

## RESUMEN

El aprovechamiento de subproductos para producir biocombustibles, energía y compuestos químicos básicos es cada vez más necesario en la situación actual de escasez de petróleo y preocupación por el medioambiente. Muchos compuestos que tradicionalmente han sido producidos a partir del petróleo pueden sintetizarse hoy día de forma biotecnológica empleando recursos renovables. En este contexto, los microorganismos pueden aprovecharse eficazmente como biocatalizadores para llevar a cabo estas transformaciones. Con este tipo de procesos se pueden aprovechar residuos o materias primas renovables para la obtención de productos de interés como bioplásticos de origen microbiano o productos químicos que pueden servir como monómeros para la síntesis de plásticos biodegradables u otro tipo de aplicaciones. La contaminación ambiental causada por los residuos de polímeros sintéticos no biodegradables es un problema en aumento debido a la estabilidad de los compuestos derivados de los combustibles fósiles. En contraste, los bioplásticos pueden obtenerse de fuentes renovables, lo que posibilita el desarrollo de procesos de producción sostenible.

En este trabajo de investigación se han estudiado y desarrollado bioprocesos para la producción de polihidroxialcanoatos, 2,3-butanodiol y ácido D-láctico de forma sostenible empleando materias primas renovables como el suero lácteo de quesería, aceite de camelina, glicerina, fracción orgánica de residuos urbanos y residuos de naranja. La caracterización de las materias primas de partida se realizó mediante técnicas de análisis composicional, análisis en HPLC, cromatografía de gases y técnicas espectrofotométricas. Con estos resultados se hizo una selección de cepas bacterianas capaces de sintetizar los productos de interés a partir de los sustratos seleccionados. Una vez seleccionadas las cepas, el trabajo se centró en el desarrollo de los procesos para conseguir buenos rendimientos de fermentación y su escalado.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son poliésteres de origen microbiano que pueden ser sintetizados por procariotas a partir de azúcares o lípidos nobles y de sustratos renovables complejos. Son una alternativa atractiva a los plásticos convencionales porque son biodegradables y pueden producirse a partir de recursos renovables, como el excedente de suero lácteo de queserías. En el capítulo I, tras un cribado *in silico* para buscar genes de  $\beta$ -galactosidasa y de PHA polimerasa, se identificaron varias bacterias como potenciales productoras de PHA a partir de suero lácteo en función de su capacidad para hidrolizar la

lactosa. Entre ellas, se seleccionó *Caulobacter segnis* DSM 29236 como cepa adecuada para desarrollar un proceso de valorización de los excedentes de suero lácteo. Este microorganismo acumuló un 31,5% de peso seco celular (CDW) de poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) con una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> en ensayos en *batch*. Además, la cepa acumuló un 37% de CDW de PHB y 9,3 g l<sup>-1</sup> en modo *fed-batch*. Este estudio revela esta especie como productora de PHA y valida experimentalmente la estrategia de bioprospección *in silico* para seleccionar microorganismos para la valorización de residuos.

Los polihidroxicanoatos de longitud de cadena media (mcl-PHAs) muestran propiedades interesantes como polímeros especiales siendo elásticos y adhesivos. Además, los microorganismos productores de mcl-PHAs, como *Pseudomonas* sp., han demostrado rendimientos elevados usando grasas y aceites. En el capítulo II, se probó por primera vez el aceite de *Camelina* para la producción de mcl-PHAs empleando distintas cepas de *Pseudomonas*. La *Camelina Sativa* es un cultivo de bajos insumos que no compite con la cadena alimentaria, cuya semilla consiste en aproximadamente un 43% de aceite en materia seca con cerca de un 90% de ácidos grasos insaturados. El uso de *Pseudomonas resinovorans* permite la fermentación directa de este sustrato sin hidrólisis previa para liberar los ácidos grasos. Una primera aproximación al desarrollo del proceso en biorreactor ha proporcionado hasta un 40% (de CDW) de contenido polimérico, igualando la mayor concentración de mcl-PHA reportado a partir de aceites vegetales (13,2 g l<sup>-1</sup>). En este estudio, *Pseudomonas resinovorans* DSM 21078 dio buenos resultados de producción de mcl-PHA utilizando aceite de camelina sin ningún pretratamiento.

Muchos compuestos que tradicionalmente se obtienen del petróleo pueden sintetizarse a partir de recursos renovables, como el 2,3-butanediol (2,3-BD). Este compuesto tiene un gran interés industrial (por ejemplo, para la producción de caucho sintético, aditivos alimentarios, plastificantes, perfumes, anticongelantes o potenciadores del octanaje, entre otros) y puede ser producido a partir de azúcares o glicerol por diferentes bacterias, principalmente microorganismos de clase 2. El glicerol crudo es un subproducto industrial de la producción de biodiésel y es uno de los sustratos más prometedores para la producción de 2,3-BD; sin embargo, este compuesto aún no se produce por fermentación a partir del glicerol a escala comercial debido a la escasa rentabilidad del proceso. En el capítulo III, se evaluaron microorganismos de Nivel de Bioseguridad clase 1 y la cepa *Raoultella planticola* CECT 843 resultó ser la mejor productora de 2,3-BD, alcanzando 23,3 g l<sup>-1</sup> y un rendimiento del 36% (g de 2,3-BD por g de glicerol). Para aumentar aún más la concentración de producto y el

rendimiento, *Raoultella planticola* CECT 843 fue sometida a mutagénesis aleatoria utilizando luz ultravioleta (UV) y etil metanosulfonato (EMS). Al final, se encontró que dos cepas mutantes producían al menos un 30% más de 2,3-BD que la cepa salvaje: *R. planticola* CECT 8158 (30,8 g l<sup>-1</sup> y 49% de rendimiento) y *R. planticola* DSM 8159 (30,5 g l<sup>-1</sup> y 49% de rendimiento). Estos resultados superan los mejores datos descritos con anterioridad para la producción de 2,3-BD a partir del glicerol.

La creciente cantidad de residuos sólidos urbanos ha provocado una serie de problemas medioambientales y, por tanto, la sociedad se enfrenta a un serio reto para su gestión eficaz. Los residuos orgánicos, o biorresiduos, tienen un uso potencial y prometedor como materia prima en bioprocesos. En el capítulo IV se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de los carbohidratos que contienen estos residuos junto con la producción de 2,3-BD mediante fermentación. En este estudio, se seleccionaron inicialmente cepas de *Bacillus licheniformis* y *Raoultella planticola* como productores eficientes de 2,3-BD. *Raoultella planticola* (cepas de tipo salvaje y mejoradas) mostró una alta tolerancia y buenos rendimientos utilizando hidrolizados de residuos orgánicos en ensayos en matraz. La estrategia de fermentación en *fed-batch* en biorreactor utilizando *Raoultella planticola* CECT 843 condujo a la producción de 54 g l<sup>-1</sup> de 2,3-BD y el proceso se escaló con éxito a escala de demostración. Por lo tanto, este estudio demuestra un procedimiento para obtener 2,3-BD por fermentación de hidrolizados de residuos orgánicos utilizando cepas de *Raoultella planticola* dentro del concepto de biorrefinería y contribuyendo al desarrollo de procesos sostenibles (este proceso fue patentado).

El ácido láctico es uno de los candidatos más interesantes para sustituir a algunos monómeros derivados del petróleo. La aplicación del ácido poliláctico (PLA) convencional está limitada por sus insuficientes propiedades térmicas. Esta limitación puede superarse mediante la generación de mezclas de ácido poli-D y poli-L-láctico. El principal problema es el escaso conocimiento de la producción de ácido D-láctico (D-LA). Los residuos de cáscara de naranja (OPW) son una interesante materia prima renovable para los procesos de biorrefinería de naturaleza biocatalítica, catalítica o térmica debido a su bajo contenido en lignina y cenizas. En el capítulo V se lleva a cabo el bioprocesamiento del OPW pretratado mediante hidrólisis enzimática y fermentación de los azúcares liberados para producir D-LA. Se han evaluado varias cepas de la especie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* para la producción de D-LA a partir del hidrolizado de OPW utilizando *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286 como cepa de referencia ya que su rendimiento en este tipo de sustrato ha sido ampliamente

reportado en estudios anteriores. Los resultados preliminares muestran que *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CECT 5037 tuvo el mejor rendimiento con un 84% para la producción de D-LA y hasta un 95% de exceso enantiomérico.

Por lo tanto, este trabajo de investigación aporta conocimientos sobre la identificación y selección de biocatalizadores industriales para el uso de materias primas renovables y residuos industriales para la producción de productos químicos y polímeros de base biológica. Estos estudios allanan el camino para el futuro desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles en el marco de las biorrefinerías y de la bioeconomía circular.