

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 750**

21 Número de solicitud: 202131193

51 Int. Cl.:

C12P 7/625 (2012.01)
C12P 7/6445 (2012.01)
C12P 7/6463 (2012.01)
C08G 63/06 (2006.01)
C08G 63/78 (2006.01)
C02F 3/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

22.12.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

19.05.2022

Fecha de concesión:

30.11.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.12.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**MOSQUERA CORRAL, Anuska;
VAL DEL RIO, Maria Angeles y
ARGIZ MONTES, Lucia**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **PROCESO PARA LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) Y TRIACILGLICERIDOS (TAG)**

57 Resumen:

Proceso para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG).

Proceso biotecnológico de una sola unidad para la recuperación simultánea de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG). La presente invención se refiere a un proceso para la producción de biomasa en forma de cultivo microbiano mixto que contiene PHA y TAG. Más particularmente, este proceso comprende ciertas etapas que transcurren en un único reactor secuencial discontinuo.

ES 2 908 750 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG)

Sector de la invención

La presente invención se refiere a un proceso biotecnológico para la producción de biomasa
5 que contiene PHA y TAG intracelulares. Más particularmente, este proceso comprende ciertas etapas que transcurren en un único reactor secuencial discontinuo.

Antecedentes

Sólo ciertos microorganismos son capaces de sintetizar y acumular intracelularmente
10 polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG) bajo condiciones de estrés (Carsanba *et al.*, Crit. Rev. Biotechnol. 2018, 38, 1230–1243). Por ello, cuando se trabaja con cultivos microbianos mixtos (CMM), aquella mezcla que incorpora, entre otros, microorganismos capaces de acumular intracelularmente PHA y microorganismos capaces de acumular intracelularmente TAG, es necesario llevar a cabo una etapa de **enriquecimiento** para
15 seleccionar aquellas poblaciones con mayor capacidad de acumulación de dichos compuestos.

Para ello, suelen utilizarse reactores secuenciales discontinuos tipo SBR (del inglés, *Sequencing Batch Reactor*). Para llevar a cabo dicho proceso de selección existen diversas estrategias, aunque la más común es la denominada estrategia ADF (del inglés *Aerobic*
20 *Dynamic Feeding*). Esta se basa en la aplicación de ciclos de saciedad/hambruna en condiciones aerobias en los que el cultivo se somete a cortos períodos de exceso (saciedad) y largos períodos de deficiencia de fuente de carbono (hambruna) (Kourmentza *et al.*, Bioengineering, 2017, 4, 55). De este modo, aquellos microorganismos con capacidad de acumular el sustrato durante la fase de saciedad tienen durante la fase de hambruna una
25 ventaja competitiva respecto al resto, pues pueden utilizar el carbono intracelular como fuente de materia y energía para su crecimiento. Sin embargo, los no acumuladores pasan un largo período de tiempo sin sustrato y no pueden duplicarse de tal modo que tras la aplicación de ciclos sucesivos de saciedad/hambruna acaban lavándose del sistema (Valentino *et al.*, N. Biotechnol. 2017, 37, 9–23).

En la última década se propusieron diferentes variaciones de la estrategia ADF para optimizar el enriquecimiento del cultivo. Entre ellas destaca el desacople de la alimentación de las fuentes de carbono y nitrógeno, lo que se conoce como estrategia DGL (del inglés *Double Growth Limitation*). Al añadir un exceso de carbono durante la fase de saciedad bajo condiciones de nitrógeno limitantes, se previene el desarrollo de poblaciones no acumuladoras. Pues sólo aquellos microorganismos capaces de metabolizar el sustrato y acumularlo intracelularmente podrán consumir la fuente de carbono. Así, al adicionar el nitrógeno al final de la fase de saciedad (en ausencia de carbono, ya que se consumió durante la saciedad) las poblaciones que acumularon PHA y/o TAG durante la fase de saciedad pueden emplear el nitrógeno para crecimiento, dando lugar a una selección más rápida y eficiente del CMM (Kourmentza *et al.*, Bioengineering, 2017, 4, 55).

Posteriormente, la biomasa enriquecida en el SBR se utiliza como inóculo en una segunda unidad, un reactor de **acumulación** tipo FBR (del inglés, *Fed Batch Reactor*) en el que el sustrato está disponible en exceso para maximizar la cantidad de compuestos intracelulares acumulados antes de su extracción y purificación. Se trata de exponer la biomasa a una fase de saciedad extendida en condiciones aerobias y ausencia de nitrógeno siempre y que el sustrato lo permita, pues así se fuerza la conversión del sustrato a PHA y/o TAG previniendo el crecimiento de poblaciones no acumuladoras. La forma de alimentación preferida en este tipo de sistemas es la estrategia de alimentación pulsante, ya que permite obtener elevadas eficiencias de acumulación evitando el efecto de inhibición por sustrato. Esta consiste en añadir pulsos sucesivos de carbono una vez se ha consumido el precedente hasta alcanzar la capacidad máxima de acumulación (Kourmentza *et al.*, Bioengineering, 2017, 4, 55; Mannina *et al.*, Bioresour. Technol. 2020, 297, 122478). Para conocer el momento en el que debe añadirse el sustrato, lo más común es efectuar un seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el sistema. Tras la adición de un pulso de carbono el OD desciende, lo que indica que hay consumo de sustrato, y vuelve a valores de saturación una vez este se ha agotado. En este momento, se añade un nuevo pulso, y así sucesivamente hasta que tras la adición de la fuente de carbono no se observa un descenso de la concentración de OD, lo que indica que se alcanzó la capacidad máxima de acumulación del CMM.

Además de estos dos reactores, cuando se utilizan corrientes que contienen compuestos orgánicos difíciles de metabolizar, como es el caso de los lípidos, suele llevarse a cabo una etapa de **pretratamiento del sustrato** en un tercer reactor para la obtención de ácidos orgánicos solubles más fácilmente metabolizables (normalmente ácidos grasos volátiles

(AGV), los precursores más comunmente empleados en la síntesis de PHA). Generalmente se trata de un proceso de fermentación acidogénica realizado en un reactor de tipo continuo de tanque agitado (CSTR, del inglés *Continuous Stirred Tank Reactor*) (Mannina *et al.*, *Bioresour. Technol.* 2020, 297, 122478).

5 Hasta el momento, la obtención de compuestos intracelulares de alto valor añadido a partir de lípidos se centró en el empleo de cultivos microbianos puros y aceites vegetales como sustrato (Basnett *et al.*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018, 29.; Donot *et al.*, *Biomass and Bioenergy* 2014, 68, 135–150; Pérez-Arauz *et al.*, *Food Packag. Shelf Life* 2019, 20, 100297). Sin embargo, estos procesos no son competitivos a gran escala debido a los altos
10 costes que presentan. Por ello, en los últimos años, la investigación se dirigió hacia el desarrollo de procesos basados en el empleo de CMM que no requieren condiciones estériles y permiten el empleo de corrientes residuales como sustrato (De Donno Novelli *et al.*, *Bioresour. Technol.* 2021, 331, 124985).

Por el momento, los estudios existentes relativos a la producción de PHA y/o TAG con
15 cultivo mixto y a partir de corrientes residuales son muy escasos.

Por un lado Campanari *et al.* (*Int. J. Biol. Macromol.* 2014, 71, 34–41) demostraron la posibilidad de producir PHA a partir de agua residual generada en la producción de aceite de oliva empleando un sistema de tres etapas en serie llevadas a cabo en varios reactores: pretratamiento, enriquecimiento y acumulación. El proceso de pretratamiento constaba de
20 dos fases: 1) extracción en fase sólida para la retirada y recuperación de polifenoles; y 2) acidificación anaerobia del agua residual desfenolizada para la conversión de la materia orgánica restante en ácidos grasos volátiles (AGV), precursores en la síntesis de PHA únicamente. El enriquecimiento del CMM, se llevaba a cabo en un reactor tipo SBR alimentado con el agua residual pretratada rica en AGV. Posteriormente, la biomasa
25 enriquecida en el SBR, se utilizaba como inóculo en un reactor de acumulación tipo FBR, también alimentado con dicha corriente residual pretratada.

Por otro lado, Tamis *et al.* (*Biotechnol. Biofuels* 2015, 8, 1–11) demostraron la posibilidad de recuperar TAG a partir de aguas residuales empleando un CMM alimentado con una emulsión de aceite vegetal-agua como sustrato modelo. Para ello consideraron un sistema
30 constituido por dos etapas secuenciales empleando dos reactores: enriquecimiento y acumulación llevadas a cabo en reactores tipo SBR y FBR, respectivamente. En la primera se efectuaba la selección del CMM con capacidad de acumular TAG, y posteriormente, con

la biomasa enriquecida en esta primera etapa se inoculaba el reactor FBR para maximizar la cantidad de TAG acumulados.

Finalmente, las autoras de la presente invención fuimos capaces de producir mayoritariamente PHAs o mayoritariamente TAGs a partir de un efluente graso generado en la industria conservera. Para ello se empleaba un proceso que comprendía dos reactores, una
5 unidad de enriquecimiento tipo SBR, y otra de acumulación tipo FBR (Argiz *et al.*, Sci. Total Environ. 2021, 763, 142944).

Por lo tanto, todavía es necesario lograr un procedimiento más sencillo y económico que permita obtener TAG, PHA o simultáneamente ambos, evitando el pretratamiento de
10 corrientes fácilmente disponibles, preferiblemente corrientes lipídicas residuales.

Breve descripción de la invención

Las autoras de la presente invención han desarrollado un proceso biotecnológico de una sola unidad para la recuperación de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG) a
15 partir de corrientes lipídicas empleando biomasa en forma de cultivos microbianos mixtos (CMM). En particular, han diseñado un procedimiento que favorece el desarrollo de un CMM con capacidad para la acumulación simultánea de PHA y TAG intracelularmente, empleando un proceso sencillo y fácil de implementar en la industria.

Una ventaja adicional es que este procedimiento se realiza en un único reactor, de modo que
20 la instalación del proceso para su operación necesita de menos superficie de implantación que la necesaria para los procesos que se emplean en la actualidad y que requieren de tres reactores en serie.

Otra ventaja de la presente invención es que evita la necesidad de un pretratamiento previo de la fuente de alimentación (sustrato) de la biomasa, lo cual simplifica el proceso y reduce
25 los tiempos de puesta en marcha y operación.

Otra ventaja es que al llevarse a cabo en una sola unidad la productividad diaria (expresada como g PHA y TAG producidos al día y por litro de reactor) se incrementa incluso para porcentajes de acumulación intracelulares menores. Pues, en la presente invención, al realizar el intercambio de volumen en el sistema al final de la fase de saciedad, la corriente
30 obtenida ya contiene la biomasa con los biopolímeros acumulados, que ya pueden extraerse

y purificarse. Sin embargo, en el proceso convencional, es necesario operar un segundo reactor, lo que alarga los tiempos de procesado reduciendo la productividad.

Otro aspecto favorable es que al disminuir el número de unidades de reacción se reducen los costes de inversión. También se prevé que los de operación sean menores. Pues, por ejemplo,
5 los costes asociados a consumos energéticos en los reactores de pretratamiento y acumulación se evitarían (agitación, aireación, bombeo, etc.).

Se trata de un proceso más simple que los convencionales desde un punto de vista conceptual. Esto permite minimizar errores y facilita la formación de personal no especializado para su operación.

10 Frente a los sistemas con cultivo mixto existentes, la presente invención es la única que permite: 1) emplear una corriente lipídica como sustrato sin necesidad de pretratarla para obtener AGV en una unidad independiente; 2) realizar las etapas convencionales de pretratamiento (en este caso solamente la hidrólisis), enriquecimiento y acumulación en una misma unidad; y 3) obtener dos tipos diferentes de compuestos intracelulares de alto valor
15 añadido, PHA y/o TAG, a partir de una misma fuente de carbono.

Así, en un aspecto la presente invención se refiere a un proceso para la producción intracelular de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG) en un cultivo microbiano mixto, caracterizado porque todas las etapas se realizan en un único reactor secuencial discontinuo, y que además comprende:

- 20 a) inocular con lodos activos el reactor,
b) un ciclo de operación del reactor que comprende:
- i. alimentar a los microorganismos presentes en el reactor con una fuente de carbono lipídica, siendo la alimentación en pulsos y, en condiciones de nitrógeno limitantes,
 - 25 ii. retirar el 50% de la mezcla del reactor, donde dicha mezcla contiene la biomasa con PHA y TAG intracelulares,
 - iii. añadir una corriente que contiene entre 0,9 y 2 veces la cantidad estequiométrica de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano,
- c) repetir el proceso desde la etapa b) en ciclos sucesivos.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema simplificado del proceso de una unidad operado a escala de laboratorio para la recuperación de PHA y TAG a partir de una corriente lipídica. (1) Reactor secuencial discontinuo (SBR, del inglés *Sequencing Batch Reactor*); (2) bomba de alimentación de la corriente lipídica (fuente de carbono); (3) bomba de descarga; (4) bomba de alimentación de la corriente acuosa (fuente de nitrógeno); (5) soplante; (6) baño termostatzado; (7) sonda de oxígeno y temperatura; (8) controlador lógico programable (PLC, del inglés *Programmable Logic Controller*); (9) almacenamiento del sustrato lipídico empleado como fuente de carbono (ver composición en Tabla 1); (10) almacenamiento de la mezcla acuosa que contiene la fuente de nitrógeno (ver composición en Tabla 2); (11) almacenamiento de la descarga del reactor que contiene la biomasa con los compuestos intracelulares acumulados (PHA y TAG).

La Figura 2 compara la configuración del ciclo de operación del SBR de la presente invención (a) con la de un SBR convencional de enriquecimiento y la subsiguiente etapa de acumulación (b).

La Figura 3 muestra un esquema simplificado de las diferentes configuraciones de ciclo de operación evaluadas en el reactor SBR, donde: C hace referencia al momento en el que se añade un pulso de sustrato lipídico empleado como fuente de carbono; y N al momento en el que se añade la corriente acuosa que contiene la fuente de nitrógeno.

La Figura 4 muestra la caracterización completa de tres ciclos de operación del reactor SBR. (a) Ciclo de 12 horas correspondiente al día 43 de operación; (b) ciclo de 18 horas relativo al día 72 de operación; y (c) ciclo de 24 horas referido al día 133 de operación. pH (●), concentración X (—), concentración NT (◆), % de biopolímero acumulado (Biop) (○), y concentración de C (□). Donde: Biop hace referencia a la suma de PHA y TAG acumulados intracelularmente expresada dicha suma como porcentaje en peso seco de la célula (% p.s.); C a la cantidad acumulativa de sustrato añadido en pulsos expresada en gramos de demanda química de oxígeno (DQO); NT a la concentración de nitrógeno total en g/L; y X a la concentración, en Cmmol/L, de biomasa activa presente en el medio de reacción.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, se entiende por **lodos activos** una mezcla floculenta de microorganismos desarrollados en un tanque de aireación bajo condiciones controladas. Se emplean en los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales para la degradación de los compuestos orgánicos.

En esta invención se entiende por **cultivo microbiano mixto** (CMM) aquel que se encuentra en condiciones no estériles y consiste en una mezcla de especies pertenecientes a diferentes grupos de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras).

En la presente invención, el término **biomasa** hace referencia al conjunto de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) presentes inicialmente en los lodos activos empleados como inóculo, y posteriormente en el CMM enriquecido en poblaciones con capacidad de hidrolizar la fuente de carbono lipídica empleada como sustrato y acumular PHA y TAG.

En la presente invención, la expresión **microorganismos oleaginosos o poblaciones oleaginosas** se refiere a microorganismos o poblaciones de microorganismos que son capaces de acumular más de un 20% de su peso seco en triacilglicéridos. Dentro de las diferentes clases de microorganismos oleaginosos (microalgas, bacterias, levaduras y hongos), sólo ciertas especies, especialmente levaduras, son capaces de sobrevivir en ambientes hidrofóbicos. Esto es, son capaces de hidrolizar y metabolizar para su acumulación intracelular fuentes de carbono lipídicas. Algunos ejemplos son las levaduras oleaginosas *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Geotrichum* y *Trichosporon* (Patel and Matsakas, Ultrason. Sonochem. 2019, 52, 364–374).

En esta invención el término **actividad microbiana** se refiere a la capacidad de descomposición de sustancias orgánicas disueltas por parte de microorganismos heterótrofos para la formación simultánea de biomasa microbiana.

En la presente invención se entiende por **sustrato** a la corriente residual lipídica que contiene la fuente de carbono que emplea el CMM para desarrollarse y acumular PHA y TAG.

En la presente invención se entiende por **fuentes de carbono lipídica** a una corriente con un contenido en lípidos superior al 85% de la DQO, en particular entre 85 y 90 % de la DQO, que los microorganismos emplean como fuente de carbono para su desarrollo.

En la presente invención se entiende por **ácidos grasos de cadena larga**, aquellos que están formados por las cadenas de más de 14 átomos de carbono. Por ejemplo, los ácidos oleico, linoelico, palmítico, esteárico, etc. Preferiblemente poseen entre 14 y 32 átomos de carbono, más preferiblemente entre 14 y 26 átomos de carbono.

- 5 En la presente invención se entiende por **hidrólisis** al proceso por el cual el contenido lipídico del sustrato se solubiliza en la fase acuosa para estar disponible para ser transformado por los microorganismos.

En la presente invención se entiende por **enriquecimiento** o selección del CMM al proceso en el cual se imponen ciertas condiciones operacionales (denominadas presiones selectivas) que favorecen el desarrollo de determinados microorganismos inicialmente presentes en el
 10 inóculo (lodos activos) con la finalidad de maximizar su presencia en el CMM enriquecido. Lo que se pretende es favorecer la supervivencia de poblaciones que son capaces de llevar a cabo ciertas funciones, en lugar de microorganismos específicos. En la presente invención se promueve el desarrollo de microorganismos capaces de: 1) hidrolizar la corriente lipídica
 15 empleada como fuente de carbono, y 2) metabolizar los compuestos resultantes de la hidrólisis (ácidos grasos de cadena larga y glicerol) y acumularlos intracelularmente como PHA y/o TAG.

En esta invención se entiende por **acumulación** el proceso mediante el cual se favorece la síntesis de PHA y TAG en el interior de las células de los microorganismos y se aumenta la
 20 cantidad de los mismos) en el interior de las células de los microorganismos presentes en el CMM enriquecido.

Se entiende por **condiciones de nitrógeno limitantes**, aquellas en las que el nitrógeno se encuentra en una cantidad mínima en el medio de reacción de manera que se limita el crecimiento microbiano, es decir, en una cantidad inferior a 20 mg nitrógeno total (NT)/L.

- 25 Se entiende por **cantidad estequiométrica de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano**, a los moles de nitrógeno requeridos para la formación de un mol de biomasa en base a la composición elemental de la biomasa que compone el CMM ($\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$) (Popovic, Heliyon, 2019, 5, 6) . Por lo tanto, estequioméricamente se necesitan 0,2 moles de N por mol de biomasa presente en el medio de reacción.

En la presente invención el término **saciedad** se refiere al período de tiempo de operación del reactor en el cual el CMM cuenta con carbono extracelular disponible en exceso en el medio de reacción y en condiciones de nitrógeno limitantes.

5 En la presente invención se entiende por **hambruna** al período de tiempo en el cual el CMM no cuenta con carbono extracelular disponible en exceso en el medio de reacción pero sí con nitrógeno.

En el proceso de esta invención se llevan a cabo en una sola unidad, es decir, en un único reactor, los procesos de hidrólisis, enriquecimiento y acumulación, que convencionalmente implican la operación de tres reactores en serie (CSTR + SBR + FBR).

10 En una realización preferida, el proceso se lleva a cabo en un único reactor secuencial que opera en modo discontinuo, tipo SBR (del inglés *Sequencing Batch Reactor*).

El proceso de la invención comprende una primera **etapa a)** que se caracteriza por inocular lodos activos en un reactor secuencial discontinuo.

15 En una realización preferida, los lodos de la presente invención comprenden poblaciones microbianas con la capacidad de realizar las siguientes funciones:

- 1) Hidrolizar las grasas presentes en la corriente lipídica empleada como fuente de carbono en ácidos grasos de cadena larga y glicerol.
- 2) Acumular intracelularmente los compuestos resultantes del proceso de hidrólisis como PHA y TAG.

20 En una realización más preferida, los lodos activos de la invención comprenden microorganismos acumuladores. Los microorganismos acumuladores de PHA pueden ser, por ejemplo, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Pandoraea*, *Azospirillum*, y *Pseudomonas*; Los microorganismos acumuladores de TAG pueden ser, por ejemplo, *Candida*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Mortierella*, y *Rhodococcus*.

25 En otra realización preferida, los lodos activos de la invención comprenden microorganismos capaces de hidrolizar lípidos. Generalmente estos microorganismos son poblaciones oleaginosas de hongos y levaduras, aunque también pueden encontrarse algunas poblaciones bacterianas que presentan esta función. Estos microorganismos capaces de hidrolizar lípidos pueden ser, por ejemplo, *Candida*, *Yarrowia*, *Fonsecaea*, *Capronia*,
30 *Acinetobacter*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Geotrichum* y *Trichosporon*.

En una realización aún más preferida, los lodos activos de la invención comprenden microorganismos acumuladores de PHA y TAG, y microorganismos capaces de hidrolizar lípidos.

5 Los lodos activos empleados en la presente invención pueden tener diferentes orígenes. En una realización preferida los lodos empleados en la presente invención son lodos procedentes de una Estación de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) urbana; en una realización más preferida son lodos procedentes del tanque de aireación del tratamiento secundario de una EDAR.

10 Otra ventaja de la presente invención es que el cultivo se enriquece en microorganismos acumuladores y también en los microorganismos que tienen la capacidad de hidrolizar la corriente lipídica utilizada como fuente de carbono. Así, tras añadir la fuente de carbono al medio de reacción, aquellos microorganismos con capacidad de segregar lipasas extracelulares catalizan su hidrólisis liberando ácidos grasos de cadena larga y glicerol (precursores en la síntesis de PHA y TAG).

15 En una realización preferida, el proceso de la invención no comprende una etapa de pretratamiento o de hidrólisis de la fuente de carbono lipídica. De este modo es posible utilizar directamente una corriente lipídica sin necesidad de emplear un reactor adicional para su pretratamiento. No es necesario llevar a cabo un proceso previo de hidrólisis para la obtención de ácidos grasos de cadena larga y glicerol. Tampoco hace falta transformar esta

20 corriente en una fuente de carbono más fácilmente metabolizable como son los ácidos grasos volátiles (que pueden obtenerse por acidificación de una fuente de carbono lipídica). Esto es posible debido al enriquecimiento que se realiza en el proceso en el que se seleccionan microorganismos acumuladores y también microorganismos que permiten hidrolizar lípidos.

25 Otra ventaja del proceso de la invención en comparación con el estado de la técnica es que la configuración de ciclo del reactor está diseñada de tal modo que permite, en un solo reactor: i) seleccionar, a partir de los lodos activos empleados como inóculo, un cultivo con capacidad de hidrolizar el sustrato y acumular PHA y TAG; ii) reproducir en cada ciclo de operación el cultivo presente en el medio de reacción; y iii) maximizar la cantidad de PHA y TAG acumulados. i) y ii) se llevan convencionalmente a cabo en un reactor tipo SBR de

30 enriquecimiento; y iii) en un reactor tipo FBR de acumulación. En la Figura 2 se muestra una comparación entre la configuración del ciclo de operación del SBR diseñado en la presente invención (Figura 2 (a)) con la de un SBR de enriquecimiento y la subsiguiente etapa de acumulación del proceso convencional (Figura 2 (b)).

El proceso de la invención también comprende una etapa b) caracterizada por un ciclo de operación del reactor.

Esta etapa b) comprende (i) alimentar a los microorganismos presentes en el reactor con una fuente de carbono lipídica, siendo la alimentación en pulsos y en condiciones de nitrógeno limitantes, es decir, la cantidad de nitrógeno es inferior a 20 mg nitrógeno total (NT)/L. Preferiblemente la cantidad de nitrógeno está entre 5 y 20 mg NT/L. Más preferiblemente, la cantidad de nitrógeno es igual o inferior a 5 mg NT/L.

Esta etapa (i) es una fase de saciedad prolongada en la que la fuente de carbono se añade en pulsos durante un largo período de tiempo y en condiciones de nitrógeno limitantes. Lo que se pretende mediante esta estrategia de alimentación es que la cantidad de compuestos intracelulares acumulados al final de la fase de saciedad sea la máxima posible. Esta fase de saciedad, está diseñada para que la cantidad de compuestos intracelulares acumulados al final de la fase de saciedad sea la máxima posible de modo que la biomasa retirada contiene los PHA y TAG producidos por el sistema.

El diseño de la fase de saciedad en la invención, evita tener que operar un segundo reactor de acumulación tipo FBR.

En la presente invención, la fase de saciedad se ha diseñado para acumular la máxima cantidad posible de biopolímeros intracelularmente (acumulación), de modo que la biomasa obtenida en la fase de saciedad ya se puede tratar para obtener los biopolímeros. A diferencia de los procesos convencionales en los que la fase de saciedad está diseñada únicamente para alimentar al CMM para enriquecerlo en los microorganismos de interés, y así la acumulación para obtener la máxima cantidad de biopolímeros posible debe de realizarse en otro reactor, habitualmente tipo FBR, lo que implica un mayor número de etapas y procesos mucho más largos que el de la presente invención.

Por lo tanto, para obtener la biomasa con biopolímeros intracelulares lista para su extracción y purificación (> 30 – 40 % en peso seco (p.s.) intracelular de PHA y TAG), en la presente invención se evita tener que inocular un reactor tipo FBR, con el cultivo previamente enriquecido en el SBR, y operarlo sometiendo a los microorganismos a una fase de saciedad prolongada para maximizar la cantidad de biopolímeros acumulados. A diferencia de lo que ocurre en la fase de saciedad de un reactor convencional de enriquecimiento tipo SBR, donde se busca únicamente que los microorganismos con capacidad de metabolizar el sustrato acumulen una cierta cantidad de carbono que les permita sobrevivir una vez agotado el

carbono extracelular (fase de hambruna), en la presente invención, además, la cantidad acumulada en el SBR es la máxima posible para evitar operar una segunda unidad de acumulación.

5 Por lo tanto, durante esta primera fase del ciclo (i), tienen lugar simultáneamente los procesos de pretratamiento y acumulación, que se llevarían a cabo tradicionalmente en dos reactores. A su vez, esta primera fase contribuye a la selección del CMM. Pues, sólo ciertos microorganismos serán capaces de acumular PHA y TAG, y estos serán los que durante la fase de hambruna podrán emplear estos compuestos intracelulares como fuente de carbono para crecimiento y mantenerse en el sistema.

10 El ciclo de operación del reactor de la etapa b) del proceso de la invención, también comprende una etapa ii) en la que se retira el 50% de la mezcla del reactor, donde dicha mezcla contiene la biomasa con PHA y TAG intracelulares.

Una ventaja adicional de la presente invención es que permite obtener la biomasa con PHA y TAG acumulados en una cantidad superior a 30 % en peso seco (p.s.) intracelular de PHA y TAG, como se muestra en los ejemplos 1, 2 y 3, y así puede llevarse directamente a los procesos de extracción y purificación de PHA y TAG posteriores.

En una realización preferida, esta etapa ii) tiene lugar inmediatamente después de la etapa i). Esta es una diferencia relevante respecto a lo que ocurre en los sistemas convencionales, en los que la descarga de la biomasa tiene lugar al final del ciclo de operación del reactor SBR de enriquecimiento, es decir, tras la fase de hambruna. De ese modo, tras la fase de hambruna, los microorganismos no tienen compuestos intracelulares acumulados ya que los emplearon como fuente de carbono para crecimiento. La biomasa que se retira del reactor tras la fase de hambruna se lleva a un reactor tipo FBR para emplearla como inóculo en un proceso de acumulación en el que se busca maximizar la cantidad de compuestos intracelulares acumulados. Este es uno de los motivos por los que los procesos convencionales deben de utilizar varios reactores.

El ciclo de operación del reactor de la etapa b) del proceso de la invención, también comprende una etapa iii) en la que se añade una corriente que contiene entre 0,9 y 2 veces la cantidad estequiométrica de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano.

30 Así, en esta etapa iii) da comienzo la fase de hambruna y los microorganismos estarán durante un largo período de tiempo sin carbono extracelular en el medio líquido. Al no haber

carbono externo, sólo aquellos microorganismos que acumularon PHA y TAG durante la fase de saciedad, pueden emplear estos compuestos como fuente de carbono para crecimiento. Por el contrario, las poblaciones no acumuladoras, no pueden replicarse y se lavarán del sistema. De este modo, al repetir varios ciclos de operación, el sistema se
5 enriquece progresiva y naturalmente en poblaciones acumuladoras, en esta fase tiene lugar el enriquecimiento del CMM.

La cantidad de nitrógeno añadida al inicio de la fase de hambruna debe ser, como máximo, la cantidad estequiométrica necesaria para el crecimiento microbiano. En una realización particular, la corriente que se emplea en esta fase es una disolución acuosa con un compuesto
10 de nitrógeno. En otra realización particular, el compuesto de nitrógeno se selecciona de entre sulfato de amonio, nitrato de amonio, y cloruro de amonio. En una realización más particular, la disolución acuosa contiene una concentración de entre 5 mg/L y 280 mg/L de cloruro de amonio.

En una realización preferida, al terminar la fase (iii) la cantidad de nitrógeno total en el medio
15 de reacción es inferior a 20 mg de nitrógeno total por litro (< 20 mg NT/L), preferiblemente inferior a 5 mg de nitrógeno total por litro (<5 mg NT/L). De este modo, en el siguiente ciclo en el que se inicie la fase de saciedad mediante la alimentación con la fuente de carbono, al tener lugar en presencia de un nivel de nitrógeno inferior a 20 mg de nitrógeno total por litro (< 20 mg NT/L), preferiblemente inferior a 5 mg de nitrógeno total por litro (< 5 mg NT/L),
20 se favorece la acumulación y se evita que la corriente lipídica sea empleada como fuente de carbono para crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la etapa (i) transcurrió bajo concentraciones de nitrógeno próximas a 5 mg NT/L como se demuestra en el ejemplo 1. Así, preferiblemente al terminar la fase (iii) la concentración de nitrógeno es igual o inferior a 5 mg NT/L y la fase (i) transcurre bajo una concentración de nitrógeno
25 igual o inferior a 5 mg NT/L.

El proceso de la invención también comprende una etapa c) que es la repetición del proceso desde la etapa b) en ciclos sucesivos.

En una realización particular, el proceso de la invención comprende ciclos de operación de longitud variable con longitudes de 12, 18 y 24 horas en diferentes periodos operacionales.
30 En otra realización particular, la etapa (i), fase de saciedad tiene una duración de entre 6 y 12 h. En otra realización particular, la etapa (iii), fase de hambruna tiene una duración de entre 6 y 12 h.

El procedimiento de la presente invención tiene el potencial de permitir la obtención de biomasa que contiene diferentes proporciones de PHA y TAG dependiendo de las condiciones de operación y por lo tanto del enriquecimiento del cultivo en unos u otros microorganismos.

- 5 En una realización particular, el proceso de esta invención permite la producción intracelular de PHA y TAG en una proporción de entre 20:80 y 80:20 de PHA:TAG. De este modo, el procedimiento de la invención comprende el enriquecimiento del cultivo en microorganismos capaces de hidrolizar el sustrato y acumular TAG, pero también en microorganismos capaces de acumular PHA. En particular, el procedimiento comprende una
- 10 alimentación de sustrato lipídico en pulsos (fase de saciedad) desacoplado de la fuente de nitrógeno (que se añade al final de la saciedad y se consume en la hambruna). El exceso de carbono debe limitarse para asegurar que el cultivo se enriquezca parcialmente en acumuladores de PHA. Para ello, en una realización preferida, durante la fase de saciedad cada pulso de alimentación contiene una cantidad de carbono igual o inferior a 1.200 mg
- 15 DQO. En otra realización más preferida, un pulso se añade cuando el 85% de carbono del pulso anterior se ha consumido o agotado, así queda remanente un 15% de carbono todavía sin consumir, que se correspondería con la fracción no biodegradable de la fuente de carbono. El consumo o agotamiento de carbono se puede monitorizar mediante la cantidad de oxígeno disuelto (OD). En otra realización preferida, la cantidad de carbono al inicio a la
- 20 fase de hambruna será igual o inferior al 15%. Además, debe asegurarse el consumo del nitrógeno añadido para el crecimiento microbiano durante la fase de hambruna para el siguiente ciclo de operación se inicie en condiciones de nitrógeno limitantes, es decir, inferior al 20 mg NT/L.

25

A continuación se describe una realización particular que ilustra la invención.

Métodos y diseño experimental

- El proceso se llevó a cabo en un reactor tipo SBR operado a escala de laboratorio. El
- 30 recipiente de reacción (1, ver Figura 1) era de metacrilato y contaba con serpentín exterior para el control de la temperatura, su volumen de trabajo eran 10 L (volumen total 15 L). A

mayores, el sistema presentaba: 1 bomba peristáltica de caudal fijo para la alimentación de la corriente lipídica empleada como fuente de carbono (2); 2 bombas peristálticas de caudal variable y sus correspondientes controladores para llevar a cabo el intercambio de volumen en el sistema (bomba para la descarga del 50 % del volumen de reacción, y bomba de alimentación de la corriente acuosa para rellenar el reactor, (3) y (4) respectivamente); 1 soplante para el aporte de aire al medio de reacción (5); baño termostarizado para el control de temperatura (6); sonda de oxígeno para la monitorización en continuo de oxígeno disuelto (OD) y temperatura (HQ40d HACH Lange, EEUU) (7); controlador lógico programable (PLC, de inglés *Programmable Logic Controller*) Siemens S7-1200 para la programación del ciclo de operación (accionamiento de las bombas en los tiempos de deseados) (8); recipiente de 1 L para la fuente lipídica (9); bolsa de 20 L para la corriente acuosa (10); y contenedor de 30 L para la recogida de la descarga (11).

Para su puesta en marcha, el reactor se inoculó al inicio del proceso con 10 L de lodos activos procedentes de la estación de depuración de aguas residuales de Calo-Milladoiro (A Coruña). Estos lodos presentaban una concentración inicial de sólidos en suspensión totales y volátiles (SST y SSV, respectivamente) de 3.63 ± 0.16 g SST/L y 3.01 ± 0.17 g SST/L y un pH de 7.5.

El reactor estaba continuamente aireado y completamente mezclado gracias a un par de difusores localizados en la parte inferior del mismo a través de los cuales se introducía aire impulsado por una bomba de aire. No se contaba con sistema de agitación mecánica. La temperatura estaba controlada en 30 ± 2 °C gracias a un serpentín exterior y un baño termostarizado. El pH del medio no se controlaba mediante un sistema de control automatizado pero se mantenía entorno a la neutralidad (7.0 ± 0.3) durante todo el ciclo de operación gracias a la adición de tampón bicarbonato en la corriente acuosa.

En los lodos activos empleados como inóculo se contaba con diferentes poblaciones microbianas, de entre las cuales era necesario seleccionar un cultivo con la capacidad de realizar las siguientes funciones:

- 1) Hidrolizar las grasas presentes en la corriente lipídica empleada como fuente de carbono en ácidos grasos de cadena larga y glicerol.
- 2) Acumular intracelularmente los compuestos resultantes del proceso de hidrólisis como PHA y/o TAG.

Para ello, el sistema se operó bajo el régimen de saciedad/hambruna considerando la modificación de la estrategia convencional (ADF) que implica alimentar de forma desacoplada las fuentes de carbono y nitrógeno, es decir, la estrategia DGL (Oliveira, *et al.*, N.Biotechnol. 2017, 37, 69-79). De este modo, la corriente lipídica (fuente de carbono) se añadía al inicio del ciclo y en ausencia de nitrógeno dando lugar a la fase de saciedad y una vez finalizada, se añadía en ausencia de carbono la fuente de nitrógeno dando lugar a la fase de hambruna. La adición de la fuente de carbono tenía lugar en pulsos durante toda la fase de saciedad.

Se probaron tres configuraciones diferentes del proceso consistentes en ciclos de operación de 12 horas, 18 horas y 24 horas, como se muestra en la Figura 3, distribuidos del siguiente modo: (I) Fase de saciedad (360 – 720 minutos): intervalos de alimentación de fuente de carbono (2 minutos) + reacción aerobia (58 – 118 minutos); (II) intercambio del 50 % del volumen de reacción (vaciado + rellenado); y (III) fase de hambruna (348 – 708 minutos), reacción aerobia tras añadir la fuente de nitrógeno (348 – 708 minutos).

Fase de saciedad: la fuente de carbono consistía en la fracción grasa de un efluente de la industria conservera procedente de la producción de atún con un elevado contenido en ácido oleico (Tabla 1).

Tabla 1. **Caracterización de la corriente lipídica empleada como sustrato.** C (carbono), DQO (demanda química de oxígeno), H (hidrógeno), N (nitrógeno), O (oxígeno), S (azufre), ST (sólidos totales), SV (sólidos volátiles).

| Parámetro | Valor |
|-----------------------|---------------|
| pH | 3,60 ± 0,20 |
| Conductividad (μS/cm) | 0,55 ± 0,10 |
| Densidad (g/L) | 889 ± 15 |
| DQO (g/L) | 2.030 ± 140 |
| ST (g/g) | 0,788 ± 0,038 |
| SV (g/g) | 0,787 ± 0,038 |

| Análisis elemental (%) | |
|------------------------|-------|
| C | 76,75 |
| H | 11,95 |
| O | 10,68 |
| N | 0,00 |
| S | 0,09 |

| Perfil ácidos grasos (%) |
|--------------------------|
|--------------------------|

| | |
|-----------------------------------|--------|
| C14:0 (Mirístico) | 0,06 |
| C14:1 (Miristoleico) | < 0,01 |
| C15:0 (Pentadecanoico) | < 0,01 |
| C16:0 (Palmítico) | 8,78 |
| C16:1 (Palmitoleico, n-7) | 0,66 |
| C17:0 (Heptadecanoico) | 0,08 |
| C17:1 (Margaroleico) | 0,10 |
| C18:0 (Esteárico) | 2,77 |
| C18:2 (Oleico, n-9+n-7) | 64,84 |
| C20:0 (Linoleico, n-6) | 13,21 |
| C18:3 (α -linoleico acid) | 0,52 |
| C20:1 (Linoleico, n-3) | <0,01 |
| C18:4 (Eicosenoico, n-9) | 0,35 |
| C20:4 (Araquidónico, n-6) | 0,27 |
| C20:4(Eicosatetraenoico) | < 0,01 |
| C21:5 (Eicosapentaenoico, n-3) | < 0,01 |
| C21:5 (Heneicosapentaenoico, n-3) | 0,05 |
| C22:5 (Docosapentaenoico, n-6) | < 0,01 |
| C22:5 (Docosapentaenoico, n-3) | < 0,01 |
| C22:6 (Docosaheptaenoico, n-3) | 0,18 |
| Otros | < 0,01 |

Esta fracción lipídica de un efluente de la industria conservera se añadió en pulsos (con una frecuencia de entre 1 y 2 horas) desde el inicio del ciclo hasta el final de la fase de saciedad. Cada vez que un pulso de sustrato se consumía se añadía uno nuevo. La periodicidad entre pulsos se fijó en función de la concentración de OD medida en continuo en el reactor mediante el empleo de una sonda de oxígeno.

- Al añadir la fuente de carbono la concentración de OD descendía como consecuencia de la metabolización del sustrato, y posteriormente ascendía hasta alcanzar de nuevo valores de saturación, lo que indicó el agotamiento de la fuente de carbono.
- El tiempo transcurrido entre la adición del pulso de carbono, y el momento en el que volvían a alcanzarse valores de saturación definió el tiempo necesario para el consumo del sustrato. Esto es, la periodicidad entre pulsos.
- Una vez definido dicho tiempo, el momento en el que debía añadirse cada pulso se programó en un controlador lógico programable (PLC, del inglés *Programmable Logic Controller*).
- La evolución de la concentración de OD se registró durante su monitorización en continuo y los perfiles se revisaron diariamente por si el tiempo de consumo de sustrato variaba y hubiese que hacer reajustes en la programación del PLC.

Intercambio: Al final de la fase de saciedad, la mitad del volumen del reactor (5 L que contenían biomasa con PHA y TAG acumulados) se retiró para la extracción y purificación de los biopolímeros. Posteriormente se añadió el mismo volumen (5 L) de una corriente acuosa que consistió en una disolución de nutrientes (fuente de nitrógeno) dando inicio a la fase de hambruna.

Fase de hambruna: la fuente de nitrógeno empleada consistió en una disolución sintética que contenía la cantidad mínima de nitrógeno en forma de NH_4Cl requerido para la duplicación de los microorganismos presentes en el medio de reacción (crecimiento), tampón NaHCO_3 para mantener el pH del sistema entorno a la neutralidad, aliltiurea para inhibir la actividad nitrificante y otros macro y micronutrientes (corriente acuosa, Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la corriente acuosa que contiene la fuente de nitrógeno.

| Compuesto | Valor |
|--|----------------|
| NH_4Cl (mg/L) | 10,00 – 250,00 |
| KH_2PO_4 (mg/L) | 25,00 – 300,00 |
| NaHCO_3 (mg/L) | 55,00 – 396,00 |
| MgSO_4 (mg/L) | 9,90 |
| KCl (mg/L) | 66,00 |
| Allilthiourea (mg/L) | 4,36 |
| Disolución de elementos traza (mL/L) * | 1,00 |

* Vishniac, W., Santer, M., 1957. The thiobacilli. *Bacteriol. Rev.* 21, 195–213

La mínima cantidad de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano, o lo que es lo mismo, la cantidad estequiométrica de nitrógeno para el crecimiento microbiano, se determina como sigue:

- Se estima una fórmula empírica para la biomasa en base a la bibliografía (Popovic, Heliyon, 2019, 5, 6) ($\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_w\text{O}_z$) considerando el tipo de poblaciones microbianas existentes en el sistema (acumuladores de PHA y TAG). Una vez definida la fórmula de la biomasa se conocen los moles de nitrógeno necesarios para formar un mol de biomasa. Por lo tanto, si se conocen los moles de biomasa existentes en el reactor, por estequiometría es posible calcular los moles de nitrógeno necesarios para la duplicación de la biomasa. Esto es:
 - De acuerdo con la fórmula de la biomasa $\text{C}_a\text{H}_b\text{N}_c\text{O}_d$, para formar 1 mol de biomasa se necesitan c moles de nitrógeno.
 - Si M son los moles de biomasa activa en el reactor, se necesitan .2 x M x c moles de nitrógeno para que la biomasa se duplique.

En los ejemplos mostrados aquí, se consideró como fórmula elemental de la biomasa la siguiente: $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$. Por lo tanto, para formar 1 mol de biomasa se necesitaron 0,2 moles de nitrógeno.

- 5 - Posteriormente, la cantidad de nitrógeno real que necesitan los microorganismos para crecimiento en cada ciclo, se reajusta en función de la concentración de nitrógeno remanente al final de la fase de hambruna, donde debe ser cero. Para conocer su valor se analiza la concentración de nitrógeno total presente en la fase líquida de una muestra tomada en el medio de reacción al final de la fase de hambruna (ver apartado muestreo y análisis).
- 10

Muestreo y análisis

Durante la caracterización de los ciclos de operación del SBR, se tomaron muestras periódicas del volumen de reacción. En la fase de saciedad estas se cogieron inmediatamente antes de la adición de cada pulso de fuente de carbono.

- 15 El pH se determinó con un pH & Ionmetro (GLP 22 Crison, Spain). Las concentraciones de sólidos en suspensión totales (SST), sólidos en suspensión volátiles (SSV), demanda química de oxígeno total (DQO_t), y demanda química de oxígeno soluble (DQO_s) se analizaron de acuerdo con el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Baird, R., & Bridgewater, L. 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association; Métodos 2540 E págs. 4-6 (SST,SSV), y 5220 B págs. 2-3 (DQO)). La concentración de iones se determinó por cromatografía iónica (861 Advanced Compact IC Metrohm, Suíza), y el carbono orgánico total, el carbono inorgánico y el nitrógeno total (COT, CI, y NT, respectivamente) mediante combustión catalítica (analizador TOL-L con el módulo TNM, 25 TOC-5000 Shimadzu, Japón). Las concentraciones de DQO_s , iones, COT, CI, y NT se determinaron en la fracción soluble de la muestra tras el centrifugado (Centrífuga 5430 Eppendorf, EEUU) y filtrado (filtros de 0.45 μm de tamaño de poro con membrana de celulosa-éster, Advantec, Japón) de la muestra bruta. Para la caracterización de la fuente de carbono, la conductividad se midió con un conductivímetro portátil (probe Sension + EC5 30 HACH-Lange, EEUU); la concentración de sólidos totales y volátiles (ST y SV, respectivamente) según lo descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Baird, R., & Bridgewater, L. 2017. Standard methods for the examination

of water and wastewater. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association; Métodos 2540 B pág. 2 (ST), y 2540 D pág. 6 (SV)); su composición elemental mediante un analizador elemental (FlashEA 1112 Thermo Scientific, EEUU); y el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases de acuerdo con las normas ISO 12966-2:2011
 5 (4.2) – método rápido, e ISO 12966-4:2015.

Los PHA y TAG acumulados intracelularmente en la biomasa se determinaron mediante cromatografía de gases (columna HP innovax equipada con un detector de ionización en llama (FID, del inglés *Flame Ionization Detector* (Agilent, EEUU)) siguiendo el método descrito por Smolders et al. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, 44, 837–848. Para ello se tomaron
 10 muestras del volumen de reacción, se centrifugaron (Centrífuga 5420 Eppendorf, USA), congelaron y liofilizaron para obtener una fase sólida. Los compuestos acumulados se cuantificaron empleando estándares de calibración comerciales para PHA (copolímero que contenía un 88 % de hidroxibutirato (HB), y un 12 % de hidroxivalerato (HV)) y TAG (ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico) (Sigma Aldrich, EEUU).

15

Cálculos

El contenido de compuestos intracelulares (PHA y TAG) contenidos en la biomasa se expresó en porcentaje de peso seco de la célula (p.s. %), como porcentaje de los SSV medidos. La concentración de biomasa activa (X) se calculó como la diferencia entre la masa
 20 de los SSV y la suma de los compuestos intracelulares acumulados ($\text{Biop} = \text{PHA} + \text{TAG}$) considerando la siguiente fórmula empírica para la biomasa $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$

Los consumos máximos de carbono y nitrógeno ($-q_S$, $-q_N$, respectivamente), y las velocidades máximas de producción de PHA, TAG y biomasa activa (q_{PHA} , q_{TAG} , q_X , respectivamente), se determinaron a partir de las pendientes máximas de las curvas que
 25 describen la evolución de la concentración de los diferentes parámetros a lo largo del tiempo. Estos parámetros se expresaron como $\text{Cmmol}/(\text{Cmmol}_X \cdot \text{h})$ excepto q_X , que se refirió al sustrato (S) y se definió como $\text{Cmmol}/(\text{Cmmol}_S \cdot \text{h})$. Los rendimientos de producción (Y , expresados como $\text{Cmmol}/\text{Cmmol}_S$) se determinaron dividiendo las velocidades máximas de producción entre la velocidad máxima de consumo de S . La productividad máxima diaria
 30 hace referencia a la masa (en g) de compuestos intracelulares acumulados (PHA y TAG) diariamente por volumen (en L) de sustrato alimentado al sistema. Este valor se determinó

dividiendo el rendimiento (transformando previamente los valores de Cmmol a g) entre los litros de corriente lipídica alimentada al día al sistema.

A continuación se muestran tres ejemplos concretos relativos a la operación del sistema bajo las diferentes configuraciones de ciclo testadas.

5

Ejemplo 1.

El reactor anteriormente descrito se operó en ciclos de 12 horas durante 57 días. El ciclo aquí ejemplificado se corresponde con el día 43 de operación.

La fuente de carbono (corriente lipídica) se añadió en pulsos durante la fase de saciedad (6
10 primeras horas). Se adicionaron un total de 6 pulsos de 0,6 mL (1,20 g DQO/pulso, teniendo en cuenta que la corriente lipídica contenía 2.000 g DOQ/L) con una frecuencia de 1 hora entre pulsos (2 minutos de alimentación de la fuente de carbono + 58 minutos de reacción aerobia), lo que supuso un flujo de 3,42 Cmmol/(L·h) durante esta primera fase.

Posteriormente se retiró el 50 % del volumen de reacción (5 L), y se añadieron 5 L de una
15 corriente acuosa con una concentración de nitrógeno de alrededor de 16 mg NT/L.

Durante las 6 horas restantes tuvo lugar la fase de hambruna.

En la Figura 4 (a) se puede observar la evolución de los principales parámetros de operación monitorizados en el reactor. La Tabla 3 recoge los valores de acumulación intracelular, la composición de los compuestos acumulados, los principales parámetros cinéticos, y los
20 rendimientos alcanzados. Tras 6 horas (final de la fase de saciedad), se alcanzó una acumulación intracelular de $50,45 \pm 0,22$ p.s. % (ratio PHA:TAG 50,5:49,5). En este momento, las velocidades máximas de acumulación de PHA y TAG fueron de 0,088 Cmmol_{PHA}/(Cmmol_S·h) y 0,073 Cmmol_{TAG}/(Cmmol_S·h), respectivamente, con una velocidad de consumo del sustrato lipídico de -0,458 Cmmol_S/(Cmmol_X·h). Los
25 rendimientos de producción de PHA y TAG fueron 0,231 Cmmol_{PHA}/Cmmol_S y 0,192 Cmmol_{TAG}/Cmmol_S, lo que resultó en un rendimiento total de 0,423 Cmmol_{Biop}/Cmmol_S.

Tabla 3. Acumulación intracelular, parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos en el reactor SBR el día 43 de operación (ciclo de 12 horas).

| Parámetro | Fase del ciclo | Valore |
|--------------------------------|----------------|--------|
| Flujo de carbono (Cmmol/(L·h)) | Saciedad | 3,42 |

| | | |
|--|------------------------|------------------|
| Acumulación intracelular (p.s. %) | Final saciedad | 50,24 ± 0,44 |
| PHB:PHV:PAL:STE:OL:LIN | Final saciedad | 46:3:6:1:32:12 |
| q_{TAG} (Cmmol _{TAG} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,073 |
| q_{PHA} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,088 |
| q_{Biop} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,162 |
| - q_N (Cmmol _N /Cmmol _X ·h) | Saciedad / Hambruna | - 0,001 / -0,012 |
| - q_C (Cmmol _C /Cmmol _X ·h) | Saciedad | -0,458 |
| q_X (Cmmol _X /Cmmol _C ·h) | Saciedad / Hambruna | 0,002 / 0,003 |
| Y_{TAG} (Cmmol _{TAG} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,192 |
| Y_{PHA} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,231 |
| Y_{Biop} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,423 |
| Y_X (Cmmol _X /Cmmol _S) | Saciedad / Hambruna | 0,023 / 0,049 |

Biop (PHA + TAG acumulados intracelularmente); C (sustrato lipídico); LIN (ácido linoleico); OL (ácido oleico); PAL (ácido palmítico); PHA (polihidroxicanoato); PHB (polihidroxiacetato); PHV (polihidroxiadipato); q (producción máxima específica); - q (consumo máximo específico); STE (ácido esteárico); TAG (triacilglicérido); X (biomasa activa); Y (rendimiento).

10 Ejemplo 2.

El reactor anteriormente descrito se operó, a partir del día 58 de operación, en ciclos de 18 horas. En este momento, la duración de la fase de saciedad se incrementó de 6 a 12 horas, mientras que la fase de hambruna se mantuvo en 6 horas. El ejemplo aquí considerado se corresponde con el día 72 de operación.

15 La fuente de carbono (corriente lipídica) se añadió en pulsos durante la fase de saciedad (12 primeras horas). Se adicionaron un total de 6 pulsos de 0,6 mL (1,20 g DQO/pulso, teniendo en cuenta que la corriente lipídica contenía 2.000 g DOQ/L) con una frecuencia de 1 hora entre pulsos (2 minutos de alimentación de la fuente de carbono + 118 minutos de reacción aerobia), lo que supuso un flujo de 1,71 Cmmol/(L·h) durante esta primera fase.

20 Posteriormente se retiró el 50 % del volumen de reacción (5 L), y se añadieron 5 L de una corriente acuosa con una concentración de nitrógeno de alrededor de 18 mg NT/L.

Durante las 6 horas restantes tuvo lugar la fase de hambruna.

En la Figura 4 (b) se puede observar la evolución de los principales parámetros de operación monitorizados en el reactor. La Tabla 4 recoge los valores de acumulación intracelular, la composición de los compuestos acumulados, los principales parámetros cinéticos, y los rendimientos alcanzados. Las velocidades de consumo de carbono y nitrógeno durante las fases de saciedad y hambruna, respectivamente fueron inferiores que en el ciclo de 12 horas (Ejemplo 1), lo que dio lugar a un menor consumo de carbono y nitrógeno durante cada una de las fases. Por lo tanto, el nitrógeno estaba en una mayor proporción en el medio de reacción (6 vs. 13 mg/L al final de la fase de saciedad en los ciclos de 12 y 18 horas, respectivamente); y además había una mayor cantidad de carbono extracelular durante la fase de hambruna (80 vs. 400 mg DQO/L). Por lo tanto, el nitrógeno estaba en condiciones menos limitantes durante la fase de saciedad y había una cantidad elevada de carbono durante la fase de hambruna (> 10 – 15 % de la DQO añadida al medio de reacción durante la fase de saciedad, porcentaje correspondiente a la DQO no biodegradable del sustrato) permitiendo el desarrollo de poblaciones no acumuladoras. Como consecuencia, se observó una reducción de la capacidad de acumulación del sistema. Entre los días 43 (Ejemplo 1) y 72 (Ejemplo 3), la acumulación intracelular máxima descendió de $50,24 \pm 0,44$ (TAG:PHA = 51:49) a $30,75 \pm 1,67$ (TAG:PHA = 65:35) peso seco % (p.s. %) y el rendimiento máximo de producción de compuestos intracelulares de 0,429 a 0,299 $\text{Cmmol}_{\text{Biop}}/\text{Cmmols}$.

Tabla 4. Acumulación intracelular, parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos en el reactor SBR el día 72 de operación (ciclo de 18 horas).

| Parámetro | Fase del ciclo | Valores |
|---|------------------------|------------------|
| Flujo de carbono ($\text{Cmmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$) | Saciedad | 1,71 |
| Acumulación intracelular (p.s. %) | Final saciedad | $30,75 \pm 1,67$ |
| PHB:PHV:PAL:STE:OL:LIN | Final saciedad | 9:26:9:2:37:17 |
| q_{TAG} ($\text{Cmmol}_{\text{TAG}}/\text{Cmmol}_X\cdot\text{h}$) | Saciedad | 0,020 |
| q_{PHA} ($\text{Cmmol}_{\text{PHA}}/\text{Cmmol}_X\cdot\text{h}$) | Saciedad | 0,012 |
| q_{Biop} ($\text{Cmmol}_{\text{PHA}}/\text{Cmmol}_X\cdot\text{h}$) | Saciedad | 0,032 |
| - q_{N} ($\text{Cmmol}_{\text{N}}/\text{Cmmol}_X\cdot\text{h}$) | Saciedad / Hambruna | -0,006 / -0,010 |
| - q_{C} ($\text{Cmmol}_{\text{C}}/\text{Cmmol}_X\cdot\text{h}$) | Saciedad | -0,069 |
| q_{X} ($\text{Cmmol}_X/\text{Cmmol}_{\text{C}}\cdot\text{h}$) | Saciedad / Hambruna | 0,006 / 0,064 |
| Y_{TAG} ($\text{Cmmol}_{\text{TAG}}/\text{Cmmol}_{\text{C}}$) | Saciedad | 0,186 |
| Y_{PHA} ($\text{Cmmol}_{\text{PHA}}/\text{Cmmol}_{\text{C}}$) | Saciedad | 0,113 |
| Y_{Biop} ($\text{Cmmol}_{\text{PHA}}/\text{Cmmol}_{\text{C}}$) | Saciedad | 0,299 |
| Y_{X} ($\text{Cmmol}_X/\text{Cmmols}$) | Saciedad / Hambruna | 0,425 / 0,390 |

Biop (PHA + TAG acumulados intracelularmente); C (sustrato lipídico); LIN (ácido linoleico); OL (ácido oleico); PAL (ácido palmítico); PHA (polihidroxialcanoato); PHB (polihidroxibutirato); PHV (polihidroxivalerato); q (producción máxima específica); $-q$ (consumo máximo específico); STE (ácido esteárico); TAG (triacilglicérido); X (biomasa activa); Y (rendimiento).

Ejemplo 3.

El reactor anteriormente descrito se operó, a partir del día 96 de operación en ciclos de 24 horas. En el presente ejemplo se analiza un ciclo correspondiente al día 133 de operación.

10 Para asegurar un mayor consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno durante las fases de saciedad y hambruna, respectivamente, se modificó la configuración del ciclo de operación en comparación con la descrita en el Ejemplo 2. Para ello, la fase de saciedad se mantuvo en 12 horas, pero para evitar la presencia de carbono extracelular durante la fase de hambruna, se redujo la cantidad de sustrato añadida durante esta fase. Para ello se adicionaron, en lugar
15 de 6 pulsos de 0,6 mL, un total de 5 pulsos de 0,60 mL cada uno, (1,20 g DQO/pulso, teniendo en cuenta que la corriente lipídica contenía 2.000 g DQO/L), lo que supuso un flujo de 1,45 Cmmol/(L·h). El CMM se alimentó con la fuente de carbono del siguiente modo: 4 intervalos de 2 minutos de alimentación de la fuente de carbono + 118 minutos de reacción aerobia; más un último intervalo de 2 minutos de alimentación de la fuente de carbono + 236
20 minutos de reacción aerobia.

Posteriormente se retiró el 50 % del volumen de reacción (5 L), y se añadieron 5 L de una corriente acuosa con una concentración de nitrógeno de alrededor de 10 mg/L.

Durante las 12 horas restantes tuvo lugar la fase de hambruna. La duración de la fase de hambruna se extendió de 6 a 12 horas en comparación con el Ejemplo 2, y la cantidad de
25 nitrógeno añadida se reajustó, en base a la concentración de nitrógeno total (NT) medida al final del ciclo de operación, para asegurar condiciones de nitrógeno más limitantes que en el Ejemplo 2.

De este modo fue posible reducir la cantidad de carbono extracelular disponible en el medio de reacción al final de la fase de saciedad (50 vs. 400 mg DQO/L) y limitar más la
30 concentración de nitrógeno disponible en el medio de reacción al final de la fase de

hambruna (5 vs. 13 mg NT/L), lo que repercutió positivamente en la capacidad de acumulación del cultivo en comparación con el ciclo de 18 horas.

En la Figura 4 (c) se puede observar la evolución de los principales parámetros de operación monitorizados en el reactor. La Tabla 5 recoge los valores de acumulación intracelular, la composición de los compuestos acumulados, los principales parámetros cinéticos, y los rendimientos alcanzados. Entre los días 72 (Ejemplo 2) y 133 (Ejemplo 3) de operación, la acumulación intracelular al final de la fase de saciedad (12 horas) aumentó de $30,75 \pm 1,67$ (TAG:PHA = 65:35) a $45,31 \pm 2,18$ (TAG:PHA = 25:75) p.s. % a pesar de añadir una menor cantidad de fuente de carbono. Consecuentemente, se observó un incremento del rendimiento de producción de compuestos intracelulares del 96 % (de 0,299 a 0,586 Cmmol_{Biop}/Cmmols).

Tabla 5. Acumulación intracelular, parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos en el reactor SBR el día 133 de operación (ciclo de 24 horas).

| Parámetro | Fase del ciclo | Valores |
|--|------------------------|------------------|
| Flujo de carbono (Cmmol/(L·h)) | Saciedad | 1,45 |
| Acumulación intracelular (p.s. %) | Final saciedad | $45,31 \pm 2,18$ |
| PHB:PHV:PAL:STE:OL:LIN | Final saciedad | 8:17:8:1:48:18 |
| q_{TAG} (Cmmol _{TAG} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,083 |
| q_{PHA} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,016 |
| q_{Biop} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _X ·h) | Saciedad | 0,099 |
| - q_N (Cmmol _N /Cmmol _X ·h) | Saciedad / Hambruna | - 0,001 / -0,005 |
| - q_C (Cmmol _C /Cmmol _X ·h) | Saciedad | -0,164 |
| q_X (Cmmol _X /Cmmol _C ·h) | Saciedad / Hambruna | 0,008 / 0,0105 |
| Y_{TAG} (Cmmol _{TAG} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,489 |
| Y_{PHA} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,097 |
| Y_{Biop} (Cmmol _{PHA} /Cmmol _C) | Saciedad | 0,586 |
| Y_X (Cmmol _X /Cmmols) | Saciedad / Hambruna | 0,086 / 0,478 |

Biop (PHA + TAG acumulados intracelularmente); C (sustrato lipídico); LIN (ácido linoleico); OL (ácido oleico); PAL (ácido palmítico); PHA (polihidroxicanoato); PHB (polihidroxiacetato); PHV (polihidroxiadipato); q (producción máxima específica); - q (consumo máximo específico); STE (ácido esteárico); TAG (triacilglicérido); X (biomasa activa); Y (rendimiento).

Comparación con la literatura

En la Tabla 6 se muestra una comparativa de los resultados obtenidos en la presente invención (Ejemplo 1), con tres referencias representativas de la literatura en las que se emplea un cultivo mixto para: (a) acumulación de PHA a partir de una corriente lipídica; (b) acumulación de TAG a partir de una corriente lipídica; y (c) acumulación preferente de PHA o TAG a partir de una corriente lipídica.

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos en la presente invención con la literatura.

| | Alimentación | Configuración del sistema | Acumulación máxima (% p.s.) | Productividad (g Biop/(L·d)) | Referencia |
|----|--|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
| a) | Agua residual de la producción de aceite de oliva | Pretratamiento + SBR + FBR | 30,00 % PHA | 1,50 | Campanari et al. (2014) |
| b) | Aceite vegetal de haba de soja | SBR + FBR | 54,00 p.s. % TAG | - | Tamis et al. (2015) |
| c) | Corriente lipídica residual procedente de la cocción de atún | SBR + FBR | 82,30 PHA + 3,33 TAG | 0.88 | Argiz et al., (2021) |
| | | | 5,80 PHA + 39,55 TAG | 0.67 | |
| d) | Corriente lipídica residual procedente de la cocción de atún | SBR | 24,62 PHA + 25,48 TAG | 1,21 | Presente invención, a las 6 horas de operación |

Biop (suma de PHA y TAG), FBR (*fed batch reactor*), PHA (polihidroxialcanoato), SBR (*sequencing batch reactor*).

En una operación previa (Argiz *et al.*, Sci. Total Environ. 2021, 763, 142944), en la que se utilizó la misma fuente de carbono en un proceso de dos unidades (reactores SBR de enriquecimiento + FBR de acumulación), se necesitaron 12 horas de operación en el SBR y 30 horas en el FBR, para alcanzar una acumulación del 82,30 % PHA del peso seco y 3,33 % TAG del peso seco (1,8 g SSV/L, 0,45 g X/L) cuando los PHA fueron los principales compuestos acumulados. Cuando la acumulación de TAG fue preferente, se necesitaron 12

horas del ciclo de operación del SBR y 27 horas adicionales en el FBR para alcanzar una acumulación del 39,55 % TAG en peso seco y 5,80 % PHA en peso seco (2,1 g SSV/L, 1,1 g X/L). Por lo tanto, se alcanzaron producciones máximas de 0,88 y 0,67 g Biop/(L·d) respectivamente, mientras que en la presente invención, con el proceso en una unidad, a
5 pesar de que la concentración de biomasa era más baja (0,48 g SSV/L, 0,22 g X/L) se alcanzó un máximo de 1,21 g Biop/(L·d).

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción intracelular de polihidroxicanoatos (PHA) y triacilglicéridos (TAG) en un cultivo microbiano mixto, caracterizado porque todas las etapas se realizan en un único reactor secuencial discontinuo, y que además
- 5 comprende:
- a) inocular lodos activos en el reactor,
 - b) un ciclo de operación del reactor, que comprende:
 - 10 i. alimentar a los microorganismos presentes en el reactor con una fuente de carbono lipídica, siendo la alimentación en pulsos y en condiciones de nitrógeno limitantes
 - ii. retirar el 50% de la mezcla del reactor, donde dicha mezcla contiene la biomasa con PHA y TAG intracelulares,
 - 15 iii. añadir una corriente que contiene entre 0,9 y 2 veces la cantidad estequiométrica de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano,
 - c) repetir el proceso desde la etapa b) en ciclos sucesivos.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde los lodos activos comprenden microorganismos acumuladores de PHA y TAG, y microorganismos capaces de hidrolizar lípidos.
- 20 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los lodos activos comprenden microorganismos acumuladores de PHA seleccionados de entre *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Pandoraea*, *Azospirillum*, y *Pseudomonas*; y microorganismos acumuladores de TAG seleccionados de entre *Candida*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Mortierella*, y *Rhodococcus*, y microorganismos capaces de hidrolizar
- 25 lípidos seleccionados de entre *Candida*, *Yarrowia*, *Fonsecaea*, *Capronia*, *Acinetobacter*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium*, *Geotrichum* y *Trichosporon*.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los lodos activos proceden de una Estación de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) urbana.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la fuente de
- 30 carbono lipídica tiene un contenido en lípidos superior al 85% de la demanda química de oxígeno (DQO).

ES 2 908 750 B2

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada pulso de alimentación contiene una cantidad de carbono igual o inferior a 1.200 mg DQO.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad de nitrógeno en la etapa (i) es inferior a 20 mg nitrógeno total (NT)/L.
- 5 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad de nitrógeno en la etapa (i) está entre 5 y 20 mg NT/L.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa ii) tiene lugar inmediatamente después de la etapa i).
- 10 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (i) tiene una duración de entre 6 horas y 12 horas.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (iii) tiene una duración de entre 6 y 12 horas.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la corriente de la etapa (iii) es una disolución acuosa con un compuesto de nitrógeno.
- 15 13. Proceso según la reivindicación 12, donde el compuesto de nitrógeno se selecciona de entre sulfato de amonio, nitrato de amonio, y cloruro de amonio.
14. Proceso según la reivindicación 12, donde la disolución acuosa contiene una concentración de entre 5 mg/L y 280 mg/L de cloruro de amonio.
- 20 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al terminar la fase (iii) la cantidad de nitrógeno total en el medio de reacción es inferior a 20 mg de nitrógeno total por litro.

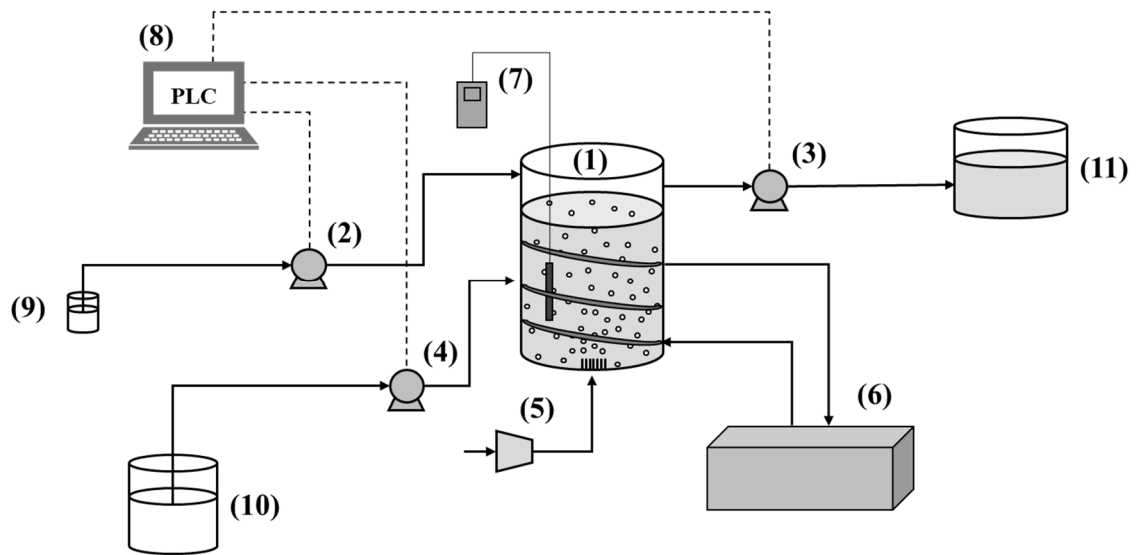


Figura 1

(a)

| | Fase de saciedad | | | | | | | | | | Int. V | Fase de hambruna | |
|-------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|------------------|---|
| Alimentación C | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Reacción aerobia | | | | | | | | | | | | | ■ |
| Descarga biomasa + biop | | | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| Alimentación N | | | | | | | | | | | | | ■ |

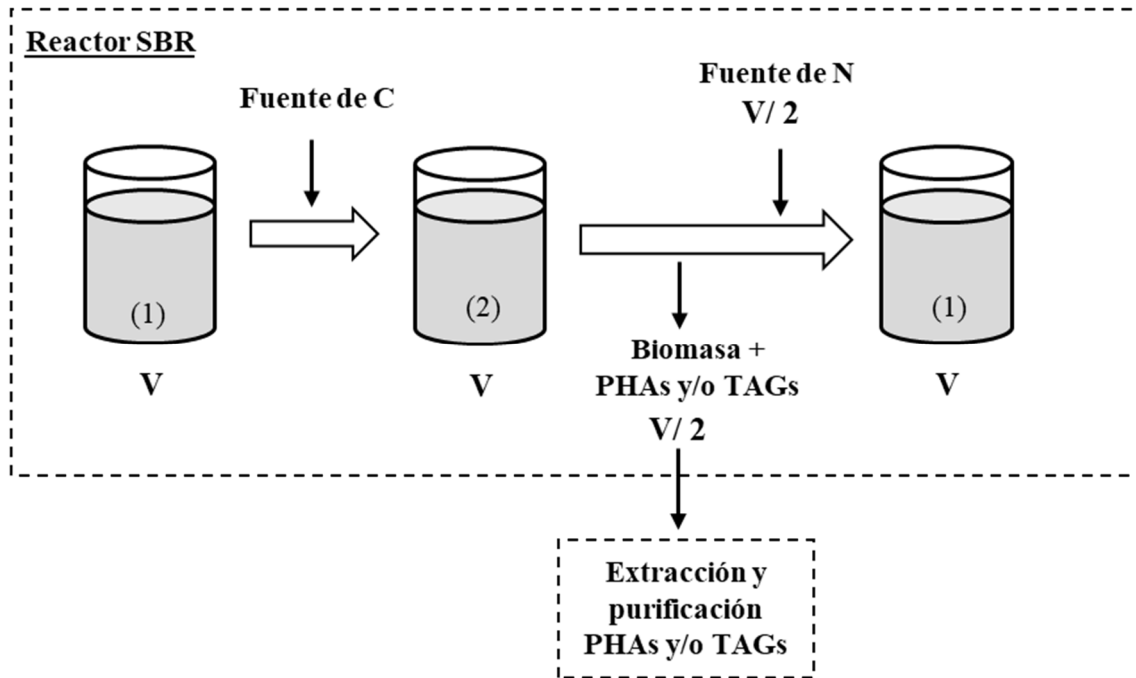


Figura 2

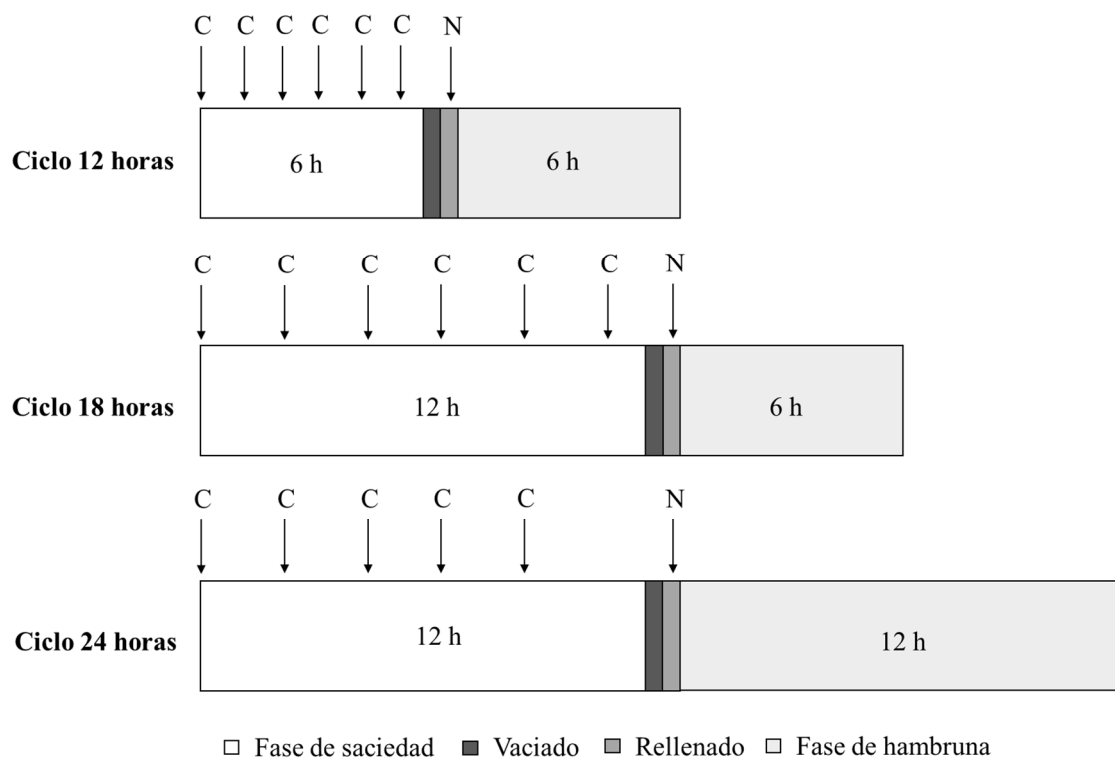


Figura 3

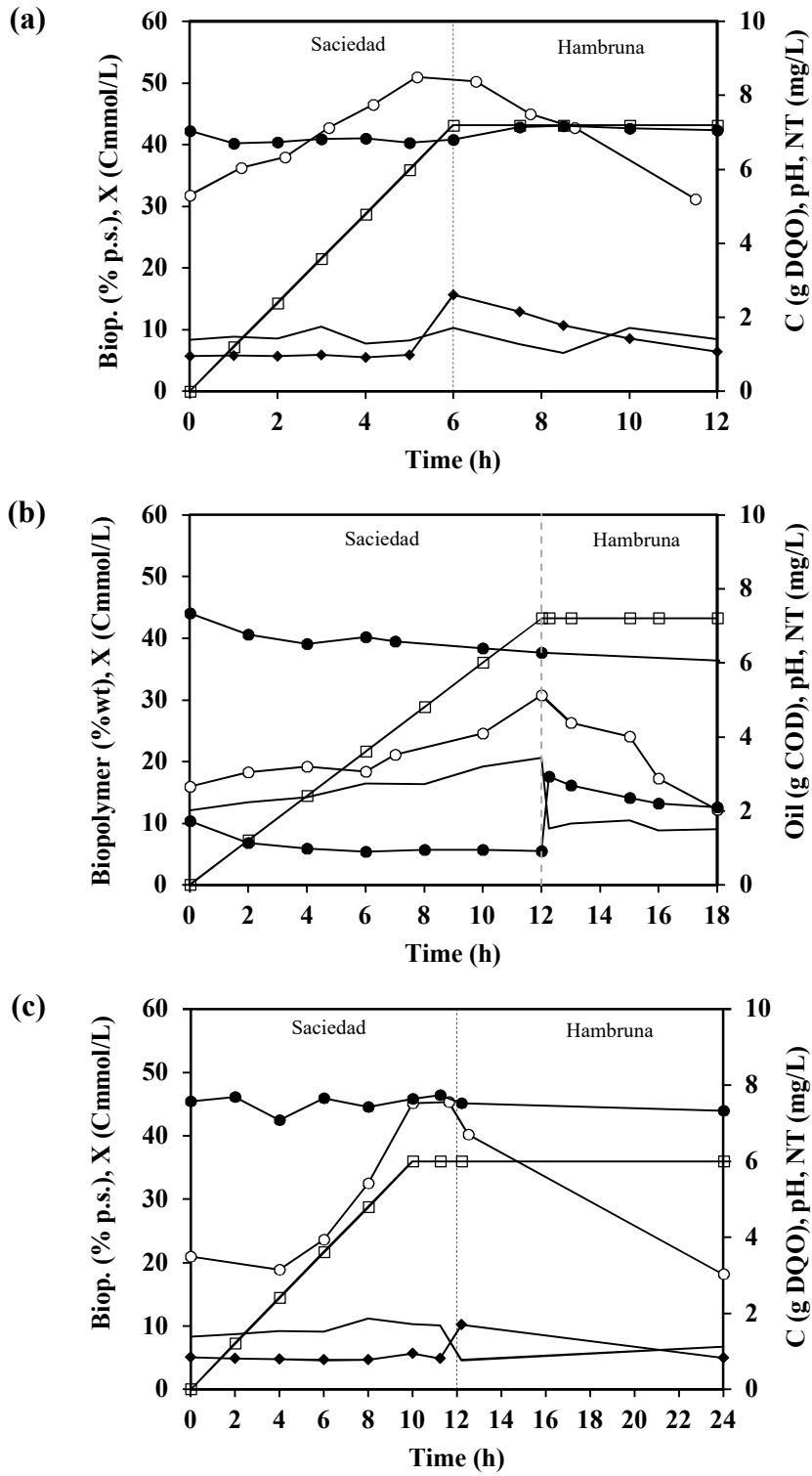


Figura 4