

Evaluación del pretratamiento biológico de biomasa macroalgal con *Aspergillus oryzae* para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) con *Cupriavidus necator*

Kelly Fernanda Cala Parra

Trabajo de Grado para optar el título de Ingeniera Química  
Modalidad Pasantía de Investigación

Directora

Ana Belén Díaz Sánchez

Ph.D. en Ciencias y Tecnologías Químicas

Co- directora

Viviana Sánchez Torres

Ph.D. en Ingeniería Química

Universidad de Cádiz

Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2022

### Dedicatoria

*A Dios, mi Creador, por haberme iluminado, guiado y bendecido en cada paso de este largo camino.*

*A mis maravillosos padres, Luz Mery Parra y Luis Cala, quienes han apostado por mí siempre, a quienes les debo el ser humano en el que me he convertido. Mi motor de vida, mi mayor ejemplo de superación, amor y honestidad.*

*A Luis Miguel Cala, el mejor hermano que la vida pudo darme, por ser mi amigo incondicional, mi SOS, por su amor, comprensión y apoyo en todo.*

*A Mariela Parra, mi Titi, madrina, amiga fiel. Por su apoyo, amor y consejos. Por su voz de aliento que me llegó cuando estuve a punto de darme por vencida. Por ser una de mis más grandes bendiciones.*

*A mis abuelos, Cecilia Alba y Rafael Parra, por ser parte fundamental de mi vida. Abuelita, sin tus oraciones, cuidados y amor no sería quién soy, no hubiera llegado donde estoy.*

### **Agradecimientos**

A Dios, por ser mi paz en medio de la tormenta, mi roca firme, mi refugio, por poner en mi camino cada oportunidad que para mí ha sido un milagro.

A mis padres, Luz Mery y Luis, por ser la fuente de mi motivación, por impulsarme y apoyarme de todas las formas posibles en mi carrera universitaria y vida personal, por haberme dado alas para volar muy alto, por alentarme a seguir mis sueños y enseñarme el valor del trabajo duro y la dedicación. Gracias por todo y tanto, son lo más grande en mi vida.

A mi hermano, Luis Miguel, mi otro yo, por ser mi cómplice, mi ayuda aun estando a km de distancia, por escucharme y estar para mí siempre que lo he necesitado sin esperar nada a cambio.

A mis abuelos, Cecilia y Rafael, a mi Titi, Mariela, por ser un rayo de sol incluso estando lejos. Porque desde que tengo uso de memoria siempre han estado cuidando de mí, en las buenas y en las malas, tendiéndome la mano. Soy muy afortunada de tenerlos a mi lado.

A mi querida alma máter, la Universidad Industrial de Santander, por formarme con los conocimientos propios de un Ingeniero Químico y dotarme de pensamiento crítico y responsabilidad social. Gracias por permitirme ser parte del grupo de Investigación Recobro Mejorado de la Escuela de Ing. Petróleos- ICP, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer al Capítulo Estudiantil AIChE UIS y Chem-E-Car, por el grupo de Danzas Macondo, por los semilleros y cada espacio y herramientas propiciados para mi crecimiento personal y profesional.

A los profesores y administrativos que a la UIS pertenecen, de manera muy especial a la Dra. Viviana Sánchez Torres, por haber aceptado ser parte de mi proyecto de grado, en los tres intentos de pasantía siempre tuve un sí de su parte y su mejor disposición. Gracias por su tiempo y enseñanzas. Y a Relaciones Exteriores, por haberme ayudado a realizar la Pasantía de Investigación.

A la Universidad de Cádiz, al centro de Investigación de Ingeniería Química y Alimentos y de manera muy especial y sincera a la Directora del presente TFG, la Dra. Ana Belén Díaz Sánchez, por su disposición siempre para conmigo, por su amabilidad, paciencia, enseñanzas, tiempo y compromiso. Por haberme permitido realizar mi sueño de una pasantía a nivel internacional y por haber depositado en mí la confianza para la realización de este proyecto.

A Agustín Romero por las recomendaciones hechas desde su experiencia y conocimientos, por su apoyo para alcanzar los objetivos de este Trabajo de Grado.

A Daniel Bohórquez, por haber compartido conmigo sus conocimientos en Biotecnología, por enseñarme los protocolos y técnicas en el laboratorio, por resolver mis dudas pacientemente, sin su ayuda me hubiera tomado el doble de tiempo el desarrollo de este TFG.

A Alexandra, por su amabilidad, calidez y empatía, gracias por llorar y reír conmigo, por los viajes y las aventuras. A ella, Eliezer, Daniel y Alberto, por la amistad que me brindaron de

manera desinteresada, por haberme adoptado como una más de Uds., hubiera estado muy sola sin su compañía, mil gracias por todo.

A Daniela, por ser la hermana de alma que la vida me dio, por ser tan incondicional, por su apoyo sincero y por cada momento que hemos vivido juntas.

A Sofía, por aceptarme tal cual soy, por darme ánimos y hacerme barra, por alegrarse con mis logros, por escucharme, porque aún en la distancia nuestra amistad sigue estando intacta, eres la mejor “prima hermana”.

A Melanie, Mary, Alejandra, Natalia, las mejores amigas que conservo desde el colegio, gracias por estar y ser parte de mi vida.

A Karen, por ser una mano amiga durante mi paso por la universidad en Colombia y durante mi estadía en España, por haber hecho parte fundamental de este proyecto que ha sido tan importante para mí.

A Wendy, por ser una gran compañera y amiga, por su ayuda incondicional y buenas vibras siempre, por ser una de las mejores amistades que conservo.

A Alejis, Johan, Diego, Norvellys, los amigos que la universidad me dejó, porque son las personas con las que recuerdo haber tenido mis mejores y peores días universitarios, en Socorro y luego en Bucaramanga, por estar las 24/7 y compartir tantos momentos. Su amistad es un regalo de la vida.

A Marijose y su madre Manolita, por haberme abierto las puertas de sus casas y enseñarme de la cultura española, por preocuparse de mi bienestar durante toda mi estadía.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este sueño.

**Tabla de contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción.....	12
1.Objetivos.....	15
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. Estado del arte.....	16
2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs).....	16
2.2 Macroalgas.....	17
2.3 Producción de PHAs a partir de macroalgas.....	18
2.3.1 Pretratamiento.....	18
2.3.2 Hidrólisis enzimática.....	20
2.3.3 Fermentación con <i>Cupriavidus necator</i> para producir PHA.....	23
3. Metodología.....	24
3.1 Pretratamiento de la macroalga <i>Rugulopteryx okamurae</i> con <i>Aspergillus oryzae</i> .....	25
3.1.1 Acondicionamiento del alga.....	25
3.1.2 Obtención de las esporas de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	25
3.1.3 Pretratamiento biológico del alga con <i>A. oryzae</i> .....	25
3.1.4 Producción de enzimas sobre <i>R. okamurae</i> con <i>A. oryzae</i> .....	26
3.1.4.1 Producción y extracción de las enzimas.....	26

3.1.4.2 Medida de la actividad enzimática .....	27
Actividad celulasa .....	27
Actividad alginato liasa .....	28
Actividad laminarinaasa .....	28
Actividad xilanasa .....	28
3.2 Hidrólisis enzimática del alga pretratada .....	29
3.2.1 Hidrólisis enzimática en condiciones estándar .....	29
3.2.2 Hidrólisis enzimática en condiciones mejoradas .....	29
3.3 Fermentación con <i>Cupriavidus necator</i> para producir PHAs .....	30
3.3.1 Preparación del medio hidrolizado .....	31
3.3.2 Preparación del preinóculo de <i>Cupriavidus necator</i> .....	31
3.3.3 Fermentación para producir PHAs .....	31
3.4 Análisis de azúcares y PHAs .....	32
3.4.1 Azúcares reductores .....	32
3.4.2 Glucosa, xilosa y galactosa .....	33
3.4.3 PHAs .....	33
4. Análisis y resultados .....	34
4.1 Producción de enzimas hidrolíticas de <i>A. oryzae</i> sobre <i>R. okamurae</i> .....	34
4.2 Hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada con <i>A. oryzae</i> .....	37
4.2.1 Azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática .....	38

4.2.2 Monosacáridos liberados tras la etapa de hidrólisis enzimática .....	39
4.3 Comparación de hidrólisis estándar e hidrólisis en condiciones mejoradas .....	40
4.4 Producción de PHAs a partir de los hidrolizados azucarados empleando <i>C. necator</i> .....	43
5. Conclusiones .....	46
6. Recomendaciones.....	47
Referencias bibliográficas .....	48

**Lista de tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Hidrólisis de macroalgas para la producción de azúcares mediante hidrólisis .....	21
<b>Tabla 2</b> Condiciones estándar y mejoradas en la hidrólisis enzimática .....	30
<b>Tabla 3</b> Rendimientos de PHB.....	45

**Lista de figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Esquema general de la obtención de PHA a partir de macroalga .....	18
<b>Figura 2</b> Esquema general de la metodología seguida en este trabajo de investigación .....	24
<b>Figura 3</b> Evolución de la producción de enzimas hidrolíticas durante la FES de <i>A. oryzae</i> sobre <i>Rugulopteryx okamurae</i> .....	35
<b>Figura 4</b> Evolución de la concentración de azúcares reductores durante la FES de <i>A. oryzae</i> ....	37
<b>Figura 5</b> Evolución de los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática de la biomasa con y sin pretratamiento .....	38
<b>Figura 6</b> Influencia del tiempo de pretratamiento sobre la concentración azúcares liberados en la etapa de hidrólisis .....	40
<b>Figura 7</b> Evolución de los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática en las condiciones estándar y mejoradas.....	41
<b>Figura 8</b> Influencia de las condiciones empleadas en la hidrólisis sobre la concentración de azúcares liberados .....	42
<b>Figura 9</b> Evolución del crecimiento de <i>C. necator</i> , producción de PHA, consumo de glucosa y azúcares reductores durante la fermentación en medio hidrolizado .....	44

## Resumen

**Título:** Evaluación del pretratamiento biológico de biomasa macroalgal con *Aspergillus oryzae* para la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) con *Cupriavidus necator*\*

**Autor:** Kelly Fernanda Cala Parra\*\*

**Palabras Clave:** Pretratamiento, macroalgas, FES, azúcares reductores, hidrólisis enzimática, polihidroxialcanoatos.

La macroalga invasora *Rugulopteryx okamurae* se acumula masivamente en las costas del sur de España, suponiendo una amenaza para la biodiversidad, generando el desplazamiento de especies nativas y la desvalorización de los recursos oceánicos. Debido a que presenta un alto contenido en carbohidratos, representa una materia prima innovadora para la producción de bioplásticos como los polihidroxialcanoatos (PHAs). Éstos sugieren una alternativa a los plásticos derivados del petróleo pues ejercen una menor carga ambiental por su completa degradación y eliminación segura. La tecnología que se ha considerado más eficiente para su obtención es la fermentación microbiana. Muchos estudios indican que *Cupriavidus necator* representa el microorganismo más adecuado para este propósito porque puede acumular grandes cantidades de PHA. Por este motivo, en este trabajo se estudia la producción de PHAs con *C. necator* a partir de hidrolizados azucarados obtenidos de la hidrólisis enzimática de la macroalga invasora *R. okamurae*. Con idea de facilitar el acceso de las enzimas a los polisacáridos de su pared celular, se evaluó la aplicación de un pretratamiento biológico, previo a la hidrólisis enzimática, utilizando el hongo *Aspergillus oryzae*. Con el alga pretratada durante 5 días bajo condiciones mejoradas se aumentó la concentración de azúcares en un 76 % en comparación con condiciones estándar. También se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas mediante fermentación en estado sólido de *A. oryzae* sobre el alga invasora, obteniendo las máximas actividades para las enzimas alginato liasa y xilanasa, con valores de 15,19 y 31,01 U/g alga seca, respectivamente. El estudio también indicó que 48 horas de hidrólisis eran suficientes para alcanzar la concentración máxima de azúcares. Tras la fermentación de los hidrolizados con *C. necator* se obtuvo una concentración de PHB de 288,00 mg/L a las 24 h, aunque su rendimiento de producción no fue muy elevado (0,04 mg/mg de biomasa).

---

\*Trabajo de Grado. Modalidad Pasantía de Investigación.

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Ana Belén Díaz Sánchez. Ph.D. en Ciencias y Tecnologías Químicas, Co- directora: Viviana Sánchez Torres. Ph.D. en Ingeniería Química

### Abstract

**Title:** Evaluation of the biological pretreatment of macroalgal biomass with *Aspergillus oryzae* to produce polyhydroxyalkanoates (PHAs) with *Cupriavidus necator*\*

**Author:** Kelly Fernanda Cala Parra\*\*

**Key words:** Pretreatment, macroalgae, polyhydroxyalkanoates, reducing sugars, SSF, enzymatic hydrolysis

The invasive macroalga *Rugulopteryx okamurae* accumulates massively on the coasts of southern Spain, posing a threat to biodiversity, causing the displacement of native species and the devaluation of ocean resources. Due to its high carbohydrate content, it represents an innovative raw material to produce bioplastics such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHAs suggest an alternative to petroleum derived plastics because they imply lower environmental loads due to their complete degradation and safe disposal. The technology that has been considered most efficient to obtain it is microbial fermentation. Many studies indicate that *Cupriavidus necator* represents the most suitable microorganism for this purpose because it can accumulate large amount of PHA. For this reason, in this work it has evaluated the production of PHA with *C. necator* from sugar hydrolysates obtained from the enzymatic hydrolysis of the invasive macroalga *R. okamurae*. With the objective of facilitating the access of enzymes to the polysaccharides of its cell wall, the application of a biological pretreatment was studied, prior to enzymatic hydrolysis, using the fungus *Aspergillus oryzae*. With the algae pretreated for 5 days under improved conditions, the concentration of sugars increased by 76% compared to standard conditions. The production of hydrolytic enzymes was also evaluated by solid state fermentation of *A. oryzae* on the invasive algae, obtaining the maximum activities for the alginate lyase and xylanase enzymes, with values of 15.19 and 31.01 U/g dry algae, respectively. The study also indicated that 48 hours of hydrolysis were sufficient to reach the maximum concentration of sugars. After fermentation of the hydrolysates with *C. necator*, a PHB concentration of 288.00 mg/L was obtained at 24 h, although its production yield was not very high (0.04 mg/mg biomass).

---

\*Bachelor Thesis. Research Intership.

\*\*Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Advisor: Ana Belén Díaz Sánchez. Ph.D. in Chemical Sciences and Technologies, Co- advisor: Viviana Sánchez Torres. Ph.D. in Chemical Engineering.

## Introducción

Por primera vez en el año 2015 se retiraron en el Estrecho de Gibraltar más de 5000 toneladas de material de arribazón de una especie de macroalga parda exótica denominada *Rugulopteryx okamurae*, perteneciente a la familia *Dictyotaceae*, que presenta una gran capacidad de proliferación vegetativa y dispersión. Por este motivo esta especie supone una amenaza para la biodiversidad marina al generar impactos ecológicos graves, como el desplazamiento de especies nativas y desvalorización de los recursos oceánicos (Martínez, 2016). Su crecimiento desmedido también presenta repercusiones en el sector pesquero y turístico. Además, *R. okamurae* ha presentado una expansión geográfica desde el sur de la Península Ibérica en 2016 hacia la costa Atlántica en 2018 y la costa Mediterránea en 2019 de dicha península (García, Sempere, Roi, Martínez, & Olaya, 2020). Por tal razón, el Ministerio para la Transición Ecológica del Gobierno de España la incluyó en el año 2020 en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (Gobierno de España, 2020). Dada la acumulación masiva de esta alga y debido a que en su composición presenta un alto contenido en carbohidratos, resulta prometedor su empleo como materia prima para la producción de bioplásticos como alternativa a aquellos plásticos obtenidos a partir del petróleo.

A nivel mundial se producen anualmente alrededor de 300 millones de toneladas de plástico, generalmente polímeros procedentes del petróleo con los que se fabrican productos como botellas, bolsas, envases, etc. Según el último informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) en el año 2016, si la tendencia de producción y consumo continúa, se estima que se alcancen los 2.000 millones de toneladas para el año 2050 (Rojo-Nieto & Montoto, 2017). Estas cifras sumadas con la elevada durabilidad del material y los bajos porcentajes de reciclaje darán como resultado la acumulación de grandes cantidades de desechos plásticos en todo

el planeta, siendo aún más crítico en los ecosistemas acuáticos por las limitaciones de su retirada (Giraldez, Braz, Lacerda, Ferraz, & Moura, 2020). Por tanto, es inminente la necesidad de encontrar una alternativa a los plásticos sintetizados a partir de petróleo. Para ello, los bioplásticos representan una solución prometedora debido a que se trata de materiales biobasados, es decir, que utilizan biomasa como materia prima, y biodegradables, pudiendo degradarse en agua, compost y dióxido de carbono (en condiciones aerobias) o a metano (en condiciones anaerobias), por la acción de microorganismos (Labeaga, 2018). Los bioplásticos más estudiados son los polihidroxialcanoatos (PHAs), poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por numerosas bacterias. Una de las más empleada hasta el momento es *Cupriavidus necator*, que posee la capacidad de producir el biopolímero a partir de hidrolizados de biomasa celulósica obtenidos tras su hidrólisis enzimática (Azizi, Najafpour, & Younesi, 2017). El estudio de la producción de PHAs a partir de macroalgas resulta de gran interés debido a que se trata de una biomasa con gran disponibilidad y dada su composición, que pueden presentar hasta un 60% de polisacáridos que pueden ser convertidos en azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática (Leyton, 2015). Para este propósito, la aplicación de un pretratamiento previo a la biomasa algal sería interesante con idea de conseguir la ruptura de la pared celular y facilitar el acceso a los azúcares complejos que la componen en dicha etapa de hidrólisis. El hecho de emplear como materia prima el alga invasora *Rugulopteryx okamurae* para la producción de PHAs podría contribuir a solucionar el problema que supone la acumulación de grandes cantidades no deseadas de esta alga invasora del territorio español.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Grupo de Investigación Ingeniería y Tecnología de Alimentos, adscrito al Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz en España, bajo la modalidad

Pasantía de Investigación. Dicho grupo trabaja en diferentes líneas de investigación, una de las cuales se centra en la valorización de biomasa de algas invasoras, mediante su uso como materia prima en la producción de precursores de bioplásticos, en respuesta al problema ambiental que supone su invasión en las costas españolas. Concretamente, el estudio se realizó sobre el alga invasora *Rugulopteryx okamurae*, que se está extendiendo sin control en el litoral de la provincia de Cádiz. En este trabajo se evaluará un pretratamiento de la biomasa algal de tipo biológico utilizando el hongo *Aspergillus oryzae*, con el objetivo de favorecer la etapa de hidrólisis enzimática y obtener hidrolizados ricos en azúcares, que se someterán posteriormente a un proceso fermentativo con *Cupriavidus necator* para obtener PHAs. Además, se estudiará la producción de diferentes enzimas hidrolíticas por parte del hongo durante su crecimiento sobre la biomasa algal.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar el pretratamiento de tipo biológico de la macroalga invasora *Rugulopteryx okamurae*, utilizando el hongo *Aspergillus oryzae*, para su valorización mediante la obtención de polihidroxialcanoatos (PHAs), tras someter sus hidrolizados a un proceso fermentativo con *Cupriavidus necator*.

### 1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Establecer las condiciones en las cuales el pretratamiento biológico con *Aspergillus oryzae* favorece la producción de azúcares reductores y glucosa tras la etapa de hidrólisis enzimática.
- ✓ Estudiar la producción de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus oryzae* durante la fermentación en estado sólido (FES) sobre la macroalga invasora.
- ✓ Determinar el tiempo de hidrólisis enzimática en el cual la producción de azúcares reductores es máxima.
- ✓ Analizar los rendimientos de PHAs a partir de los hidrolizados azucarados empleando *Cupriavidus necator*.

## 2. Estado del arte

### 2.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Los PHAs son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos almacenados dentro de ciertos microorganismos para ser utilizados como fuente de energía y carbono. También se denominan biopolíesteres, pues en su polimerización tiene lugar la formación de un enlace éster y son obtenidos biotecnológicamente empleando bacterias (Lemos & Mina, 2015).

Se clasifican según la longitud de su cadena; los de cadena corta están formados por monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, los de cadena media de 6 a 14 átomos de carbono y los mixtos son la combinación de los mencionados con anterioridad. Cabe resaltar que los más atractivos a nivel industrial son los de cadena media, pues poseen ventajas con respecto a sus propiedades mecánicas y, además, son biodegradables y biocompatibles (Labeaga, 2018). Entre ellos se destaca el poli3-hidroxibutirato (PHB), el PHA más investigado, que se trata de un biopolímero semicristalino, insoluble en agua, con propiedades de baja permeabilidad para O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, y CO<sub>2</sub>, sintetizado por un gran número de bacterias como material de almacenamiento y ya utilizado exitosamente en aplicaciones farmacológicas (embalaje de células y comprimidos), en la industria alimentaria industria (envases de embalaje), en láminas agrícolas y otros (Valdez, Barraza, Angeles, & Rivas, 2020). En contraste, los plásticos derivados del petróleo tienen bajo costo, baja conductividad y resistencia a la corrosión, pero no son degradados por microorganismos, es decir, no son biodegradables, por tanto, se acumulan en el ecosistema en grandes cantidades al poseer la capacidad de almacenar compuestos químicos tóxicos con baja solubilidad en agua, como bifenilos policlorados, dicloro difenil tricloroetano y nonilfenoles, convirtiéndolos en contaminantes principalmente en los mares (Segura, Noguez, & Espín, 2007).

Los bioplásticos representan una alternativa sostenible a los plásticos derivados de la industria petroquímica, pues se trata de materiales biobasados, es decir, que utilizan biomasa como materia prima, y biodegradables, pudiendo degradarse en agua, compost y dióxido de carbono (en condiciones aerobias) o a metano (en condiciones anaerobias), por la acción de microorganismos (Labeaga, 2018). Una adecuada opción de materia prima en la producción de PHA es la biomasa macroalgal, dada su variada composición de carbohidratos y fácil recuperación de sus azúcares fermentables. Dependiendo de su especie, se pueden usar eficazmente como fuente de carbono para la obtención de bioproductos de alto valor añadido, además de disponer de otras ventajas como el hecho de no requerir tierra para su cultivo y el bajo suplemento de nutrientes necesario para su crecimiento (Ghosh, y otros, 2019).

## 2.2 Macroalgas

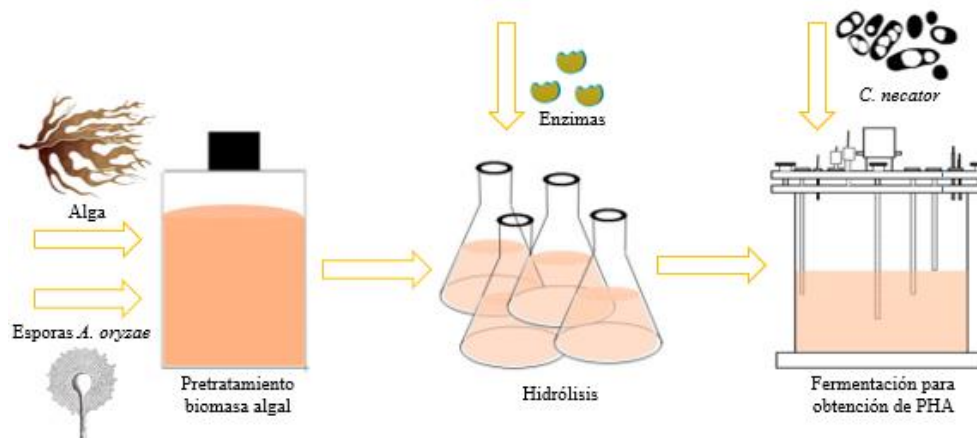
Las macroalgas se clasifican en *Phaeophyta* (pardas), *Rhodophyta* (rojas) y *Chlorophyta* (verdes), en función de su pigmentación (Beetul, Gopeechund, & Kaullysing, 2016). A su vez, las macroalgas pardas también denominadas marrones o feofíceas, son bentónicas, es decir, viven adheridas a algún tipo de sustrato en el fondo del mar o en la costa. Existen alrededor de 250 géneros y 1500-2000 especies de algas pardas, una de estas es la macroalga *Rugulopteryx okamurae*, proveniente de las costas pacíficas de Japón, China, Corea, Taiwán y Filipinas (Sánchez, 2020). Su expansión hasta las costas españolas podría deberse al tránsito de barcos que transportan mercancía desde el continente asiático hacia España y que posteriormente atracan en los Puertos de Algeciras y Tanger.

Las paredes celulares de las algas pardas están formadas por polisacáridos, presentando celulosa en su capa interna y en su capa externa alginato y fucoidano. También, acumulan polisacáridos como productos de reserva en su citoplasma como la laminarina (polisacárido

formado por unidades de glucosa) y, además, carecen de lignina (Mansilla & Alveal, 2004). Debido a su alto contenido en carbohidratos representan una materia prima de gran interés para la obtención de bioplásticos como los PHAs. Las etapas requeridas para este fin incluyen un pretratamiento de la biomasa algal para favorecer la accesibilidad de dichos carbohidratos, hidrólisis para su conversión en azúcares fermentables y fermentación para transformarlos en PHAs, como se muestra en la Figura 1, a continuación:

### Figura 1

*Esquema general de la obtención de PHA a partir de macroalga*



## 2.3 Producción de PHAs a partir de macroalgas

### 2.3.1 Pretratamiento

Dada la compleja estructura de la biomasa macroalgal y con el fin de mejorar la accesibilidad de la materia orgánica para el proceso de hidrólisis, es necesario realizar previamente un pretratamiento (Méndez, 2018). Existen tres clasificaciones de técnicas para llevar a cabo el pretratamiento: físicas, químicas y biológicas. Dependiendo de la técnica escogida se obtienen rangos de rendimientos y productos variados, debido a su eficacia y mecanismo de acción (Sankaran, y otros, 2020). Por una parte, el pretratamiento físico se aplica para alterar la superficie,

el área, el tamaño de las partículas, el índice de cristalinidad y grado de polimerización de la biomasa. No sugiere problemas ambientales, pero implica alta potencia y consumo de energía que se traduce en un alto costo de producción. Por otra parte, el pretratamiento químico se trata de aplicar diversos agentes químicos, siendo los más usados ácidos, álcalis y organosolventes. En los primeros se usan generalmente ácido sulfúrico, ácido acético y ácido fosfórico. Los alcalinos implican habitualmente el uso de hidróxidos de potasio, sodio, amonio y calcio para el pretratamiento de biomasa. Los últimos implican el uso de disolventes orgánicos como metanol, etanol, alcohol tetrahidrofurfurílico, etileno glicol, acetona, entre otros (Mankar, Pandey, Modak, & Pant, 2021). En cuanto al pretratamiento biológico, implica el uso de microorganismos y enzimas. El pretratamiento más investigado es el ácido utilizando autoclave, sin embargo, el pretratamiento biológico presenta una serie de ventajas frente a los demás como su bajo requerimiento energético, costos de capital reducidos y baja formación de inhibidores. Sus tipos más investigados son los enzimáticos, así como los microbianos, empleando generalmente hongos (Zhuo, y otros, 2018). Así, por ejemplo, se ha empleado la enzima ligninolítica extraída de *Pleurotus ostreatus* IBL-02 para el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar, aumentando el rendimiento de hidrólisis de la celulosa en un 72,9 % (Sankaran, y otros, 2020).

Un hongo prometedor para ser utilizado en un pretratamiento biológico es *Aspergillus oryzae*. Se trata de un hongo filamentoso, ampliamente empleado en la industria de alimentos, en especial en el procesamiento de sake y de soja, siendo empleado durante mucho tiempo de forma segura en la producción de enzimas (Frisvad, Møller, & Larsen, 2018). Además, posee gran capacidad fermentativa, crecimiento rápido y facilidad de cultivo (Jin, Hu, Wang, & Jin, 2021). Los pretratamientos biológicos empleando este tipo de hongos se suelen llevar a cabo mediante fermentación en estado sólido (FES) (Sharma & Rai, 2020). Se trata de un proceso en el que los

microorganismos crecen en un ambiente libre de agua, puesto que simula el hábitat natural de los hongos filamentosos, otorgándoles la capacidad de sintetizar considerables cantidades de enzimas y otros metabolitos (Soccol, y otros, 2017). Este hongo se ha empleado para la obtención de una gran variedad de compuestos de interés como el ácido glutámico y muchas enzimas industriales, como la glucoamilasa, las  $\alpha$ -amilasas, la celulasa y las proteasas, entre otras (Chang, Horn, & Gomi, 2014).

Según estudios realizados recientemente sobre la mejora en la degradación de la biomasa lignocelulósica de la paja de maíz usando un pretratamiento biológico con *A. oryzae*, se consiguió un rendimiento de azúcar 4,07 veces mayor al obtenido con la biomasa sin pretratar (Saleem, Akbar, Xu, & Wang, 2021).

### **2.3.2 Hidrólisis enzimática**

La fase de hidrólisis enzimática, también denominada sacarificación, consiste en la conversión de los polisacáridos presentes en azúcares simples mediante la acción de enzimas hidrolíticas producidas a partir de bacterias y hongos, fundamentalmente (Huang, y otros, 2022). Las enzimas más comúnmente utilizadas son las hidrolasas, que incluyen celulasas y xilanasas, y otras carbohidrasas (Khare, Pandey, & Larroche, 2015). Comparando con la hidrólisis utilizando agentes químicos, con la hidrólisis enzimática se obtiene mayor selectividad, se emplean condiciones de operación más suaves, se reduce la contaminación al medio ambiente y la acumulación de subproductos no deseados de la reacción biocatalítica (Ravanal, y otros, 2016). Sin embargo, la hidrólisis enzimática requiere ser llevada a cabo por enzimas específicas del sustrato, como en el caso de las enzimas celulasa y hemicelulasa que rompen los enlaces de celulosa y hemicelulosa, respectivamente, que presentan el inconveniente del alto coste de su producción (Wang & Lü, 2021).

Las enzimas que han sido más empleadas para hidrolizar algas son los preparados enzimáticos comerciales Cellic Ctec 2, Celluclast 1,5 L, Novozyme 188 y Viscozyme, que contienen carbohidrolasas, Alcalase y Flavourzyme que presentan proteasas, y Lecitase que contiene lipasas (Gómez, 2016).

En la bibliografía se han encontrado diversos trabajos que recogen la hidrólisis de diferentes especies de macroalgas para la obtención de azúcares reductores, como la glucosa, después de haberlas sometido a un pretratamiento previo, que aparecen resumidos en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Hidrólisis de macroalgas para la producción de azúcares mediante hidrólisis*

Macroalga	Tipo	Pretratamiento	Hidrólisis	AP	Referencia
<i>Sargassum spp.</i>	Parda	10 % de BA (p/v)	<b>Enzimática</b>	120 mg/g biomasa (AR)	(Borines, de
		con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 4 % (p/v), 115 °C, 1,5 h.	10 FPU celulasa/g biomasa	y 40 mg/g biomasa (Glu)	León, & Cuello, 2013)
<b>Ácida combinada con enzimática</b>					
<i>Sargassum fulvellum</i>	Parda	10 % de BA (p/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M (pH 5,5 a	59,6 mg/g biomasa	(Azizi,
		con HCl 0,1 N, 121 °C, 15 min.	50 °C, 24 h)	(Glu)	Najafpour, & Younesi, 2017)
			15 FPU celulasa/g de alga seca		

<i>Laminaria japonica</i>	Parda	18 % de BA (p/v)	<b>Enzimática</b>	69,8 mg/g biomasa (Glu)	(Kim, Li, Jung, Chang, & Lee, 2011)
		con HCl 0,1 N, 121 °C, 15 min.	Celluclast 1,5 L (0,01 g/ g de alga seca)		
<i>Sargassum spp.</i>	Parda	10 % de BA (p/v)	<b>Enzimática</b>	200,8 mg/g biomasa (AR) y	(Kim, Li, Jung, Chang, & Lee, 2011)
		con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,15 N, 121 °C, 15 min.	Celluclast 1,5 L. (0,01 g/ g de alga seca)	49,98 mg/g biomasa (Glu)	
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Roja	20 % de BA (p/v)	<b>Ácida asistida por microondas</b>	51,47 mg/g biomasa (AR)	(Teh, Lee, Chen, Lin, & Sheen, 2017)
		com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M, 160 °C, 10 min.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M (a 160 °C, 10 min)		
<i>Palmaria palmata</i>	Roja	10 % de BA (p/v)	<b>Ácida</b>	218 mg/g biomasa (AR),	(Mutripah, Meinita, Kang, Jeong, & Susanto, 2014)
		con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,4 M, 125 °C, 25 min.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 M (121 °C, 15 min)	27 mg/g biomasa (Glu), 128 mg/g biomasa (Gal)	
<i>Ulva Lactuca</i>	Verde	10 % de BA (p/v)	<b>Ácida</b>	199 mg/g biomasa (AR),	(Kostas, White, Du, & Cook, 2016)
		con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M, 121 °C, 15 min.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 % (p/v) (121 °C, 15 min)	53 mg/g biomasa (Glu), 8 mg/g biomasa (Gal)	

---

*Nota.* La denotación FPU se refiere a actividad celulasa (Unidades de papel de filtro), BA se refiere a Biomasa Algal, AP a Azúcares Producidos, AR a Azúcares Reductores, Glu a Glucosa, Gal a Galactosa.

### 2.3.3 Fermentación con *Cupriavidus necator* para producir PHA

Los azúcares obtenidos tras la hidrólisis enzimática pueden ser fermentados obteniendo un tipo de PHA u otro dependiendo del microorganismo empleado (Labeaga, 2018). El polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero perteneciente a la familia de los PHAs, que es el más estudiado debido a que sus características como peso molecular, fragilidad, rigidez y punto de fusión les otorga similitudes a algunos de los termoplásticos derivados de la industria petroquímica, como el polipropileno (Nygaard, Yashchuck, & Hermida, 2019). *Cupriavidus necator* es la bacteria modelo y la primera en ser investigada, con la cual se han realizado un mayor número de estudios sobre la síntesis de PHAs y la optimización de su producción, usando glucosa como fuente de carbono. Además, ha demostrado tener una gran capacidad de acumulación de estos biopoliésteres, con lo que representa el microorganismo estudiado más rentable para este proceso fermentativo (Araya, 2019). Estos compuestos son utilizados por la bacteria como fuente de carbono y energía, pudiendo llegar a acumularse hasta un 90 % del peso seco celular bajo ciertas condiciones de cultivo (Law & Slepecky, 1961). En general, estos compuestos se acumulan en mayor cantidad cuando la bacteria se encuentra bajo condiciones de estrés, como puede ser la limitación en el suministro de un nutriente específico, obteniendo como resultado una menor biomasa bacteriana (Mozumder, García-González, De Hower, & Volcke, 2015).

En la bibliografía se recogen varios estudios en los cuales se han llegado a obtener mediante fermentación microbiana con *C. necator* producciones significativas de PHA, específicamente, de PHB. Al-Battashi et al. reportan un peso celular seco de 5,36 g/L y una concentración de PHB de

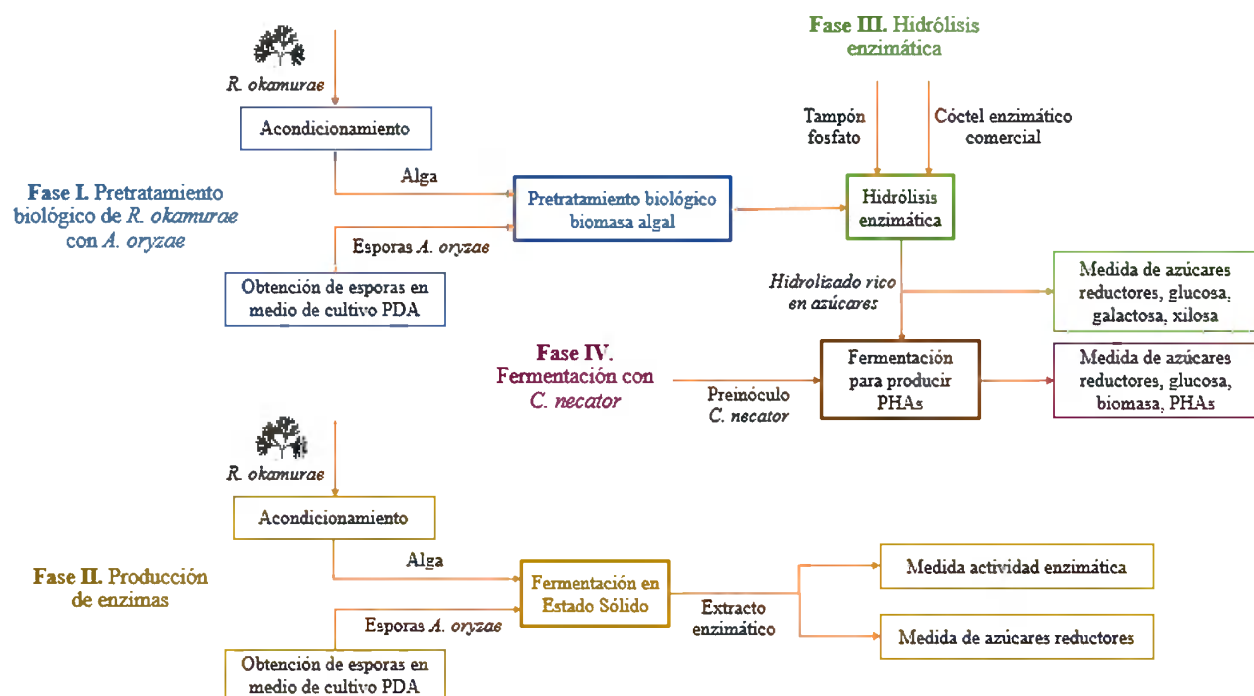
3,93 g/L, con un rendimiento de PHB de 0,54 g/g de azúcares reductores, a partir de los azúcares de la macroalga parda *Sargassum spp.* (Al-Battashi, Annamalia, Sivakumar, Al-Bahry, & Tripathi, 2019). Por otro lado, en otro estudio realizado sobre la macroalga parda *Laminaria japónica* se reportó una producción de PHA de 4,1 g/L, después de 96 h de cultivo con *C. necator* (Muhammad, Aloui, Khomlaem, Hou, & Soo Kim, 2020).

### 3. Metodología

En la Figura 2 se muestra el esquema general referente a la metodología empleada en el presente proyecto de investigación.

**Figura 2**

*Esquema general de la metodología seguida en este trabajo de investigación*



### **3.1 Pretratamiento de la macroalga *Rugulopteryx okamurae* con *Aspergillus oryzae***

#### **3.1.1 Acondicionamiento del alga**

La macroalga invasora *Rugulopteryx okamurae* se recogió en la Playa de Los Lances, Tarifa (Cádiz) en períodos de marea baja. Se almacenó en depósitos de 25 L de polietileno y se lavó con agua del grifo para eliminar sal e impurezas hasta alcanzar una conductividad final de 600  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A continuación, se secó en el invernadero del Campus de Puerto Real a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez seca, se molió en un molino de cuchillos hasta conseguir un polvo fino y homogéneo, que se almacenó en depósitos de polietileno a temperatura ambiente hasta su uso.

#### **3.1.2 Obtención de las esporas de *Aspergillus oryzae***

Para el pretratamiento biológico se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae* KKB4 (aislado en Kebumen, Java Central, Indonesia), que se conservaba en tubos de agar inclinado con medio agar de extracto de malta a 4 °C. En una cabina de flujo laminar horizontal (AH-100, Telstar), el hongo se sembró en placas Petri en un medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (PDA) (Merck KGaA) y se incubó a 30 °C durante 3 días. Las esporas se resuspendieron con una solución de NaCl al 0,9 % raspando con un asa de siembra la superficie del cultivo. Se realizó el recuento de esporas en una Cámara de Neubauer utilizando un microscopio Leica DM750 M. Finalmente, se añadió glicerol al 50 % al volumen de esporas obtenido. El glicerinado se conservó a -70 °C en tubos criogénicos estériles con capacidad de 2 mL.

#### **3.1.3 Pretratamiento biológico del alga con *A. oryzae***

Para el pretratamiento biológico con el hongo *A. oryzae*, en matraces Erlenmeyer de 100 mL se añadió 1 g de alga seca y 3 mL de disolución nutritiva (Mandel's mineral salts solution),

ajustada a pH 5,0 utilizando un pH-metro (Basic 20, Crison), compuesta por: urea (0,3 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,4 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0,3 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/L), extracto de levadura (0,25 g/L), peptona (0,75 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mg/L),  $\text{MnSO}_4$  (1,6 g/L) y  $\text{ZnSO}_4$  (1,4 g/L). A continuación, se esterilizaron en un autoclave (Autester ST DRY PV III, Selecta) durante 20 min a 121 °C. Una vez atemperados, se inocularon con  $10^8$  esporas de *Aspergillus oryzae* KKB4, procedentes de los tubos criogénicos, y se incubaron en una estufa (A.S.L., Ibercex S.A) en condiciones estáticas a 30 °C. La variable sometida a estudio fue el tiempo de pretratamiento con el propósito de conocer el día en el cual se consiguen una mayor concentración de azúcares reductores tras la etapa de hidrólisis. Concretamente, se evaluaron los días 0, 4, 5 y 8, realizando cada condición por triplicado. Una vez finalizado el pretratamiento, los sólidos tratados fueron sometidos a hidrólisis enzimática tal y como se explicará en el apartado 3.2.1.

### **3.1.4 Producción de enzimas sobre *R. okamurae* con *A. oryzae***

#### **3.1.4.1 Producción y extracción de las enzimas**

Se evaluó la producción de varias enzimas hidrolíticas durante el crecimiento en estado sólido (FES) de *Aspergillus oryzae* KKB4 sobre *R. okamurae*. Para ello, en matraces Erlenmeyer con capacidad para 250 mL se añadieron 2 g de alga seca y 6 mL de disolución nutritiva (Mandel's mineral salts solution, pH 5,0). A continuación, se esterilizaron en el autoclave durante 20 min a 121 °C y, una vez atemperados, se inocularon con  $10^8$  esporas de *A. oryzae* procedentes de los crioviales. Los matraces se incubaron en la estufa con condiciones estáticas a 30 °C durante varios días. Se estudió la producción de las enzimas celulasa, alginato liasa, laminarinaasa y xilanasasa a distintos tiempos de fermentación, concretamente 0, 3, 5, 6, 8 y 10 días. Para ello, una vez transcurrido dicho tiempo, a cada matraz Erlenmeyer se le adicionó 30 mL de disolución Polioxietilen 20 sorbitan monooleato, comúnmente conocido como Tween 80, al 0,1% (v/v)

(Panreac Química SA). A continuación, los matraces Erlenmeyer se introdujeron en un agitador orbital (IKA KS 4000 i control) a 150 rpm durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5810 R) a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (extracto enzimático) y se conservó a 4 °C hasta su análisis. Cada experimento se realizó por triplicado.

### **3.1.4.2 Medida de la actividad enzimática**

En los extractos obtenidos tras la FES se midieron las actividades de las enzimas celulasa (EC 3.2.1.91), alginato liasa (EC 4.2.2.3), laminarinasa (EC 3.2.1.39) y xilanasas (EC 3.2.1.8), como se explicará a continuación. Se definió una unidad de actividad celulasa total (Filter Paper Unit, FPU), alginato liasa (U), laminarinasa (U) y xilanasas (U), respectivamente como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1  $\mu$ mol de azúcar reductor por minuto en las condiciones de estudio. En este trabajo se expresarán las unidades de actividad enzimática obtenidos por gramos de alga seca. Los métodos empleados para determinar estas actividades enzimáticas se describen a continuación:

#### **Actividad celulasa**

Para medir la actividad celulasa total (FPasa, medida sobre papel de filtro) se siguió el procedimiento implantado por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Baker & Adney, 2008). La reacción tuvo lugar en tubos de ensayo de vidrio en los que se añadió 1 mL de tampón citrato (0,05 M, pH 5) y una tira de papel filtro Whatman No.1 (50 mg) de 1  $\times$  6 cm, como sustrato de la enzima. Los tubos de ensayo se incubaron en un termobloque (Accublock D-1031, LabNet Biotecnica) a 50 °C durante 60 min. Finalizado este tiempo, se agregaron 3 mL de la disolución de DNS (preparada tal y como se describe en el apartado 3.4.1) a cada tubo de ensayo y se incubaron nuevamente en el termobloque a 105 °C durante 10 min para evaluar los

azúcares reductores producidos. Se utilizó una recta de calibrado utilizando glucosa como estándar. Cada análisis se realizó por triplicado.

### **Actividad alginato liasa**

Para medir la actividad alginato liasa en cada tubo de ensayo se añadieron 1,8 mL de alginato de sodio (0,8 % (p/v)) en tampón fosfato (20 mM, pH 6,3) y 0,2 mL de extracto enzimático. La mezcla se incubó en un termobloque a 30 °C durante 90 min. Finalizado este tiempo, se siguieron los mismos pasos descritos para la enzima celulasa. Cada análisis se realizó por triplicado.

### **Actividad laminarinasa**

Para medir la actividad de la enzima laminarinasa se añadieron a cada tubo de ensayo de vidrio 0,25 mL de laminarin (0,3 % (p/v)) en tampón fosfato de potasio (50 mM, pH 5,8) y 0,25 mL de extracto enzimático. La mezcla se incubó en un termobloque a 30 °C durante 20 min. Finalizado este tiempo, se agregaron 0,5 mL de la solución de DNS a cada tubo de ensayo, para la medida de los azúcares reductores. Se utilizó una recta de calibrado empleando glucosa como estándar. Cada análisis se realizó por triplicado.

### **Actividad xilanasa**

Para medir la actividad de la enzima xilanasa se añadieron a cada tubo de ensayo de vidrio 0,90 mL de xilano (0,3 % (p/v)) en tampón acetato (0,1 M, pH 5,0) y 0,10 mL de extracto enzimático. La mezcla se incubó en un termobloque a 50 °C durante 10 min. Finalizado este tiempo, se agregó a cada tubo 1 mL de la solución de DNS para la medida de los azúcares reductores. En este caso se utilizó una recta de calibrado utilizando xilosa como estándar. Cada análisis se realizó por triplicado.

## **3.2 Hidrólisis enzimática del alga pretratada**

### **3.2.1 Hidrólisis enzimática en condiciones estándar**

Para evaluar el tiempo más adecuado para llevar a cabo el pretratamiento biológico del alga con *Aspergillus oryzae*, los distintos sólidos obtenidos tras el pretratamiento fueron sometidos a hidrólisis enzimática. Inicialmente, se emplearon unas condiciones estándar que son las que se emplean habitualmente en el Grupo de Investigación Ingeniería y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Cádiz para poder comparar distintos pretratamientos. Para ello, una vez finalizado el pretratamiento, a los matraces Erlenmeyer con el sólido pretratado se le añadieron 45 mL de una disolución de tampón fosfato (0,05 M, pH 5,0), se introdujeron en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Una vez atemperados, se adicionaron a cada matraz 345 µL del preparado enzimático comercial Cellic Ctec2 (20 FPU/g de sólido), incubándose en un agitador orbital a 50 °C y 150 rpm. Se tomaron 500 µL de muestra a distintos tiempos durante todo el proceso que fueron congeladas en tubos Eppendorf a -70 °C hasta el posterior análisis de glucosa y azúcares reductores. Cada experimento se realizó por triplicado.

### **3.2.2 Hidrólisis enzimática en condiciones mejoradas**

Una vez seleccionado el mejor tiempo de pretratamiento con *A. oryzae* utilizando las condiciones de hidrólisis estándar, se procedió a llevar a cabo la hidrólisis enzimática en otras condiciones probadas por el grupo de investigación y que han resultado ser más adecuadas para obtener mayores rendimientos de hidrólisis. En este caso, se disminuyó el volumen usado de tampón fosfato y se aumentó la cantidad de alga y tal como se observa en la Tabla 2, con una concentración de biomasa algal cinco veces superior. Para una mejor homogenización se aumentó la velocidad de agitación de 150 a 250 rpm. Además, se redujo el volumen de preparado comercial Cellic Ctec2 para disminuir los costos del proceso. Para disponer de más biomasa algal en la etapa

de hidrólisis fue necesario realizar el pretratamiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL, a cada uno de los cuales se añadieron 2,25 g de alga, 7,4 mL de disolución nutritiva y  $10^8$  de esporas de *A. oryzae*, procediendo de igual forma que se mencionó anteriormente. Al sólido pretratado se le añadieron 22,5 mL tampón fosfato (0,05 M, pH 5,0) y se esterilizó en el autoclave a durante 20 min a 121 °C. Una vez atemperado, se adicionó a cada matraz 283,1  $\mu$ L del preparado enzimático comercial Cellic Ctec2 (50 FPU/g de sólido), incubándose en un agitador orbital (Thermo Scientific MaxQ 6000) a 250 rpm y 50 °C. Se tomaron 500  $\mu$ L de muestra a distintos tiempos durante todo el proceso que fueron congeladas en tubos Eppendorf a -70 °C hasta el posterior análisis de glucosa y azúcares reductores. Una vez finalizada la hidrólisis se midió el volumen total obtenido de hidrolizados y se preparó el medio para realizar la fermentación con *C. necator* como se explica en el apartado 3.3.1.

**Tabla 2**

*Condiciones estándar y mejoradas en la hidrólisis enzimática*

<b>Variables</b>	<b>Condiciones estándar</b>	<b>Condiciones mejoradas</b>
Alga seca (g)	1	2,25
Tampón fosfato (mL)	45	22,5
Relación sólido-líquido (g/mL)	0,02	0,1
Esporas <i>A. oryzae</i>	108	108
Temperatura de incubación (°C)	50	50
Enzima Cellic Ctec2 (FPU/g sólido)	137	50
Velocidad de agitación (rpm)	150	250

### 3.3 Fermentación con *Cupriavidus necator* para producir PHAs

El hidrolizado enzimático que presentaba mayor concentración de azúcares reductores fue sometido a fermentación con *C. necator* para producir PHAs.

### 3.3.1 Preparación del medio hidrolizado

El hidrolizado enzimático, obtenido en las condiciones de hidrólisis mejoradas, que se encontraba conservado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongeló en un vaso de precipitado de vidrio de 500 mL y se ajustó el pH a 7,2 con microperlas de NaOH (Labkem). A continuación, se añadieron progresivamente 0,04 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L); 0,3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L) y 1,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (9 g/L), y se mezclaron utilizando un agitador magnético (Agimatic-E J.P. Selecta) durante 15 min a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez hecho esto, el hidrolizado se depositó en un frasco Pyrex de 250 mL y se autoclavó durante 20 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su esterilización. Una vez atemperado, en una campana de flujo laminar, se agregaron 50 mL del mismo a matraces Erlenmeyer de 250 mL y 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de elementos traza que se componía de los compuestos:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,25 g/L),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2 g/L),  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,23 g/L),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g/L) y HCl (10 mL/L).

### 3.3.2 Preparación del preinóculo de *Cupriavidus necator*

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de un glicerinado de células de *C. necator* CECT 4635, cuya densidad óptica es 397 nm, que se conservaba a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y 20 mL de medio nutritivo compuesto de extracto de carne (5 g/L), peptona (10 g/L), NaCl (5 g/L) y agar (15 g/L), con pH ajustado a 7,2. Dicho matraz se incubó a 250 rpm, durante 16 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3 Fermentación para producir PHAs

Tras las 16 h de incubación del preinóculo, al hidrolizado preparado siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.1, en matraces Erlenmeyer de 250 mL se le agregaron 2,5 mL del preinóculo de *C. necator*. Los matraces Erlenmeyer se incubaron en el agitador orbital a 250 rpm, durante 120 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El crecimiento de la bacteria se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS DR 5000). Durante la fermentación

se tomaron muestras de 500  $\mu\text{L}$  para la medida de azúcares reductores y glucosa y 1000  $\mu\text{L}$  para la medida de PHAs, a los que se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaClO}$  (10 %, Labkem) necesario para su posterior análisis. Todas las muestras se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su determinación. Las fermentaciones se realizaron por triplicado.

### **3.4 Análisis de azúcares y PHAs**

#### **3.4.1 Azúcares reductores**

Para la medida de los azúcares reductores se empleó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se trata de una técnica colorimétrica basada en una reacción tipo redox entre los azúcares reductores presentes en la muestra y el DNS, en la cual los azúcares reductores reducen el DNS, de color amarillo, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de color rojo, midiendo su absorbancia a 540 nm. En este caso, se llevó a cabo dicho método adaptado a microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos (Gonçalves, Rodríguez-Jasso, Gomes, Teixeira, & Belo, 2010).

La disolución de DNS se preparó añadiendo 5 g de ácido dinitrosalicílico a 250 mL de agua destilada a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez atemperada la disolución, se añadieron 100 mL de una disolución de  $\text{NaOH}$  2 N y 150 g de tartrato de sodio y potasio 4-hidrato. Finalmente, la mezcla se enrasó hasta 500 mL.

Para la medida de los azúcares, se añadieron a cada pocillo 25  $\mu\text{L}$  de muestra y 25  $\mu\text{L}$  de la disolución de DNS, disponiendo la microplaca en el termobloque durante 10 min a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para parar la reacción, la placa se colocó en el congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de agua destilada a cada pocillo. Finalmente se midió la absorbancia a 540 nm en un Espectrofotómetro Visible (EPOCH2, BioTek Instruments), utilizando el programa GEN 5. Para

determinar la concentración de azúcares reductores se empleó una recta de calibrado utilizando estándares de glucosa, realizando cada medida por duplicado.

### 3.4.2 Glucosa, xilosa y galactosa

La glucosa, xilosa y galactosa se determinaron en un analizador bioquímico (YSI 2900, Vertex), el cual proporciona la concentración de dichos azúcares en g/L.

### 3.4.3 PHAs

Para el análisis, se descongelaron las muestras que ya tenían NaClO y se agitaron en un vortex durante 10 segundos. A continuación, se centrifugaron a 12.500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se conservó el sólido sedimentado de cada muestra. Dicho sólido se disolvió en 2 mL de metanol ácido y se añadió 1 mL de cloroformo heptadecano (99 %) (Sigma-Aldrich). Los tubos se llevaron al termobloque durante 4 h a 100 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se atemperaron y se añadió 1 mL de agua destilada a cada tubo. Se agitaron en el vortex por 30 segundos, se cubrieron con papel aluminio y se refrigeraron a 4 °C durante 20 horas. Para su análisis, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio se extrajo la fase orgánica depositada al fondo de cada tubo y se llevó a viales de vidrio con capacidad de 2 mL para analizar los PHAs en un Cromatógrafo de Gases (GC-2014, Shimadzu). Este método es similar al empleado por Braunegg et al. (Braunegg, Sonnleitner, & Lafferty, 1978).

Por último, se analizaron los rendimientos de PHAs obtenidos y se calculó el rendimiento Producto-Sustrato ( $Y_{P/S}$ ), definido como la concentración de biopolímero formado por concentración de glucosa consumida [Ec. 1], el rendimiento Producto-Biomasa ( $Y_{P/X}$ ), que es igual a la concentración de biopolímero formado por concentración de biomasa formada [Ec. 2], y, por último, el rendimiento Biomasa-Sustrato ( $Y_{X/S}$ ), expresado como concentración de Biomasa formada por concentración de glucosa consumida [Ec. 3].

$$Y_{P/S} = \frac{[PHA] \left(\frac{mg}{L}\right)}{[glucosa] \left(\frac{mg}{L}\right)} \quad [\text{Ec. 1}]$$

$$Y_{P/X} = \frac{[PHA] \left(\frac{mg}{L}\right)}{[biomasa] \left(\frac{mg}{L}\right)} \quad [\text{Ec. 2}]$$

$$Y_{X/S} = \frac{[biomasa] \left(\frac{mg}{L}\right)}{[glucosa] \left(\frac{mg}{L}\right)} \quad [\text{Ec. 3}]$$

#### 4. Análisis y resultados

##### 4.1 Producción de enzimas hidrolíticas de *A. oryzae* sobre *R. okamurae*

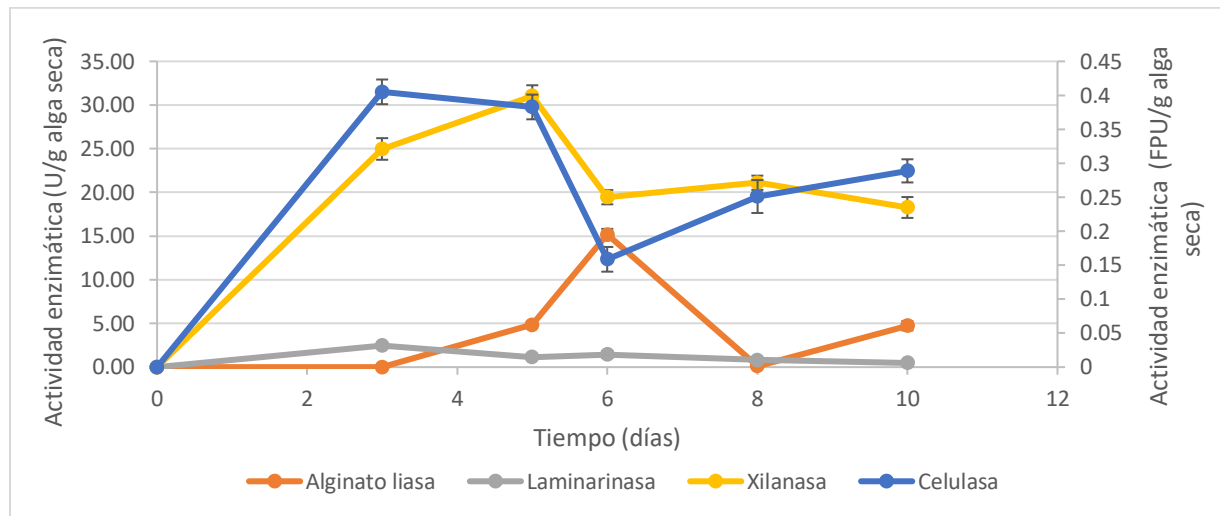
Se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus oryzae* sobre *Rugulopteryx okamurae* a los 0, 3, 5, 6, 8 y 10 días. En los extractos enzimáticos obtenidos concretamente se determinaron las actividades enzimáticas celulasa, alginato liasa, laminarina y xilanasas.

La Figura 3 representa la evolución en la producción de las 4 enzimas mencionadas durante los 10 días objeto de estudio. Se aprecia como la actividad celulasa aumenta rápidamente desde el tiempo 0 h hasta el tercer día, momento en el cual alcanza la máxima producción de 0,41 FPU/g alga seca. A partir de este día la producción disminuye y vuelve a aumentar alcanzando 0,29 FPU/g alga seca a los 10 días de proceso. La máxima actividad celulasa alcanzada en este trabajo fue similar a la obtenida por Pirota et al. (Pirota, Tonelotto, Delabona, & Fonseca, 2016), que fue de 0,40 FPU/g sólido seco, obtenida con *A. oryzae* crecido sobre salvado de trigo en un biorreactor a escala de laboratorio, con una humedad del 60 %, tras dos días de proceso. Una actividad celulasa más elevada, concretamente de 9,06 FPU/g, fue analizada tras 4 días de fermentación en estado sólido del hongo marino *Cladosporium sphaerospermum* sobre el alga verde *Ulva fasciata* (Trivedi, Reddy, Radulovich, & Jha, 2015).

**Figura 3**

*Evolución de la producción de enzimas hidrolíticas durante la FES de A. oryzae sobre*

*Rugulopteryx okamurae*



*Nota.* En la figura, el eje de las ordenadas situado a la izquierda representa las actividades alginato liasa, laminarinasa y xilanasa. En cuanto al eje ubicado a la derecha, describe la actividad celulasa.

Respecto a la enzima alginato liasa, su actividad aumenta desde el comienzo del proceso hasta el sexto día, momento en el que se alcanza un máximo de 15,19 U/g alga seca. Entre el sexto y el octavo día se observa un descenso y un ligero aumento de actividad al décimo día. Una actividad de ~ 24 U/mL fue alcanzada con el hongo marino *Dendryphiella arenaria*, tras 6 días de cultivo, crecido sobre un medio nutritivo con alginato (1,5 % p/v) procedente del alga parda *Sargassum latifolium* (Gomaa, Fawzy, Hifney, & Abdel-Gawad, 2019). En un estudio realizado por Sun et al., se alcanzó una actividad enzimática de 545 U/mg proteína tras 8 horas de proceso con la bacteria *Pseudoalteromonas sp.* Alg6B crecida sobre la macroalga *Laminaria japónica* a 30 °C (Sun, Zhou, Duan, & Yu, 2020).

En cuanto a la actividad laminarasa, se percibió un pico de producción de 2,47 U/g alga seca al tercer día, descendiendo hasta el décimo día donde se analizó una actividad de 0,50 U/g

alga seca. Actividades enzimáticas superiores fueron analizadas por otros autores sobre otros sustratos. Así, por ejemplo, se analizó un valor máximo de actividad laminarinasa de 379,10 U/mg proteína tras cinco días de proceso cuando se empleó el hongo filamentoso *Aspergillus niger* crecido sobre desechos lignocelulósicos. Sin embargo, en este caso el medio fue enriquecido con nitrato de amonio y carboximetilcelulosa como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente (El-Shora, El-Sharkawy, Khateb, & Darwish, 2021).

Finalmente, la actividad xilanasa aumenta significativamente desde el comienzo del proceso hasta el quinto día, tiempo al que alcanza el valor máximo de 31,03 U/g alga seca. Entre el quinto y el sexto día se produce una disminución de la actividad hasta 19,45 U/g, y se mantiene prácticamente estable hasta el final del proceso. La actividad máxima conseguida para esta enzima en este trabajo es muy superior a la obtenida empleando otros sustratos. Así, por ejemplo, en un estudio realizado sobre orujo de uva, se alcanzó en el sexto día una actividad máxima de 18.70 U/g sólido seco empleando el hongo *Aspergillus awamori* (Díaz, de Ory, Caro, & Blandino, 2012).

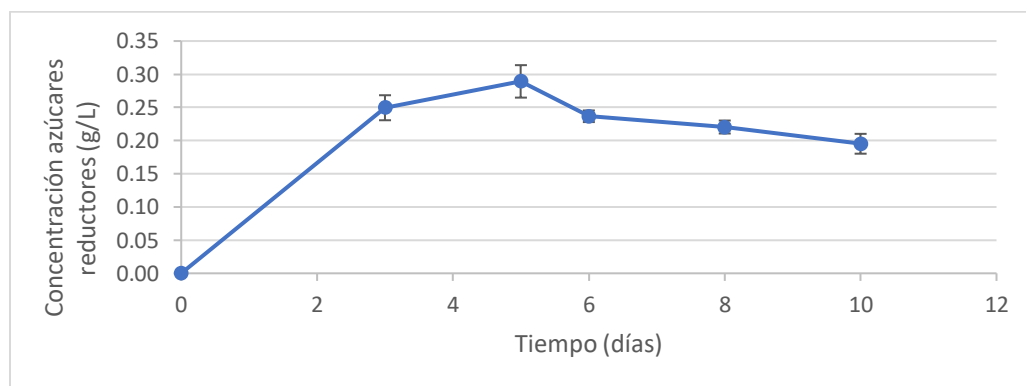
Por tanto, se puede concluir en este estudio que mediante FES de *Aspergillus oryzae* sobre el alga parda *Rugulopteryx okamurae* se obtiene una mayor producción de enzima xilanasa, seguida del alginato liasa, laminarinasa y, en menor medida, celulasa. El uso de estos extractos enzimáticos ricos en xilanasa en la hidrólisis enzimática de biomasa algal sería interesante. Parab et al. (2017) estudiaron la hidrólisis enzimática de tres especies de alga, *Ahnfeltia plicata*, *Padina tetrastromatica* y *Ulva lactuca* (roja, parda y verde, respectivamente) con xilanasa (50 U), obteniendo hidrolizados con 233, 100 y 73,30 µg, respectivamente, de azúcares reductores por mg de biomasa algal (Parab, Khandeparker, Amberkar, & Khodse, 2017).

En la Figura 4 se muestran los azúcares reductores analizados durante la FES de *A. oryzae* sobre *R. okamurae*. La gráfica realmente representa el balance entre los azúcares producidos como

resultado de la acción de las enzimáticas hidrolíticas excretadas al medio por el hongo, y su consumo para su mantenimiento y crecimiento celular. La concentración de azúcares reductores aumenta hasta el valor máximo de 0,29 g/L que se alcanza el quinto día, tiempo en el cual se detecta la máxima producción de actividad xilanasa (Figura 3). Este aumento de la concentración durante los primeros 5 días de proceso indica que hay mayor producción de azúcares reductores que consumo por parte del hongo. A partir de este momento empiezan a disminuir hasta el décimo día, cuya concentración fue de 0,19 g/L. Este descenso es indicativo que, durante esta etapa, hay mayor consumo de azúcares reductores que producción por parte de las enzimas. Estos resultados guardan similitud con los obtenidos en el estudio de Li et al., en el cual se realizó una fermentación con *Yarrowia lipolytica* sobre *L. japónica*, en el cual se evidenció que después de 72 h de proceso, las concentraciones de glucosa y manitol disminuyeron (Li, Wang, Wang, Peng, & Wang, 2019).

#### Figura 4

*Evolución de la concentración de azúcares reductores durante la FES de A. oryzae*



#### 4.2 Hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada con *A. oryzae*

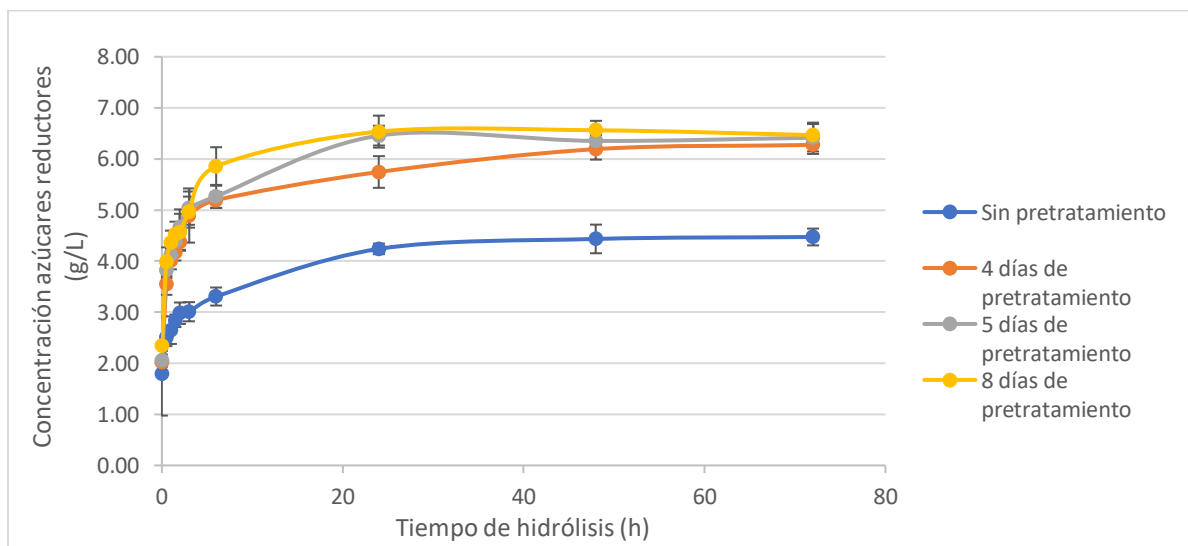
Se evaluó el pretratamiento de la biomasa algal con *A. oryzae* estudiando los tiempos de 0, 4, 5, y 8 días. Para establecer el más adecuado, tras el pretratamiento se realizó una hidrólisis enzimática para evaluar la concentración de azúcares producidos.

#### 4.2.1 Azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática

El perfil que describe la evolución de la concentración de azúcares reductores en función del tiempo durante el cual se desarrolló la hidrólisis (72 h) se plasma en la Figura 5. Al analizarla, se infiere que todos los días de pretratamiento mantienen una tendencia similar. Así, durante las primeras 6 h de proceso se observa una liberación más rápida de los azúcares, que siguen aumentando de una manera más lenta hasta las 24 horas aproximadamente, y se mantienen prácticamente constantes hasta el final del proceso. Se observa una mayor liberación de azúcares con la biomasa pretratada biológicamente, en cualquiera de las condiciones de estudio, que con el alga sin pretratar. La concentración de azúcares liberados en la hidrólisis aumenta con el tiempo de pretratamiento estudiado entre 4 y 5 días, sin embargo, no hay diferencias muy importantes comparando los días 5 y 8, de forma que con el pretratamiento de 8 días se consigue la máxima producción de 6,56 g/L a las 48 h y con 5 días se consigue 6,46 g/L a las 24 h. Sin embargo, en la hidrólisis de la biomasa sin pretratar se analizaron 4,47 g/L.

#### Figura 5

*Evolución de los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática de la biomasa con y sin pretratamiento*



Concentraciones de azúcares reductores similares han sido obtenidas por otros autores que aplicaron un pretratamiento biológico con *Aspergillus oryzae* sobre otros sustratos. Este es el caso de la investigación realizada por Pirota et al., en la que se obtuvo una concentración máxima de azúcares reductores de 4,70 g/L, pero a un tiempo de hidrólisis mayor (72 h), empleando bagazo de caña de azúcar pretratado durante 1 día con *A. oryzae* P6B2 (Pirota, Delabona, & Farinas, 2014).

#### **4.2.2 Monosacáridos liberados tras la etapa de hidrólisis enzimática**

Como se comentó en el apartado anterior, se seleccionó el pretratamiento con *A. oryzae* de 5 días como el más adecuado para continuar con el estudio.

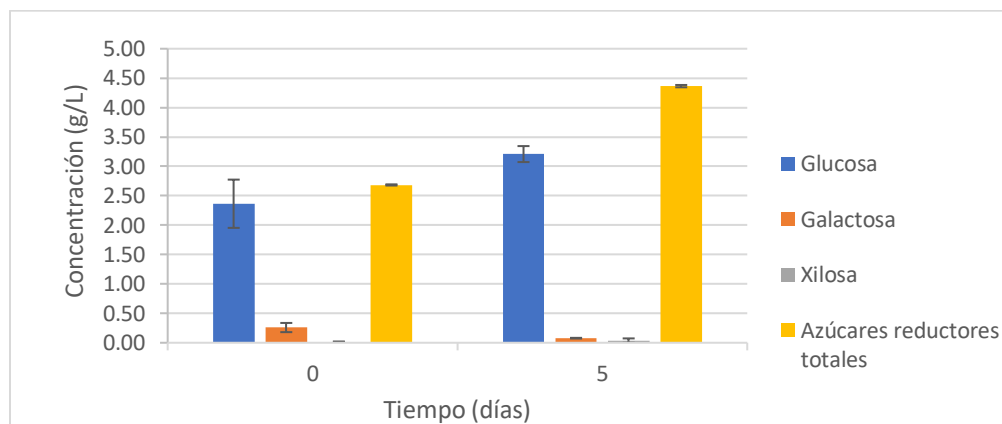
Se analizó la concentración de glucosa, galactosa y xilosa en los hidrolizados obtenidos tras la hidrólisis enzimática de la biomasa sin pretratar y pretratada durante 5 días mostrando los resultados en la Figura 6. Se pone de manifiesto como de los tres azúcares, el mayoritario en los hidrolizados es la glucosa, que representa el 88 % y el 74 %, respectivamente, de los azúcares reductores en el hidrolizado sin pretratamiento y en el hidrolizado obtenido del pretratamiento de 5 días.

Se observa como con el pretratamiento, se consigue aumentar la concentración de glucosa de 2,36 g/L a 3,21 g/L, lo que representa un incremento del 36 %. Este aumento de la concentración de glucosa es interesante con vistas a la fermentación para producir PHAs. La fructosa es el azúcar que generalmente se emplea para producir altas concentraciones de PHAs. Sin embargo, si las células crecen en un medio con glucosa en vez de fructosa, la glucosa se metaboliza por la vía de Entner–Doudoroff, dando piruvato que puede transformarse mediante una dehidrogenasa en acetil-CoA, que es el componente intermedio central de las reacciones de síntesis de PHAs (Zhila, Sapozhnikova, Kiselev, & Vasiliev, 2021).

En cuanto a la galactosa y a la xilosa, se infiere que sus concentraciones son bajas con respecto a los azúcares reductores en ambos hidrolizados, representando el 9,7 % y el 0,4 %, respectivamente, en el extracto obtenido de la biomasa sin pretratamiento, y el 0,4 % y 0,9 %, respectivamente en el extracto de la biomasa pretratada. Esta disminución observada tras el pretratamiento puede deberse a una reducción de los polisacáridos de los que proceden estos azúcares durante el pretratamiento biológico (Marzo, Díaz, Caro, & Blandino, 2021).

### Figura 6

*Influencia del tiempo de pretratamiento sobre la concentración azúcares liberados en la etapa de hidrólisis*



*Nota.* La figura representa el efecto del tiempo de pretratamiento sobre las concentraciones de azúcares obtenidos a las 72 h de hidrólisis enzimática, es decir, al finalizar la etapa.

### 4.3 Comparación de hidrólisis estándar e hidrólisis en condiciones mejoradas

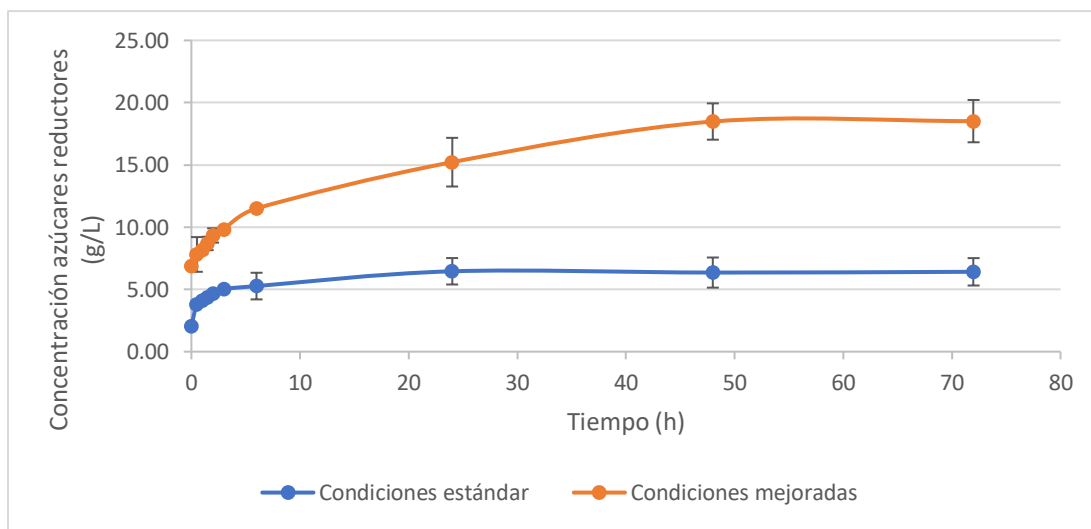
Se estudió la producción de azúcares tras la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada durante 5 días en condiciones estándar y mejoradas.

En la Figura 7 se observa una concentración máxima de azúcares reductores de 6,42 g/L obtenida a las 24 h, empleando condiciones estándar, que se mantenía prácticamente constante

hasta el final del proceso. Sin embargo, con las condiciones mejoradas, se alcanzó el máximo de 18,52 g/L a las 72 h. Aunque las condiciones mejoradas tomaron 48 h más en alcanzar el pico máximo, el incremento fue altamente significativo, en comparación con las concentraciones obtenidas con las condiciones estándar, pues tras la hidrólisis (72 horas) la producción de azúcares reductores aumentó en un 35 %.

### Figura 7

*Evolución de los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática en las condiciones estándar y mejoradas*

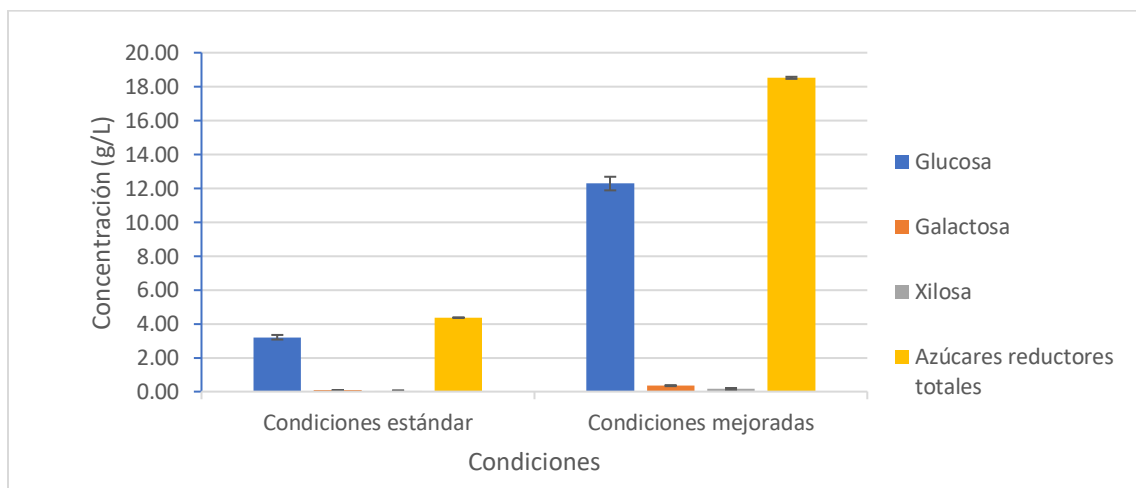


En la Figura 8 se muestran las concentraciones de glucosa, galactosa y xilosa en los hidrolizados tras la hidrólisis enzimática en condiciones estándar y mejoradas. Se pone de manifiesto como los azúcares reductores de los medios hidrolizados, en ambos casos, se componen mayoritariamente de glucosa, en un 74% en condiciones estándar y 66 % en condiciones mejoradas. Concretamente, se obtuvieron 3,21 g/L en condiciones estándar y 12,28 g/L en condiciones mejoradas, que es un 74 % superior. La concentración de galactosa y la xilosa, que se obtienen en menor medida en ambas condiciones, también es superior en las condiciones mejoradas, con valores de 0,35 y 0,15

g/L, respectivamente, que son 80 % superior a las obtenidas en condiciones estándar. Esta concentración de azúcares más elevada se justifica con la mayor concentración de biomasa alga empleada en la etapa de hidrólisis, siendo 5 veces mayor en las condiciones mejoradas. Sin embargo, no se consiguen concentraciones de glucosa 5 veces superior lo que podría deberse a efectos de inhibición, o bien a una homogeneización incompleta de los sólidos en la suspensión de biomasa por su alta viscosidad (Kadić, Palmqvist, & Lidén, 2014). Además, en las condiciones mejoradas se empleó una mayor velocidad de agitación, 250 rpm frente a 150 rpm, ya que a altas concentraciones de sólido es necesario una mezcla adecuada para evitar gradientes de concentración y controlar de forma más adecuada el pH y la temperatura del proceso (Kadić, Palmqvist, & Lidén, 2014). El efecto positivo de la agitación sobre los rendimientos de hidrólisis enzimática ha sido evidenciado por otros autores (Balan, Chiaramonti, & Kumar, 2013).

### Figura 8

*Influencia de las condiciones empleadas en la hidrólisis sobre la concentración de azúcares liberados*



Dado que los hidrolizados tras la hidrólisis enzimática en condiciones mejoradas presentaban mayores concentraciones de azúcares reductores y glucosa, fueron los empleados en la fermentación con *C. necator* para la producción de PHA.

#### **4.4 Producción de PHAs a partir de los hidrolizados azucarados empleando *C. necator***

Como se mencionó anteriormente los hidrolizados azucarados obtenidos en las condiciones mejoradas se sometieron a fermentación con *C. necator*. El cromatógrafo de gases reveló que el PHA mayoritario presente tras dicha fermentación era el poli3-hidroxi-butirato (PHB).

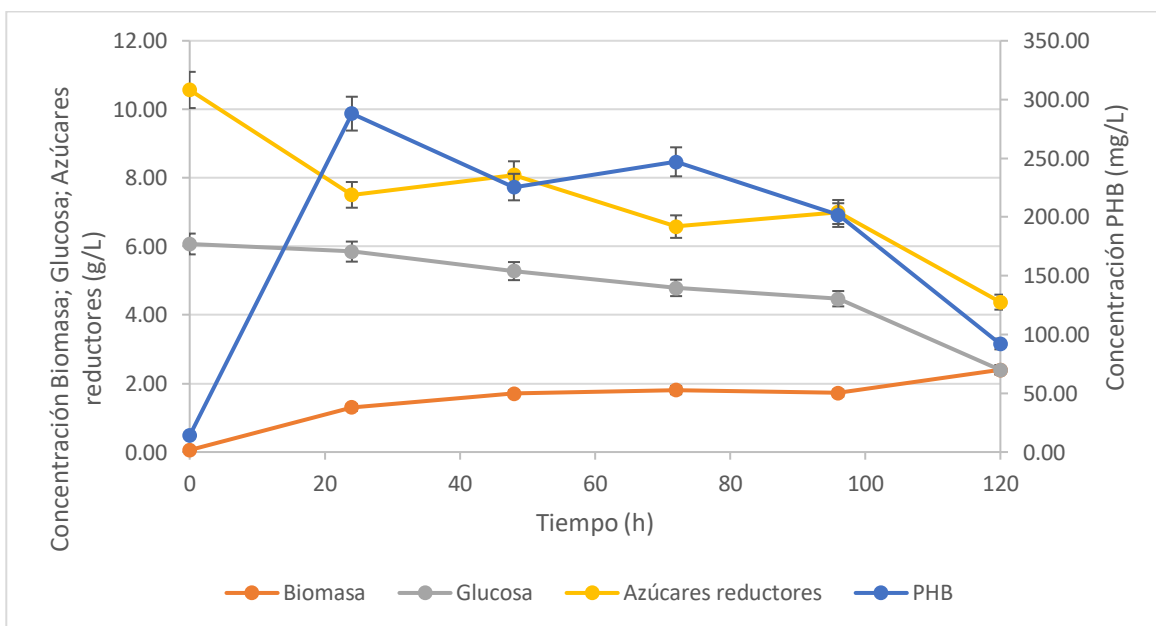
En la Figura 9 se ilustra el perfil de parámetros durante la fermentación con *C. necator* durante 120 h de proceso. Se observan los perfiles de azúcares reductores y glucosa, cuya concentración inicial era de 10,57 g/L y 6,07 g/L, respectivamente, que disminuyen a lo largo del proceso, alcanzando valores de 4,37 y 2,39 g/L a las 120 h.

Se observa un mayor crecimiento celular de *C. necator* en las primeras 24 h, aumentando levemente hasta las 48 h, tiempo al cual se detecta una concentración de 1,71 g/L. Entre las 48 y las 92 horas permanece casi constante y luego aumenta ligeramente. El mayor crecimiento celular se corresponde con una mayor disminución de los azúcares en el medio. Se pone de manifiesto como la acumulación de PHB comienza en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, alcanzando un valor máximo de 288,0 mg/L a las 24 h, tiempo en el cual se observa una disminución de los azúcares reductores y la glucosa. A partir de este tiempo, la concentración de PHB no aumenta, pero si lo va haciendo la biomasa, y disminuyen los azúcares presentes. Esto es indicativo de que la fuente de carbono está siendo empleada para la producción de biomasa y no para la producción de PHB. Esta parada en la producción de PHB ha sido observada por otros autores. Así, López-Cuellar et al. lo explican con una limitación de la fuente de nitrógeno y exceso de la fuente de carbono (López-Cuellar, Alba-Flores, Gracida Rodríguez, & Pérez-Guevara, 2011).

Aunque se conoce que la limitación de nitrógeno favorece la producción de PHB empleando *C. necator*, la concentración de nitrógeno debe ser suficiente para permitir una apropiada acumulación del biopolímero. Los niveles de nitrógeno y fósforo son fundamentales para equilibrar el almacenamiento de PHA y el crecimiento microbiano de manera que se minimice el crecimiento de biomasa y se maximice el PHA almacenado. En un estudio realizado por Hao y colaboradores, en la producción de PHB encontraron que cuando las cantidades de los nutrientes excedieron una relación de N/C de 150 mg/g y P/C de 15 mg/g, la producción de PHA se vio afectada, posiblemente debido al crecimiento de biomasa redundante sobre la síntesis de PHA y la alteración del metabolismo microbiano (Hao, Wang, & Wang, 2017).

### Figura 9

*Evolución del crecimiento de C. necator, producción de PHA, consumo de glucosa y azúcares reductores durante la fermentación en medio hidrolizado*



*Nota.* En la figura, el eje de las ordenadas situado a la izquierda representa las concentraciones en mg/L de biomasa de *C. necator*, glucosa y azúcares reductores. En cuanto al eje ubicado a la derecha, describe la concentración en mg/L de PHA obtenidos.

La concentración máxima de PHB analizada en este trabajo se encuentra dentro del rango de producción de otros trabajos reportados en la literatura, entre 20 a 5200 mg/L, empleando distintos microorganismos como *Pseudomonas oleovorans* (1000 mg/L), *Escherichia coli* (3200 mg/L), *Klebsiella aerogenes* (3300 mg/L), *Brevundimonas sp.* (4000 mg/L), *Pseudomonas pseudoflava* (3500 mg/L), *Burkholderia cepacia* (3500 mg/L), *Enterococcus sp.* (5200 mg/L) y *K. pneumoniae* (130 -9600 mg/L) (Valdez, Barraza, Angeles, & Rivas, 2020).

Los rendimientos de PHB obtenidos se muestran en la Tabla 3. Se observa que el rendimiento  $Y_{P/X}$ , que representa la relación entre la cantidad de PHA y la de biomasa, fue inferior al obtenido en otros trabajos con *C. necator*. Así, por ejemplo, Nygaard y col., obtuvieron un rendimiento  $Y_{P/X} = 0,51$  mg/mg, sin embargo, en este caso se empleó fructosa comercial (1,5 g/L) para la producción de PHB con *Cupriavidus necator* (Nygaard, Yashchuck, & Hermida, 2019). En este estudio se empleó el doble de concentración de la fuente de carbono, se adicionó sulfato de amonio (2,0 g/L) como fuente de nitrógeno y se empleó tampón fosfato (2,0 g/L) para el mantenimiento del pH. Estas condiciones aseguraron tanto el crecimiento microbiano como la acumulación de PHB.

**Tabla 3**

*Rendimientos de PHB*

$Y_{P/S}$ [mg PHB/ mg glucosa]	$Y_{P/X}$ [mg PHB/ mg biomasa]	$Y_{X/S}$ [mg biomasa/mg glucosa]
0,04	0,04	1,00

## 5. Conclusiones

- Teniendo en cuenta la concentración de azúcares reductores medidos tras la hidrólisis enzimática, el pretratamiento biológico con *A. oryzae* de cinco días resultó el más adecuado, alcanzado 6,46 g/L en las condiciones estándar.
- En las condiciones de hidrólisis mejoradas se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 18,52 g/L, un 76 % superior a la alcanzada en las condiciones estándar.
- La concentración máxima de azúcares reductores se obtuvo a las 48 h de hidrólisis enzimática, valor que se mantenía prácticamente hasta el final del proceso.
- Los hidrolizados azucarados obtenidos tras la hidrólisis enzimática, en condiciones mejoradas, fueron fermentados con *C. necator*, alcanzando una concentración máxima a las 24 horas de proceso de 288,0 mg/L de PHB, valor que se encuentra dentro del rango de producción de otros trabajos recogidos en la literatura.
- Durante la fermentación en estado sólido de *A. oryzae* sobre la biomasa algal se liberaban distintas enzimas hidrolíticas, siendo la alginato liasa y la xilanasa las producidas en mayor medida, con actividades máximas de 15,19 y 31,01 U/g alga seca, alcanzadas a los 6 y 5 días, respectivamente.
- Por lo tanto, el alga invasora *Rugulopteryx okamurae* mostró un gran potencial para ser utilizada como materia prima en la producción de PHAs, tras ser sometida a un pretratamiento biológico de cinco días con *Aspergillus oryzae* y una posterior hidrólisis enzimática, bajo condiciones mejoradas.

## 6. Recomendaciones

Sería interesante evaluar la producción de azúcares en la etapa de hidrólisis tras la aplicación de un pretratamiento biológico, pero empleando hongos marinos, ya que en la literatura se encuentran trabajos que recogen su gran capacidad para hidrolizar los polisacáridos presentes en las algas.

Teniendo en cuenta la alta actividad xilanasa medida en los extractos enzimáticos obtenidos de la FES de *A. oryzae* sobre biomasa algal, también sería de interés utilizar estos extractos en la hidrólisis enzimática, bien para suplementar el cóctel enzimático comercial y mejorar los rendimientos del proceso, o reducirlo para disminuir los costes del proceso. Podría ser incluso interesante liofilizar los extractos enzimáticos previamente, para concentrarlos, y aumentar así su actividad enzimática.

En cuanto a la etapa de fermentación con *C. necator*, para mejorar los rendimientos de producción de PHAs habría que analizar la relación carbono nitrógeno en los extractos obtenidos tras la hidrólisis y, de ser necesario, ajustar dicha relación para trabajar con una concentración de nitrógeno suficiente, pero en condiciones limitantes para favorecer dicha producción.

### Referencias bibliográficas

- Al-Battashi, H., Annamalia, N., Sivakumar, N., Al-Bahry, S., & Tripathi, B. (2019). Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 183-205.
- Araya, V. (2019). *Bioprospección de bacterias obtenidas de suelo y su aplicación potencial en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs)*. Heredia: Universidad Nacional de Costa Rica.
- Azizi, N., Najafpour, G., & Younesi, H. (2017). Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1029-1040.
- Baker, J., & Adney, B. (2008). Measurement of Cellulase Activities. *National Renewable Energy Laboratory*.
- Balan, V., Chiamonti, D., & Kumar, S. (2013). Review of US and EU initiatives toward development, demonstration, and commercialization of lignocellulosic biofuels. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 732-759.
- Beetul, K., Gopeechund, A., & Kaullysing, D. (2016). Challenges and Opportunities in the Present Era of Marine Algal Applications. Tech.
- Borines, M., de León, R., & Cuello, J. (2013). Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource Technology*, 22-29.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., & Lafferty, R. (1978). A Rapid Gas Chromatographic Method for the determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29-37.
- Chang, P., Horn, B., & Gomi, K. (2014). ASPERGILLUS | *Aspergillus oryzae*. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 77-82.
- Díaz, A. B., de Ory, I., Caro, I., & Blandino, A. (2012). Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food and Bioprocess Processing*, 72-78.
- El-Shora, H., El-Sharkawy, R., Khateb, A., & Darwish, D. (2021). Production and immobilization of  $\beta$ -glucanase from *Aspergillus niger* with its applications in bioethanol production and biocontrol of phytopathogenic fungi. *Scientific Reports*.
- Frisvad, J., Møller, L., & Larsen, T. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9481-9515.

- García, J., Sempere, J., Roi, A., Martínez, M., & Olaya, L. (2020). From exotic to invasive in record time: The extreme impact of *Rugulopteryx okamurae* (Dictyotales, Ochrophyta) in the strait of Gibraltar. *Science of the Total Environment*, 97-113.
- García-Gómez, J., Sempere-Valverde, J., Ostalé-Valriberas, E., & Martínez, M. (2018). *Rugulopteryx okamurae* (E.Y. Dawson) I.K. Hwang, W. J. Lee & H.S. Kim (Dictyotales, ochrophyta), alga exótica “explosiva” en el estrecho de Gibraltar. Observaciones preliminares de su distribución e impacto. *Revista de Estudios Campogibraltares*, 97-113.
- Ghosh, S., Gnam, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Gozin, M., & Golberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology*, 166-173.
- Giraldez, L., Braz, F., Lacerda, A., Ferraz, L., & Moura, D. (2020). Efectos de los microplásticos en el medio ambiente: Un macroproblema emergente. *Revista de Ciencia y Tecnología RECYT*, 100-107.
- Gobierno de España. (2020). Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. *Ministerio para la transición ecológica*.
- Gomaa, M., Fawzy, M., Hifney, A., & Abdel-Gawad, K. (2019). Optimization of enzymatic saccharification of fucoïdan and alginate from brown seaweed using fucoïdanase and alginate lyase from the marine fungus *Dendryphiella arenaria*. *Journal of Applied Phycology*, 1955–1965.
- Gómez, G. (2016). *Estudio de hidrólisis enzimática en biomasa microalgal procedente del tratamiento de aguas residuales con purines*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R., Gomes, N., Teixeira, J., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2016-2048.
- Hao, J., Wang, X., & Wang, H. (2017). Overall process of using a valeratedominant sludge hydrolysate to produce high-quality polyhydroxyalkanoates (PHA) in a mixed culture. *Scientific reports*.
- Huang, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tan, W., Wu, X., . . . Yong, Q. (2022). Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Jafari, N., Jafarizadeh-Malmiri, H., Hamzeh-Mivehroud, M., & Adibpour, M. (2017). Optimization of UV irradiation mutation conditions for cellulase production by mutant fungal strains of *Aspergillus Niger* through solid state fermentation. *Green Processing and Synthesis*, 333-340.
- Jin, F.-J., Hu, S., Wang, B.-T., & Jin, L. (2021). Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 644404.

- Kadić, A., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2014). Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed. *Biotechnology for Biofuels*, Article number: 77.
- Khare, S., Pandey, A., & Larroche, C. (2015). Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 38-44.
- Kim, N.-J., Li, H., Jung, K., Chang, H., & Lee, P. (2011). Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresource Technology*, 7466-7469.
- Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 255–269.
- Kostas, E., White, D., Du, C., & Cook, D. (2016). Selection of yeast strains for bioethanol production from UK seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 1427–1441.
- Labeaga, A. (2018). *Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones*. España: Master Thesis, Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Law, J., & Slepecky, R. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J Bacteriol*, 33-37.
- Lemos, A., & Mina, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 93-101.
- Leyton, C. (2015). *Condiciones óptimas de fermentación de carbohidratos de algas pardas, mediante el uso de organismos genéticamente modificados*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Li, S.-Y., Wang, Z.-P., Wang, L.-N., Peng, J.-X., & Wang, Y.-N. (2019). Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Bioresource Technology*, 84-89.
- Li, S.-Y., Wang, Z.-P., Wang, L.-N., Peng, J.-X., & Wang, Y.-N. (2019). Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Bioresource Technology*, 84-89.
- Lomartire, S., Marques, J., & Gonçalves, A. (2022). An Overview of the Alternative Use of Seaweeds to Produce Safe and Sustainable Bio-Packaging. *Applied sciences*, 3123.
- López-Cuellar, M., Alba-Flores, J., Gracida Rodríguez, J., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74-80.
- Mankar, A., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 125235.
- Mansilla, A., & Alveal, K. (2004). Generalidades sobre macroalga. *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*, Concepción, Consejo Nacional del Libro y la Lectura.

- Martínez, F. (2016). Arribazones de la especie exótica *Rugulopteryx okamurae* (E.Y. Dawson) I.K. Hwang, W.J. Lee & H.S. Kim (Dictyotales, Ochrophyta) en el Estrecho de Gibraltar: primera cita para el Atlántico y España. *Journal of Geosciences*, 3.
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., & Blandino, A. (2021). Effect of Several Pretreatments on the Lactic Acid Production from Exhausted Sugar Beet Pulp. *Foods*.
- Méndez, L. (2018). *Optimización de la digestión anaerobia de microorganismos fotosintéticos: pretratamiento térmico y uso de cianobacterias*. Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 426-428.
- Mozumder, M., García-González, L., De Hwer, H., & Volcke, E. (2015). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from CO<sub>2</sub>: Modeldevelopment and process optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 107-116.
- Muhammad, M., Aloui, H., Khomlaem, C., Hou, C., & Soo Kim, B. (2020). Production of polyhydroxyalkanoates and carotenoids through cultivation of different bacterial strains using brown algae hydrolysate as a carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Mutripah, S., Meinita, M., Kang, J., Jeong, G., & Susanto, A. (2014). Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer's yeast. *Journal of Applied Phycology*, 687-693.
- Nygaard, D., Yashchuck, O., & Hermida, É. (2019). Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon*.
- Parab, P., Khandeparker, R., Amberkar, U., & Khodse, V. (2017). Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21. *3 Biotech*, Article number: 296.
- Pirota, R., Delabona, P., & Farinas, C. (2014). Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Using Enzyme Extract and Whole Solid-state Fermentation Medium of Two Newly Isolated Strains of *Aspergillus Oryzae*. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 259-264.
- Pirota, R., Tonelotto, M., Delabona, P., & Fonseca, R. (2016). Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21-31.
- Ravanal, M., Pezoa, R., Von, S., Hemming, J., Salazar, O., Anugwom, I., . . . Lienqueo, M. (2016). Comparison of different types of pretreatment and enzymatic saccharification of *Macrocyctis pyrifera* for the production of biofuel. *Algal Research*, 141-147.
- Rojo-Nieto, E., & Montoto, T. (2017). *Basuras marinas, plásticos y microplásticos orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global*. España: Ecologistas en acción.

- Saleem, M., Akbar, M., Xu, Z., & Wang, H. (2021). A review on the role of pretreatment technologies in the hydrolysis of lignocellulosic biomass of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 106276.
- Sánchez, P. (2020). *Impactos ecológicos globales de algas invasoras en ecosistemas acuáticos*. Jaén: Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén.
- Sankaran, R., Parra, R., Pakalapati, H., Show, P., Ling, T., Chen, W.-H., & Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, 122-476.
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Bioteología*, 361-372.
- Sharma, D., & Rai, R. (2020). Biological treatment of Lignocelluloses with white-rot fungi and its applications. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 4073-4079.
- Socol, C., Ferreira, E., Junior, L., Grace, S., Lorenci, A., & Porto de Souza, L. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 52-71.
- Sun, C., Zhou, J., Duan, G., & Yu, X. (2020). Hydrolyzing *Laminaria japonica* with a combination of microbial alginate lyase and cellulase. *Bioresource Technology*, 123548.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 49-58.
- Teh, Y., Lee, K., Chen, W.-H., Lin, S.-C., & Sheen, H.-K. (2017). Dilute sulfuric acid hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* with microwave-assisted heating for biochar production and sugar recovery. *Bioresource Technology*, 20-27.
- Tena, M., & Jorrín, J. (2018). *Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura*. Zamora: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Trivedi, N., Reddy, C., Radulovich, R., & Jha, B. (2015). Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Research*, 48-54.
- Valdez, A., Barraza, M., Angeles, A., & Rivas, A. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain using low-cost media from fruit peel residues. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Wang, T., & Lü, X. (2021). Chapter 8 - Overcome saccharification barrier: Advances in hydrolysis technology. *Woodhead Publishing Series in Energy*, 137-159.
- Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T.-H., Loh, K.-C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2022). A Review on Enhancing *Cupriavidus necator* Fermentation for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production From Low-Cost Carbon Sources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 946085.

- Zhila, N., Sapozhnikova, K., Kiselev, E., & Vasiliev, A. (2021). Properties of Degradable Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Synthesized by a New Strain, *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1, from Various Carbon Sources. *Polymers*.
- Zhuo, S., Yan, X., Liu, D., Si, M., Zhang, K., Liu, M., . . . Shi, Y. (2018). Use of bacteria for improving the lignocellulose biorefinery process: importance of pre-erosion. *Biotechnology for Biofuels*, 146.