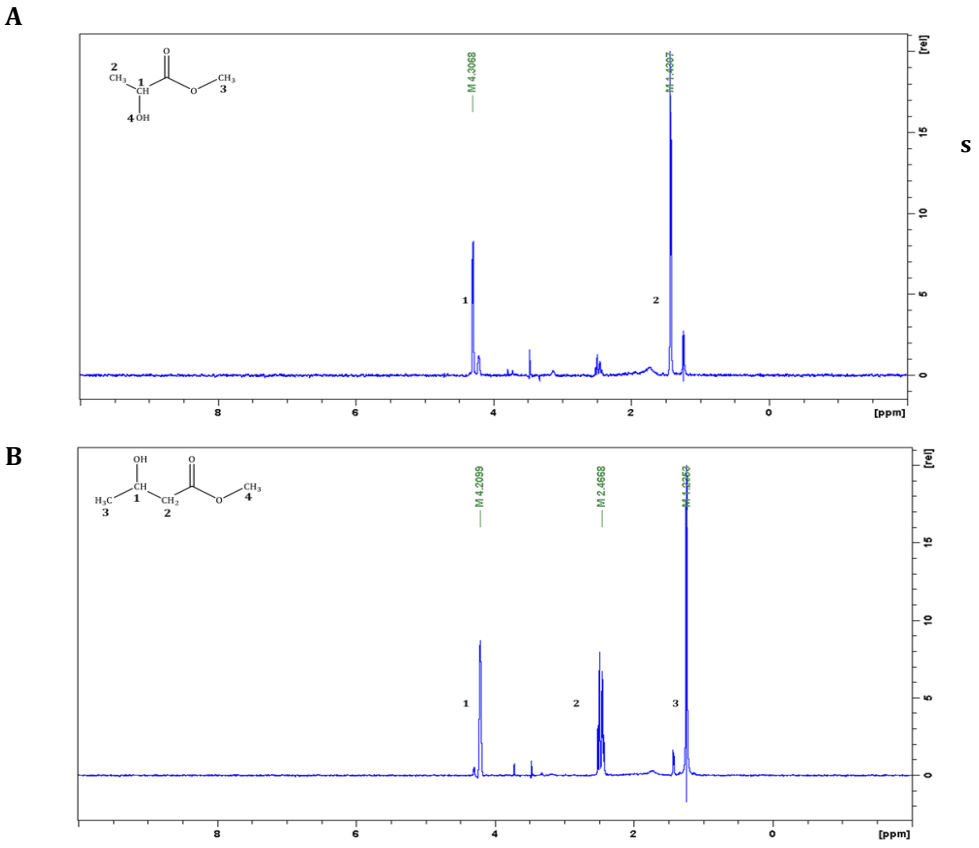


Figura Anexos 3. (A) Espectro TOCSY selectivo a la frecuencia 4.3 ppm y **(B)** espectro TOCSY selectivo a la frecuencia 4.2 ppm.

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q0KC00 (H16_A1331) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      ---MKVITAREAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTLVYSAG        57
tr|Q0KC00|H16_A1331      MNKVYASAAEALAGVVRDGQTIAVGGFGLCGIPEALIAALRD----SGAKQ-LTCIS---        52
                                  : . :*.  *.:*:** *:* .**  .*  **:  **.:    **  : ** :

tr|Q0K874|H16_A2718      QGDRGARGVNHFGNAG---------MTASIVGGHWRSATRLATLAMAEQCEGYNLPQGVL        108
tr|Q0KC00|H16_A1331      ----NNAGVDGFGLGLLLATRQISKMISSYVGEN----KEFERQYLAGELELEFTPQGTL        104
                                   .  **: ** .          * :* ** :    ..:    :* : *    ***.*

tr|Q0K874|H16_A2718      THLYRAIAGGKPGVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDF        168
tr|Q0KC00|H16_A1331      AEKLRAGGSGIPAFFTKTGVGTIVAE----------------------G----KEIREF        137
                               :.  ** ..* *..:** *: *:*                       *     :  :*

tr|Q0K874|H16_A2718      RGDEYLFYPSFPIHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHELLAMAQAAHNSGGIVIAQVES        228
tr|Q0KC00|H16_A1331      DGQQYVMERSLTADVALVKAYKADKAGNLVFRRTARNFNP-----MCAMAGKVTIAEVEH        192
                                *::*::  *:  . **::.  **  ***  :* * :.:       .  :* :.**:**

tr|Q0K874|H16_A2718      LVDHHEI-LQAIHVPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAP        287
tr|Q0KC00|H16_A1331      IVETGELDPDEIHLAGIFVKRLVLNTTPEKRIEQRTVRAAS--------------------        233
                               :*:  *:  : **: **:*. :*:  .* ::    :

tr|Q0K874|H16_A2718      VAAGPLDARTIVQRRAVMELARRAPRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIG        347
tr|Q0KC00|H16_A1331      ------------------------------------------------------------        233


tr|Q0K874|H16_A2718      GTPADGLSFGASAYPEAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEGA        407
tr|Q0KC00|H16_A1331      ------------------------------------------------------------        233


tr|Q0K874|H16_A2718      SIAGVGGFINITQSARAVVFMGTLTAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSFNG        467
tr|Q0KC00|H16_A1331      ------------------------------------------------------------        233


tr|Q0K874|H16_A2718      PYVASLGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQDL        527
tr|Q0KC00|H16_A1331      ------------------------------------------------------------        233


tr|Q0K874|H16_A2718      REMDARLFQAGPLHL                                              542
tr|Q0KC00|H16_A1331      ---------------                                              233
```

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q0KC00 (H16_A1332) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      MKVITAREAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTLVYSAGQGD        60
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      RGARGVNHFGNAGMTASIVGGHWRSATRLATLAMAEQCEGYNLPQGVLTHLYRAIAGGKP        120
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      GVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDFRGDEYLFYPSFP        180
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      IHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHELLAMAQAAHNSGGIVIAQVESLVDHHEILQAIH        240
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      VPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAPVAAGPLDARTIVQ        300
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      --------------------------------MAWTRDEMAA--------------------        10
                                                          *  :  .*

tr|Q0K874|H16_A2718      RRAVMELARRAPRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIGGTP--------AD        352
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      -RAATE--LQDGFYVNLGIGLPTLVANWVPE-GMEVW-LQSENGLLGIGPFPTEDEVDAD        65
                          **. *   :    ****:*:*: *.  . : *:: : *  * * :*  *        **

tr|Q0K874|H16_A2718      GLSFGA----SAYPEAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEGAS        408
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      MINAGKQTVTTLPGSSIFSSADSFAMIRGGHINLAILGAMQVSEKGDLANWMI---PGKM        122
                          :. *     :   .::...  .* : .** *:*****  ::. :*::    :    *

tr|Q0K874|H16_A2718      IAGVGGFINITQSARAVVFMGTLTAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSFNGP        468
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      VKGMGGAMDLVAGVGRVVVLMEHTA---KKKDGTEDIKILKDCN----------LPLTG-        168
                         : *:** :::. ..  **.:   **   : : *  .::*::: .          * :.*

tr|Q0K874|H16_A2718      YVASLGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQDLR        528
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      ----VGVVNRIITDLGVI-----DVTDEGLKLVETAPGVSREEIQ-AKTGAPLL------        212
                             :*:    **: .*:        :  *.*** ****. :.    : .:*:

tr|Q0K874|H16_A2718      EMDARLFQAGPLHL                                               542
tr|Q0KBZ9|H16_A1332      --------------                                               212
```

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q0K4S5 (H16_B0198) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      --MKVITA-REAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTLV-YSA        56
tr|Q0K4S5|H16_B0198      MINKLYDSVEAAVAGIHDGATILIGGFGLAGMPAELID----ALIEQG-ARDLTIVNNNA        55
                            *:  : . *.* ::** *:  .**  **    : :     :::.*  ****:*  .*

tr|Q0K874|H16_A2718      GQGDRGARGVNHFGNAGMTASIVGGHWRSAT--RLATLAMAEQCEGYNLPQGVLTHLYRA        114
tr|Q0K4S5|H16_B0198      GNGDTGLAALLKT---KRVRKIICSFPRQADSYVFDSLYHAGEIELELVPQGNLAERIRA        112
                         *:** *  .: :      . .*: .. *.*    : :*  * : *   :*** *:.  **

tr|Q0K874|H16_A2718      IAGGKPGVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDFRGDEYL        174
tr|Q0K4S5|H16_B0198      AGAGIGGFFTRTAYG----------------------TPLAEGKE----TRIIDGQGYV        145
                          ..*  *.:*: .                          :****     :  : *: *:

tr|Q0K874|H16_A2718      FYPSFPIHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHEL-LAMAQAAHNSGGIVIAQVESLVDHH        233
tr|Q0K4S5|H16_B0198      FETPIHADFALIKADTADRWGNLTYRKTARNFGPIMAMAAK------CAIVQVSHVVELG        199
                         *   :  . ***:. :**  ***: :: * :.   :***         .*.**. :*:

tr|Q0K874|H16_A2718      EI-LQAIHVPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAPVAAGP        292
tr|Q0K4S5|H16_B0198      EMDPEHIVTPGLFVKRVVKVA----------------------------------------        220
                         *:  : * .**::*. **

tr|Q0K874|H16_A2718      LDARTIVQRRAVMELARRAPRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIGGTPAD        352
tr|Q0K4S5|H16_B0198      ------------------------------------------------------------        220


tr|Q0K874|H16_A2718      GLSFGASAYPEAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEGASIAGV        412
tr|Q0K4S5|H16_B0198      ------------------------------------------------------------        220


tr|Q0K874|H16_A2718      GGFINITQSARAVVFMGTLTAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSFNGPYVAS        472
tr|Q0K4S5|H16_B0198      ------------------------------------------------------------        220


tr|Q0K874|H16_A2718      LGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQDLREMDA        532
tr|Q0K4S5|H16_B0198      ------------------------------------------------------------        220


tr|Q0K874|H16_A2718      RLFQAGPLHL                                                          542
tr|Q0K4S5|H16_B0198      ----------                                                          220
```

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q0K4S5 (H16_B0199) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      MKVITAREAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTLVYSAGQGD        60
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      RGARGVNHFGNAGMTASIVGGHWRSATRLATLAMAEQCEGYNLPQGVLTHLYRAIAGGKP        120
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      GVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDFRGDEYLFYPSFP        180
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      IHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHELLAMAQAAHNSGGIVIAQVESLVDHHEILQAIH        240
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      VPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAPVAAGPLDARTIVQ        300
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------------------------------------MQRLTR        6
                                                                                 : :.:

tr|Q0K874|H16_A2718      RRAV--MELARRAPRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIGGTP--ADGL--        354
tr|Q0K4S4|H16_B0199      DQMAARVAKDIPDGAVVNLGIGLPTLVGNHLPAD--KEILLHSENGLLGMGPAPAPGEED        64
                          : .  :        *****:*:*: **        . : *  * * :*  *  * *

tr|Q0K874|H16_A2718      --SFGASAYP------EAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEG        406
tr|Q0K4S4|H16_B0199      GDLINAGKQPVTVKPGGSFFHHADSFAMMRGGHLDFCVLGAFQVSEKGDL--ANWHTGAP        122
                            :.*.  *       :...:  .* : .** :*:.:**  ::. :*::  :::  *

tr|Q0K874|H16_A2718      ASIAGVGGFINITQSARAVVFMGTL-TAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSF        465
tr|Q0K4S4|H16_B0199      GAIPAVGGAMDLAIGAKQVFVMMEHQTKQGESKIVPQCTYPLTGIGCVTRIYTDLATID-        181
                         .:* .*** :::: .*: *..*    *  * .  . :    :.  * *.:*  ::: :.

tr|Q0K874|H16_A2718      NGPYVASLGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQ        525
tr|Q0K4S4|H16_B0199      ------------------------VTADGLVARDLVE---GLSFDE-LQRITGVPLKLAA        213
                                               . *** .   ***   *:.::. :    ..*: :*

tr|Q0K874|H16_A2718      DLREMDARLFQAGPLHL                                                542
tr|Q0K4S4|H16_B0199      -----------------                                                213
```

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q7WWV4 (PHG388) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      ---MKVITAREAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTL-VYSA        56
tr|Q7WWV4|PHG388         MIDKLYRTAREAMDDVPDGATIAIGGFGGAGMPDELIDALI----EQGA-KDLTVVSNNA        55
                               *****   * ** *:* .** ***  : : :**     :.*  :***:   .*

tr|Q0K874|H16_A2718      GQGDRGARGVNHFGNAGMTASIVGGH--WRSATRLATLAMAEQCEGYNLPQGVLTHLYRA        114
tr|Q7WWV4|PHG388         GNGDTGLAALLK---ARRVRKLVCSFPRQRDAYVFEELYRAGQIELEVVPQGTLAERLRA        112
                         *:** *  .: :   *  . .:* ..   *.*  :  *  * * *   :***.*:.  **

tr|Q0K874|H16_A2718      IAGGKPGVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDFRGDEYL        174
tr|Q7WWV4|PHG388         AGSGIGAFYTPTGYGTL----------------------LAEGK----ETRQIDGRGYV        145
                          ..*  .. *  *  *:                      :****    :: :: *  *:

tr|Q0K874|H16_A2718      FYPSFPIHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHEL-LAMAQAAHNSGGIVIAQVESLVDHH        233
tr|Q7WWV4|PHG388         LEYPLPVDVALINAAAADRWGNLIYNKTARNFAPVMAMAASQ------TIAAVARVCELG        199
                         :   :*:. ***..:***  ***  :: * :.   :*** :       .** *  : :

tr|Q0K874|H16_A2718      E-ILQAIHVPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAPVAAGP        292
tr|Q7WWV4|PHG388         ELDPEDVVTPGIFVSRVVLRDGAVAQAEVMQAG----------------------------        232
                         *   : : .***:*. **: *. . :  .:  .

tr|Q0K874|H16_A2718      LDARTIVQRRAVMELARRAPRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIGGTPAD        352
tr|Q7WWV4|PHG388         ------------------------------------------------------------        232


tr|Q0K874|H16_A2718      GLSFGASAYPEAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEGASIAGV        412
tr|Q7WWV4|PHG388         ------------------------------------------------------------        232


tr|Q0K874|H16_A2718      GGFINITQSARAVVFMGTLTAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSFNGPYVAS        472
tr|Q7WWV4|PHG388         ------------------------------------------------------------        232


tr|Q0K874|H16_A2718      LGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQDLREMDA        532
tr|Q7WWV4|PHG388         ------------------------------------------------------------        232


tr|Q0K874|H16_A2718      RLFQAGPLHL                                                          542
tr|Q7WWV4|PHG388         ----------                                                          232
```

Alineamiento de las secuencias Q0K874 (H16_A2718) y Q7WWV5 (PHG387) mediante Clustal Omega

```
tr|Q0K874|H16_A2718      MKVITAREAAALVQDGWTVASAGFVGAGHAEAVTEALEQRFLQSGLPRDLTLVYSAGQGD        60
tr|Q7WWV5|PHG387         ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      RGARGVNHFGNAGMTASIVGGHWRSATRLATLAMAEQCEGYNLPQGVLTHLYRAIAGGKP        120
tr|Q7WWV5|PHG387         ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      GVMTKIGLHTFVDPRTAQDARYHGGAVNERARQAIAEGKACWVDAVDFRGDEYLFYPSFP        180
tr|Q7WWV5|PHG387         ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      IHCALIRCTAADARGNLSTHREAFHHELLAMAQAAHNSGGIVIAQVESLVDHHEILQAIH        240
tr| Q7WWV5|PHG387         ------------------------------------------------------------        0


tr|Q0K874|H16_A2718      VPGILVDYVVVCDNPANHQMTFAESYNPAYVTPWQGEAAVAEAEAAPVAAGPLDARTIVQ        300
tr|Q7WWV5|PHG387         -------------------------------------------------MDQL-ARNMLA        10
                                                                              . * **.::

tr|Q0K874|H16_A2718      RRAVMELARR--APRVVNLGVGMPAAVGMLAHQAGLDGFTLTVEAGPIGGTPA-------        351
tr|Q7WWV5|PHG387         ----ARVARDIPDGSYVNLGIGLPTLVANHLP--RHREVILHSENGVLGQWSAAEPGQED        64
                              .:**       ****:*:*: *.          . *  * * :*   *

tr|Q0K874|H16_A2718      -DGLSFGAS----AYPEAVVDQPAQFDFYEGGGIDLAILGLAELDGHGNVNVSKFGEGEG        406
tr|Q7WWV5|PHG387         WDLINAGKEAIRLEQGAAFFHHADAFGMMRGGHLDICVLGAFQVSEQGDL--ANWHTGAP        122
                          * :. * .        *...:   *.: .** :*:.:**  ::. :*::  :::  *

tr|Q0K874|H16_A2718      ASIAGVGGFINITQSARAVVF-MGTLTAGGLEVRAGDGGLQIVREGRVKKIVPEVSHLSF        465
tr|Q7WWV5|PHG387         DAIPAVGGAMDLAIGARRVFVMMDHLTRDGASKLRRQCSYPLTGLRCVNRVYTELGTFAI        182
                          :* .*** :::: .** *.. *. ** .* .    : .  :.    *:::  *:. :::

tr|Q0K874|H16_A2718      NGPYVASLGIPVLYITERAVFEMRAGADGEARLTLVEIAPGVDLQRDVLDQCSTPIAVAQ        525
tr|Q7WWV5|PHG387         G-P----RGVSVI----------EAV--GDMSPQALQSVTDVELDFTTL-----------        214
                         . *     *: *:          .*   *:     :: . .*:*:  .*

tr|Q0K874|H16_A2718      DLREMDARLFQAGPLHL                                                542
tr|Q7WWV5|PHG387         -LRP----EYA------                                                220
                          **      :
```

Material suplementario del Capítulo 3

Biomasa total ($mg \cdot L^{-1}$)					
Tiempo (h)	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
RR02_01	73±27	330±24	511±24	664±34	840±25
V1	68±20	549±77	588±19	676±45	836±63
V2	42±20	598±16	876±21	883±42	896±51
V3	62±23	468±22	602±33	693±40	793±62
V4	186±60	589±30	814±12	870±23	880±25
V5	275±16	541±22	794±34	828±43	846±22
PHA (%)					
Tiempo (h)	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
RR02_01	7,6 ± 1,2	8,6 ± 2,4	8,1 ± 1,4	5,9 ± 3,2	2,0 ± 0,2
V1	8,1 ± 1,6	11,3 ± 0,4	9,8 ± 4	2,3 ± 1,0	3,3 ± 2,0
V2	6,2 ± 0,2	9,8 ± 1,0	9,4 ± 3,3	3,7 ± 1,1	2,6 ± 0,1
V3	8,2 ± 0,6	10,7 ± 1,5	10,4 ± 0,9	8,3 ± 2,2	2,5 ± 1,1
V4	8,8 ± 3,8	13,3 ± 1,5	8,5 ± 2,1	1,8 ± 0,6	1,4 ± 0,4
V5	9,4 ± 2,8	11,4 ± 0,7	7,6 ± 0,6	1,9 ± 0,6	2,6 ± 0,3
PHA ($mg \cdot L^{-1}$)					
Tiempo (h)	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
RR02_01	7,5 ± 1,8	44,8 ± 5,1	49,1 ± 2,8	28,1 ± 1,4	30,0 ± 3,2
V1	5,7 ± 1,2	40,1 ± 3,6	54,3 ± 8,2	42,9 ± 5,2	14,3 ± 2,0
V2	2,6 ± 0,6	58,8 ± 1,0	82,4 ± 3,3	32,9 ± 3,7	23,7 ± 0,8
V3	5,0 ± 1,7	54,8 ± 0,8	62,7 ± 8,8	40,5 ± 8,3	24,6 ± 1,3
V4	14,8 ± 0,4	77,8 ± 4,7	54,9 ± 1,2	28,1 ± 1,2	11,2 ± 3,6
V5	20,1 ± 1,0	62,7 ± 6,2	60,5 ± 4,1	14,3 ± 2,9	18,7 ± 3,2
Biomasa residual ($mg \cdot L^{-1}$)					
Tiempo (h)	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**
RR02_01	65 ± 20	285 ± 30	462 30	636 ± 20	810 ± 20
V1	62 ± 20	509 ± 10	534 ± 20	633 ± 60	822 ± 70
V2	40 ± 10	540 ± 60	794 ± 10	850 ± 30	873 ± 10
V3	57 ± 20	413 ± 10	540 ± 20	653 ± 20	769 ± 70
V4	177 ± 30	512 ± 40	759 ± 10	842 ± 10	869 ± 10
V5	255 ± 20	483 ± 70	734 ± 30	814 ± 50	828 ± 10

Tabla Anexos 1. Parámetros de crecimiento durante la fermentación del *syngas* con acetato. Se muestran los datos obtenidos para la biomasa total, la producción de PHA y la biomasa residual de la cepa parental RR02_01 y las 5 variantes adaptadas aisladas (V1-V5). Se muestra la desviación obtenida en 6 réplicas biológicas.