



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción sostenible de péptidos y PHAS a partir de biomasa crecida en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales.

Sustainable production of peptides and PHAs from biomass grown in wastewater treatment photobioreactors.

Autor: Belén Gómez Calderón

Tutores: Silvia Bolado y Natalia Pila

Curso 2023-2024

Valladolid, septiembre, 2024

Summary

This Work presents a preliminary experimental study of bioplastic production and peptide recovery from microalgae and bacteria biomass, grown in pig purine treatment photobioreactors.

The biomass has been hydrolyzed by different methods, obtaining the highest solubilizations with acid and alkaline hydrolysis at 121°C (~15 g/L of TOC and 4 g/L of TN), approximately double that with enzymatic hydrolysis assisted with ultrasound. The best growth results of the microorganism *Paracoccus denitrificans*, an organism capable of accumulating polyhydroxyalkanoates, were obtained with hydrolyzed acid diluted to 10% (1.68 g/L). The degradation compounds generated in the chemical hydrolyses inhibited the growth of the microorganism in alkaline hydrolyzate. The enzymatic hydrolyzate provided lower concentrations of microorganisms (0.95 g/L) but larger peptides, which could be separated by different techniques. Approximately 50% of the peptides in the enzymatic hydrolyzate were precipitated with acetone, ethanol, and ammonium sulfate.

Keywords: Bioplastics, carbohydrates, microalgae, piggery wastewater proteins, recovery, valorization.

Resumen

Este Trabajo presenta un estudio experimental preliminar de producción de bioplásticos y recuperación de péptidos a partir de biomasa de microalgas y bacterias, crecida en fotobiorreactores de tratamiento de purines de cerdo.

La biomasa ha sido hidrolizada por distintos métodos, obteniendo las mayores solubilizaciones con hidrólisis ácida y alcalina a 121°C (~15 g/L de TOC y 4 g/L de TN), aproximadamente el doble que con hidrólisis enzimática asistida con ultrasonidos. Los mejores resultados de crecimiento del microorganismo *Paracoccus denitrificans*, organismo capaz de acumular polihidroxicanoatos, se obtuvieron con hidrolizado ácido diluido al 10% (1,68 g/L). Los compuestos de degradación generados en las hidrólisis químicas inhibieron el crecimiento del microorganismo en hidrolizado alcalino. El hidrolizado enzimático proporcionó menores concentraciones de microorganismo (0,95 g/L) pero péptidos de mayor tamaño, que pudieron separarse por distintas técnicas. Aproximadamente el 50% de los péptidos del hidrolizado enzimático precipitaron con acetona, etanol y sulfato de amonio.

Palabras clave: Bioplásticos, carbohidratos, microalgas, proteínas, purines de cerdo, recuperación, valorización.

Agradecimientos

A la Universidad de Valladolid por hacer posible el funcionamiento del Máster a pesar de la situación sanitaria que aconteció en el curso 2021-2022.

A mi tutora Silvia y a mi tutora de laboratorio Natalia, por apoyarme, por la absoluta paciencia y por guiarme en todo momento en el seguimiento del trabajo y haberlo podido sacar adelante a pesar de las dificultades que ha habido para conseguir terminar dicho trabajo.

A mis padres y mi hermano por siempre demostrarme su apoyo incondicional y confiar en mi en todo momento.

A mi familia, por ser otro gran apoyo durante todos los años de estudiante y como persona.

A mis amigos, por respetarme en cada momento, hacer que desconecte cuando lo he necesitado y seguir dándome ánimos hasta el final.

A mi pareja, por seguir alentándome a pesar de que muchas veces he querido abandonar y por darme ese cariño que he necesitado en todo momento para continuar este proyecto.

A mis compañeros de Máster, por haberme ayudado en todo lo que han podido y he necesitado.

A Sara Sanz, por ser mi pilar fundamental siempre, confiar en mi más que yo misma, aguantar mis quejas y ayudarme en todo lo que ha podido.

ÍNDICE

Capítulo 1.....	1
1 Introducción.....	1
1.1 La biomasa microalgal	4
1.2 Hidrólisis de biomasa algal	5
1.3 Separación de péptidos	7
1.4 Hidrolizados de biomasa algal: sustrato para producir PHAs.....	8
1.5 Polímeros biodegradables.....	9
1.6 Polihidroxialcanoatos.....	9
Capítulo 2.....	12
2 Objetivos.....	12
3 Materiales y métodos	13
3.1 Biomasa microalgal empleada	13
3.2 Hidrólisis de biomasa algal	13
3.3 Experimentos de crecimiento de microorganismos.....	15
3.4 Métodos de separación de péptidos	16
3.5 Métodos analíticos	18
4 Resultados y discusión.....	20
4.1 Composición de la biomasa	20
4.2 Composición de los hidrolizados	21
4.3 Precipitación de péptidos en los hidrolizados de microalgas	26
Capítulo 3.....	31
5 Conclusiones.....	31
6 Anexos	33
7 Bibliografía	40

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición macromolecular en % base seca del consorcio microalgas-bacterias (Elaboración propia).....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. Perfil de aminoácidos presentes en los tres tipos de hidrolizados de biomasa algal (Elaboración propia).....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 3. Crecimiento de Paracoccus denitrificans en diferentes tipos de hidrolizados a distintas concentraciones (Elaboración propia).....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 4. Ensayo 1: Hidrólisis. (Elaboración propia).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 5. Ensayo 2: Precipitación de los péptidos de los hidrolizados. (Elaboración propia).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 6. Ejemplos de composiciones de biomasa de plantas de aguas residuales como porcentajes de masa en base seca. (Elaboración propia).....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 7. Características de los lípidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia).....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 8. Características de las proteínas de la masa algal del estudio. (Elaboración propia).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 9. Características de los carbohidratos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 10. Características de los sólidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 11. Características de los sólidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 12. Composición en base seca de la masa algal. (Elaboración propia).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 13. Composición en base seca sin cenizas. (Elaboración propia).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 14. Concentraciones de Carbohidratos. (Elaboración propia).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 15. Determinación de TOC, Carbono Inorgánico y NT. (Elaboración propia).....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 16. Fracción líquida de los hidrolizados después de la precipitación. (Elaboración propia).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 17. Caracterización muestra. (Elaboración propia).....</i>	<i>39</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Diagrama general de tratamiento de aguas residuales (LLuesma Vidal,2022)</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Fotobiorreactor cerrado para el crecimiento de microalgas (Estévez et al, ,2021)</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Producción global de bioplásticos 2023-2028. (European Bioplastics-nova-Institute,2023).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Estructura general de un monómero de PHA (Dobrogojski et al.,2018)</i>	<i>10</i>
<i>Figura 5. Composición del carbono orgánico total y nitrógeno total en hidrolizados (g/ L) (Elaboración propia).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6. Péptidos (g/L) presentes en las fracciones líquidas (FL) y precipitado proteico (PP)* (Elaboración propia).....</i>	<i>27</i>

Capítulo 1

1 Introducción

El aumento de la población mundial, junto con la agricultura y la ganadería intensivas y la rápida industrialización, está provocando un incremento significativo en la generación de aguas residuales, lo cual, sumado a los problemas de suministro de agua limpia en países subdesarrollados, está planteando un grave problema para la sociedad (Sousa *et al.*, 2018). Estas aguas contienen un gran número de contaminantes orgánicos e inorgánicos, elevada demanda biológica y química de oxígeno (DBO y DQO), además de otros compuestos como microplásticos, metales pesados, nitratos y fosfatos entre otros, influyendo directamente en la calidad del agua de consumo contribuyendo a la generación de problemas relacionados con la salud humana en zonas aledañas a la descarga de efluente (Wollmann *et al.*, 2019, Chai *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, el tratamiento de aguas residuales se realiza en tres etapas (**Figura 1**). Una primera etapa de eliminación de materiales por sedimentación, seguida por la segunda etapa de eliminación de la materia orgánica por degradación-oxidación mediante procesos físicos o biológicos (Rambabu *et al.*, 2021). La tercera y última etapa consiste en la reducción de nitratos, fosfatos y el resto de la materia orgánica, etapa esencial para obtener efluentes de agua limpia e inocuos (Chai *et al.*, 2021). La principal limitante de estos procesos es el elevado costo energético o el impacto ambiental (alta huella de carbono y pérdida de nutrientes) que supone, sumado a los altos costes que conlleva la eliminación de nitrógeno o fósforo, lo que hace que exista una elevada demanda de procesos de tratamiento de aguas residuales alternativos (Mohamad *et al.*, 2017).

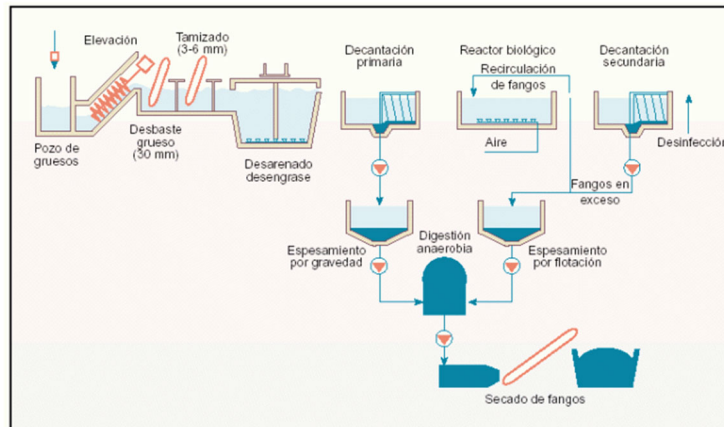


Figura 1. Diagrama general de tratamiento de aguas residuales (LLuesma Vidal, 2022)

La producción ganadera, especialmente en el sector porcino, genera grandes volúmenes de aguas residuales que presentan una alta carga de materia orgánica y elevadas concentraciones de nitrógeno. Este hecho ha llevado a un creciente interés en la gestión y tratamiento de estas aguas para prevenir problemas ambientales y aprovechar sus nutrientes (Su *et al.*, 2020). La utilización de microalgas en biorreactores fotosintéticos se ha propuesto como una alternativa innovadora a los métodos tradicionales, como el tratamiento con fangos biológicos, debido a su capacidad para recuperar nutrientes, como nitrógeno y fósforo, y su potencial para generar biomasa valiosa (García *et al.*, 2018). El tratamiento de aguas residuales con microalgas no solo ayuda a reducir la contaminación, sino que también puede contribuir a la producción de biocombustibles, fertilizantes, piensos u otros productos de valor añadido. Así, el uso de biorreactores fotosintéticos se presenta como una solución eficiente para la gestión de residuos en la industria porcina, alineándose con las políticas de economía circular y sostenibilidad ambiental.

Es cierto que la utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales implica una interacción compleja entre estos organismos y las bacterias presentes en el medio, dando lugar a la formación de un consorcio microalga-bacteria. (Shahid *et al.*, 2020). Dado que en estos sistemas no se pueden mantener condiciones estériles, el consorcio que predominará en los reactores será aquel que se forme de manera natural, dependiendo de la composición del agua residual, las condiciones ambientales, el diseño del reactor y las condiciones de operación (Acién Fernández *et al.*, 2018).

En este sentido, los fotobiorreactores en los que crecen simbióticamente microalgas y bacterias surgen como una alternativa prometedora en el tratamiento de aguas residuales con elevado contenido de nitrógeno y fósforo (**Figura 2**). Las microalgas requieren de nitrógeno y fósforo para la síntesis de proteínas y metales, como micronutrientes para su crecimiento, por lo que muestran una gran capacidad de absorción de nutrientes. En numerosas investigaciones realizadas se ha observado una considerable disminución del nivel de metales pesados, nitratos y fosfatos en las aguas residuales que han estado en contacto con microalgas (Chai *et al.*, 2021). Estos sistemas proporcionan también elevadas eliminaciones de microcontaminantes pesados, debido a la compleja variedad de grupos funcionales presentes en las paredes celulares (Plöhn *et al.*, 2021).

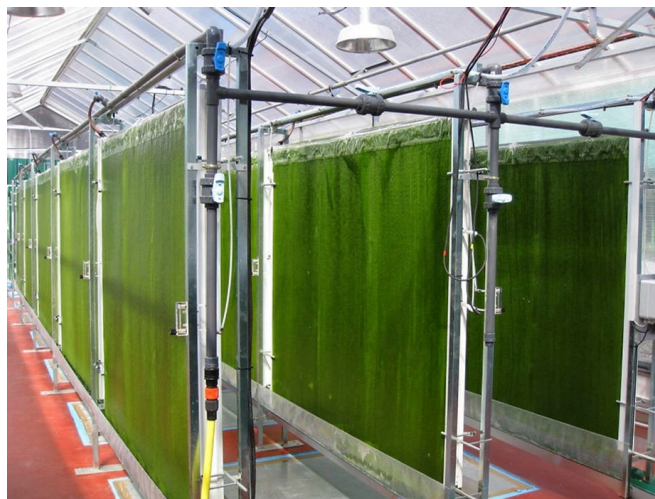


Figura 2. Fotobiorreactor cerrado para el crecimiento de microalgas (Estévez et al., 2021)

En términos de economía circular, la biomasa producida en plantas de tratamiento de aguas residuales tiene la característica de ser más sostenible. Durante los tratamientos aeróbicos biológicos, las microalgas pueden fijar el CO₂ y, al mismo tiempo, producen el O₂ que necesitan las bacterias aeróbicas, ahorrando costos de aireación y fijando el CO₂ en el proceso. Esta tecnología y, en concreto, la biomasa generada se ha revelado como una fuente prometedora de carbono y nutrientes útiles para la obtención de bioproductos valiosos. En este marco, la biomasa de microalgas cultivada en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales es una fuente potencial de carbono para la producción de bioplásticos como los polihidroxialcanoatos (PHAs) y de péptidos de interés agrícola o industrial.

1.1 La biomasa microalgal

Las microalgas son organismos fotosintéticos compuestos por proteínas, carbohidratos o lípidos, entre otros productos orgánicos generados utilizando energía solar, CO₂ y nutrientes de un medio acuático (Rojo *et al.*, 2023). Uno de los primeros usos de la biomasa de algas se dio a principio de 1950 como fuente de proteínas alternativa, y en esos años comenzó a utilizarse también en la limpieza de aguas residuales en Estados Unidos. Pero no fue hasta la década del sesenta que comenzó la producción a gran escala (Spolaore *et al.*, 2006).

Respecto a su composición, las microalgas, y especialmente las crecidas en aguas residuales, tienen un elevado contenido en proteínas, con un patrón de aminoácidos que en la mayoría de casos se asemeja al de las proteínas alimentarias (Guil Guerrero *et al.*, 2004). Respecto a su contenido en hidratos de carbono, los principales que se encuentran son almidón, glucosa y diversos azúcares y polisacáridos, con una digestibilidad global alta (Spolaore *et al.*, 2006). El contenido en lípidos de las microalgas es muy variable, pudiendo ir desde el 1% hasta el 70%, aunque suele encontrarse en concentraciones entorno al 10% en biomasa algal crecida en aguas residuales. Los lípidos que aparecen en las microalgas son principalmente glicerol, y también aparecen bases esterificadas en ácidos grasos saturados o insaturados (Brown *et al.*, 1997). Las microalgas tienen un elevado contenido de muchas vitaminas esenciales, como la A, B1, B2, B6, B12, C o E, así como biotina o ácido fólico, entre otras (Brown *et al.*, 1999). Las microalgas son también ricas en diversos pigmentos, como pueden ser la clorofila o los carotenoides (Spolaore *et al.*, 2006).

La riqueza de la biomasa de microalgas la convierte en una fuente susceptible de utilización en numerosos procesos, por ello, los procesos de biorrefinería de microalgas se han propuesto como una alternativa muy prometedora para extraer biocompuestos de forma secuencial (Ansari *et al.* 2017; Vanthoor-Koopmans *et al.* 2013). El primer paso para una valorización integral de la biomasa algal es la ruptura de la pared celular con el objetivo de maximizar la solubilización de los componentes

intracelulares minimizando las pérdidas y la degradación de los componentes a extraer (Rojo *et al.*, 2021).

1.2 Hidrólisis de biomasa algal

Las microalgas se han utilizado en los últimos años como fuente de carbono para la fermentación de microorganismos (Kumar *et al.*, 2020; Kusmayadi *et al.*, 2023). La falta de lignina en la pared celular de las microalgas permite una extracción de azúcar más sencilla en comparación con la biomasa lignocelulósica, pero es necesario un pretratamiento para hidrolizar los macrocomponentes como proteínas y polisacáridos y liberar los péptidos y azúcares fermentables, aumentando la accesibilidad al carbono para el crecimiento de los microorganismos (Kumar *et al.*, 2020a; Pittmann & Steinmetz, 2016).

En comparación con los carbohidratos y los lípidos, la extracción y estabilización de la fracción proteica puede ser más desafiante debido a su sensibilidad a las condiciones extremas como el pH bajo y altas temperaturas, sumado al hecho de que las proteínas presentes en la biomasa pueden ser valiosas desde un punto de vista económico y nutricional (Lorenzo-Hernando *et al.*, 2019).

La extracción de proteínas a partir de biomasa cultivada en agua residual es un enfoque valioso dentro de las biorrefinerías, aunque presenta ciertas limitaciones para el uso de estas proteínas en el consumo humano debido a la calidad del medio. Sin embargo, estas proteínas pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones comerciales. Por ejemplo, pueden servir como alimento para animales, lo que ayudaría a mejorar la sostenibilidad de la producción ganadera al aprovechar recursos que de otro modo se desperdiciarían (Hashemian *et al.*, 2019). También pueden ser transformadas en biofertilizantes, contribuyendo a la agricultura sostenible al devolver nutrientes al suelo (Bleakley y Hayes, 2017; Lorenzo-Hernando *et al.*, 2019). De hecho, estudios recientes han demostrado que la mejor secuencia de biorrefinería de biomasa de microalgas es sin duda una extracción primaria de proteínas seguida de la extracción de lípidos y carbohidratos, esta secuencia disminuye las pérdidas de proteínas, mejorando la calidad de los productos obtenidos (Amorim *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilizar los azúcares fermentables, obtenidos de la hidrólisis de la biomasa, para la síntesis de polímeros valiosos, la relación carbono/nitrógeno (C/N) en el medio de cultivo es un factor crucial a considerar. Cuando se eliminan las proteínas, que son una fuente rica en nitrógeno, se incrementa la relación C/N del medio. Este aumento puede favorecer la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHAs), ya que muchos microorganismos utilizan el exceso de carbono para sintetizar este biopolímero en condiciones de limitación de nitrógeno (Valencia *et al.*, 2021).

Rojo *et al.*, (2023) compararon diferentes métodos de hidrólisis del consorcio microalga-bacteria cultivado en aguas residuales de purines, informando recuperaciones elevadas de monosacáridos, 86,8% para hidrólisis ácida y 82,3% para hidrólisis alcalina. En relación a la fracción peptídica, la hidrólisis alcalina es la que reporto mayores valores de recuperación (81%) mientras que la acida resultó en elevada rotura de las proteínas, dando lugar a un elevado porcentaje de aminoácidos en el hidrolizado.

Otro método, la extracción enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE), resultó en recuperaciones de monosacáridos más bajas (45,2%) pero permitió la recuperación del 43,6% de las proteínas como péptidos, con la ventaja adicional de ser de gran tamaño (135 kDa) y un 46,7% de pureza peptídica. Los péptidos de elevado tamaño presentan propiedades funcionales muy interesantes para su aplicación a nivel industrial. Esta alternativa podría ser de gran interés en un enfoque de biorrefinería que integre la valorización fraccionada de los diferentes componentes de la biomasa de microalgas, ya que permitiría aprovechar buenos retornos económicos de la producción de péptidos de alto tamaño molecular, a la par que se podrían utilizar los azúcares fermentables en la síntesis de polímeros por fermentación microbiana (Rojo *et al.*, 2023).

1.3 Separación de péptidos

La separación de los péptidos provenientes de la liberación de la fracción proteica de la biomasa algal de otros componentes liberados, como carbohidratos y lípidos, es un proceso crucial en la valorización de estas biomoléculas. Una estrategia ampliamente utilizada se basa en alterar la solubilidad de las proteínas en agua, para conseguir la precipitación y separación de estas biomoléculas por centrifugación posterior (Amorim *et al.*, 2021).

La dispersabilidad de las proteínas en agua depende, básicamente, de la relación entre las interacciones proteína-proteína y proteína-agua, y los factores que disminuyen las interacciones proteína-agua o aumentan las interacciones proteína-proteína inducen la agregación de las proteínas. Los parámetros más importantes para alterar estas interacciones son la fuerza iónica y el pH. En sistemas con altas concentraciones de sales, las proteínas compiten con las sales por las moléculas de agua reduciendo las interacciones proteína-agua y la dispersabilidad de las proteínas, esto se llama *salting out* (Corrêa *et al.*, 2020). El ajuste del pH es un proceso simple y de bajo costo con gran escalabilidad que mejora la dispersión de las proteínas. El grado de dispersabilidad de las proteínas disminuye a medida que el pH está cerca de sus puntos isoeléctricos lo que resulta en mayores interacciones entre estas (Amorim *et al.*, 2021).

Otra propiedad que es ampliamente utilizada para separar proteínas es la precipitación por desnaturalización mediando el agregado de ácido tricloroacético (TCA). El TCA es un agente desnaturalizante que provoca la coagulación de las proteínas. Cuando se añade a una solución que contiene proteínas, el cambio en la pH y el aumento de la concentración de ácido conducen a la desnaturalización de las proteínas, lo que hace que pierdan su conformación nativa. Esto promueve la agregación de las proteínas (Spínola *et al.*, 2023). El agregado de solventes orgánicos (acetona, etanol, entre otros) tienen también la propiedad de deshidratar y desnaturalizar las proteínas.

Estos solventes tienden a romper las interacciones no covalentes, como los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones iónicas que mantienen la estructura tridimensional de las proteínas. La aplicación de estos solventes a baja temperatura puede ser particularmente beneficiosa. A temperaturas más bajas, la actividad térmica se reduce, lo que puede ayudar a preservar ciertas características estructurales de la proteína, permitiendo una mejor manipulación de la estructura (Wang *et al.*, 2003). Esto puede ser crucial en la purificación o en la extracción de proteínas, donde se busca mantener la actividad biológica de la proteína (Grossmann *et al.*, 2018).

En conclusión, el control de la solubilidad y la manipulación de las condiciones del medio son herramientas clave para la separación eficiente de proteínas de microalgas, permitiendo su aprovechamiento en diversas aplicaciones biotecnológicas y alimentarias.

1.4 Hidrolizados de biomasa algal: sustrato para producir PHAs

A pesar de la gran versatilidad de esta biomasa, la información disponible sobre la utilización de biomasa de microalgas para la producción de PHAs es bastante limitada. En este sentido, Kumar *et al.*, (2020) utilizando biomasa de microalgas desgrasada (DAB) de un consorcio compuesto por *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. reportaron una producción de 0,42 g PHB/g DAB utilizando consorcio bacteriano mixto enriquecido. Por otro lado, Kusmayadi *et al.*, (2023) utilizaron *Chlorella sorokiniana* SU-1 cultivada en fotobiorreactor utilizando aguas residuales diarias como medio de cultivo, la biomasa de microalgas se hidrolizó con ácido sulfúrico y se utilizó como medio de cultivo para la fermentación por levaduras (*Rodotorula glutinis*) reportando una producción de 1,85 g/L PHB. Sin embargo, a pesar del alto porcentaje de solubilización de carbohidratos reportado en la bibliografía (Lorenzo-Hernando *et al.*, 2019; Martín-Juárez *et al.*, 2019; Martín Juárez *et al.*, 2021; Rojo *et al.*, 2023) no se encontró información sobre tecnologías que realicen el aprovechamiento integral del hidrolizado de biomasa de consorcios microalgales-bacterias, cultivadas en fotobiorreactores utilizados para la remediación de aguas residuales, como sustrato para la fermentación bacteriana y producción de PHAs.

1.5 Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables podrían producirse, a partir de biomasa residual, uno de los recursos más abundantes renovables y sostenibles en un proceso neutral de carbono. En este sentido, en los últimos años se han alcanzado avances significativos en biotecnología para la producción de polímeros biodegradables a partir de recursos renovables con el objetivo de cero residuos plásticos y cero emisiones netas de carbono (Sohn *et al.*, 2022).

Los bioplásticos aparecen en el mercado como una alternativa tentadora para reemplazar a los plásticos convencionales, siendo los polihidroxicanoatos (PHAs) unos de los principales bioplásticos. En la decimoquinta conferencia de *European Bioplastics* se ha realizado un análisis de mercado que pronostica el crecimiento de la producción global de los bioplásticos durante los próximos 5 años, que se muestra **Figura 3:**

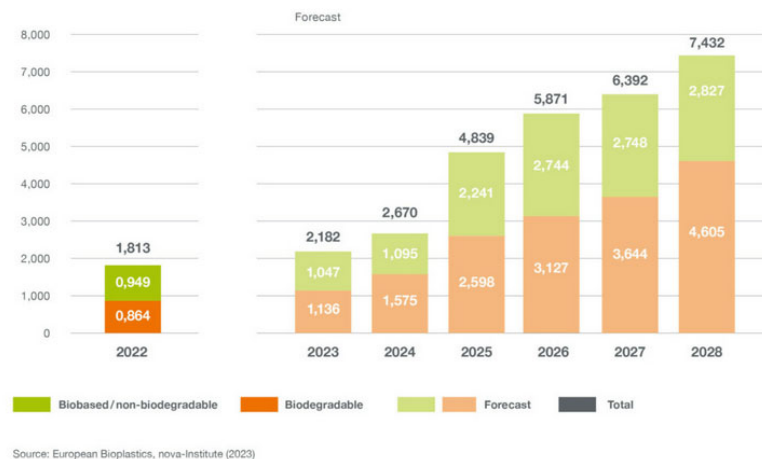


Figura 3. Producción global de bioplásticos 2023-2028. (European Bioplastics-nova-Institute, 2023)

1.6 Polihidroxicanoatos

Los PHAs son una familia de polímeros biodegradables, que son acumulados por una amplia gama de bacterias como compuestos de almacenamiento, cuando se cultivan en condiciones de exceso de carbono y nitrógeno limitado (Kumar *et al.*, 2020; Bordel *et al.*, 2021).

Se caracterizan por su rápida y completa biodegradabilidad en el medio ambiente sin la generación de compuestos tóxicos (Kalaiyezhini & Ramachandran, 2015). Además, son biocompatibles y su producción es natural (Bordel *et al.*, 2021). En la **Figura 4**, se muestra la estructura general de un monómero de PHA (Dobrogojski *et al.*, 2018).

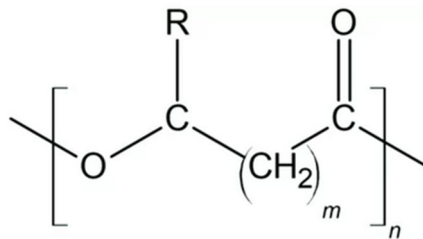


Figura 4. Estructura general de un monómero de PHA (Dobrogojski et al., 2018)

Existen más de 150 tipos de PHA, entre los que el polihidroxiбутирато (PHB) es el más abundante y ampliamente estudiado (Kusmayadi *et al.*, 2023). Los PHAs, muestran un gran potencial como sustituto de los plásticos derivados del petróleo, ya que son respetuosos con el medio ambiente, no tóxicos y biocompatibles (Kumar *et al.*, 2020a). A pesar de todas las ventajas de los PHAs sobre los plásticos convencionales, la producción a gran escala es limitada debido a sus altos costos productivos, lo que representa la principal barrera en la expansión del mercado de PHA (Chavan *et al.*, 2021; Kalia *et al.*, 2021).

El costo de las materias primas, principalmente la fuente de carbono utilizada como medio de cultivo de microorganismos, representa la principal limitación para la producción de PHA, contribuyendo hasta el 30-50% de los costos generales de producción de PHA (Crutchik *et al.*, 2020; Kourmentza *et al.*, 2018).

Para superar estos problemas, se han explorado fuentes alternativas de carbono para usar como sustrato, como glicerol crudo, ácidos grasos de biodiesel, desechos de origen animal, aceite de cocina usado, destilado de aceite de oliva, efluente de molienda de aceite de palma, jugo de prensa de pasto ensilado rico en manitol o subproductos de la producción de sidra y caucho.

Todas estas fuentes se han utilizado de manera efectiva en la producción de copolímeros (Andler *et al.*, 2019; Cerrone *et al.*, 2015; Choonut *et al.*, 2020; Muhr *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2019; Urbina *et al.*, 2019).

Microorganismos productores de PHAs

Ciertos microorganismos pueden experimentar acumulación de PHAs en respuesta a condiciones de estrés ambiental, siendo una relación C/N elevada uno de los factores de crecimiento determinantes (Bordel *et al.*, 2021). Los PHAs pueden ser producidos por cianobacterias, microalgas y bacterias y se utilizan comúnmente como biopolímeros de reserva energética ante situaciones de estrés nutricional.

Paracoccus denitrificans ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de producir PHA, hasta un 70% de su peso, a partir de diferentes fuentes de carbono (Rueda *et al.*, 2023). En este contexto, Mounghprayoon *et al.* (2024) obtuvieron 47,8 g de PHA/L a partir de hidrolizado de pulpa de yuca utilizando *Paracoccus* sp; Kumar y Kim (2019) informaron que el mismo microorganismo sintetizó 1 g de PHA/L utilizando aceite de cocina usado como fuente de carbono, Tanaka *et al.* (2016), obtuvieron 2,66 g de PHB utilizando CO₂ como única fuente de carbono con *Paracoccus denitrificans*, Kalaiyezhini y Ramachandran, (2015) utilizaron glicerol y obtuvieron 10,7 g de PHA/L. Los residuos utilizados para el crecimiento de los productores de PHA provienen principalmente de plantas de tratamiento de residuos o industrias alimentarias.

Capítulo 2

2 Objetivos

Con base en la discusión anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el uso potencial de diferentes hidrolizados de biomasa de microalgas, producidas en un fotobiorreactor de tratamiento de aguas residuales porcinas, como materia prima alternativa para la producción de PHAs por *Paracoccus denitrificans*. Se estudiará también, la recuperación previa de la fracción proteica del hidrolizado de biomasa microalgal, de un elevado valor, para aumentar la relación C/N del sustrato. Este trabajo se enmarca en los objetivos del proyecto Retos 2020 PROPHACTION: “Recovery of proteins and PHA production from biomass grown in wastewater treatment plants”, financiado por el MICINN.

Para conseguir este objetivo global, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar el tipo de hidrólisis que proporcione el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de *P. denitrificans*.
- Estudiar el crecimiento de *P. denitrificans* en función del tipo de hidrólisis y concentración del medio de cultivo.
- Evaluar alternativas de separación de la fracción proteica presente en el hidrolizado.

3 Materiales y métodos

Este Trabajo de Fin de Máster es un estudio preliminar que no culmina con la producción de PHAs. El estudio se centra principalmente en los ensayos de diferentes tipos de hidrólisis, el crecimiento de un microorganismo capaz de acumular PHAs en el hidrolizado agotado y la separación de los péptidos presentes en el hidrolizado. Estudios posteriores optimizarán la producción y acumulación de PHAs y su extracción y purificación.

3.1 Biomasa microalgal empleada

La biomasa liofilizada de microalgas utilizada en este trabajo fue proporcionada por la Universidad de Almería (España). La biomasa fue un consorcio de microalgas y bacterias cultivadas en un fotobiorreactor de capa fina utilizado para la remediación de aguas residuales de granjas porcinas, cosechadas por centrifugación, liofilizadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso posterior. La especie de microalga más abundante en la biomasa fue *Scenedesmus almeriensis*. La composición macromolecular de esta biomasa se determinó como 22,7 % de carbohidratos, 41,3 % de proteínas y 6,7 % de lípidos en una base de masa seca libre de cenizas (Rojo *et al.*, 2023). Debido a la baja concentración de lípidos en la biomasa inicial, el estudio se centró en el seguimiento de carbohidratos y proteínas. La determinación del carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) fueron $0,376 \pm 0,018$ g/g de TOC y $0,076 \pm 0,001$ g/g de TN.

A continuación, se han ensayado varios métodos, entre los cuales destacan en este trabajo los métodos químicos (hidrólisis ácida y alcalina) y los biológicos (hidrólisis enzimática) asistidos con ultrasonidos (Nitsos *et al.*, 2020)

3.2 Hidrólisis de biomasa algal

De acuerdo con estudios previos, se seleccionaron tres métodos de hidrólisis para solubilizar los macrocomponentes de la biomasa de microalgas, dos químicos que han proporcionado elevados rendimientos de solubilización y una hidrólisis

enzimática asistida por ultrasonido que permite la recuperación de péptidos de alto tamaño molecular (Martin Juárez *et al.*, 2021; Rojo *et al.*, 2023). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado con una concentración de biomasa del 5% (m/m), en un erlermeyer de 0,5 L con un volumen de trabajo de 0,25 L. Después de la hidrólisis, las suspensiones se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall X4 Pro para separar las fracciones sólida y líquida. En la fracción líquida, se analizaron las concentraciones de carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) para determinar la solubilización. También se midieron los monosacáridos y los péptidos (aminoácidos), para conocer la disponibilidad de carbono y nitrógeno y evaluar su posible utilización como medio para el crecimiento de *Paracoccus denitrificans*, utilizando los compuestos liberados con la hidrólisis de la biomasa como fuente de carbono. No fue posible medir el nitrógeno amoniacal debido a la interferencia de los cloruros presentes en el hidrolizado.

Los métodos de hidrólisis seleccionados para este estudio fueron:

Hidrólisis química: ácida y alcalina

La hidrolisis química se entiende como un pretratamiento, que implica una acción del agua sobre otras especies, modificando sus propiedades ácido-base, o bien provocando la ruptura de determinados enlaces, fragmentando la molécula o dando lugar a otras especies distintas a la molécula original.

Las hidrolisis ácida y alcalina se hicieron siguiendo el procedimiento descrito y optimizado por Rojo *et al.* (2023). La biomasa de microalgas se preparó al 5% m/m añadiendo NaOH 2 M o HCl 2 M, según corresponda. Los ensayos de hidrólisis se realizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 1 hora, precalentando la suspensión hasta 80°C antes de la adición de los reactivos.

Dicha temperatura se empleó porque proporcionaba altos rendimientos de solubilización en trabajos previos y biombras similares. (Martin Juárez *et al.*, (2021)).

Experimentos de extracción enzimática asistida por ultrasonido (UAEE)

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando 1:100 m/m de la enzima comercial Protamex proporcionada por Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Se utilizaron las condiciones enzimáticas óptimas proporcionadas por el fabricante de 50°C y pH de 6,5, no siendo necesaria la adición de buffer. Para mejorar la solubilización de los macrocomponentes, la hidrólisis enzimática fue asistida por ultrasonidos (UAEE) y los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de ultrasonidos (UIP1000HD, 1000W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) durante 1 h, trabajando al 50% de amplitud (Rojo *et al.*, 2023).

La enzima *Protamex* es una endoproteasa formada por una mezcla de Alcalasa y Neutrasa con 1,5 Au-A/g de actividad enzimática. Además, proporciona rendimientos moderados de solubilización de proteínas y carbohidratos, pero tamaños de péptidos considerables en biomasa de algas similares. (Rojo *et al.*, 2021).

3.3 Experimentos de crecimiento de microorganismos

Para investigar la viabilidad de los diferentes hidrolizados de biomasa de microalgas como sustrato, se cultivó un inóculo de *P. denitrificans* al 5% (v/v) utilizando hidrolizado como fuente de carbono y medio de sal mineral (MSM) en diferentes proporciones de composición. La composición de MSM por litro fue (NH₄)₂SO₄ (0,68 g/L), K₂HPO₄ (5 g/L), KH₂PO₄ (0,5 g/L), CaCl₂·2H₂O (20 mg/L), MgSO₄·7H₂O (1 g/L) y solución de oligoelementos (2 mL/L).

La composición de la solución de oligoelementos es la siguiente: FeSO₄ 7H₂O 4,98 g/L, ZnCl₂ 7H₂O 0,44 g/L, CuSO₄ 5H₂O 0,78 g/L, Na₂MoO₄ 2H₂O 0,24 g/L, MnSO₄ 4H₂O 0,81 g/L (Harms *et al.*, 1985) Todos los componentes utilizados, con una pureza superior al 95%, se adquirieron a Sigma Aldrich (España).

Se probaron diferentes proporciones para cada hidrolizado: 10, 20 y 30% de hidrolizado para hidrólisis ácida y alcalina y 10, 20, 30, 40 y 50% de hidrolizado para experimentos UAEE. El pH del medio de fermentación se ajustó a 7 antes de la esterilización, utilizando NaOH o HCl 6M para hidrolizados químicos.

Después de la neutralización de los hidrolizados de microalgas, el precipitado se eliminó por centrifugación a 6500 rpm durante 10 min y se esterilizó durante 15 min en autoclave a 121°C (Kusmayadi *et al.*, 2023).

Los cultivos de *P. denitrificans* se incubaron a 37°C en matraces agitados de 0,25 L de volumen con 0,1 L de volumen de trabajo, con 5% (v/v) de inóculo, a 150 rpm durante 24 horas. Al final del experimento, los cultivos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. Se determinó el TOC, TN, monosacáridos y péptidos en la fase líquida, y el pellet se liofilizó hasta peso constante. Finalmente, el crecimiento bacteriano se determinó gravimétricamente.

3.4 Métodos de separación de péptidos

Dependiendo de la técnica de disrupción aplicada a las células de microalgas, el medio puede presentar proteínas de moderado peso molecular, péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos y otros subproductos (Law *et al.*, 2018). Al ser considerada la fracción de mayor valor comercial por su potencial utilidad se plantean distintos métodos de separación de los péptidos liberados de los hidrolizados obtenidos previamente.

Separación por el agregado de agentes desnaturalizantes

La precipitación de péptidos a través de desnaturalización es una técnica que viene resultando efectiva para su separación. Este proceso implica que los péptidos pierdan su conformación nativa, favoreciendo su agregación y posterior precipitación.

I- Solventes orgánicos en frío: A 10 mL del hidrolizado se añadieron tres volúmenes de acetona o etanol a -20°C (Wang *et al.*, 2003), según corresponda y se mantuvo a 4°C durante la noche. La muestra se centrifugó a 10 000 g, 4 °C durante 10 min. Se separaron ambas fracciones para su posterior análisis.

II- *Precipitación con Acido Tricloroacético (TCA)*: A 10 mL de hidrolizado y se añadieron tres volúmenes de TCA al 10 % p/v. La mezcla se incubó durante la noche a 4°C y se centrifugó a 10 000 g, 4 °C durante 10 min. Se separaron ambas fracciones para su posterior análisis (Wang *et al.*, 2003).

Salting out

El *salting out* es un método ampliamente utilizado para la purificación y el estudio de péptidos, basado en la influencia del agregado de sales en la solubilidad. Se evaluó la efectividad de dos sales ampliamente utilizadas en la separación de proteínas (Sankaran *et al.*, 2018).

A 10 mL del hidrolizado se agregaron 5 mL de sulfato de amonio o cloruro de calcio 1 M, según corresponda. La mezcla se agito suavemente durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron a 10 000 g, 4 °C durante 10 min. Se separaron ambas fracciones para su posterior análisis

Precipitación basada en el punto isoelectrico

La técnica de separación de péptidos por variación del pH se basa en el principio del punto isoelectrico (pI) de las proteínas. Cada proteína tiene un pH específico en el cual su carga neta es cero, lo que se conoce como su punto isoelectrico. Cuando el pH de una solución se ajusta al valor del pI de la proteína, esta adquiere una carga neta y, por lo tanto, puede ser separada de la solución por precipitación. Inicialmente, se probó la precipitación del punto isoelectrico para separar las proteínas de la solución. Al estar trabajando con tres hidrolizados con distintos valores de pH inicial (hidrolizado acido pH \approx 1; hidrolizado alcalino pH \approx 10, hidrolizado enzimático pH \approx 7) la variación del pH dependía las características del hidrolizado de partida. En el hidrolizado acido se aumentó hasta pH \approx 8 usando NaOH 0,5 M, mientras que en el alcalino se disminuyó hasta pH \approx 2 usando HCl 0,5 M, para el enzimático se probaron ambas variaciones.

En todos los casos se siguió el procedimiento reportado por Grossmann *et al.* (2018). A 10 mL del hidrolizado se agregó gota a gota NaOH o HCl (0,5 M) según corresponda, midiendo el pH de la solución *in situ*, al alcanzar el valor de pH deseado las muestras se mantuvieron en agitación durante 30 min, luego se centrifugaron a 10 000 g, 4 °C durante 10 min. Se separaron ambas fracciones para su posterior análisis.

Se obtuvieron dos fracciones después de la centrifugación para cada ensayo: un precipitado de péptidos (PP) y un sobrenadante o fracción líquida (FL).

Se determinaron monosacáridos y péptidos en la FL. El PP se secó hasta peso constante, posteriormente se resuspendieron los péptidos en 3 mL de HCl 0,1 M para su posterior determinación de nitrógeno. Finalmente, el porcentaje de precipitación de péptidos en cada ensayo se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Precipitación de péptidos} = \frac{\text{g péptidos en PP}}{\text{g péptidos en hidrolizado inicial}} \times 100 \text{ Eq. 1}$$

3.5 Métodos analíticos

Los carbohidratos en la biomasa inicial se solubilizaron mediante hidrólisis ácida con H₂SO₄ durante 1 h a 30°C siguiendo el protocolo descrito por Rojo *et al.* (2021). A continuación, se determinaron los monosacáridos en el sobrenadante utilizando un módulo de separación HPLC Shimadzu LC-2050C equipado con un detector de índice de refracción (RID) y una columna Aminex® HPX-87H (Bio-Rad), utilizando una solución de ácido sulfúrico 25 mM (calidad HPLC) con un caudal de 0,6 mL/min como eluyente. Se utilizaron estándares externos de glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa como soluciones de calibración multiestándar disponibles comercialmente con una pureza > 95% (Sigma, Aldrich, España).

Los lípidos en la biomasa inicial se determinaron utilizando el método de Kochert (1978) con una modificación en la relación cloroformo-metanol (2:1) (Rojo *et al.*, 2021).

El contenido de nitrógeno orgánico de la biomasa cruda, de los hidrolizados y de las fracciones sólidas y líquidas después de la separación de péptidos se determinó mediante el método del nitrógeno total Kjeldahl.

El método consta de 3 etapas: *-digestión*: Un tratamiento con H₂SO₄ concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ion amonio; *-destilación*: Se alcaliniza la muestra digerida con NaOH y el nitrógeno se desprende en forma de amoniaco. El amoniaco destilado se recoge sobre un exceso de ácido bórico; *-valoración*: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formado,

equivalente al nitrógeno presente en la muestra, empleando ácido sulfúrico como valorante.

Finalmente, el contenido de proteínas de la biomasa inicial, así como de las fracciones líquidas y sólidas después de cada tratamiento se calculó aplicando la relación nitrógeno: proteína (factor N/P) de 4.3 calculada a partir del perfil de aminoácidos obtenido en la biomasa inicial por HPLC según Rojo *et al.*, (2021). Los péptidos o el perfil de aminoácidos de las fracciones líquidas se determinaron por HPLC utilizando un método analítico interno estándar, del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVa) con un Zorbax Eclipse AAA y detector UV (Rojo *et al.*, 2021).

4 Resultados y discusión

En esta sección se presentan y comentan los resultados de las anteriores secciones.

4.1 Composición de la biomasa

La composición de la biomasa inicial se muestra en la **Tabla 1**. Se puede observar que presenta un 14,4% de cenizas, valor que está dentro del esperado para consorcios de microalga-bacteria crecida en plantas de tratamiento de purines, debido a la presencia de Ca^{2+} , K^+ , Mg^+ , Na^+ y metales como Cu^+ y Zn^{+2} según lo descrito por Hernández et al., (2018). Los cálculos de la composición de la biomasa se realizan en base seca libre de cenizas, del cual se obtiene una composición macromolecular de 22,6% de carbohidratos (compuesto por un 11.1% de glucosa, 10.5% de xilosa, < 1% de celobiosa y arabinosa), un 41,3% de proteínas y un 7,2% de lípidos.

Tabla 1. Composición macromolecular en % base seca del consorcio microalgas-bacterias (Elaboración propia)

MACROMOLÉCULA*	% en base seca	% en base seca libre de cenizas
PROTEÍNAS	35,4	41,3
CARBOHIDRATOS	19,3	22,6
LÍPIDOS	6,1	7,2
CENIZAS	14,4	-

* los resultados se expresan como medias \pm desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas.

El bajo contenido de lípidos, moderado de carbohidratos y elevado contenido de proteínas de la biomasa utilizada podría deberse a los nutrientes presentes en los purines utilizados como medio de cultivo. Los purines son efluentes con elevado contenido de P y N, nutrientes que contribuyen a la síntesis de proteínas y carbohidratos por parte de las microalgas, por el contrario, la producción de lípidos se ve favorecida en medios de cultivo con contenidos de N y P limitados (Sánchez-Bayo et al., 2020; Rehman et al., 2022; Yaakob et al., 2021).

Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en la bibliografía que establecen la fuerte relación entre la composición de la biomasa en macronutrientes con las condiciones de cultivo, con un elevado contenido de proteínas en biomasa algal procedente de plantas de tratamiento de aguas residuales (Rojo et al., 2021).

4.2 Composición de los hidrolizados

El primer paso para investigar la viabilidad de utilizar hidrolizado de microalgas como sustrato para el crecimiento bacteriano es determinar la composición del hidrolizado obtenido por los tres tratamientos. La **Figura 5** muestra el TOC y TN de las diferentes hidrólisis. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de 2 determinaciones analíticas. Las líneas de intervalo verticales representan la desviación estándar de las medias.

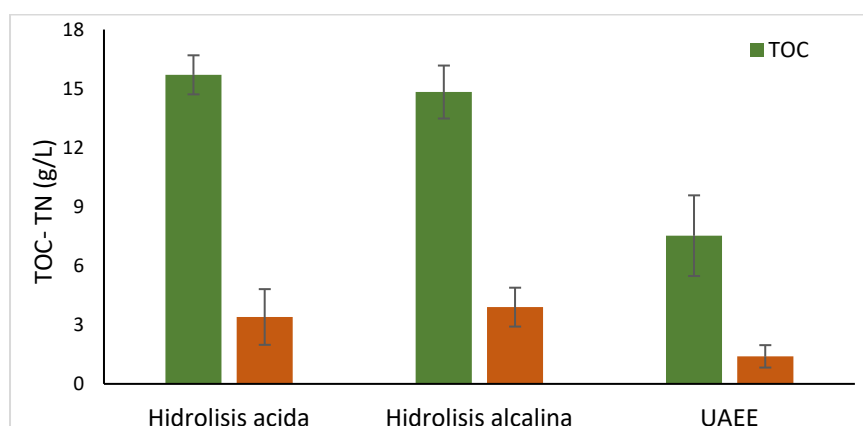


Figura 5. Composición del carbono orgánico total y nitrógeno total en hidrolizados (g/L) (Elaboración propia).

Estos resultados muestran que la composición de los hidrolizados depende de los tratamientos, aumentando la disrupción celular con la severidad del tratamiento (Kusmayadi *et al.*, 2023). Como se esperaba, las hidrólisis ácida y alcalina proporcionaron mayores solubilizaciones en comparación con la hidrólisis enzimática, pero con mayor concentración de compuestos de degradación. La hidrólisis química descompone la celulosa y la hemicelulosa presentes en la biomasa, lo que resulta en la liberación de azúcares simples y otros subproductos.

La composición de azúcares obtenida concordó con los resultados previamente reportados en la bibliografía, compuesta por glucosa (1,95 g/L), xilosa (1,68 g/L), 5-hidroximetil furfural (0,35 g/L) y furfural (0,14 g/L). La hidrólisis alcalina proporcionó hidrolizados con composiciones de azúcar similares (glucosa 1,69 g/L y xilosa 1,32 g/L), la UAEE resultó en valores más bajos de recuperación para ambos monosacáridos (glucosa 1,02 g/L y xilosa 0,91 g/L), no se encontraron furfural ni 5-hidroximetil furfural en ambas hidrólisis (Rojo *et al.*, 2023).

En cuanto al contenido de nitrógeno presente en los hidrolizados, no hay diferencias significativas ($p < 0,5$) entre los valores encontrados en la hidrólisis química (3,9 g/L para hidrólisis alcalina y 3,4 g/L para hidrólisis ácida). En cambio, en el hidrolizado enzimático se encontró el valor más bajo de TN (1,4 g/L). Estas tendencias coinciden con las reportadas previamente en la bibliografía (Lorenzo-Hernando *et al.*, 2019; Rojo *et al.*, 2023).

Para analizar y comparar la severidad de los tratamientos empleados, en relación a la fracción proteica, es necesario analizar el perfil de aminoácidos. Los perfiles de aminoácidos de la fracción líquida para tres hidrolizados se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos presentes en los tres tipos de hidrolizados de biomasa algal (Elaboración propia).

Aminoácidos (g/L)	Hidrolizado ácido	Hidrolizado alcalino	UAEE
Acido aspártico (Asp)	0,4	2,24	0,30
Acido glutámico (Glu)	1,05	2,68	0,60
Serina (Ser)	0,05	0,29	0,02
Glicina (Gly)	0,75	1,69	0,03
Arginina (Arg)	0,05	0,04	0,02
Alanina (Ale)	0,90	2,12	0,45
Valina (Val)	0,30	0,87	0,15
Leucina (Leu)	0,60	1,64	0,30
Lisina (Lys)	0,45	0,88	0,30
Prolina (Pro)	0,17	0,71	0,12
Treonina (THR)	0,03	0,04	ND
Tirosina (Tyr)	0,15	0,82	ND
Fenilalanina (Phe)	0,30	0,95	ND
Isoleucina (Ile)	0,15	0,21	ND
Total AA	5,35	15,18	2,29

La hidrólisis alcalina proporciona la máxima recuperación de aminoácidos, con ácido glutámico (2,68 g/L), ácido aspártico (2,24 g/L) y alanina (2,21 g/L) como componentes principales, la glicina (1,69 g/L) y la leucina (1,64 g/L) contribuyeron significativamente al contenido total. La recuperación total de aminoácidos obtenida en la hidrólisis alcalina fue de 15,18 g/L, valores similares fueron publicados por Rojo *et al.*, 2023.

Por otro lado, en la hidrólisis ácida, el total de aminoácidos obtenidos fue de 5,35 g/L, con ácido glutámico (1,05 g/L) y alanina (0,9 g/L), como aminoácidos principales. En cambio, la UAEE presenta 2,29 g/L de aminoácidos, siendo el ácido glutámico (0,6 g/L) el principal. Los tres hidrolizados exhibieron diferencias notables. La literatura reportó que la mayor solubilización de aminoácidos en la hidrólisis alcalina podría estar relacionada con la ruptura de enlaces disulfuro y la desintegración celular por saponificación de lípidos en la membrana/pared celular (Rojo *et al.*, 2023).

Por otro lado, la baja recuperación de aminoácidos obtenida con la hidrólisis ácida podría estar relacionada con pérdidas por degradación de aminoácidos o péptidos solubilizados para dar lugar a amonio o amidas (Planyavsky *et al.*, 2015). Aunque la UAEE da como resultado una menor tasa de solubilización de aminoácidos, esta hidrólisis proporciona una alta pureza de péptidos. Rojo *et al.* (2023) demuestran que la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos utilizando Protamex resultó en péptidos con tamaños moleculares de 11 kDa a 135 kDa utilizando SDS-page.

Evaluación del efecto de la concentración de hidrolizado de microalgas sobre el crecimiento bacteriano

La dependencia de la concentración de azúcares en el crecimiento de *P. denitrificans* ha sido ampliamente demostrada en la literatura (Khomlaem *et al.*, 2020; Sawant *et al.*, 2015). La concentración inicial de azúcares puede afectar significativamente la producción de biomasa, ya que estos compuestos son una fuente crucial de carbono y energía para las bacterias. Sin embargo, es importante considerar que no solo la cantidad de azúcares, sino también la calidad y la ausencia de inhibidores son determinantes en el proceso de crecimiento. Por lo tanto, realizar una dilución adecuada de los hidrolizados puede ser una estrategia efectiva para minimizar estos efectos adversos y favorecer una alta producción de biomasa.

En este sentido, se probaron diferentes concentraciones de los hidrolizados (ácido, alcalino y enzimático) obtenidos al variar la relación hidrolizado-medio mineral, como medios de cultivo para *P. denitrificans*, con el fin de encontrar la concentración óptima de hidrolizado para el crecimiento del microorganismo. Los experimentos se llevaron a cabo a un pH inicial de 7, temperatura controlada a 37 °C, a una velocidad de agitación de 150 rpm, durante 24 h. Más tarde, se midió la biomasa total producida. La eficiencia de utilización del caldo hidrolizado se determinó en términos de crecimiento de biomasa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Crecimiento de *Paracoccus denitrificans* en diferentes tipos de hidrolizados a distintas concentraciones (Elaboración propia).

Hidrolizado	dilución %	TOC (g/L)	TN (g/L)	Carbohidratos (g/L)	Amino ácidos (g/L)	<i>P. denitrificans</i> (g/L)
Acido	10	1,447±0,4	0,378±0,1	0,361±0,1	0,499±0,1	1,68±0,3
	20	3,032±0,4	0,627±0,1	0,665±0,10	1,033±0,2	0,75±0,3
	30	5,213±0,5	0,914±0,3	0,918±0,2	1,412±0,4	0,44±0,2
Alcalino	10	2,229±0,2	0,4168±0,2	0,299±0,1	1,487±0,2	-
	20	4,258±0,5	0,785±0,3	0,579±0,1	3,012±,2	-
	30	6,125±0,9	1,125±0,2	0,877±0,10	4,825±,3	-
UAEE	10	0,776±0,3	0,179±0,1	0,179±0,1	0,261±0,1	0,91±0,1
	20	1,444±0,4	0,3240,2	0,329±0,1	0,523±0,1	0,95±0,2
	30	2,338±0,6	0,509±0,2	0,537±0,1	0,789±0,2	0,78±0,6
	40	2,991±0,9	0,646±0,1	0,701±0,2	0,995±0,2	0,71±0,2
	50	3,375±0,9	0,782±0,3	0,911±0,2	1,316±0,3	0,6±0,2

Como se muestra en la **Tabla 3** *Paracoccus denitrificans* presenta una tasa de crecimiento diferente en cada hidrolizado. Se encontró que el hidrolizado ácido al 10% es el que presenta mayor rendimiento de biomasa (1,68 g/L).

A medida que aumenta la concentración de hidrolizado, y por consiguiente de azúcares, se esperaba un mayor crecimiento, en cambio la menor producción de biomasa se encontró cuando se utilizó hidrolizado ácido al 30%.

Esto podría atribuirse a que con un aumento en la concentración de hidrolizado no solo aumentan los azúcares presentes, sino también los compuestos inhibidores de la fermentación microbiana como el 5-hidroximetil furfural y el furfural (Kusmayadi *et al.*, 2023). Por otro lado, para la hidrólisis enzimática, la biomasa obtenida al 20% fue la más alta (0,95 g/L), seguida por la del 10% (0,91 g/L). La hidrólisis alcalina no permitió el crecimiento bacteriano, lo que podría estar relacionado con la saponificación de lípidos de la pared celular (Khueychai *et al.*, 2018).

Además de la fuente de carbono, el nitrógeno es un parámetro importante no solo para el crecimiento de *P. denitrificans*, sino también para la síntesis de PHAs, ya que un suministro limitado de nitrógeno y un exceso de carbono son favorables para la producción de PHAs (Moungprayoon *et al.*, 2024). A pesar de que el hidrolizado alcalino presenta valores de nitrógeno más altos, también podría haber compuestos inhibidores que no permitan el crecimiento de *Paracoccus denitrificans*, como se mencionó anteriormente.

Los resultados del análisis ANOVA indicaron una diferencia significativa en la producción de biomasa ($p < 0,05$) al comparar el crecimiento de *P. denitrificans* utilizando hidrolizados ácidos y enzimáticos.

Por lo tanto, la hidrólisis ácida al 10% y la UAEE al 20% ofrecieron la mayor producción de biomasa, con una composición similar de macrocomponentes (TOC y TN), lo que indica que esta es la relación C/N óptima para el crecimiento de *P. denitrificans* utilizando el consorcio microalgal-bacteriano hidrolizado como sustrato. En consecuencia, estos hidrolizados podrían utilizarse como sustratos para la producción de PHAs.

4.3 Precipitación de péptidos en los hidrolizados de microalgas

Con el objetivo de, en un proceso de biorrefinería posterior, poder recuperar los péptidos solubilizados, y aumentar la relación C/N en los hidrolizados, potenciando la acumulación de PHAs, se realizaron ensayos preliminares de precipitación de péptidos. Se realizaron ensayos de precipitación de péptidos por: aumento de la fuerza iónica de la solución (CaCl_2); *salting out* (TCA y sulfato de amonio); el punto isoeléctrico de los péptidos (aumento y disminución del pH) y con el agregado de solventes orgánicos en frío (acetona y etanol a -20°C).

Las determinaciones se realizaron a la fracción líquida y sólida obtenida luego de la separación por centrifugación. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la **Figura 6**.

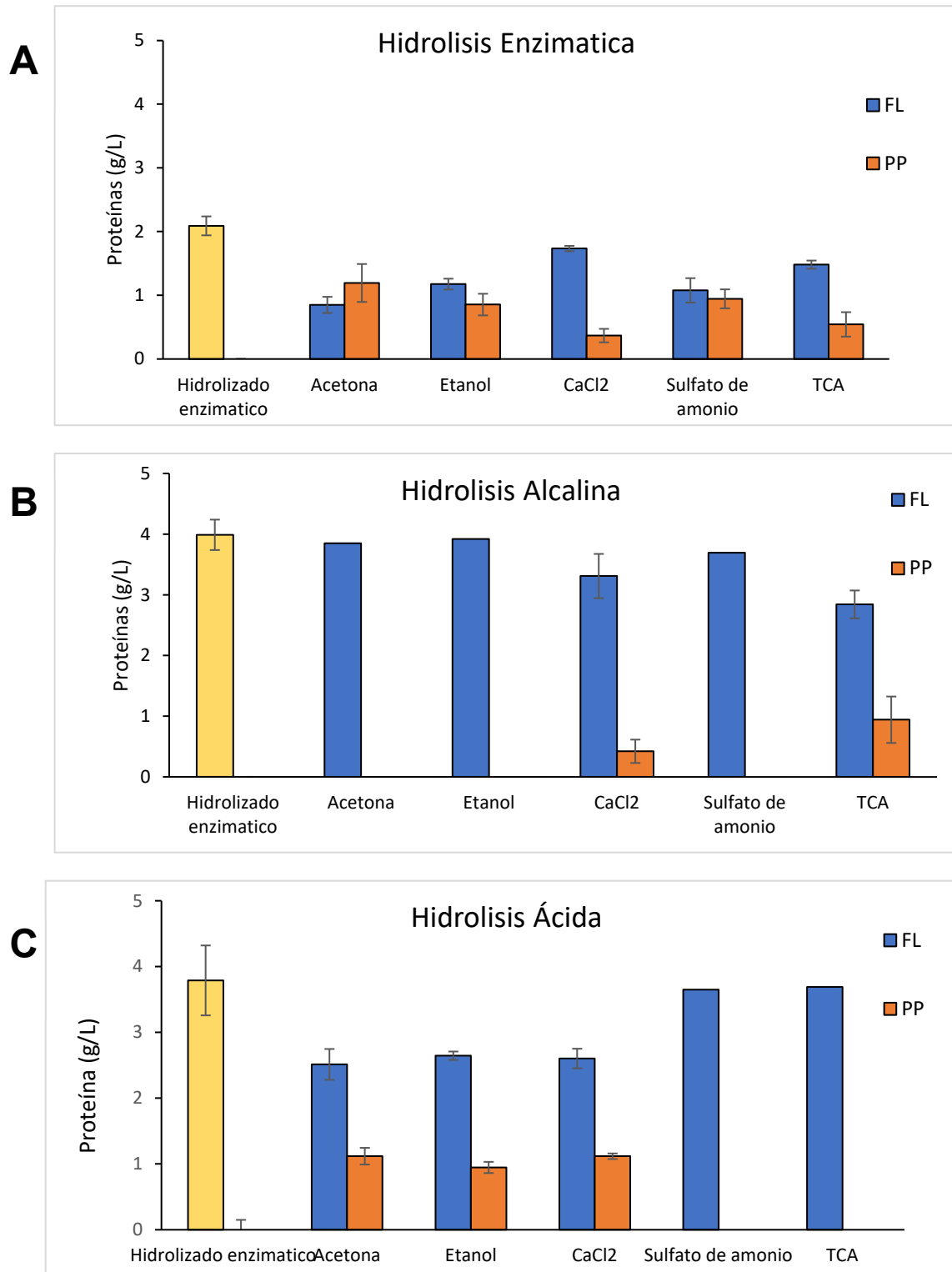


Figura 6. Péptidos (g/L) presentes en las fracciones líquidas (FL) y precipitado proteico (PP)* (Elaboración propia).

***A- Hidrólisis enzimática asistida** Protamex (1:100 g/g, 50 °C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud J/s, 34560 J/gbiomasa); **B y C-Hidrólisis química:** 1 h con NaOH y HCl 2M a 120°C, respectivamente. Los resultados se muestran como la media de dos determinaciones.

En la **Figura 6A**, se evidencia la efectividad de varios agentes precipitantes en la precipitación de péptidos de un hidrolizado enzimático. Los hallazgos concuerdan con lo que han reportado Rojo *et al.* (2023), que concluyeron que la hidrólisis enzimática genera péptidos más grandes, favoreciendo su separación mediante diversos precipitantes. Un análisis más detallado señala que todos los agentes precipitantes evaluados logran separar péptidos del hidrolizado enzimático. Los resultados obtenidos con el sulfato de amonio presentan interferencias en las mediciones de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, por lo que estos datos fueron corregidos teniendo en cuenta el sulfato de amonio adicionado, tras lo cual se determinó un 45% de precipitación de péptidos, en relación a los péptidos presentes en el hidrolizado enzimático. Los solventes orgánicos en frío mostraron buenos rendimientos en la precipitación de péptidos. Con acetona, se logró una precipitación del 57% de los péptidos presentes en el hidrolizado enzimático iniciales, mientras que el etanol alcanzó un 47%. En comparación, los agentes precipitantes basados en sales, como CaCl_2 y TCA, lograron separaciones significativamente menores, con un 17% y un 25% respectivamente.

En el análisis de los hidrolizados de péptidos obtenidos por métodos químicos, como se observa en las **Figuras 6 B y C**, es evidente que no todos los agentes utilizados logran separar péptidos de manera efectiva en ambas fracciones.

En la fracción alcalina, la separación de péptidos del hidrolizado se muestra como un desafío, ya que los solventes orgánicos y el sulfato de amonio no logran precipitar estos péptidos de manera efectiva. En contraste, el cloruro de calcio y el ácido tricloroacético (TCA) demuestran una cierta eficacia, obteniendo un 10,6% y 23,5% de precipitación de péptidos respecto a las presentes en el hidrolizado alcalino respectivamente.

Esta discrepancia en la eficiencia de los agentes precipitantes podría estar relacionada con la naturaleza de los compuestos resultantes de la hidrólisis alcalina.

En este contexto, es importante señalar que la hidrólisis alcalina genera la hidrólisis por saponificación de la pared celular. La saponificación implica la formación de sales de ácidos grasos y glicerol, lo que puede dificultar la disponibilidad de estos compuestos para procesos de precipitación (Viegas *et al.*, 2015; Khueychai *et al.*, 2018). Esto sugiere que los productos obtenidos tras una hidrólisis alcalina pueden presentar características que los hacen menos accesibles a los métodos de separación convencionales. Por lo tanto, la combinación de estos factores puede explicar la baja efectividad en la separación de péptidos en la fracción alcalina, resaltando la necesidad de considerar diferentes enfoques o condiciones para mejorar los rendimientos de separación en futuros experimentos.

En la fracción ácida (**Figura 6C**), se observa que algunas sales como el sulfato de amonio y el TCA no consiguen separar los péptidos del hidrolizado, mientras que acetona, etanol y el cloruro de calcio sí muestran resultados significativos, obteniendo un 29,2%, un 25,0% y un 29,5% de eficiencia en la separación en relación al contenido de péptidos presentes en el hidrolizado ácido, respectivamente. Esta variabilidad en la eficacia de separación puede atribuirse a la naturaleza de los productos generados durante la hidrólisis ácida. Este proceso tiende a ser más severo, generando péptidos más pequeños y, en algunos casos, aminoácidos libres (Rojo *et al.*, 2023).

Estos compuestos resultantes, debido a su bajo peso molecular y a su solubilidad, son más difíciles de separar por, lo que explica la ausencia de precipitación de péptidos (evidenciada por la falta de precipitado luego de la centrifugación) al usar ciertos agentes como el sulfato de amonio, que normalmente son más efectivos para precipitar péptidos de mayor tamaño y complejidad estructural (Corrêa *et al.*, 2020).

En resumen, los tres hidrolizados estudiados presentan diferente comportamiento frente a los mismos agentes precipitantes, propiedad que estaría directamente relacionada con la naturaleza de los péptidos y aminoácidos y otros posibles compuestos de degradación nitrogenados que los componen.

Este comportamiento subraya la importancia de seleccionar adecuadamente los métodos y agentes de separación en función de la naturaleza del hidrolizado y el objetivo específico del análisis.

Capítulo 3

5 Conclusiones

Las conclusiones que se obtienen de este Trabajo de Fin de Máster una vez se ha realizado el estudio de los hidrolizados de biomasa algal y se han analizado los resultados, son las siguientes:

Los hidrolizados de biomasa de microalgas, obtenidos de fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales porcinas son una materia prima prometedora para la producción de PHAs por *Paracoccus denitrificans*. La hidrólisis química a elevada temperatura proporciona hidrolizados con elevados rendimientos de solubilización de carbono orgánico y nutrientes, pero con formación de compuestos inhibidores del crecimiento de *Paracoccus denitrificans*.

El hidrolizado ácido (HCl 2M, 121°C, 1 h) resultó un sustrato adecuado para el crecimiento de *Paracoccus denitrificans*, pero resultó necesario trabajar con una dilución al 10% para conseguir concentraciones de microorganismos de 1,68 g/L. La hidrólisis básica (NaOH 2M, 121°C, 1h) proporcionó hidrolizados con elevadas concentraciones de carbono y nitrógeno, pero con elevada presencia de inhibidores en los que no creció *Paracoccus denitrificans* ni siquiera con diluciones del 10%. La hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos consiguió bajas solubilizaciones, y reducidos crecimientos de *Paracoccus denitrificans*, alcanzándose concentraciones de 0,95 g/L en diluciones al 20%.

A través del estudio de la separación de la fracción proteica en los tipos de hidrolizados, se encontró una escasa o nula precipitación de péptidos en los hidrolizados químicos, atribuida al reducido tamaño molecular de los péptidos o incluso aminoácidos obtenidos por estos métodos. En el caso de la hidrólisis alcalina, sólo se obtuvieron reducidas precipitaciones de péptidos por adición de tricloro acético (23,5%) y cloruro de calcio (10,6%), mientras que etanol, acetona y cloruro de calcio consiguieron precipitar algunos de los péptidos liberados por la hidrólisis ácida (25-30%).

Todos los métodos ensayados consiguieron precipitar una fracción de los péptidos liberados por hidrólisis enzimática (posiblemente por su mayor tamaño), obteniendo los mejores resultados (~50%) con sulfato de amonio, acetona y etanol.

Los resultados obtenidos abren nuevos caminos para la producción de biopolímeros de origen biológico. Los hallazgos de este estudio podrían facilitar la transición hacia sistemas de producción más circulares, donde los residuos agroindustriales se transforman en recursos valiosos, apoyando así tanto la economía como el medio ambiente.

6 Anexos

Primeramente, se presentan las tablas del **Ensayo 1** y el **Ensayo 2**, correspondientes a la las 3 hidrólisis realizadas y a la precipitación de los péptidos de los hidrolizados con su código:

Tabla 4. Ensayo 1: Hidrólisis. (Elaboración propia)

Código	Tratamiento	T (°C)	Enzima/Reactivo	C enzimas/reactivo	Tiempo (h)	Lugar
E1	Hidrólisis Enzimática	50 (óptima enzima)	Protamex (proteasa)	1:100 w/w	1	Ultrasonido
E2	Hidrólisis química	120	NaOH	2M	1	Autoclave
E3	Hidrólisis química	120	HCl	2M	1	Autoclave

**En todos los tratamientos: 5% de biomasa en base seca (12,5 g biomasa en 250 g de solución).*

Tabla 5. Ensayo 2: Precipitación de los péptidos de los hidrolizados. (Elaboración propia)

Código	Procedimiento	Concentración	Fracción	Código s/fracción	Hidrolisis
E1	Control			E1	Hidrolisis Enzimática
E1P1	Acetona		Sólido	E1P1S	
			Líquido	E1P1L	
E1P2	Etanol		Sólido	E1P2S	
			Líquido	E1P2L	
E1P3	CaCl ₂	1 M	Sólido	E1P3S	
			Líquido	E1P3L	
E1P4	Sulfato de aluminio	1 M	Sólido	E1P4S	
			Líquido	E1P4L	
E1P5	Ácido tricloroacético	1 M	Sólido	E1P5S	
			Líquido	E1P5L	
E1P6	↓pH	≅ 2	Sólido	E1P6S	
			Líquido	E1P6L	
E1P7	↑pH	≅ 8	Sólido	E1P7S	
			Líquido	E1P7L	
E2	Control			E2	Hidrolisis Ácida
E2P1	Acetona		Sólido	E2P1S	
			Líquido	E2P1L	
E2P2	Etanol		Sólido	E2P2S	
			Líquido	E2P2L	
E2P3	CaCl ₂	1 M	Sólido	E2P3S	
			Líquido	E2P3L	

E2P4	Sulfato de aluminio	1 M	Solido Liquido	E2P4S E2P4L	
E2P5	Ácido tricloroacético	1 M	Solido	E2P5S	
			Liquido	E2P5L	
E2P6	↓pH	≅ 2	Solido	E2P6S	
			Liquido	E2P6L	
E2P7	↑pH	≅ 8	Solido	E2P7S	
			Liquido	E2P7L	
E3P1	Control			E3	
E3P1	Acetona		Solido	E3P1S	
			Liquido	E3P1L	
E3P2	Etanol		Solido	E3P2S	
			Liquido	E3P2L	
E3P3	CaCl ₂		Solido	E3P3S	
			Liquido	E3P3L	
E3P4	Sulfato de aluminio		Solido	E3P4S	
			Liquido	E3P4L	
E3P5	Ácido tricloroacético		Solido	E3P5S	
			Liquido	E3P5L	
E3P6	↓pH		Solido	E3P6S	
			Liquido	E3P6L	
E3P7	↑pH		Solido	E3P7S	
			Liquido	E3P7L	

A continuación, se muestran las tablas correspondientes a las **características de la biomasa** del estudio y las **composiciones en base seca y en cenizas**.

Tabla 6. Ejemplos de composiciones de biomasa de plantas de aguas residuales como porcentajes de masa en base seca. (Elaboración propia)

	N	P	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Referencias
Lodo secundario	2.4-5	0.6-2.3	32-41	6.1-9.8	2-12	Gherghel <i>et al.</i> , 2019 Suarez-Iglesias <i>et al.</i> , 2017
Biomasa algal	5-8	1-2	30-60	13-25	4-24	Martin <i>et al.</i> , 2016

Tabla 7. Características de los lípidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia)

Lípidos					
Masa alga (g)	ST (%)	m alga real (g)	m bote (g)	m bote + lípidos (g)	% L
0,108	93,93	0,1014	17,1045	17,1098	5,22
0,1894	93,93	0,1779	17,2982	17,3107	7,03

Tabla 8. Características de las proteínas de la masa algal del estudio. (Elaboración propia)

Proteínas						
Masa alga (g)	ST (%)	m alga real (g)	V valorante (mL)	M valorante	% N	% P
0,1018	93,93	0,0956	5,76	0,1	8,434	36,60
0,1014	93,93	0,0952	5,35	0,1	7,864	34,13

Tabla 9. Características de los carbohidratos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia)

Carbohidratos						
Masa alga (g)	ST (%)	m alga real (g)	m CH (mg)	% CH	% Glucosa	% Xilosa
0,3028	93,93	0,284	55,24	19,42	9,68	9,10
0,301	93,93	0,283	54,46	19,26	9,36	8,96

Tabla 10. Características de los sólidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia)

Sólidos						
m crisol (g)	m crisol + alga (g)	m 105° (g)	m 550°C (g)	ST (%)	Cenizas (%)	SV (%)
17,8517	18,1085	18,0929	17,8864	93,93	14,39	80,41

Tabla 11. Características de los sólidos de la masa algal del estudio. (Elaboración propia)

Aminoácido (mg/g)	
Ácido aspártico	37,34
Ácido glutámico	49,28
Serina	20,04
Histidina	7,61
Glicina	23,32
Treonina	16,61
Arginina	22,8
Alanina	34,27
Tirosina	13,1
Cisteína	3,11
Valina	14,49
Metionina	7,85
Fenilalanina	18,45
Isoleucina	10,94
Leucina	31,52
Lisina	22,58
Prolina	20,01
	353,32

Tabla 12. Composición en base seca de la masa algal. (Elaboración propia)

Composición base seca (%)	
Seca (%)	93,93
Lípidos (%)	6,13
Proteínas (%)	35,37
Carbohidratos (%)	19,34
Cenizas (%)	14,39
Glucosa (%)	9,52
Xilosa (%)	9,03
Celobiosa (%)	0,65

Tabla 13. Composición en base seca sin cenizas. (Elaboración propia)

Composición base seca sin cenizas (%)	
Lípidos (%)	7,16
Proteínas (%)	41,31
Carbohidratos (%)	22,59
Glucosa	11,11
Xilosa	10,54
Celobiosa (%)	0,76

Tabla 14. Concentraciones de Carbohidratos. (Elaboración propia)

Cogido Ensayo	Conc. Celobiosa		Conc. Glucosa		Conc. Xilosa		Conc. Arabinosa		Total
E1	0,2450	0,2450	1,1420	1,1420	0,0500	0,0500			1,4370
E1P1S	0,0753		0,4972		9043,2210				0,5725
E1P1L	0,1858	0,2611	0,8094	1,3066	13218,6140	22261,8350			0,9952
E1P2S	0,0736		0,4927		9180,4601				0,5663
E1P2L	0,1729	0,2465	0,7850	1,2778	12420,1325	21600,5925			0,9579
E1P3S	0,0304		0,1803		4173,3155				0,2106
E1P3L	0,2387	0,2691	0,9453	1,1255	4508,0955	8681,4111			1,1840
E1P4S	0,0880		0,4770		8319,5972				0,5650
E1P4L	0,1483	0,2363	1,1214	1,5984	2781,1713	11100,7685			1,2697
E1P5S	0,0049		0,3112		7887,0863				0,3161
E1P5L	0,0049	0,0049	1,1654	1,4765	20151,2634	28038,3498			1,1654
HE CC 0,45	0,1489		0,5863		3802,1464				0,7352
HE PERM 0,45	0,1379	0,2868	0,9178	1,5041	2345,5414	6147,6878			1,0557
E2	0,2740	0,2740	4,1600	4,1600	3,3280	3,3280	0,2360	0,2360	4,6700
E2P3S	0,0468		1,0282		132183,0033		0,0570		1,1320
E2P3L	0,1180	0,1648	3,0029	4,0311	529066,7875	661249,7909	0,1138	0,1708	3,2347
E2P5S	5,0257		1,0742		101929,0792		0,0136		6,1134
E2P5L	5,0257	5,0257	3,7291	4,8033	547051,3362	648980,4153		0,0136	3,7291
E3	0,6500	0,6500	1,6100	1,6100	8990,1969	8990,1969	0,1185	0,1185	2,3785
E3P1S	0,1086		0,4924		8700,1235		0,0354		0,6364
E3P1L	0,4071	0,5158	1,1076	1,6000	16626,7161	25326,8396	0,1493	0,1847	1,6640
E3P2S	0,0990		0,4589		7968,1821		0,0332		0,5911
E3P2L	0,4201	0,5191	1,0522	1,5110	9300,0243	17268,2065	0,1229	0,1561	1,5951
E3P3S	0,1866		0,8498		17845,2322				1,0364
E3P3L	0,5059	0,6925	0,9713	1,8212	13206,1377	31051,3699	0,1789	0,1789	1,6562

Tabla 15. Determinación de TOC, Carbono Inorgánico y NT. (Elaboración propia)

Muestra	Dilución	Carbono Total (mg/L)	Carbono Orgánico (mg/L)	Carbono Inorgánico (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)
E1	0,02	6984	6625	359	1858,2
E1P1S	0,05	5338,676	5320	18,676	988,6
E1P1L		No se puede inyectar en el equipo porque está en solvente orgánico alto en C y satura			
E1P2S	0,05	812,96	803,2	9,76	577,5
E1P2L		No se puede inyectar en el equipo porque está en solvente orgánico alto en C y satura			
E1P3S	0,02	638,48	618,4	20,08	497,05
E1P3L	0,02	6032,4	5630	402,4	1420,5
E1P4S	0,02	821,424	814,2	7,224	579
E1P4L	0,02	2663,3	2605,6	57,7	9580
E1P5S	0,02	5966,18	5920	46,18	1153
E1P5L	0,1		4036	6,85	1865
HE CC 0,45		3402	2640	762	1362
HE PERM 0,45		1010,7392	1010,4	0,3392	1281
E2		16546,52	16530	16,52	4047,5
E2P3S		5901,5	5810	91,5	1248
E2P3L	0,02	11078,6	10610	468,6	
E2P5S					
E2P5L		17243,36	17225	18,36	2811
E3		22291,5	21670	621,5	4168,5
E3P1S	0,02	4803,95	4745	58,95	932,5
E3P1L		No se puede inyectar en el equipo porque está en solvente orgánico alto en C y satura			
E3P2S	0,02	1890,75	1756	134,75	936,5
E3P2L		No se puede inyectar en el equipo porque está en solvente orgánico alto en C y satura			
E3P3S	0,02	6636,325	6600	36,325	1384,5
E3P3L	0,02	14582,5	14170	412,5	2934
X1 (HE nuevo)	0,02	8008,22	8000	8,22	1867
X2 (HE congelado)	0,02	7923,044	7915	8,044	1877,5
X3(HE perm 0,45)	0,02	9315,97	9310	5,97	2048,5
X4 (HE perm 0,22)	0,02	6994,554	6985	9,554	1674

Tabla 16. Fracción líquida de los hidrolizados después de la precipitación. (Elaboración propia)

MUESTRA: FRACCION LIQUIDA DE LOS HIDROLIZADOS LUEGO DE LA PRECIPITACION								
Muestra	V (biomasa)/mL	C H ₂ SO ₄ (N)	V H ₂ SO ₄ /mL	C(N)/ppm	C (Proteína)/ppm	MEDIA	Total (ppm)	
E1	2	0,1	3,68	2576,00	11076,80	10971,45	10971,45	
	2	0,1	3,61	2527,00	10866,10			
Acetona	E1P1S	2	0,1	2,05	1435,00	6170,50	10715,60	
		2	0,1	2,11	1477,00	6351,10		
	E1P1L	2	0,1	1,55	1085,00	4665,50		
		2	0,1	1,41	987,00	4244,10		
Etanol	E1P2S	2	0,1	1,51	1057,00	4545,10	10655,40	
		2	0,1	1,47	1029,00	4424,70		
	E1P2L	2	0,1	2,09	1463,00	6290,90		
		2	0,1	2,01	1407,00	6050,10		
CaCl ₂	E1P3S	2	0,1	0,65	455,00	1956,50	11031,65	
		2	0,1	0,63	441,00	1896,30		
	E1P3L	2	0,1	3,05	2135,00	9180,50		
		2	0,1	3	2100,00	9030,00		
Sulfato de amonio	E1P4S	2	0,1	1,6	1120,00	4816,00	22996,40	
		2	0,1	1,69	1183,00	5086,90		
	E1P4L	2	0,1	6,03	4221,00	18150,30		
		2	0,1	5,96	4172,00	17939,60		
Ácido TCA	E1P5S	2	0,1	0,93	651,00	2799,30	10625,30	
		2	0,1	0,96	672,00	2889,60		
	E1P5L	2	0,1	2,63	1841,00	7916,30		
		2	0,1	2,54	1778,00	7645,40		
HE CC 0,45	HE CC 0,45	2	0,1	2,36	1652,00	7103,60	11904,55	
		2	0,1	2,47	1729,00	7434,70		
	HE PERM 0,22	2	0,1	1,69	1183,00	5086,90		
		2	0,1	1,74	1218,00	5237,40		
	HE PERM 50 KDa	2	0,1	1,53	1071,00	4605,30		
		2	0,1	1,55	1085,00	4665,50		
E2	E2	2	0,1	6,33	4431,00	19053,30	18345,95	
		2	0,1	5,86	4102,00	17638,60		
E2P3S	E2P3S	2	0,1	0,66	462,00	1986,60	12943,00	
		2	0,1	0,63	441,00	1896,30		
E2P3L	E2P3L	2	0,1	3,61	2527,00	10866,10	11001,55	
		2	0,1	3,7	2590,00	11137,00		
E2P5S	E2P5S	2	0,1	1,33	931,00	4003,30	4334,40	11859,40

PROPHACTION

	2	0,1	1,55	1085,00	4665,50			
E2P5L	2	0,1	2,59	1813,00	7795,90	7525,00		
	2	0,1	2,41	1687,00	7254,10			
E3	2	0,1	5,87	4109,00	17668,70	17292,45	17292,45	
	2	0,1	5,62	3934,00	16916,20			
E3P1S	2	0,1	1,73	1211,00	5207,30	5041,75	15832,60	
	2	0,1	1,62	1134,00	4876,20			
E3P1L	2	0,1	3,51	2457,00	10565,10	10790,85		
	2	0,1	3,66	2562,00	11016,60			
E3P2S	2	0,1	1,45	1015,00	4364,50	4319,35	16374,40	
	2	0,1	1,42	994,00	4274,20			
E3P2L	2	0,1	4,01	2807,00	12070,10	12055,05		
	2	0,1	4	2800,00	12040,00			
E3P3S	2	0,1	1,73	1211,00	5207,30	5101,95	16976,40	
	2	0,1	1,66	1162,00	4996,60			
E3P3L	2	0,1	4,01	2807,00	12070,10	11874,45		
	2	0,1	3,88	2716,00	11678,80			

Tabla 17. Caracterización muestra. (Elaboración propia)

Muestra	Determinación de C (mg/L)		Determinación de N	
	TOC	Carbohidratos	NKT (mg prot)	NT (mg/L)
E1	8008,22	1586,42	2551,50	1844,2
E1P1S	5320	572,52	1456,00	988,6
E1P1L	-	995,18	1036,00	-
E1P2S	803,2	359,57	1043,00	577,5
E1P2L	-	958,25	1435,00	-
E1P3S	618,4	128,17	448,00	497,05
E1P3L	5630	1183,96	2117,50	1420,5
E1P4S	814,2	486,37	1151,50	579
E1P4L	2605,6	1269,72	4196,50	9580
E1P5S	5920	818,91	661,50	1153
E1P5L	4036	17846,48	1809,50	1865
HE CC 0,45	7923,044	735,20	1690,50	1362
HE PERM 0,45	9315,97	1055,69	1200,50	1281
HE 0,22	6994,554	970,55	1078,00	1674
E2	16530	7046,20	4266,50	4047,5
E2P3S	5810	1703,18	451,50	1248
E2P3L	10610	5113,65	2558,50	
E2P5S	6890	6156,80	1008,00	
E2P5L	17225	27635,78	1750,00	2811
E3	21670	2094,26	4021,50	4168,5
E3P1S	4745	413,91	1172,50	932,5
E3P1L	-	1514,76	2509,50	
E3P2S	1756	350,25	1004,50	936,5
E3P2L	-	1471,78	2803,50	
E3P3S	6600	741,81	1186,50	1384,5
E3P3L	14170	1436,56	2761,50	2934

7 Bibliografía

a b c d e f g h "HAMAP: proteoma completo de *Paracoccus denitrificans* (cepa Pd 1222)". *HAMAP (Anotación manual y automatizada de alta calidad de proteomas microbianos), servidor de proteómica ExpPAS y (Expert Protein Analysis System) del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB)*. Instituto Suizo de Bioinformática.

Ación Fernández, F., Gómez-Serrano, C., Fernández-Sevilla, J. (2018). *Recovery of Nutrients from Wastewaters Using Microalgae: Review*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2 (September). Department of Chemical Engineering, University of Almeria. 1-13 Disponible en: <https://doi:10.3389/fsufs.2018.00059>

Adnan, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Snoussi, M., Badraoui, R., Alreshidi, M., Elasbali, A. M., Al-Soud, W. A., Alharethi, S. H., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2022). *Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization*. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 3982, 14(19), 3982. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/POLYM14193982>

Agencia Europea de Medio Ambiente. (2024). *Plastics*. Recuperado el 28 de agosto de 2024. Disponible en: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/in-depth/plastics?activeAccordion=dd2e16ef-4d34-48ae-bd38-31258544004d>.

Ahmed M.B., Zhou J.L., Ngo H.H., Guo W., Thomaidis N.S., Xu J. (2017) *Journal of Hazardous Materials*, 323

Al-Zuhair, S., Ashraf, S., Hisaindee, S., Darmaki, N. A., Battah, S., Svistunenko, D., Reeder, B., Stanway, G., & Chaudhary, A. (2017). *Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins*. *Engineering in Life Sciences*, 17(2), 175-185. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201600127>. » <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201600127>

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. D. R., Leite, M. D. O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021). *Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976-2002.

Andersen, R.A. (2013b). *The microalgal cell. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), Handbook of microalgal culture* (Chap. 1, 1st ed., pp. 1-20). Oxford: John Wiley & Sons. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118567166.ch1>.

Anderson, A. J. y Dawes, E. A. (1990). *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472.

Andler, R., Vivod, R., Steinbüchel, A. (2019). *Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber*. *El Sevier. Journal Of Bioscience and Bioengineering*. Vol 127. Issue 3. Pages 360-365. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172318306352>

Ansari, F. A., Shriwastav, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2017). *Exploration of microalgae biorefinery by optimizing sequential extraction of major metabolites from Scenedesmus obliquus*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(12), 3407-3412.

Araúz P. (2021). *Bioplástico de La Cascarilla de Arroz y La Fécula de Maíz*. (Proyecto) Disponible en: <https://es.scribd.com/document/548283021/BIOPLASTICO-DE-LA-CASCARILLA-DE-ARROZ-Y-LA-FECULA-DE-MAIZ>

Arcos, M. (2007). *Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxicanoatos mediante Un biorreactor discontinuo*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). *Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production*. *Foods*, 6(5), 33.

Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., García-Encina, P.A., 2016. *Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse*. *Bioresour. Technol.* 201, 182e190.

Bordel, S., Rob, J.M., van Spanning y Santos-Beneit, F. (2021). *Imaging and modelling of poly (3-hydroxybutyrate) synthesis in Paracoccus denitrificans*: Article. Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, School of Industrial Engineering, University of Valladolid. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01273-x>

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). *Nutritional properties of microalgae for mariculture*. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3).

Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, & C. (1999). *The vitamin content of microalgae used in aquaculture*. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 11).

Castillo, D. (2008). *Efecto Del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.

Castillo, O.S., Torres-Badajoz, S.G., Núñez-Colín, C.A., Peña-Caballero, V., Herrera-Méndez, C.H., Rodríguez-Núñez, J.R. (2017). *Producción de Biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas*. *Hidrobiología*. Universidad de Guanajuato, México. 27 (3): 337-352

Capson-Tojo G., Batstone D.J., Grassino M., Vlaeminck S.E., Puyol D, Verstraete W, Kleerebezem R., Oehmen A., Ghimire A., Pikaar I.j, Lema J.M., Hülsen T. (2020) *Biotechnology Advances*, 43, 107567

Cerrone, F., Davis, R., Kenny, S.T., Woods, T., O'Donovan, A., Gupta, V.K, Tuohy, M., Babu, R.P., O'Kiely, P., O'Connor, K. (2015). *Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation*. *El Sevier. Bioresource Technology*. Vol 191. Pages 45-52. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415006628>

Chai, W. S., Tan, W. G., Halimatul Munawaroh, H. S., Gupta, V. K., Ho, S. H., & Show, P. L. (2021). *Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review*. *Environmental Pollution*, 269, 116236. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.116236>

Chavan, S., Yadav, B., Tyagi, R.D., Drogui, P. (2021). *A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks*. *El Sevier. Vol 341*. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421012426>

Choonut, A., Prasertsan, P., Klomklao, S., & Sangkharak, K. (2020). *Bacillus thermoamylovorans-related strain isolated from high temperature sites as potential producers of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA)*. *Current Microbiology*, 77, 3044-3056.

Corrêa, P. S., Morais Junior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2020). *Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods*. *Processes*, 9(1), 10.

Creaprint. Inmould Label specialists. *Bioplásticos: la guía definitiva en 2022*. Disponible en: <https://www.creaprintiml.com/es/que-son-bioplasticos/>

Crutchik, D., Franchi, O., Caminos, L., Jeison, D., Belmonte, M., Pedruoso, A., Val del Rio, A., Mosquera-Corral, A., Luis-Campos, J. (2020). *Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production: A Feasible Economic Option for the Treatment of Sewage Sludge in Municipal Wastewater Treatment Plants*: A journal. Vol 12. Issue 4. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/4/1118#>

Cuellar-Bermúdez, S.P., Aguilar-Hernández, I., Cardenas-Chavez, D.L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M.A., & Parra-Saldívar, R. (2015). *Extraction and purification of high-value metabolites from micro-algae. Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190-209. PMID: 25223877. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12167>

D'Alessandro, A.B., & Antoniosi Filho, N.R. (2016). *Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review*. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 58, 832-841. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>

Del Campo, J.A., García- González, M., & Guerrero, M.G. (2007). *Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current State and perspectives*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1163-1174. PMID:17277962. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>

D'Hondt E., Martín-Juárez J., Bolado S., Kasperoviciene J., Koreiviene J., Sulcius S., Elst K., Bastiaens L. (2017) *Cell disruption technologies. In Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. Ed: Muñoz R. and González-Fernández C., Elsevier.

Dobrogojski, J., Spychalski, M., Lucinski, R., Borek, Stawomir. (2018). *Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates: A review*. Vol.:(0123456789)1 3Acta 40:162. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>

Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017). *B-glucanos, su Producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género Nannochloropsis (Ochrophyta, Eustigmatales)*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52 (1), 33-49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000100003>

Estévez, O. (2021). *Cultivo de microalgas mediante el uso de fotobiorreactores*. Petro Energía. Disponible en: <https://www.petroenergia.info/post/cultivo-de-microalgas-mediante-el-uso-de-fotobiorreactores>

European Bioplastics. *Market*. Disponible en: <https://www.european-bioplastics.org/market/>

Filipigh, A.A., (2021). *Valorización de un consorcio de microalgas y bacterias: comparación de métodos convencionales y nuevos métodos de extracción asistida*. (Trabajo Fin de Máster). Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control de Calidad Químicos. Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias. Valladolid

Fortune Business Insights. *Plastic Market Size, share y COVID-19 Impact Analysis*. Más información disponible en: <https://www.fortunebusinessinsights.com/plastics-market-102176>

Gao J., Weng W., Yan Y., Wang Y., Wang Q. (2020) *Chemosphere*, 249, 126107

García, D., Posadas, E., Blanco, S., Ación, G., García-Encina, P., Bolado, S., & Muñoz, R. (2018). *Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors*. *Bioresource Technology*, 248, 120–126. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>

Gherghel A., Teodosiu C., De Gis S. (2019) *J. of Cleaner Production*, 228, 244-263.

Grados, R.; Álvarez M.T.; Gimenez A. y Mattiasson, B. (2008). *Degradación anaeróbica de desecho agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxicanoatos*. *Biofarbo* 16, 28-35.

Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). *Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides**. *Algal Research*, 29, 266-276.

Guil-Guerrero, J. L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J. C., Campra-Madrid, P., & RebolosoFuentes, M. M. (2004). *Functional properties of the biomass of three microalgal species*. *Journal of Food Engineering*, 65(4), 511–517. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.02.014>.

Guldhe, A., P. Singh, S. Kumari, I. Rawat, K. Permaul & Bux, F. 2016. *Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized Aspergillus niger whole cell lipase biocatalyst*. *Renewable Energy* 85: 1002-1010. Disponible en: <https://10.1016/j.renene.2015.07.059>

Harms, N., De Vries, G. E., Maurer, K., Veltkamp, E., & Stouthamer, A. H. (1985). *Isolation and characterization of Paracoccus denitrificans mutants with defects in the metabolism of one-carbon compounds*. *Journal of bacteriology*, 164(3), 1064-1070.

Hashemian, M., Ahmadzadeh, H., Hosseini, M., Lyon, S., & Pourianfar, H. R. (2019). *Production of microalgae-derived high-protein biomass to enhance food for animal feedstock and human consumption*. In *Advanced bioprocessing for alternative fuels, biobased chemicals, and bioproducts* (pp. 393-405). Woodhead Publishing.

Hernández, D., Molinuevo-Salces, B., Riaño, B., Larrán-García, A. M., Tomás-Almenar, C., & García-González, M. C. (2018). *Recovery of protein concentrates from microalgal biomass grown in manure for fish feed and valorization of the by-products through anaerobic digestion*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 28.

Hildebrand, G., Poojary, M.M., O'Donnell, C., Lund, M.N., Garcia-Vaquero, M., Tiwari, B.K., 2020. *Ultrasound-assisted processing of Chlorella vulgaris for enhanced protein extraction*. *J. Appl. Phycol.* 32, 1709-1718. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>

John, P. and Whatley, F.R. (1975). *Paracoccus denitrificans and the evolutionary origin of the mitochondrion*. Nature. 254(5500), 495-498. PMID 235742.

Kalaiyehzini, D., & Ramachandran, K. B. (2015). *Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from glycerol by Paracoccus denitrificans in a batch bioreactor: Effect of process variables*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 45(1), 69–83. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.887582>

Kalia, V.C., Singh-Patel, S.K., Shanmugam, R., Lee, J. (2021). *Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications*. El Sevier. Bioresource Technology. Vol 326. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421000766>

Katagi, V. N., Arekal, R. N., & Divyashree, M. S. (2024). *Utilization of palm oil and palm oil effluent as a carbon source for the production of polyhydroxybutyrate co-polyhydroxyhexanoate P (HB-co-HHx) a biopolymer in bacillus sp*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology.

Khomlaem, c., Aloui, H., Deshmukh, A., Yun, J-H., Kim, H-S., Napathorn, S.C., Kim, B.S. (2020). *Defatted Chlorella biomass as a renewable carbon source for polyhydroxyalkanoates and carotenoids co-production*. EL Sevier. Algal Research. Vol 51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221192642030391X>

Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., & Choen, Z. (2011). *LC-PUFA from photosynthetic microalgae: Occurrence, biosynthesis, and prospects in Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 91 (4), 905-915. PMid: 21720821. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-001-3441-x>

Khueychai, S., Jangpromma, N., Choowongkomon, K., Joompang, A., Daduang, S., Vesaratchavest, M., Payoungkiattikun, W., Tachibana, S., Klaynongsruang, S. (2018). *A novel ACE inhibitory peptide derived from alkaline hydrolysis of ostrich (Struthio camelus) egg white ovalbumin*. El Sevier. Process Biochemistry. Vol 73. Pages 235-245. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511318305142>

Kochert, G. (1978). *Quantitation of the macromolecular components of microalgae*. In *Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods* (pp. 189–195). Cambridge University Press London.

Koller M. (2018) *Fermentation*, 4, 30.

Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., Reis, M.A.M. (2018). *Burkholderia thailandensis as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids*. *El Sevier. Bioresource Technology*. Vol 247. Pages 829-837. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852417317030>

Kumar, R., Strezov, V., Weldekidan, H., He, J., Singh, S., Kan, T., & Dastjerdi, B. (2020). *Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 123, 109763. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2020.109763>

Kusmayadi, A., Huang, C. Y., Leong, Y. K., Lu, P. H., Yen, H. W., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2023). *Integration of microalgae cultivation and anaerobic co-digestion with dairy wastewater to enhance bioenergy and biochemicals production*. *Bioresource technology*, 376, 128858.

Larrosa, A. P., Camara, A. S., Moura, J. M., & Pinto, L. A. (2018). *Spirulina sp. biomass dried/disrupted by different methods and their application in biofilms production*. *Food science and biotechnology*, 27, 1659-1665.

Law, S. Q., Mettu, S., Ashokkumar, M., Scales, P. J., & Martin, G. J. (2018). *Emulsifying properties of ruptured microalgae cells: Barriers to lipid extraction or promising biosurfactants? Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 438-446.

Laycock, B.; Halley, P.; Pratt, S.; Werker, A.; Lant, P. (2013). *The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates*. *Prog. Polym. Sci.* 38, 536-583.

Le Guillard, C., Bergé, J.P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J.Y., Baron, R., Fleurence, J., Dumay, J., 2016. *Soft liquefaction of the red seaweed grateloupia turuturu yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process*. J. Appl. Phycol. 28, 2575-2585. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0788-x>

Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. *Bioresource Technology*, 101(1, Suppl 1), S75-S77. PMID:19386486. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>

LLuesma Vidal, M. (2022). *Gestión del agua residual: Importancia para la Salud Pública. Esquema sinóptico de una estación depuradora*. Disponible en: <https://blog.uchceu.es/enfermeria/gestion-agua-residual-salud-publica/>

Lorenzo-Hernando, A., Ruiz-Vegas, J., Vega-Alegre, M., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). *Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation*. *Bioresource Technology*, 273, 599–607. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.11.068>.

Luengo, J.M. 2018, *Bioplásticos de origen bacteriano: los poli-hidroxicanoatos*. *AmbioCiencias*, 16, 5-24. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

Martín J., Lorenzo A., Muñoz R., Blanco S., Bolado S. (2016) *Bioresource Technology*, 218, 265–271

Martín J., Vega M., Riol E., Muñoz R., Bolado S. (2019) *Bioresource Technology*, 281, 239-249
Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., Bolado Rodríguez, S., 2016. *Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment*. *Bioresour. Technol.* 218, 265-271.

Martín-Juárez, J., Vega-Alegre, M., Riol-Pastor, E., Muñoz-Torre, R., Bolado-Rodríguez, S., 2019. *Optimization of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater*. *Bioresour. Technol.* 281, 239–249. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>

Martin Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P.A., Muñoz Torre, R., Bolado Rodríguez, S., 2021. *Evaluation of pretreatments for solubilization of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater*. *Chemosphere* 268, 129330. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129330>

Medrano-Barboza, J., (2024). *Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal de Scenedesmus sp. Cultivada en agua residual de faenamiento avícola con luz artificial*. (Trabajo de Fin de Carrera). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Internacional SEK.

Medrano-Barboza, J., Herrera-Rengifo, K., Aguirre-Bravo, A., Ramírez-Iglesias, J. R., Rodríguez, R., & Morales, V. (2022). *Pig Slaughterhouse Wastewater: Medium Culture for Microalgae Biomass Generation as Raw Material in Biofuel Industries*. *Water (Switzerland)*, 14(19). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/w14193016>

Mohamad, K. A., Mohd, S. Y., Sarah, R. S., Mohd, H. Z., & Rasyidah, A. (2017, September). *Total nitrogen and total phosphorus removal from brackish aquaculture wastewater using effective microorganism*. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1885, No. 1). AIP Publishing.

Morillas-España, A., Sánchez-Zurano, A., Lafarga, T., del Mar Morales-Amaral, M., Gómez-Serrano, C., Ación-Fernández, F. G., & González-López, C. V. (2021). *Improvement of wastewater treatment capacity using the microalga Scenedesmus sp. and membrane bioreactors*. *Algal Research*, 60, 102516. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.10251>.

Moungprayoon, A., Lunprom, S., Reungsang, A., & Salakkam, A. (2024). *Poly(3-hydroxybutyrate) production from cassava processing wastes by Paracoccus sp. through high cell density cultivation: Effects of substrates limitation and kinetic analysis*. *Industrial Crops and Products*, 213, 118442. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2024.118442>.

Muhr, A., Rechberger, E. M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Strohmeier, K., Schober S., Mittelbach M. & Koller, M. (2013). *Novel description of mcl-PHA biosynthesis by Pseudomonas chlororaphis from animal-derived waste*. *Journal of Biotechnology*, 165(1), 45-51.

Mundoplast. (2024, agosto 28). *Producción mundial de bioplásticos*. Recuperado de <https://mundoplast.com/produccion-mundial-bioplasticos-2/>

Naranjo, J.M. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos Agroindustriales*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Manizales. Colombia.

Nitsos, C., Filali, R 646., Taidi, B., Lemaire, J., 2020. *Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review*. *Biotechnol. Adv.* 45, 107650. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>

Onay, M., Sonmez, C., Oktem, H. A., & Yucel, M. (2016). *Evaluation of various extraction techniques for efficient lipid recovery from thermo-resistant microalgae, Hindakia, Scenedesmus and Micractinium species*. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7(02), 141-150. Disponible en <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2016.72012>»
<http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2016.72012>

Plöhn, M., Spain, O., Sirin, S., Silva, M., Escudero-Oñate, C., Fernando-Climent, L., Allahverdiyeva, Y., Funk, C. (2021). *Wastewater treatment by microalgae*. Wiley Online Library. *Physiologia Plantarum*, Vol 173. Issue 2. Pages 568-578.

Postma, P.R., Suarez-García, E., Safi, C., Olivieri, G., Olivieri, G., Wijffels, R.H., Wijffels, R.H., 2017. *Energy efficient bead milling of microalgae: effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates*. *Bioresour. Technol.* 224, 670-679.

Rahman, A., & Miller, C. D. (2017). *Microalgae as a source of bioplastics*. In *Algal green chemistry* (pp. 121-138). Elsevier.

Rambabu, K., Thanigaivelan, A., Bharath, G., Sivarajasekar, N., Banat, F., & Show, P. L. (2021). *Biosorption potential of Phoenix dactylifera coir wastes for toxic hexavalent chromium sequestration*. *Chemosphere*, 268, 128809. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128809>.

Ramírez, S., Julián, A., Parra, V., John, A., Adalucy, Á.A., (2017). *Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos*. Programa de Microbiología. Universidad Libre de Pereira. Vol. 6. Pág. 10-16.

Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Suneja, K. G. (2022). *Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content*. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282-290.

Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). *Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis*. *Bioresource Technology*, 335(May). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>

Rojo, E. M., Filipigh, A. A., & Bolado, S. (2023). *Assisted-enzymatic hydrolysis vs chemical hydrolysis for fractional valorization of microalgae biomass*. *Process Safety and Environmental Protection*, 174, 276–285. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.03.067>

Rueda, E., Senatore, V., Zarra, T., Naddeo, V., García, J., & Garfí, M. (2023). *Life cycle assessment and economic analysis of bioplastics production from cyanobacteria*. *Sustainable Materials and Technologies*, 35, e00579.

Salakkam, A., Sittijunda, S., Mamimin, C., Phanduang, O., Reungsang, A., 2021. *Valorization of microalgal biomass for biohydrogen generation: A review*. *Bioresour. Technol.* 322, 124533. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124533>

Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). *Cultivation of microalgae and cyanobacteria: Effect of operating conditions on growth and biomass composition*. *Molecules*, 25(12), 2834.

Sankaran, R., Manickam, S., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J. S., & Show, P. L. (2018). *Extraction of proteins from microalgae using integrated method of sugaring-out assisted liquid biphasic flotation (LBF) and ultrasound*. *Ultrasonics sonochemistry*, 48, 231-239.

Sawant, S.S., Salunka, B.K., Kim, B.S. (2015). *Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate halophile Paracoccus sp. LL1*. *El Sevier. Bioresource Technology*. Vol 194. Pages 247-255. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415009724>

Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Zohaib Nawaz, M., Nawaz, S., Asraful, A., Aamer Mehmood, M., (2020). *Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review*. *Science of The Total Environment*. Vol 704. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>

Simbaña, S. S. C., Mora, D. S. A., Pavón, S. J. L., & Sierra, T. I. B. (2023). *Microplásticos, un problema de salud pública emergente*. *Revista Información Científica*, 102(1), 48.

Slocombe, S. P., Zhang, Q. Y., Ross, M., Stanley, M. S., & Day, J. G. (2016). *Screening and Improvement of marine microalgae for oil production*. In S. P. Slocombe & J. R. Benemann (Eds.), *Microalgal production for biomass and high-value products* (Chap. 4, pp. 91-113). Boca Ratón: CRC Press.

Sohn, Y. J., Son, J., Lim, H. J., Lim, S. H., Park, S. J. (2022). *Valorization of lignocellulosic biomass for polyhydroxyalkanoate production: Status and perspectives*. *Bioresource Technology*, 127575.

Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2018). *A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines*. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 146–162. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.09.058>.

Spínola, M. P., Costa, M. M., & Prates, J. A. (2023). *Studies on the impact of selected pretreatments on protein solubility of *Arthrospira platensis* microalga*. *Agriculture*, 13(1), 221.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). *Commercial applications of microalgae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. Disponible en: <https://doi.org/10.1263/JBB.101.87>.

Su, J. J., Ding, S. T., & Chung, H. C. (2020). *Establishing a smart farm-scale piggery wastewater treatment system with the internet of things (IoT) applications*. *Water (Switzerland)*, 12(6). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/w12061654>.

Suarez García, E., Van Leeuwen, J., Safi, C., Sijtsma, L., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H. E., & Van den Berg, C. (2018). *Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications*. *Bioresource Technology*, 268, 197-203. PMID:30077880. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.131>. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.131>

Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. (2000). *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates biological polyesters*. *Progress on polymer science*, 25, 1503-15y.35.

Taher, H., S. Al-zuhair, A. H. Al-marzouqi, Y. Haik & M. Farid. 2014. *Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production*. *Biomass and Bioenergy* 66: 159-167. Disponible en: <https://10.1016/j.biombioe.2014.02.034>.

Tanaka, K., Mori, S., Hirata, M., Matsusaki, H. (2016). *Autotrophic Growth of Paracoccus denitrificans in Aerobic Condition and the Accumulation of Biodegradable Plastics from CO₂*. Environment and Ecology Research. Japan. 4(4):231-236. Disponible en: <https://DOI:10.13189/eer.2016.040407>

Urbina, L., Eceiza, A., Gabilondo, N., Ángeles Corcuera, M. (2019). *Valorisation of apple waste for active packaging: multicomponent polyhydroxyalkanoate coated nanopapers with improved hydrophobicity and antioxidant capacity*. El Sevier. Food Packaging and Shelf Life. Vol 21. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289419302224>

Valencia, A. I. S., Zamora, U. R., Rodríguez, M. M., Ramírez, J. Á., Peláez, M. L. S., & Ortiz, C. F. (2021). *Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW)*. Journal of Water Process Engineering, 40, 101975.

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., & Eppink, M. H. (2013). *Biorefinery of microalgae for food and fuel*. Bioresource technology, 135, 142-149.

Viegas, C.V., Hachemi, I., Arvela, P.M., Smeds, A., Aho, A., Freitas, S.P., Cristiane Gorgônio, C.M., Carbonetti, G., Peurla, M., Paranko, J., Kumar, N., Gomes-Aranda, D.A., Murzin, D.Y. (2015). *Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga Chlorella sp.* El Sevier. Algal Research. Vol 11. Pages 156-164. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926415001642>

Wang, S. B., Hu, Q., Sommerfeld, M., & Chen, F. (2003). *An optimized protocol for isolation of soluble proteins from microalgae for two-dimensional gel electrophoresis analysis*. Journal of applied phycology, 15, 485-496.

Wang, Q., Wang, Y., Huang, M., Hayat, K., Kurtz, N.C., Wu, X., Ahmad, M., Zheng, F., 2021. *Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties*. Ultrason. Sonochem. 80, 105789. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105789>

Wikipedia Enciclopedia Libre: Disponible en el siguiente enlace:

https://es.wikipedia.org/wiki/Purificaci%C3%B3n_de_prote%C3%ADnas

Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). *Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches*. In Engineering in Life Sciences (Vol. 19, Issue 12, pp. 860–871). Wiley-VCH Verlag. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>.

Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). *Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview*. *Cells*, 10(2), 393.

Yan, Y., Liu, F., Gao, J., Wan, J., Ding, J., Li, T., 2022. *Enhancing enzyme activity via low intensity 698 ultrasound for protein extraction from excess sludge*.

Zeller, M. A., Hunt, R., Jones, A., & Sharma, S. (2013). *Bioplastics and their thermoplastic blends from Spirulina and Chlorella microalgae*. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(5), 3263-3275.

Zhang W., Alvarez-Gaitan J.P., Dastyar D., Saint C.P., Zhao M., Short M.D. (2018), *Water*, 10, 545