



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**OPTIMIZACIÓN EN REACTOR CONTINUO DE LA BIOCONVERSIÓN DE
SYNGAS EN OSMOLITOS.**

Autora: Dña. Vanessa Rioja Virumbrales
Tutoras: Dña. Sara Cantera Ruiz de Pellón
Dña. Eva Marcos-Rodrigo

Valladolid, Julio, 2025



RESUMEN

El syngas derivado de residuos orgánicos representa una materia prima renovable clave para procesos basados en economía circular. Aunque los procesos biológicos son más sostenibles que los físico-químicos, su desarrollo está limitado por el escaso número de bacterias capaces de valorizar syngas y por la baja rentabilidad de los productos obtenidos (ácidos grasos o etanol). En este contexto, *Hydrogenibacillus schlegelii*, una bacteria carboxidótrofa y halotolerante destaca como plataforma prometedora por su capacidad de transformar syngas en compuestos de alto valor como la hidroxiectoína (HE) y proteína microbiana.

Este trabajo optimiza por primera vez un proceso continuo de producción de HE y proteína a partir de syngas, evaluando diferentes condiciones operativas: tiempos de residencia, tasas de dilución y relaciones $H_2:CO$.

Se realizaron tres experimentos. El primero con relación $H_2:CO$ 35:30 y 1 h de residencia; el segundo con 2 h; y el tercero, con $H_2:CO$ 55:20, tasas de dilución variables y recuperación de proteína. Un mayor tiempo de residencia duplicó la producción de HE (19,0 a 39,6 $mg_{HE_{total}} \cdot L^{-1}$), mientras que tasas de dilución elevadas aumentaron la recuperación total de HE (3,33 a 8,76 $g_{HE_{total}} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$), con un 65% de HE extracelular. Además, se alcanzaron 46,7 $g_{proteína} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ de proteína microbiana y una mejora significativa en la eliminación de CO (del 24,9% al 81,8%). Este proyecto demuestra la viabilidad de valorizar por vía biológica el syngas en compuestos de valor industrial, contribuyendo así hacia una economía circular y sostenible.

Palabras clave: Valorización de syngas, proceso continuo, *Hydrogenibacillus schlegelii*, hidroxiectoína, proteína microbiana.



ABSTRACT

Syngas derived from organic waste represents a key renewable raw material for processes based on a circular economy. Although biological processes are more sustainable than physicochemical ones, their development is limited by the limited number of bacterias capable of valorizing syngas and the low profitability of the resulting products (fatty acids or ethanol). In this context, *Hydrogenibacillus schlegelii*, a carboxydophilic and halotolerant bacterium, stands out as a promising platform due to its ability to transform syngas into a high-value compounds such as hydroxyectoine (HE) and microbial protein.

This study optimizes for the first time a continuous process to produce HE and protein from syngas, evaluating different operational conditions: residence times, dilution rates and $H_2:CO$ ratios.

Three experiments were conducted. The first experiment featured a 35:30 $H_2:CO$ ratio and 1 h residence time; the second, a 2 h residence time; and the third, a 55:20 $H_2:CO$ ratio with variable dilution rates and protein recovery. Longer residence times doubled HE production (from 19.0 to 39.6 $mg_{HEtotal} L^{-1}$), while higher dilution rates increased total HE recovery (from 3.33 to 8.76 $g_{HE total} m^{-3} d^{-1}$), with 65% of HE being extracellular. Furthermore, 46.7 of microbial protein were achieved, along with a significant improvement in CO removal (from 24.9% to 81.8%). This project demonstrates the feasibility of biologically valorizing syngas into industrially valuable compounds, contributing to a circular and sustainable economy.

Key words: Syngas valorization, continuous process, *Hydrogenibacillus schlegelii*, hydroxyectoine, microbial protein.



Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Syngas.....	1
1.2.	Microorganismos carboxidótrofos.....	3
1.3.	Compuestos de alto valor	3
1.4.	Justificación experimental	6
2.	Objetivos.....	7
3.	Materiales y métodos.....	8
3.1.	Inóculo.....	8
3.2.	Medio de cultivo AMS.....	8
3.3.	Fase gas.....	9
3.4.	Métodos analíticos	10
3.5.	Procedimiento experimental.	13
4.	Resultados y discusión.....	16
4.1.	Crecimiento celular durante las distintas estrategias de operación.	18
4.2.	Consumo de syngas durante las diferentes estrategias de operación	19
4.3.	Producción de hidroxietanoína.	20
4.4.	Producción de proteínas.....	22
5.	Conclusiones.....	24
6.	Bibliografía	25



Índice Figuras

Figura 1. Formas de obtención de productos derivados del syngas.	2
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso experimental.....	13
Figura 3. Evolución de la concentración de biomasa (SST) en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución 0,0125 d ⁻¹ (Exp. 1), 0,05 d ⁻¹ y 0,1 d ⁻¹ (Exp. 2) y 0,15 d ⁻¹ , 0,21 d ⁻¹ y 0,24 d ⁻¹ (Exp. 3). Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.	18
Figura 4. a) Evolución de la degradación de CO con el tiempo en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲). b) Evolución de la degradación de H ₂ con el tiempo en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲). Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.	19
Figura 5. a) Evolución de la concentración de HE total en los Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución 0,0125 d ⁻¹ (Exp. 1), 0,05 d ⁻¹ y 0,1 d ⁻¹ (Exp. 2) y 0,15 d ⁻¹ , 0,21 d ⁻¹ y 0,24 d ⁻¹ (Exp. 3). b) Evolución de la concentración de hidroxietoína extracelular en los Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲).	21
Figura 6. Evolución de la concentración de proteínas (▲), y de la proteína específica durante el Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución de 0,15 d ⁻¹ , 0,21 d ⁻¹ y 0,24 d ⁻¹ . Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.....	23



Índice Tablas

Tabla 1. Composición syngas (%v/v) en función de la materia prima empleada.....	1
Tabla 2. Composición del medio AMS.	8
Tabla 3. Composición de los elementos traza ácidos y básico y de la solución de vitaminas con CaCl_2	9
Tabla 4. Tiempos de retención en GC-TCD.	10
Tabla 5. Resumen de las condiciones de operación experimentadas.	14
Tabla 6. Condiciones y resultados obtenidos en cada experimento	17

1. Introducción

En la Unión Europea se producen anualmente 88 toneladas de residuos orgánicos municipales los cuales tradicionalmente se han tratado mediante métodos como el compostaje, la incineración, el reciclaje o su depósito en vertederos (European Environment Agency, 2020).

En 2022, en torno a un 23% de los residuos municipales totales fueron destinados a vertederos (Statista, 2025). Sin embargo, esta práctica presenta numerosas desventajas como un elevado coste, la emisión de olores, la contaminación del aire, del agua y del suelo, así como la liberación de gases de efecto invernadero (GEIs) que contribuyen al cambio climático (Hoareau et al., 2021). Con el fin de minimizar dichos impactos, la Comisión Europea ha establecido como objetivo que, para el año 2035, se reduzcan en un 10% la cantidad de residuos municipales enviados a vertederos (Parlamento Europeo, 2024).

Una alternativa es la gasificación de los residuos orgánicos, la cual consiste en una oxidación parcial de los residuos a alta temperatura, con déficit de oxígeno, generando como producto un gas combustible denominado syngas. Este proceso es sostenible e innovador debido a que se reducen las emisiones de GEIs, mejora la eficiencia en el tratamiento de residuos y disminuye la dependencia de vertederos.

1.1. Syngas

El syngas está compuesto principalmente de una mezcla de hidrógeno (H_2) y monóxido de carbono (CO), y en menor medida dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y trazas de otros compuestos (Fiore et al., 2020).

La composición y calidad del syngas dependen de factores como la materia prima de partida (Tabla 1), el agente gasificante o la temperatura de gasificación, entre otros (Instituto para la Diversificación Ahorro de la Energía, 2007).

Tabla 1. Composición syngas (%v/v) en función de la materia prima empleada.

Sustratos	CO	H_2	CO_2	CH_4	Bibliografía
Residuo Sólido Urbano (RSU)	41	33,7	13,8	4,1	(Klinghoffer & Castaldi, 2013)
Digestato	10-14	9-12	13-17	3-5	(Freda et al., 2019)
Madera	17-18,5	37-40	32-35	7,5-8,5	(Turn et al., 1998)
Carbón	14,5-15,5	38-45,7	25,7-32	10-12,5	(Chen et al., 2017)

Esta mezcla de gases es una materia prima rica en carbono y energía tanto para la generación de una gran variedad de productos químicos como de energía (Figura 1)(Neto et al., 2025). Sin embargo, a pesar de su potencial como materia prima

renovable, las tecnologías para llevar a cabo una conversión físico-química o biológica no siempre son rentables.

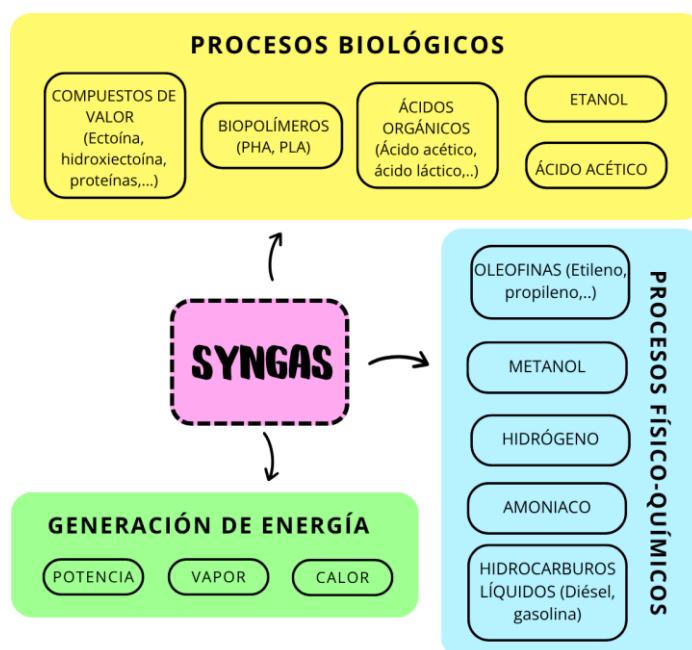


Figura 1. Formas de obtención de productos derivados del syngas.

Para la transformación físico-química del syngas en productos químicos, uno de los procesos más empleados es el proceso físico-químico de Fischer-Tropsch, basado en la conversión del syngas, en presencia de un catalizador, en hidrocarburos líquidos como combustibles sintéticos (Araujo-Ferrer et al., 2013). No obstante, posee desventajas como la necesidad de un acondicionamiento previo del syngas para eliminar contaminantes, o la dependencia a una relación específica de $H_2:CO$ (Ruiz & Sánchez, 2014).

Es por ello que surgen las tecnologías biológicas como una alternativa para la transformación de syngas en productos químicos. La aplicación de estos procesos posee ventajas económicas debido a la disminución del coste al eliminar las etapas de purificación tanto del gas como del producto final. Además, gracias a la diversidad microbiana existen microorganismos capaces de metabolizar los componentes del syngas en composiciones variables, no requiriéndose de una relación de $H_2:CO$ específica, y con capacidad para mantener una alta selectividad del producto (Marcos-Rodrigo et al., 2025).

Actualmente, la biotransformación del syngas se encuentra condicionada tanto por la reducida cantidad de microorganismos estudiados capaces de llevar a cabo este proceso, como por la escasa diversidad y valor comercial de los productos obtenidos (Köpke & Simpson, 2020). En consecuencia, la búsqueda de nuevos microorganismos capaces de convertir el syngas en compuestos de alto valor es una línea de investigación de gran interés.

1.2. Microorganismos carboxidótrofos

El CO, además de ser uno de los componentes mayoritarios del syngas, es un sustrato tóxico para la mayoría de los seres vivos.

Los microorganismos carboxidótrofos son aquellos capaces de emplear dicho sustrato como fuente de carbono y energía y se clasifican en función de su tolerancia al CO (Esquivel-Elizondo et al., 2017). Los carboxidótrofos toleran concentraciones de CO superiores al 1 % (v/v) y son capaces de usar el CO como fuente de energía y carbono, mientras que los carboxidóvoros, además de requerir de otra fuente de carbono orgánico, solo toleran concentraciones menores al 1 (%v/v) (Cordero et al., 2019).

Dentro de los carboxidótrofos, se pueden clasificar distintas categorías en función de su metabolismo, entre las cuales se encuentran: los microorganismos anaerobios y aerobios.

Los carboxidótrofos anaerobios son los más estudiados en la transformación de syngas. Este grupo incluye a los acetógenos, como *Clostridium ljungdahlii*, los cuales requieren de completa ausencia de O₂ y emplean la vía de Wood-Ljungdahl para transformar el CO en compuestos de bajo valor comercial como el etanol o el acetato (Ragsdale, 2008; Siebert et al., 2022).

Por otro lado, los carboxidótrofos aerobios, aunque menos explorados, representan una alternativa prometedora. Estos microorganismos requieren de la presencia de O₂ y son capaces de fijar el CO₂ a través del ciclo de Calvin-Benson-Bassham, utilizando el CO como fuente de energía (Siebert et al., 2022).

Aunque se conocen muy pocos, algunos carboxidótrofos son capaces de crecer en ambientes extremos. Un ejemplo de carboxidótrofo aerobio extremófilo es la cepa *Hydrogenibacillus schlegelii*. Se trata de una bacteria termófila y halotolerante, es decir, su temperatura óptima de crecimiento son 65°C y es capaz de crecer en ambientes con alta salinidad ([NaCl] <6%). Esta capacidad de crecer en ambientes extremos es posible gracias a la producción de osmolitos protectores como la hidroxiectoína. Por lo que, por todas las características mencionadas, dicho microorganismo es capaz de emplear H₂, CO y CO₂ como únicas fuentes de carbono y energía en un ambiente termófilo y salino, resultando en la producción de hidroxiectoína (Marcos-Rodrigo et al., 2025; Rasigraf et al., 2014).

1.3. Compuestos de alto valor

1.3.1. Hidroxiectoína

Los microorganismos halófilos y halotolerantes que habitan en entornos de alta salinidad deben hacer frente al estrés osmótico. Para sobrevivir, regulan la concentración intracelular de solutos de bajo peso molecular, lo que les permite mantener el equilibrio osmótico y prevenir la pérdida de agua celular, evitando así la plasmólisis (contracción y desprendimiento del citoplasma respecto a la pared celular) y la deshidratación irreversible, sin interferir con el metabolismo celular.

Para dicha regulación, los microorganismos acumulan sales inorgánicas o solutos compatibles, también denominados osmolitos. Los osmolitos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular y se dividen en clases estructurales: azúcares (sacarosa), aminoácidos, polioles (glicerol) o aminoácidos derivados (ectoína e hidroxiectoína). Según la duración del estrés osmótico, el nivel de salinidad, la

disponibilidad de sustratos y osmolitos en el medio, las bacterias emplean una variedad de solutos u otros para alcanzar el equilibrio (Pastor et al., 2010).

La ectoína (ácido (S)-2-metil-3,4,5,6-tetrahidropirimidino-4-carboxílico) y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína (ácido 5D,6S-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidina-6-carboxílico) (HE) son dos de los osmolitos más representativos y estudiados. Estos compuestos, producidos de forma natural por diversos microorganismos extremófilos, desempeñan un papel clave en la protección celular frente a condiciones ambientales extremas. Además de su función biológica, se está implementando su uso en la industria farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades protectoras frente a la radiación ultravioleta, inflamación y reacciones alérgicas (Liu et al., 2021).

Ambos compuestos actúan como osmoprotectores intracelulares, sin embargo, la HE tiene mayor capacidad de estabilización y además es protectora contra el estrés por calor (Pastor et al., 2010).

Estos compuestos pueden obtenerse mediante producción biológica o síntesis química. Sin embargo, esta última presenta una baja selectividad por lo que a nivel industrial se opta por la producción biológica (Stępniewska et al., 2014). Dentro de la vía biológica, puede llevarse a cabo empleando cepas puras, microorganismos modificados o consorcios.

Las cepas puras poseen elevada especificidad en la producción del compuesto deseado, pero requieren condiciones de operación más específicas y controladas. En cuanto a los consorcios, poseen mayor robustez y flexibilidad frente a variaciones del entorno, no obstante, pueden producir otros compuestos además del deseado por lo que disminuye la especificidad del producto (Carmona-Martínez et al., 2021; Liu et al., 2021). A pesar de las distintas alternativas, la industria farmacéutica tiende a favorecer el uso de organismos no modificados y requiere de un exigente grado de pureza por lo que es preferible el empleo de extremófilos puros (Becker & Wittmann, 2020).

Generalmente, la HE se sintetiza junto con ectoína como parte del mismo proceso. Sin embargo, el interés creciente por obtener HE de manera específica ha impulsado el desarrollo de estrategias de cultivo que favorecen su síntesis diferencial. El aumento de la temperatura y salinidad del medio de cultivo es una prometedora estrategia debido a que la HE posee una temperatura de transición vítrea más elevada que la ectoína (Liu et al., 2021).

Económicamente, la ectoína posee un precio de mercado que oscila entre 600-1000 \$/kg. Sin embargo, el precio de la HE es un 40% superior al de la ectoína convirtiéndose así en un producto interesante con un alto valor añadido (Herrero-Lobo et al., 2024).

Entre sus aplicaciones, en el sector farmacéutico se emplea en productos de inhalación, gotas oculares y “sprays” nasales para tratar enfermedades como alergias o conjuntivitis (Carmona-Martínez et al., 2021). En cosmética, destaca como humectante ya que protege y estabiliza las membranas de las células contra el efecto de la radiación, viento y humedad, los cuales provocan el envejecimiento y deshidratación de la piel (Wang & Zhang, 2010). Estos compuestos también se utilizan en biotecnología para el desarrollo de plantas resistentes al estrés salino y la sequía (Kadam et al., 2024).

1.3.2. Proteínas

Entre los productos de valor comercial también se encuentra la proteína microbiana, como una alternativa al uso de proteína animal y vegetal.

La creciente necesidad de proteína para la alimentación humana, junto con el rápido incremento de la población mundial, ha generado un gran reto: se estima que para el año 2050 será necesario producir anualmente alrededor de 1250 millones de toneladas de carne y productos lácteos anualmente para cubrir la demanda global de proteína animal (Torrejón, 2020).

El principal problema para cubrir la demanda futura es que la producción de proteína animal no es sostenible debido a la baja conversión entre las materias primas. La industria cárnica y láctea emplean proteína vegetal para transformarla en animal. Sin embargo, se requiere de 6 kg de proteína vegetal para producir 1 kg de proteína animal. Además, la proteína de origen vegetal requiere de grandes extensiones de campos de cultivo y de agua (Torrejón, 2020).

Es por ello que surge la proteína unicelular (*single cell protein*, SCP por sus siglas en inglés) como un suplemento empleado en la dieta tanto de humanos como de animales, siendo un sustituto prometedor, eficiente y sostenible con el medio ambiente, frente a la proteína animal y vegetal (Jiang et al., 2022). Además, desde un punto de vista económico, en 2022 el mercado de SCP se valoró en 13100 millones de dólares (Ye et al., 2024).

Dicha proteína puede proceder de levaduras, bacterias, hongos o algas y posee diversas ventajas. Por un lado, las SCP tienen una elevada productividad debido a las altas tasas de crecimiento de los microorganismos y el alto grado de conversión entre las materias primas y la proteína obtenida. Por otro lado, las SCP permiten un suministro constante debido a que el cultivo de microorganismos, excepto en el caso de las algas, se realiza en reactores cerrados y es independiente de las condiciones climáticas y de extensiones de tierra (Forero-Ararat et al., 2021).

La SCP se utiliza en diversos procesos industriales, como los relacionados con la producción de papel o cuero, donde actúa como estabilizador de espuma. Además, se emplea en la industria alimentaria, especialmente en la producción de alimentos vegetarianos o veganos como sustituto de la carne, y también como aditivo alimentario gracias a su contenido en vitaminas y compuestos aromáticos (Torrejón, 2020).

Específicamente, la SCP bacteriana es muy prometedora debido a sus altas velocidades de crecimiento, en comparación con otros microorganismos (Olmedo Bellido, 2017). Sin embargo, actualmente su uso está restringido para la alimentación animal (Torrejón, 2020).

1.4. Justificación experimental

Actualmente, debido al gran interés en alcanzar una economía circular y reducir la cantidad de residuos depositados en vertederos, la valorización de residuos orgánicos como materia prima para la obtención de syngas se ha convertido en una alternativa medioambientalmente atractiva.

Sin embargo, la composición del syngas varía según la naturaleza de los residuos utilizados, implicando dificultades para el empleo eficiente de tecnologías fisicoquímicas. Es por ello por lo que se plantea la transformación biológica del syngas como una estrategia prometedora. Mediante la transformación biológica se obtiene una mayor especificidad del producto, así como una mayor rentabilidad económica debido a la disminución del coste de las etapas de purificación del gas, ya que no se requiere de un ratio de composición del syngas específico, así como por la obtención de productos de valor añadido, como la HE o la proteína microbiana. No obstante, el rango de microorganismos estudiados capaces de llevar a cabo esta transformación es limitado.

Estudios previos han demostrado la viabilidad de la obtención de HE en procesos biológicos en lotes en los cuales se ha empleado la cepa pura *Hydrogenibacillus schlegelii* alimentada con syngas. En este trabajo, se avanzará el estado del arte estudiando la optimización de la obtención de distintos compuestos de valor, HE y proteína principalmente, en un proceso en biorreactores operados en continuo.

Para ello, se empleará la cepa pura *H. schlegelii* con el fin de evaluar como distintas composiciones de syngas afectan a la producción de HE y proteína. Asimismo, se probarán diferentes tasas de dilución con el objetivo de establecer un proceso estable que permita maximizar la recuperación de compuestos de valor y facilitar su escalado a nivel industrial.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es optimizar el proceso continuo de valorización del syngas en productos de alto valor, como la HE y las proteínas microbianas, utilizando la cepa pura *Hydrogenibacillus schlegelii* DSM2000 bajo distintas composiciones de syngas.

Para ello se definen los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar cómo afecta la variación del tiempo de residencia y la composición de syngas en la conversión del syngas en HE y proteínas.
- Comparar los resultados obtenidos para identificar los parámetros que maximizan la conversión del syngas.
- Optimizar el proceso para conseguir la mayor productividad de HE y proteína microbiana.

3. Materiales y métodos

3.1. Inóculo

El inóculo empleado fue una cepa pura de *Hydrogenibacillus schlegelii* DSM 2000 adquirida en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (Brunswick, Alemania).

Previo a su cultivo en reactores, el inóculo se cultivó a 65 °C en botellas de 1,2 L, las cuales contenían 200 mL de medio AMS con 4% de NaCl. Dichas botellas se cerraron herméticamente y se introdujo en ellas una mezcla de syngas y oxígeno con la siguiente composición (% v/v): 28 H₂: 24 CO: 20 CO₂: 20 O₂: 8 CH₄ para los experimentos con syngas 35 H₂: 30 CO; y 42 H₂: 17 CO: 12 CO₂: 20 O₂: 8 CH₄ para aquellos con syngas 55 H₂: 20 CO, coincidiendo con la fase gaseosa que se utilizaría posteriormente en el reactor.

El crecimiento del microorganismo fue monitoreado mediante el consumo de la fase gaseosa. Una vez alcanzada una alta actividad bacteriana, se extrajo medio a tubos de ensayo cónicos tipo Falcon y se centrifugaron para retirar el sobrenadante. El pellet celular resultante se resuspendió en medio de cultivo procedente del reactor a inocular.

3.2. Medio de cultivo AMS

Para la preparación del medio mineral salino de amonio también llamado, medio AMS, se disolvieron en agua destilada tipo I los compuestos mostrados en la Tabla 2. Además, se añadieron 2 mL de elementos traza básicos y 2 mL de elementos traza ácidos. Posteriormente, se enrasó a 2 L y se esterilizó en el autoclave a 121 °C y 1,2 atm durante 20 minutos.

Tras dejar enfriar el medio autoclavado a temperatura ambiente, se añadieron 20 mL de la solución de vitaminas con CaCl₂ y 20 mL de una solución de KH₂PO₄, cuya concentración es de 100 g·L⁻¹.

La composición de los elementos traza ácidos y básicos, así como de la solución de vitaminas con CaCl₂, se detallan en la Tabla 3.

Tabla 2. Composición del medio AMS.

Compuesto	g·L ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1
NaCl	40
NH ₄ Cl	0,5
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,88
Fe(II)SO ₄ · 7H ₂ O	0,005
KNO ₃	1

Tabla 3. Composición de los elementos traza ácidos y básico y de la solución de vitaminas con CaCl_2 .

Elementos traza básicos	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
NaOH	400
Na_2SeO_3	17,3
Na_2WO_4	29,4
Na_2MoO_4	20,5
Elementos traza ácidos	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
HCl	1800
H_3BO_3	61,8
MnCl_2	61,25
FeCl_2	943,5
CoCl_2	64,5
NiCl_2	12,86
ZnCl_2	67,7
CuCl_2	13,35
Vitaminas con CaCl_2	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Biotina	20
Nicotinamida	200
P-ácido aminobenzoico	100
Vitamina B1 (tiamina)	200
Ácido pantoténico	100
Piridoxamina	500
Vitamina B12(Cianocobalamina)	100
Vitamina B2 (Riboflavina)	100
CaCl_2	5500

3.3. Fase gas

Los gases empleados para el crecimiento de los cultivos, tanto en el reactor como en las botellas de cultivo, fueron oxígeno puro y dos composiciones de syngas con distinta relación $\text{H}_2:\text{CO}$ (Carburos Metálicos S.A., España).

El syngas 35:30 está compuesto por $\text{H}_2:\text{CO}:\text{CO}_2:\text{CH}_4$ a razón de 35:30:25:10 % (v/v). Por otro lado, se empleó un syngas 55:20 con una composición de 55:20:15:10 % (v/v). Ambas concentraciones están basadas en valores reales de syngas generados a partir de desechos orgánicos como lodos de depuradora o biomasa forestal, mediante gasificación con vapor (Galvagno et al., 2009; Turn et al., 1998).

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Análisis de la composición y medida del caudal de la fase gas.

La composición de la fase gas a la entrada y la salida, así como el consumo de cada uno de sus componentes, se realizó haciendo uso de la cromatografía de gases mediante el equipo Agilent 8860 GC-TCD (Agilent, EE.UU.).

Este equipo se conforma por un detector de conductividad térmica (TCD), una columna Agilent 19091L-413 (30 m x 320 μm x 0,25 μm), para la separación de los distintos componentes, y un gas portador, que en este caso fue el helio, a una velocidad de 4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. Respecto a la temperatura de operación en el inyector, horno y detector fueron 150 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ y 200 $^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Los tiempos de retención de los distintos componentes de la fase gas son los mostrados en la Tabla 4, conformando un tiempo total de análisis de 9,9 minutos.

Tabla 4. Tiempos de retención en GC-TCD.

Componente	CO ₂	H ₂	O ₂	N ₂	CH ₄	CO
t _R (min)	3,08	7,33	7,59	7,94	8,65	9,51

Mediante el uso de una jeringa de gases de 250 μL (Hamilton Company, EE. UU.), se sacó muestra del toma-muestras de la línea de entrada y salida de gas del reactor. Seguidamente se despresurizó la jeringa y se inyectó en el equipo de cromatografía.

Una vez obtenido el cromatograma resultante, para determinar la concentración de cada componente se utilizaron las rectas de calibrado para relacionar el área resultante con la concentración (%v/v), resultando así la proporción de cada componente en la mezcla gaseosa.

Para determinar las eficacias de eliminación (EE,%) de CO e H₂, así como la eficacia de producción (EP,%) de CO₂, en el reactor se emplearon la Ecuación 1 y 2, respectivamente. En cuanto a la determinación del caudal de salida de la fase gas se llevó a cabo mediante una técnica de desplazamiento de líquido, es decir, se hizo uso de una probeta graduada invertida en la cual se registró el volumen de fase líquida del interior de la probeta desplazado durante un minuto.

$$EE (\%) = \frac{[x]_{\text{entrada}} \cdot Q_{\text{entrada}} - [x]_{\text{salida}} \cdot Q_{\text{salida}}}{[x]_{\text{entrada}} \cdot Q_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EP (\%) = \frac{[x]_{\text{salida}} \cdot Q_{\text{salida}} - [x]_{\text{entrada}} \cdot Q_{\text{entrada}}}{[x]_{\text{entrada}} \cdot Q_{\text{entrada}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

siendo:

[x]_{entrada}: concentración de CO/H₂/CO₂ a la entrada ($\text{m}^3 \cdot (\text{m}^3_{\text{total fase gas}})^{-1}$)

[x]_{salida}: concentración de CO/H₂/CO₂ a la salida ($\text{m}^3 \cdot (\text{m}^3_{\text{total fase gas}})^{-1}$)

Q_{entrada}: caudal a la entrada ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)

Q_{salida}: caudal a la salida ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)

3.4.2. Determinación de la concentración de hidroxietileno.

Para cuantificar la concentración de osmolito, en este caso HE, tanto en el medio extracelular como intracelular, se empleó cromatografía líquida de alta resolución con el equipo HPLC Water Alliance e2695 Separations Module (Waters, EE.UU.) mediante un muestreo automático que analiza 5 μL de muestra y detección UV a 210 nm. Dicho HPLC consta de una columna Polaris 3Å NH₂ 150x 4,6 mm (Agilent Technologies, EE.UU.) empleando como fase móvil una solución de agua y acetonitrilo 99,9 % en proporción 25:75 (% v/v). La separación se realizó a 40 °C con un flujo de 0,6 mL·min⁻¹.

Para la preparación de las muestras, se vertieron 2 mL del medio de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10000 g y 4 °C durante 10 minutos en AccuSpin Micro 17R (Fisher Scientific, EE.UU.). Una vez centrifugado, el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de 0,22 μm y se vertió en un vial de HPLC, obteniendo así la muestra de HE extracelular la cual se almacenó a 4 °C hasta su medición.

El pellet resultante de la centrifugación tras retirar el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su extracción.

Para extraer el osmolito, se llevó a cabo un proceso de lisis celular. Para ello, se añadió al tubo que contiene el pellet, 30 $\pm$ 5 mg de perlas de circonio junto con 2 mL de etanol al 70 (% v/v) y se agitó a 3450 oscilaciones·min⁻¹ durante tres ciclos de 30 segundos en un Minibead-beater 16 (Biospec, EE.UU.). Seguidamente, se centrifugó de nuevo a 10000 g y 4 °C durante 10 minutos, y se filtró 1 mL del sobrenadante con un filtro de jeringa de 0,22 μm a un vial de HPLC.

Para conocer la relación entre el área de la señal obtenida y la concentración del analito se realizaron curvas de calibrado con patrones de HE pura (>95%) (Sigma Aldrich, USA).

3.4.3. Determinación de la concentración de proteínas.

La medición de proteínas se llevó a cabo en el espectrofotómetro UV mini-1240 (Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 562 nm.

Para preparar la muestra, se vertieron 2 mL del medio de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó durante 10 minutos, a 4 °C y 10000 g en AccuSpin Micro. Tras finalizar dicho proceso se extrajo el sobrenadante y se almacenó el pellet a 4 °C hasta su extracción.

La extracción de las proteínas se llevó a cabo haciendo uso del kit de análisis de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Para ello, se resuspendió la muestra en 1 mL de agua ultrapura. Posteriormente, 50 μL de la muestra resuspendida se pasaron a un nuevo tubo donde se añadió 1 mL de reactivo de trabajo y se mezcló. Seguidamente, se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos y finalmente se procedió a su medición.

Para conocer la relación entre la concentración de proteínas y la densidad óptica se realizó una curva de calibrado con patrones estándar de proteína de suero bovino a distintas concentraciones.

3.4.4. Medición del pH.

Para medir el pH, se extrajeron 2 mL de medio de cultivo del reactor, los cuales se dejaron enfriar en un tubo cerrado hasta alcanzar temperatura ambiente. Este procedimiento es importante debido a que la temperatura afecta al valor de pH. Además, debe estar cerrado para que el CO₂ de la fase gas quede retenido ya que también es un factor que modifica el valor final.

Una vez enfriado se procedió a su medida mediante el equipo pH-metro Basic 20 pH (Crison, España).

3.4.5. Análisis de sólidos suspendidos totales y densidad óptica.

El seguimiento de la biomasa se llevó a cabo mediante la medición de los sólidos suspendidos totales (SST) y la densidad óptica.

Para determinar la concentración de biomasa, primero se introdujo en un desecador un filtro de 0,45 µm durante 15 minutos y se pesó (m_i) en una balanza analítica.

A continuación, empleando un sistema de filtración, se hicieron pasar 20 mL de muestra (V) a través del filtro que posteriormente se lavó con 30 mL de agua tipo I para eliminar posibles sales restantes. Una vez finalizada la filtración, se secó el filtro a 65 °C durante 48 h en la estufa. Pasado este tiempo, se introdujo de nuevo al desecador por 15 minutos y se pesó (m_f).

Conociendo tanto el volumen de muestra empleado, como la masa de sólidos suspendidos se calculó los SST en el medio con la Ecuación 3.

$$\text{SST (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{m_f - m_i}{V} \quad \text{Ecuación 3}$$

En relación a la densidad óptica (OD₆₅₀), se tomaron 2 mL de muestra de caldo de cultivo y se midió en el espectrofotómetro UV mini-1240 (Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 650 nm.

3.4.6. Medición del carbono inorgánico y carbono orgánico total.

La medición de las muestras de carbono inorgánico (CI) y de carbono orgánico total (COT) se llevaron a cabo en el equipo TOC-L CPH (Shimadzu, Japón) el cual lleva integrado un auto-muestreador ASI-L (Shimadzu, Japón).

Para la preparación de la muestra de CI, se introdujeron 20 mL de agua tipo I y seguidamente 180 µL de NaOH 0,5 M en una botella serológica cerrada con un septum con el fin de aumentar el pH y que el CO₂ quede retenido en el medio consiguiendo su transformación en carbonatos. Posteriormente, se inyectaron 10 mL de medio, haciendo uso de un filtro de jeringa PES de 0,22 y se dejó de reposar hasta trasvasarlo a un vial previo a su medición.

Por otro lado, en el caso de la muestra de COT, se introdujeron 20 mL de agua tipo I y 1 mL de HCL 0,5 M en un vial para bajar el pH. Seguidamente, se vertieron 10 mL de medio filtrado y se dejó abierto el vial durante mínimo una hora para la liberación del CO₂ y su posterior medición en el equipo.

A la hora de medir las muestras, se colocó en la secuencia de análisis, antes y después de las muestras, un vial de blanco (agua tipo I) y patrones de 100 mg·L⁻¹ de COT y CI.

3.5. Procedimiento experimental.

3.5.1. Diagrama de flujo y descripción del proceso experimental.

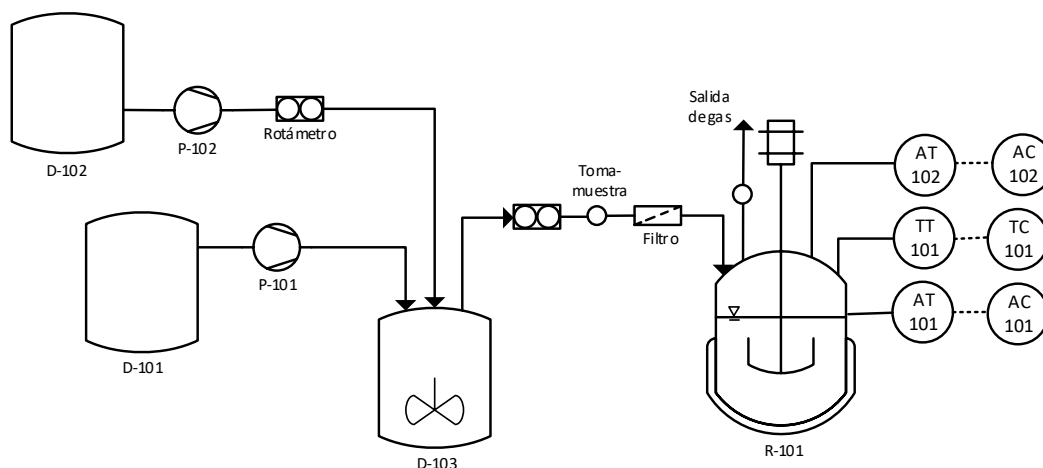


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso experimental.

El proceso consistió en un biorreactor de tanque de burbujeo de 2 L agitado por un motor eléctrico a 100 rpm. En el reactor, se disponía de un control continuo de temperatura (TT-101), de pH (AT-102), así como el monitoreo del oxígeno disuelto (AT-101) mediante el equipo BioFlo 120 (Eppendorf, España).

En la tapa del reactor se instaló un septum por el cual se inyectaron las muestras líquidas de vitaminas y de solución de KH_2PO_4 . Asimismo, se dispuso de un toma-muestra de líquido mediante el cual se introdujo el inóculo, descargándose directamente en contacto con el medio del interior del reactor, además de ser la vía de extracción de muestra de medio de cultivo.

En cuanto a la fase gas, la corriente de entrada, regulada por un rotámetro, procedía de una cámara de mezcla (D-103) en la cual se homogenizaban distintas corrientes. Esta cámara de mezcla era alimentada mediante dos corrientes, una impulsada por una bomba (P-102) y controlada mediante un rotámetro, y la otra impulsada por una bomba (P-101). Dicha fase gas se introdujo de forma continua, en el fondo del reactor a través de un difusor de acero inoxidable, produciendo pequeñas burbujas resultando así, en una mayor superficie de transferencia gas-líquido.

En el conducto de la corriente gaseosa de entrada se dispuso de un toma-muestras seguido de un filtro de 0,2 μm PTFE serie Acro 50 (PALL CORPORATION, España) con el fin de evitar la contaminación del sistema. Por otro lado, en la corriente de salida se colocó otro toma-muestras para poder determinar la composición de la fase en estos puntos. Tanto en el toma-muestra de la corriente de entrada como de salida, se conectaron sondas para llevar a cabo un control continuo de la temperatura.

Para llevar a cabo la fermentación en biorreactor de mezcla perfecta se realizó un procedimiento experimental similar en los distintos experimentos.

3.5.2. Condiciones de operación

El reactor se operó a una temperatura de 65 °C. En relación con el control de pH, se dispuso de un bombeo de NaOH 1 M según necesidad, es decir, con el objetivo de mantener el pH en torno a 6,5-7.

En los experimentos (Exp.) realizados, tras autoclavar el conjunto reactor-medio se mantuvo el reactor en abiótico durante 2-3 días con el fin de descartar posibles fugas y comprobar que la composición de la fase gaseosa era la deseada y se mantenía estable tanto a la entrada como a la salida.

Una vez finalizado el periodo de abiótico, se procedió con la inoculación del reactor.

○ EXPERIMENTO 1

La fase gas empleada se compuso de una mezcla de oxígeno puro y syngas ($H_2:CO$) 35:30. El flujo de alimentación al reactor, trabajando con un tiempo de residencia de 1 h, resultó en una composición de 20:80 (%v/v), es decir, 20 % O_2 y 80 % syngas, quedando por lo tanto una composición de la corriente ya homogenizada de ($H_2:CO:CO_2:CH_4:O_2$) 28:24:20:8:20 % (v/v). Además, se trabajó con una tasa de dilución del líquido de $0,0125\ d^{-1}$.

○ EXPERIMENTO 2

Como en el experimento anterior, la fase gas fue una mezcla de O_2 y syngas 35:30. No obstante, en este caso se trabajó con un tiempo de residencia de 2 h y se varió la tasa de dilución a $0,05\ d^{-1}$ y un posterior aumento a $0,1\ d^{-1}$.

○ EXPERIMENTO 3

La fase gas empleada se compuso de una mezcla de O_2 y syngas ($H_2:CO$) 55:20, resultando en una corriente de entrada de la fase gas ya homogenizada de composición ($H_2:CO:CO_2:CH_4:O_2$) 42:17:12:5:20 % (v/v). Bajo estas condiciones, se trabajó a un tiempo de residencia de 2 h y una tasa de dilución del líquido variable en función del valor del COT.

Como se puede ver en la Tabla 5, a modo de resumen se muestran las condiciones de operación llevadas a cabo en cada experimento.

Tabla 5. Resumen de las condiciones de operación experimentadas.

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Fase gas	H_2	28	28	42
	CO	24	24	17
	CO_2	20	20	12
	CH_4	8	8	5
	O_2	20	20	20
Tiempo de residencia del gas (horas)		1	2	2
Tasa de dilución del líquido ($días^{-1}$)		0,0125	0,05/0,1	Variable según el valor del COT
Duración (días)		10	28	22

3.5.3. Monitorización del proceso.

Durante la realización de los distintos experimentos, diariamente se midió la composición de la fase gas, tanto a la salida como a la entrada, así como el caudal de salida.

Una vez inoculado, hasta que inició el crecimiento del microorganismo, se extrajeron diariamente 4 mL para llevar a cabo el control por duplicado del pH y OD₆₅₀, según lo explicado en la Sección 3.4.4.

Durante la etapa de crecimiento exponencial de la biomasa, diariamente se procedió a la toma de muestra para la medición por duplicado de HE, tanto intracelular como extracelular, así como de proteínas y la medición del carbono orgánico total (COT). Para todo ello, se extrajeron 28 mL de caldo de cultivo. Cada 2 días se extrajeron 60 mL adicionales para proceder con la medición del carbono inorgánico (CI) y de la concentración de biomasa (SST).

Durante la etapa de crecimiento estacionario de la biomasa, se procedió con el reemplazo continuo de medio, es decir, se extrajo medio del reactor, a mayores del extraído para llevar a cabo los análisis independientemente de la tasa de dilución (la cual era variable en cada etapa y estado celular), y se introdujo medio nuevo. Para cada uno de los experimentos se trabajó a distinta tasa de dilución, la cual se calcula con la Ecuación 4.

$$t_d (d^{-1}) = \frac{V_R}{V_T} \quad \text{Ecuación 4}$$

siendo V_R : volumen reemplazado (mL) y V_T : volumen total del reactor (mL).

4. Resultados y discusión

H. schlegelii es un microorganismo carboxidótrofo capaz de emplear el CO como única fuente de carbono y energía. Además, se trata de un halotolerante, es decir, es capaz de crecer a concentraciones de salinidad de hasta un 6%, termófilo con temperaturas óptimas de crecimiento de (50-75 °C) produciendo HE de forma aislada debido al estrés osmótico (Cantera et al., 2023; Marcos-Rodrigo et al., 2025).

En los experimentos realizados en lotes por Cantera et al. (2023) y Marcos-Rodrigo et al. (2025), las concentraciones específicas máximas de HE intracelular fueron de $62,2 \pm 7,9$ y $32,3 \pm 5,3$ mg_{HE,intracelular}g_{biomasa}, respectivamente.

En esta investigación se trató de maximizar la producción de HE y proteína microbiana optimizando la estrategia de operación de biorreactores operados en continuo. Para ello, se llevaron a cabo tres estrategias de operación experimentales (Exp).

En la Tabla 6, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en cada estrategia de operación experimental.



Tabla 6. Condiciones y resultados obtenidos en cada experimento

		Exp. 1	Exp. 2		Exp. 3		
Tiempo de residencia del gas (h)		1	2		2		
Relación H ₂ :CO (%v/v)		28:24	28:24		42:17		
Tasas de dilución (d ⁻¹)		0,0125	0,05	0,1	0,15	0,21	0,24
Eficacia promedio de eliminación (%)	H ₂	12,0±2,0	67,2±3,2	68,1±2,7	93,6±1,3	89,2±1,9	87,4±7,2
	CO	-	24,9±9,4	33,0±5,6	74,8±9,5	32,7±15,6	81,8±6,8
Eficacia promedio de producción (%)	CO ₂	14,8±4,8	27,0±5,4	31,0±5,7	25,7		47,1±10,2
[Biomasa] _{máxima} (mg·L ⁻¹)		228,5	380,9	414,5	309,3±1,3	300,5±8,2	350,1±6,3
[HE] _{extracelular, máxima} (mg·L ⁻¹)		13,7	25,9	20,6	21,6	21,4	23,1
[HE] _{total, máx} (mg·L ⁻¹)		19,0	39,6	33,3	38,4	31,8	36,5
[Proteínas] _{promedio} (mg·L ⁻¹)		-	-	-	160,9±13,5	122,5±36,0	191,5±2,8
Proteína específica (%)		-	-	-	56,0±10	59,9±10,1	56,1±1,8

4.1. Crecimiento celular durante las distintas estrategias de operación.

En los tres experimentos (Exp.) se observó un crecimiento celular dependiente de las condiciones de operación y de la composición del syngas.

En la Figura 3 se muestra como en todas las estrategias de operación se identifica una fase de latencia correspondiente al periodo de adaptación de la cepa pura a las condiciones del medio, para posteriormente iniciar su crecimiento en la fase exponencial.

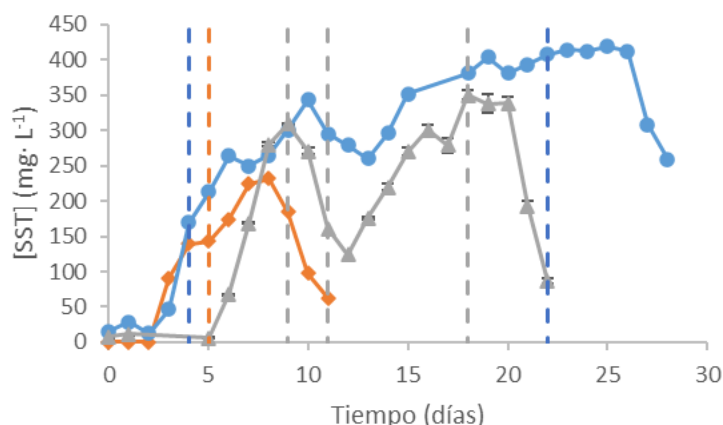


Figura 3. Evolución de la concentración de biomasa (SST) en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución 0,0125 d⁻¹ (Exp. 1), 0,05 d⁻¹ y 0,1 d⁻¹ (Exp. 2) y 0,15 d⁻¹, 0,21 d⁻¹ y 0,24 d⁻¹ (Exp. 3). Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.

Cabe destacar el tiempo de residencia como un factor determinante.

En el Exp. 1, con un tiempo de residencia de 1 h y un ratio de H₂:CO de 35:30, se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 228,5 mg·L⁻¹. La tasa de dilución probada de 0,0125 d⁻¹ mostró que a partir de la fase exponencial hay una caída de la biomasa, lo cual se relacionó con un aumento de los metabolitos inhibitorios, esto se corroboró con los resultados de COT de 117,1 mg_{COT}·L⁻¹. El COT representa la concentración de metabolitos secundarios, como compuestos intracelulares debidos a la lisis celular (aminoácidos, nucleótidos, ...). Un elevado valor de dicho parámetro puede afectar al crecimiento de la bacteria llegando a producir su muerte por toxicidad (Ranawat & Rawat, 2017; Rodero et al., 2022).

En el Exp. 2, se aumentó el tiempo de residencia a 2h, manteniéndose el ratio de gas de H₂:CO de 35:30, llegando a alcanzar concentraciones máximas de biomasa de 414,5 mg·L⁻¹, lo que evidencia una mejora en la eficiencia del crecimiento celular debido a un mayor tiempo de contacto gas-líquido. En este Exp. 2 se llevaron a cabo diversas tasas de dilución (0,05 y 0,1 d⁻¹) con el fin de evitar la acumulación de metabolitos inhibitorios que produjeron la muerte celular en el Exp.1, además de reponer nutrientes esenciales. Así a una tasa de dilución de 0,05 d⁻¹, se llegaron a valores de COT de 552,3 mg_{COT}·L⁻¹ con una concentración de biomasa de 380,9 mg·L⁻¹, por lo que se aumentó la tasa de dilución a 0,1 d⁻¹ con el fin de reducir la concentración de COT logrando estabilizarlo en torno a 400 mg_{COT}·L⁻¹ alcanzando en esta etapa el máximo valor de concentración de biomasa.

En el Exp. 3, dado que es una optimización del proceso, se mantuvo el tiempo de residencia a 2h, pero se varió el ratio de gas de $H_2:CO$ de 55:20 y se aumentó la tasa de dilución en diversas ocasiones (0,15, 0,21 y 0,24 d^{-1}). El objetivo fue mantener el COT dentro del rango deseado de 150-180 $mg_{COT} \cdot L^{-1}$. Como resultado, se logró un valor medio de $146 \pm 19,4 \text{ } mg_{COT} \cdot L^{-1}$, lo que demuestra que el aumento de la tasa de dilución permite controlar el COT. Sin embargo, este ajuste conllevó una disminución en la concentración de biomasa, alcanzándose concentraciones de biomasa menores $350,1 \pm 6,3 \text{ } mg \cdot L^{-1}$, con una tasa de dilución de 0,24 d^{-1} .

4.2. Consumo de syngas durante las diferentes estrategias de operación

En cuanto al consumo de gases, se evidenció una mejora de la eficiencia con la optimización de las condiciones.

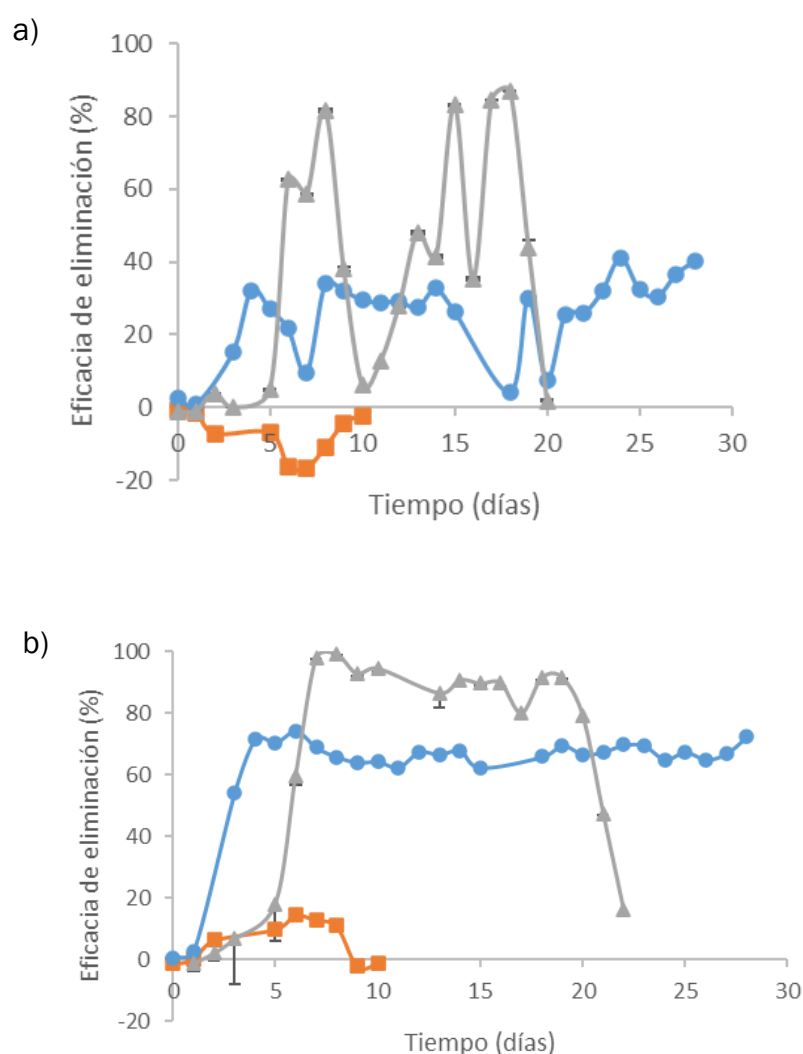


Figura 4. a) Evolución de la degradación de CO con el tiempo en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲).
b) Evolución de la degradación de H_2 con el tiempo en el Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲). Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.

En el Exp. 1, con un tiempo de residencia del gas de 1 h y un ratio de $H_2:CO$ de 35:30, como se muestra en la Figura 4a, los valores de eficacia de eliminación del CO son negativos, esto es debido a que no se pudo determinar la degradación de este

componente por falta de control del caudal de la fase gas a la salida, por lo que no se tuvo en cuenta la variación de caudal entre la salida y la entrada. Este factor resulta relevante ya que la producción de CO_2 , junto con el consumo simultáneo de O_2 e H_2 , altera el balance molar total de la fase gas, implicando la variación del caudal volumétrico entre la entrada y la salida.

Además, el bajo tiempo de residencia, 1 h, hace que el tiempo que pasa el gas en el reactor sea bajo y por consiguiente la bacteria no sea capaz de consumirlo disminuyendo así su conversión (Cherkasov et al., 2022).

No obstante, a una tasa de dilución de $0,05 \text{ d}^{-1}$ se obtuvo una eficacia media de eliminación de H_2 (Figura 4b) de $12,0 \pm 2,0 \%$ y una producción de CO_2 de $14,8 \pm 4,8 \%$.

En el Exp. 2, se aumentó el tiempo de residencia a 2h y se mantuvo el ratio de $\text{H}_2:\text{CO}$ en 35:30, resultando en una eficacia de degradación media de CO y de H_2 de $24,9 \pm 9,4 \%$ y $67,2 \pm 3,2 \%$ respectivamente, con una producción de CO_2 de $27,0 \pm 5,4 \%$ a una tasa de dilución de $0,05 \text{ d}^{-1}$. No obstante, al aumentar la tasa de dilución a $0,1 \text{ d}^{-1}$, mejoró la degradación de CO a un valor de $33,0 \pm 5,6 \%$, mientras que la del H_2 se mantuvo en $68,1 \pm 2,7 \%$ y la producción de CO_2 aumentó a valores de $31,0 \pm 5,7 \%$.

En el Exp. 3, manteniendo el tiempo de residencia y variando el ratio de $\text{H}_2:\text{CO}$ a 55:20 resultó en un consumo más variable. A una tasa de dilución de $0,15 \text{ d}^{-1}$ se obtuvo una eficiencia de degradación de CO de $74,8 \pm 9,5 \%$, mientras que la del H_2 fue mayor y más estable $93,6 \pm 1,3 \%$, produciéndose un $25,7 \%$ de CO_2 . Al llevar a cabo el aumento de la tasa de dilución, con un valor de $0,21 \text{ d}^{-1}$ hubo un cambio significativo en las eficacias de degradación de CO e H_2 en valores de $32,7 \pm 15,6 \%$, $89,2 \pm 1,85 \%$, respectivamente. No obstante, con las siguientes variaciones de las tasas de dilución se estabilizó el proceso resultando en unas eficacias de $81,8 \pm 6,8 \%$ para el CO , $87,4 \pm 7,15 \%$ para el H_2 y $47,1 \pm 10,2 \%$ para la producción de CO_2 , para una tasa de $0,24 \text{ d}^{-1}$.

En el Exp. 3 se obtuvieron mejores resultados de eliminación de los gases. Esto puede deberse a que, en presencia de sal, la mejora del crecimiento de la biomasa solo puede lograrse con una fuente de energía externa como lo es el H_2 (Marcos-Rodrigo et al., 2025). Es por ello que al aumentar la disponibilidad de dicho gas se pudo favorecer su consumo, alcanzando mayores eficacias de eliminación. Además, otro motivo de la mejora pudo ser que al aumentar la tasa de dilución se permitió el control del COT siendo esta la causa de la mejora en la eficacia de consumo de CO debido a la eliminación de metabolitos con efecto inhibitorio para el metabolismo del CO .

4.3. Producción de hidroxietoína.

Consistente con lo reportado por Marcos-Rodrigo et al., (2025), durante la realización de los tres experimentos, se detectó la producción exclusiva de HE como único osmolito, sin presencia de ectoína, lo que contrasta con lo observado en otros microorganismos que suelen generar mezclas de ambos compuestos (Cantera et al., 2023). No obstante, a diferencia de los cultivos en lote, en el sistema continuo se observó HE tanto intracelular como extracelular, lo que facilita su posterior recuperación y purificación.

Desde el inicio del crecimiento bacteriano se observó un aumento progresivo en la HE total (Figura 5a), Hasta los días 3, 3 y 5 en los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente, la HE detectada fue exclusivamente intracelular. Este fenómeno se asocia a la

respuesta de la cepa al choque osmótico inicial provocado por la alta salinidad del medio, que induce la síntesis de osmolitos para equilibrar la presión osmótica celular (Bursy et al., 2007).

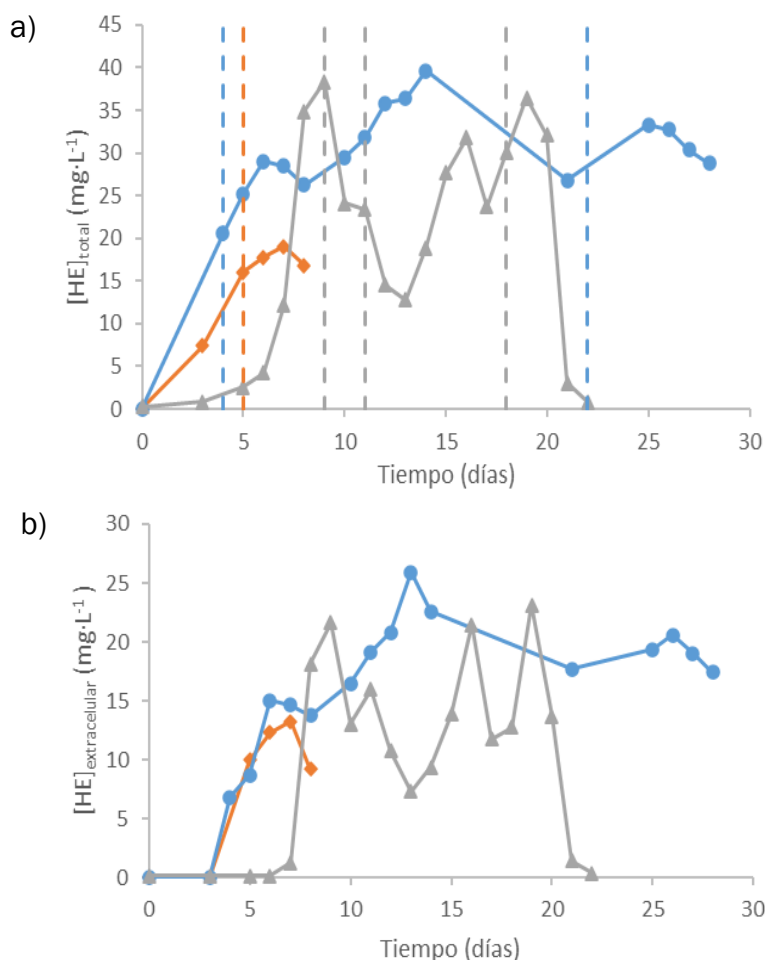


Figura 5. a) Evolución de la concentración de HE total en los Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución $0,0125 d^{-1}$ (Exp. 1), $0,05 d^{-1}$ y $0,1 d^{-1}$ (Exp. 2) y $0,15 d^{-1}$, $0,21 d^{-1}$ y $0,24 d^{-1}$ (Exp. 3). b) Evolución de la concentración de hidroxietioína extracelular en los Exp. 1 (■), Exp. 2 (●) y Exp. 3 (▲).

En el Exp. 1, con un tiempo de residencia de 1 h y una relación $H_2:CO$ de 35:30 a una tasa de dilución de $0,05 d^{-1}$ se obtuvo una producción máxima de HE total de $19,0 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$.

En el Exp. 2, manteniendo la relación de $H_2:CO$ pero aumentando el tiempo de residencia a 2 h, con una tasa de dilución de $0,05 d^{-1}$ se alcanzó un máximo de $39,6 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$ mientras que la producción promedio fue de $26,0 \pm 9,0 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$, la cual se mantuvo al aumentar la tasa de dilución a $0,1 d^{-1}$.

En el Exp. 3, manteniendo el tiempo de residencia en 2 h y variando la relación $H_2:CO$ a 55:20, se alcanzó un máximo de HE total de $38,36 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$, similar al obtenido en el Exp. anterior, manteniéndose un valor promedio de $31,3 \pm 10,0 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$, para una tasas de dilución de $0,15 d^{-1}$. Sin embargo, en este caso, al aumentar la tasa de dilución a $0,21$ y $0,24 d^{-1}$, la producción media de HE total fue de $25,1 \pm 4,8 mg_{HEtotal} \cdot L^{-1}$.

¹ y $32,9 \pm 3,3 \text{ mg}_{\text{HEtotal}}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, los cuales son valores alrededor de los obtenidos anteriormente.

Desde una perspectiva industrial, el uso de tasas de dilución más elevadas permitiría una mayor recuperación de hidroxiacetona, incluso si las concentraciones totales alcanzadas no son máximas, lo que podría traducirse en una mejor eficiencia del proceso de extracción y purificación. Es decir, para los máximos de HE total mencionados anteriormente se obtendría una productividad de $0,24$, $0,79$ y $5,75 \text{ g}_{\text{HE}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, en los Exp. 1, 2 y 3, con unas tasas de dilución de $0,0125$, $0,05$ y $0,15 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, a la máxima tasa de dilución estudiada en los distintos experimentos, con su máxima concentración de HE correspondiente, se obtendría una recuperación de $0,24$, $3,33$ y $8,76 \text{ g}_{\text{HE}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, en los Exp. 1, 2 y 3, con unas tasas de dilución de $0,0125$, $0,1$ y $0,24 \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

No obstante, estos valores corresponden a la HE total, es decir, intracelular y extracelular. Sin embargo, industrialmente la HE extracelular tiene mayor interés frente a la intracelular debido a que no debe extraerse, lo que aumentaría los costes de producción. Para las máximas tasas de dilución se recuperarían una cantidad de HE extracelular máxima de $0,17$, $2,1$ y $5,55 \text{ g}_{\text{HE}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, en los Exp. 1, 2 y 3, con unas tasas de dilución de $0,0125$, $0,1$ y $0,24 \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

La HE intracelular una vez se ha alcanzado el máximo inicial, comienza a ser excretada al medio, aumentando por lo tanto la HE extracelular (Figura 5b). En el Exp. 1, la HE extracelular máxima alcanza un valor menor ($13,7 \text{ mg}_{\text{HE,extracelular}}\cdot\text{L}^{-1}$) frente a los otros experimentos, siendo los valores en estos de $25,9 \text{ mg}_{\text{HE,extracelular}}\cdot\text{L}^{-1}$ (Exp. 2), para una tasa de dilución de $0,05 \text{ d}^{-1}$ y $23,1 \text{ mg}_{\text{HE,extracelular}}\cdot\text{L}^{-1}$ (Exp. 3), para una tasa de dilución de $0,24 \text{ d}^{-1}$. Dicho suceso puede deberse a que en el primer experimento no se llegó a alcanzar un estado estacionario y por lo tanto no tuvo lugar el equilibrio osmótico con su correspondiente excreción de HE al medio.

Con estos Exp. se ha demostrado que tanto el tiempo de residencia del gas como el aumento de la tasa de dilución son factores clave en la producción y recuperación, respectivamente, de HE. Sin embargo, la variación de la composición del syngas no genera una diferencia notoria en la producción del osmolito.

4.4. Producción de proteínas.

Como optimización del proceso, en el Exp. 3 se evaluó el potencial de la proteína microbiana generada como un compuesto de valor añadido, con el objetivo de ampliar la valorización del syngas más allá de la producción de osmolitos.

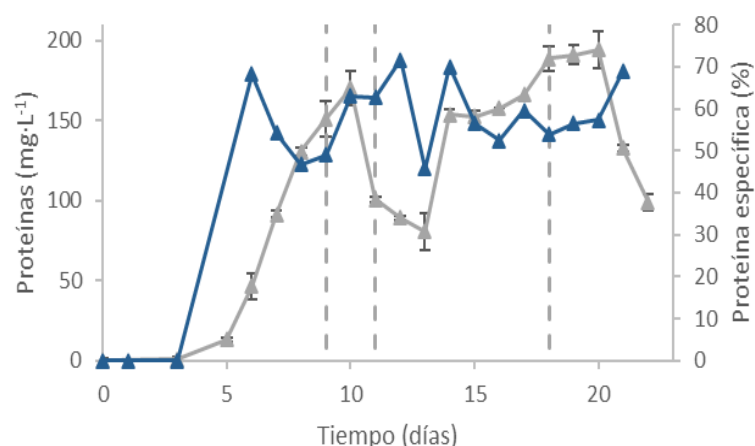


Figura 6. Evolución de la concentración de proteínas (▲), y de la proteína específica durante el Exp. 3 (▲), con sus respectivos inicios de reemplazo de medio para unas tasas de dilución de 0,15 d⁻¹, 0,21 d⁻¹ y 0,24 d⁻¹. Las barras de error representan las desviaciones típicas de los duplicados.

En el Exp. 3, una tasa de dilución de 0,15 d⁻¹ resultó en una concentración media de proteínas de 160,9±13,5 mg·L⁻¹, lo que equivale a un contenido de proteína cruda por biomasa seca (proteína específica) de 56,0±9,8 %. Sin embargo, como se muestra en la Figura 6, al aumentar la tasa de dilución se observaron variaciones tanto en la concentración total de proteína como en su proporción específica. Con una tasa de dilución de 0,24 d⁻¹, se alcanzó una concentración promedio de proteína de 191,53±2,8 mg·L⁻¹ lo cual indica una proteína específica de 56,1±1,8 %. A pesar de no disponer de datos comparativos con los otros experimentos realizados, estos resultados reflejan la viabilidad de considerar la biomasa como materia prima para obtener proteína microbiana.

Según Jiang et al. (2022), al emplear *Cupriavidus necator* H16 alimentado con syngas, se alcanzan valores de proteína cruda de 50,03±0,78 % del peso seco celular, lo cual es un resultado similar al obtenido experimentalmente en el Exp. 3. Además, los autores concluyen que la variación de la composición del syngas no afecta significativamente al contenido de proteína.

Por otro lado, en condiciones de no presencia de CO, empleando una mezcla de H₂ y O₂ con bacterias oxidantes de H₂ (*Alcaligenes eutrophus* Z1, *Ralstonia eutropha* B5789 y *Seliberia carboxyhydrogena* Z1062), se alcanza hasta un 70 % de proteína cruda en peso seco (Matassa et al., 2015).

Desde un punto de vista industrial, la máxima concentración de proteínas alcanzada con una tasa de dilución de 0,24 d⁻¹, es de un valor de 194,5 mg_{proteína}·L⁻¹, pudiendo extraerse por lo tanto una cantidad máxima de proteínas de 46,7 g_{proteína}·m⁻³·d⁻¹.

5. Conclusiones

Esta investigación permitió determinar que un tiempo de residencia de 2 horas mejora la degradación de CO en comparación con 1 hora. Además, respecto a las distintas composiciones de syngas, se observó que un aumento en el ratio de $H_2:CO$ no afecta a la producción de HE, pero sí influye a la degradación del CO, alcanzándose picos de eliminación de hasta el 90 %, aunque con un consumo inestable. Finalmente, el aumento de la tasa de dilución en función del valor de COT permitió lograr una recuperación máxima de HE de $8,76 \text{ g}_{HE} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ a la máxima tasa de dilución $0,24 \text{ d}^{-1}$. La optimización del proceso permitió la conversión de syngas no solo a HE sino también a proteína microbiana alcanzando recuperaciones de $46,7 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ integrando así el concepto de biorrefinería integrada.

Con este proyecto se ha logrado optimizar el proceso biológico en continuo para valorizar syngas -procedente de la gasificación de residuos orgánicos- en compuestos de valor industrial contribuyendo así hacia una economía circular y sostenible.

La optimización del proceso llevada a cabo es de gran relevancia debido a que es la primera vez que se obtienen productos de valor industrial, como la HE y la proteína microbiana, en un proceso continuo alimentado con syngas como única fuente de carbono y energía. Además, es la primera vez que se ha obtenido un proceso que permite la recuperación de HE como osmolito aislado directamente del medio.

Para investigaciones futuras se plantea probar tasas de dilución mayores con el fin de ver si sigue aumentando la productividad de HE y proteína microbiana, así como probar otras composiciones de syngas con el fin de ver si el funcionamiento es similar o varía.

6. Bibliografía

- Araujo-Ferrer, S. C., De Almeida, A., Zabala, A., & Granados, A. (2013). Uso de catalizadores en los procesos Fischer-Tropsch. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* (Vol. 12, No. 2, pp. 257-269) Acceso: 29/06/2025. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v12n2/v12n2a6.pdf>
- Becker, J., & Wittmann, C. (2020). Microbial production of extremolytes – high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 65, pp. 118–128). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.010>
- Bursy, J., Pierik, A. J., Pica, N., & Bremer, E. (2007). Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, (Vol. 282, No. 43, pp. 31147–31155). <https://doi.org/10.1074/jbc.M704023200>
- Cantera, S., Di Benedetto, F., Tumulero, B. F., & Sousa, D. Z. (2023). Microbial conversion of carbon dioxide and hydrogen into the fine chemicals hydroxyectoine and ectoine. *Bioresource Technology*, (Vol. 374). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128753>
- Carmona-Martínez, A. A., Marcos-Rodrigo, E., Bordel, S., Marín, D., Herrero-Lobo, R., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2021). Elucidating the key environmental parameters during the production of ectoines from biogas by mixed methanotrophic consortia. *Journal of Environmental Management* (Vol. 298). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113462>
- Chen, Z., Dun, Q., Shi, Y., Lai, D., Zhou, Y., Gao, S., & Xu, G. (2017). High quality syngas production from catalytic coal gasification using disposable Ca(OH)₂ catalyst. *Chemical Engineering Journal* (Vol. 316, pp. 842–849). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.025>
- Cherkasov, N., Adams, S. J., Bainbridge, E. G. A., & Thornton, J. A. M. (2022). Continuous stirred tank reactors in fine chemical synthesis for efficient mixing, solids-handling, and rapid scale-up. In *Reaction Chemistry and Engineering* (Vol. 8, No. 2, pp. 266–277). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d2re00232a>
- Cordero, P. R. F., Bayly, K., Man Leung, P., Huang, C., Islam, Z. F., Schittenhelm, R. B., King, G. M., & Greening, C. (2019). Atmospheric carbon monoxide oxidation is a widespread mechanism supporting microbial survival. *ISME Journal* (Vol. 13, No. 11, pp. 2868–2881). <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0479-8>
- Neto, A. S., Wainaina, S., Chandolias, K., Piatek, P., & Taherzadeh, M. J. (2025). Exploring the Potential of Syngas Fermentation for Recovery of High-Value Resources: A Comprehensive Review. In *Current Pollution Reports* (Vol. 11, No. 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40726-024-00337-3>
- Esquivel-Elizondo, S., Delgado, A. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Evolution of microbial communities growing with carbon monoxide, hydrogen, and carbon dioxide. *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 93, No. 6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix076>

- European Environment Agency. (2020). Bio-waste in Europe: turning challenges into opportunities. <https://doi.org/10.2800/630938>
- Fiore, M., Magi, V., & Viggiano, A. (2020). Internal combustion engines powered by syngas: A review. In *Applied Energy* (Vol. 276). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115415>
- Forero-Ararat, V., Gómez-Viera, S., Penagos-Montaña, N., & Porras-Osorio, L. F. (2021). Artículo de Revisión. Microorganismos: una perspectiva actual. <http://revistareciteia.es.tl/>
- Freda, C., Nanna, F., Villone, A., Barisano, D., Brandani, S., & Cornacchia, G. (2019). Air gasification of digestate and its co-gasification with residual biomass in a pilot scale rotary kiln. In *International Journal of Energy and Environmental Engineering* (Vol. 10, No. 3, pp. 335–346). <https://doi.org/10.1007/s40095-019-0310-3>
- Galvagno, S., Casciaro, G., Casu, S., Martino, M., Mingazzini, C., Russo, A., & Portofino, S. (2009). Steam gasification of tyre waste, poplar, and refuse-derived fuel: A comparative analysis. *Waste Management* (Vol. 29, No. 2, pp. 678–689). <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.06.003>
- Herrero-Lobo, R., Fernández-González, N., Marcos, E., Martínez, M. A., García-Encina, P., Rodero, M. del R., Muñoz, R., & Bordel, S. (2024). Production of hydroxyectoine from biogas by an engineered strain of *Methylobacterium alcaliphilum* using a novel Taylor-flow bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Vol. 100, No. 7, pp. 1425–1433). <https://doi.org/10.1002/jctb.7796>
- Hoareau, C. E., Ahmad, N., Nuid, M., Rubiyatno, Khoi, D. N., & Kristanti, R. A. (2021). Sustainable Technology in Developed Countries: Waste Municipal Management. *Industrial and Domestic Waste Management* (Vol. 1, No. 1, pp. 48–55). <https://doi.org/10.53623/idwm.v1i1.49>
- Instituto para la Diversificación Ahorro de la Energía. (2007). *Biomasa: Gasificación*. <https://www.idae.es/publicaciones/biomasa-gasificacion>
- Jiang, Y., Yang, X., Zeng, D., Su, Y., & Zhang, Y. (2022a). Microbial conversion of syngas to single cell protein: The role of carbon monoxide. *Chemical Engineering Journal* (Vol. 450, No. 2). <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.138041>
- Jiang, Y., Yang, X., Zeng, D., Su, Y., & Zhang, Y. (2022b). Microbial conversion of syngas to single cell protein: The role of carbon monoxide. *Chemical Engineering Journal* (Vol. 450). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138041>
- Kadam, P., Khisti, M., Ravishankar, V., Barvkar, V., Dhotre, D., Sharma, A., Shouche, Y., & Zinjarde, S. (2024). Recent advances in production and applications of ectoine, a compatible solute of industrial relevance. In *Bioresource Technology* (Vol. 393). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130016>
- Klinghoffer, N. B., & Castaldi, M. J. (2013). Gasification and pyrolysis of municipal solid waste (MSW). In *Waste to Energy Conversion Technology* (pp. 146–176). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1533/9780857096364.2.146>

- Köpke, M., & Simpson, S. D. (2020). Pollution to products: recycling of 'above ground' carbon by gas fermentation. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 65, pp. 180–189). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.017>
- Liu, M., Liu, H., Shi, M., Jiang, M., Li, L., & Zheng, Y. (2021). Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 20, No. 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>
- Marcos-Rodrigo, E., Lebrero, R., Muñoz, R., Sousa, D. Z., & Cantera, S. (2025). Syngas biological transformation into hydroxyectoine. *Bioresource Technology* (Vol. 417). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131842>
- Matassa, S., Boon, N., & Verstraete, W. (2015). Resource recovery from used water: The manufacturing abilities of hydrogen-oxidizing bacteria. In *Water Research* (Vol. 68, pp. 467–478). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.028>
- Olmedo Bellido, J. P. (2017). Diseño de las etapas de fermentación y de acondicionamiento de la materia prima para la producción de SCP. Acceso: 21/05/2025. <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/20092/927517.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Parlamento Europeo. (2024). El trabajo de la UE para la gestión sostenible de residuos. Acceso: 07/06/2025. <https://www.europarl.europa.eu/topics/es/article/20180328ST000751/el-trabajo-de-la-ue-para-la-gestion-sostenible-de-residuos>
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. In *Biotechnology Advances* (Vol. 28, No. 6, pp. 782–801). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.005>
- Ragsdale, S. W. (2008). Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1125, pp. 129–136). <https://doi.org/10.1196/annals.1419.015>
- Ranawat, P., & Rawat, S. (2017). Stress response physiology of thermophiles. In *Archives of Microbiology* (Vol. 199, No. 3, pp. 391–414). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>
- Rasigraf, O., Kool, D. M., Jetten, M. S. M., Sinninghe Damsté, J. S., & Ettwig, K. F. (2014). Autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin-Benson-Bassham cycle by the denitrifying methanotroph "Candidatus Methyloirabilis oxyfera." *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 80, No. 8, pp. 2451–2460). <https://doi.org/10.1128/AEM.04199-13>
- Rodero, M. del R., Herrero-Lobo, R., Pérez, V., & Muñoz, R. (2022). Influence of operational conditions on the performance of biogas bioconversion into ectoines in pilot bubble column bioreactors. *Bioresource Technology* (Vol. 358). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127398>

- Ruiz, E., & Sánchez, J. M. (2014). Purification and conditioning of biomass gasification gas. *Boletín Del Grupo Español Del Carbón* (Vol. 33, pp. 15–19). <http://hdl.handle.net/10261/109031>
- Siebert, D., Eikmanns, B. J., & Blombach, B. (2022). Exploiting Aerobic Carboxydophilic Bacteria for Industrial Biotechnology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 180, pp. 1–32). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/10_2021_178
- Statista. (2025). Porcentaje de residuos municipales enviados a vertederos en la Unión Europea (UE-27) de 2000 a 2023. Acceso: 20/05/2025. <https://www.statista.com/statistics/1480844/european-union-municipal-waste-landfill-share/>
- Stępniewska, Z., Goraj, W., Kuźniar, A., Pytlak, A., Ciepielski, J., & Frączek, P. (2014). Biosynthesis of ectoine by the methanotrophic bacterial consortium isolated from Bogdanka coalmine (Poland). *Applied Biochemistry and Microbiology* (Vol. 50, No. 6, pp. 594–600). <https://doi.org/10.1134/S0003683814110039>
- Torrejón, A. (2020). Single Cell Protein: La alternativa a las proteínas de origen animal para desarrollo de nuevos ingredientes. Acceso: 10/06/2025 <https://www.ainia.com/ainia-news/single-cell-protein-alternativa-proteinas-origen-animal-desarrollo-nuevos-ingredientes/>
- Turn, S., Kinoshita, C., Zhang, Z., Ishimura, D., & Zhou, J. (1998). An experimental investigation of hydrogen production from biomass gasification. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 23, No. 8). [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(97\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(97)00118-3).
- Wang, Y., & Zhang, L. (2010). Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 62, No.1, pp. 90–95). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.014>
- Ye, L., Bogicevic, B., Bolten, C. J., & Wittmann, C. (2024). Single-cell protein: overcoming technological and biological challenges towards improved industrialization. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 88). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2024.103171>