

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos, englobada en la línea de investigación de “Valorización y caracterización de materiales residuales en el marco de la economía circular”, siendo financiada principalmente por el proyecto BIOTRES (S2018/EMT-4344 BIOTRES-CM, <https://madrid.bio3project.es/>) de la Comunidad de Madrid. Asimismo, se ha realizado una estancia predoctoral en el Instituto de Investigación en Biociencias de la Université de Mons del 3 de mayo al 3 de agosto de 2021 durante la realización de la Tesis Doctoral.

La transición desde la actual economía lineal a una economía circular es uno de los grandes retos de nuestra sociedad. Uno de los principales motores de este cambio de paradigma es el previsible agotamiento de los recursos materiales. La gestión eficiente de los recursos se convierte, por tanto, en algo esencial. El incremento de la generación de residuos sólidos municipales supone un coste medioambiental y económico para la sociedad, pero a la vez una fuente de recursos que no puede ser desaprovechada. Más de la mitad de estos residuos es material biodegradable, conocido como la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (FORSU) y que constituye una fuente abundante de carbono.

La necesidad de garantizar el suministro de materiales y energía, así como de minimizar la dependencia de los combustibles fósiles, ha impulsado el concepto de las biorrefinerías, que es análogo al de las refinerías basadas en el petróleo, pero que utiliza residuos orgánicos en lugar de petróleo como materia prima. El principal objetivo de una biorrefinería es maximizar el valor derivado de los componentes y productos intermedios convirtiéndolos en una gama de valiosos bioproductos y bioenergía. Uno de estos productos de alto valor añadido son los bioplásticos, candidatos a substituir los plásticos derivados del petróleo, omnipresentes en nuestra vida y que causan serios problemas medioambientales y a los ecosistemas. Dentro de los posibles sustitutos, los polihidroxialcanoatos (PHA) son una alternativa con propiedades químicas, térmicas y mecánicas similares a los plásticos derivados del petróleo, pero más amigables con el medio ambiente, ya que son biodegradables y compostables, por lo que son un componente perfecto para entrar en las cadenas de producción de una economía circular.

Actualmente, la producción de PHA no ha conseguido ser económicamente competitiva frente a los plásticos tradicionales. La producción industrial de PHA actualmente consiste en procesos con cultivos puros y materias primas simples como azúcares, lo cual encarece la producción debido a los altos costes de esterilización y de esta materia prima. Para reducir costes, en los

últimos años se está estudiando procesos con cultivos mixtos, que no requieren esterilización, y la utilización de residuos como materia prima. Para reducir aún más los costes, el uso de bacterias fototróficas purpura (BFP) constituye un prometedor mecanismo para la industria debido a su alta versatilidad metabólica y a que no necesitan oxígeno para la acumulación de PHA.

El metabolismo más común de las BFP es el fotoheterotrófico, con el cual son capaces de usar los fotones emitidos por el sol como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono y electrones. Este perfil metabólico optimiza el uso de los compuestos orgánicos, ya que no deben derivar una parte para la producción de energía, como sí tienen que hacer los cultivos quimiotróficos, pudiéndose obtener así mayores rendimientos de recuperación de carbono. Es por ello que cultivos mixtos de BFP pueden reducir los costes de producción de PHA y abrir nuevas vías biotecnológicas, ya que pueden usar ácidos carboxílicos de cadena corta, derivados de procesos de fermentación, como sustratos baratos y fácilmente disponibles y, además, utilizar el sol como fuente de energía.

Nunca antes se había intentado llevar a cabo la valorización completa de la FORSU utilizando como tecnología central los cultivos mixtos de BFP para producir productos de alto valor añadido. La mayoría de los trabajos realizados con cultivos mixtos de BFP se centran en el tratamiento de aguas residuales, y los que tratan sobre acumulación de PHA emplean casi exclusivamente cultivos puros. El estudio de una fotobiorefinería integrada, donde se concatenen pretratamientos térmicos y procesos biotecnológicos para valorizar la FORSU y conseguir cerrar los ciclos de carbono y energía de manera competitiva representa un reto aun por explotar. Además, otra pregunta sin respuesta son las diferentes rutas de acumulación de carbono de los cultivos mixtos de BFP según diferentes estados redox y de estrés.

Como la FORSU es extremadamente heterogénea y puede contener compuestos tóxicos, el primer reto de esta tesis es comprobar que un pretratamiento de hidrólisis térmica puede crear una corriente líquida con la cual las BFP puedan crecer y acumular PHA. En la **Sección I** se propone el estudio de una prueba de concepto de biorrefinería donde se encadena el pretratamiento por hidrólisis térmica con una digestión anaerobia de la fracción sólida resultante y un proceso fotoheterotrófico con BFP de la fracción líquida. Esta prueba de concepto se estudió con FORSU real de recogida selectiva y preclasificada en una planta de tratamiento, así como en residuo lignocelulósico de poda de parques. Los resultados mostraron una solubilización de materia orgánica (DQO) en la hidrólisis térmica de hasta un 40%, con ratios muy altos de DQO/nutrientes, siendo más importante la temperatura que el tiempo de reacción. Además, el pretratamiento mejora la biodegradabilidad general de la FORSU, compensando en su potencial metanogénico la pérdida de parte del carbono de la fracción líquida. El biogás producido podría alimentar una planta

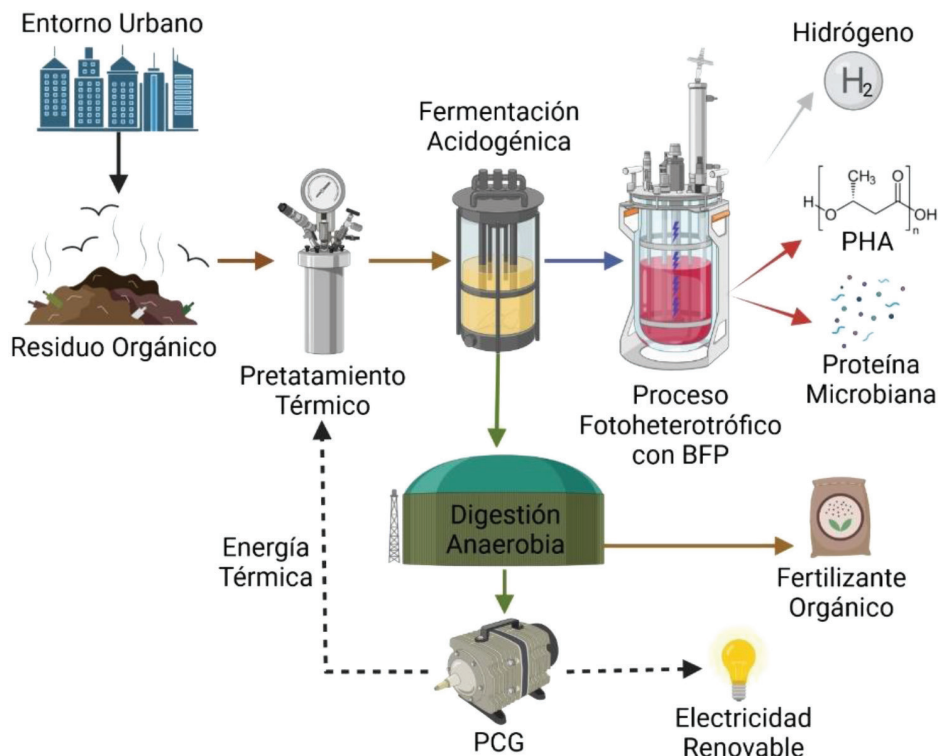
de cogeneración (PCG), con resultados de generación de energía térmica y eléctrica que podrían hacer el proceso energéticamente autosostenible. En cuanto a la asimilación de la corriente líquida por el cultivo mixto de BFP, se consigue un consumo de hasta el 80% de la DQO con rendimientos de biomasa de hasta 0,5 gSSV gDQO⁻¹. Además, se alcanzaron acumulaciones de hasta el 21% en materia seca de PHA, confirmando la viabilidad de la prueba de concepto propuesta.

Para mejorar los rendimientos de biomasa y de producción de PHA, se conoce que las BFP asimilan con mayor facilidad compuestos orgánicos reducidos como los ácidos carboxílicos de cadena corta (ácido acético, propiónico, butírico, etc.). Por ello, se propone un paso de pretratamiento intermedio, la fermentación acidogénica. En la **Sección II** se estudia la viabilidad de la co-fermentación a temperaturas termofílicas de los dos componentes más abundantes de la FORSU: residuos de comida y residuo lignocelulósico. Esta fermentación se estudia sin y con pretratamiento térmico mediante explosión de vapor. El pretratamiento con explosión de vapor mejora considerablemente la solubilización de materia orgánica y, tras ambos tratamientos, se consiguen porcentajes de solubilización de hasta el 80% de la DQO en la corriente líquida. Además, la fermentación acidogénica produce simultáneamente H₂, consiguiéndose en estos ensayos producciones de hasta 162 ± 5 mlH₂ gDQO⁻¹. Los resultados mostraron claramente un efecto sinérgico positivo en la eficiencia global de la co-fermentación entre ambos residuos y una fuerte dependencia en la distribución de ácidos carboxílicos. Se alcanzaron valores de hasta 0,58 gDQO de ácidos carboxílicos por gDQO añadido con el pretratamiento térmico, y una acidificación del 93% (%DQO referido a ácidos carboxílicos).

Habiendo demostrado que la combinación de pretratamiento térmico y fermentación acidogénica termofílica permite obtener una corriente líquida con alta carga en ácidos carboxílicos de cadena corta, en la **Sección III** se procedió a estudiar la fotobiorefinería propuesta (Figura R1). Se utiliza un fotobiorreactor de membrana (FBRM) para tratar el efluente líquido de un fermentador acidogénico en continuo alimentado con hidrolizado de FORSU tras steam explosion. La fracción sólida obtenida tras la fermentación la valorizamos mediante digestión anaerobia.

En este estudio se intenta optimizar el crecimiento de biomasa y la acumulación de PHA en el FBRM ajustando la carga orgánica que reciben las BFP. Se alcanzó una acumulación máxima de PHA del 42% en materia seca, el máximo obtenido hasta ahora en un cultivo mixto de BFP alimentado con residuos. Se han detectado PHA de cadena media como el polihidroxihexanoato, con mejores propiedades físico-químicas en comparación con los PHA de cadena corta, que podrían diversificar sus aplicaciones industriales. Se muestran también por primera vez alternativas a la acumulación de PHA: el

Figura R1. Representación esquemática de la fotobiorrefinería de tratamiento de residuos propuesta.



almacenamiento de carbono tanto en el glucógeno como en los polímeros extracelulares (PEC), al tiempo que se deriva el exceso de electrones en H_2 incluso en presencia de amonio orgánico. Además, se ha realizado un estudio estadístico de la evolución de las comunidades bacterianas para determinar la influencia de las variables ambientales sobre su variabilidad, como por ejemplo la variación de géneros en el FBRM tras un shock de carga orgánica o que géneros son los más prominentes cuando se acumula PHA. Por último, se realizaron balances de materia y energía preliminares que indican que la fotobiorrefinería integrada propuesta puede ser energéticamente sostenible, a la vez que produce 109 kg de PHA por tonelada de sólidos totales de FORSU. Estos resultados resultan prometedores para una implementación a mayor escala de una fotobiorrefinería basada en BFP.

Por último, en la **Sección IV** se muestra una revisión crítica sobre el escalado del proceso más innovador de la fotobiorrefinería propuesta, el proceso fotoheterotrófico con BFP. El éxito y la viabilidad económica de la producción a

escala industrial de biopolímeros depende principalmente de cómo enriquecer cultivos mixtos de BFP capaces de acumular grandes cantidades de PHA y los principales cuellos de botella para el escalado de esta tecnología. Se discuten las ventajas y desventajas de las estrategias de acumulación de PHA, como la de festín y hambruna o festín permanente, teniendo esta última la ventaja clara de poder recuperar hasta el 100% de carbono (acercando el sistema a la neutralidad de CO_2) con una alta conversión en PHA. En cuanto al escalado se concluye que, posiblemente, la mejor opción sea reactores al aire libre, principalmente utilizando la iluminación solar natural como fuente de energía. Sin embargo, se indican muchas estrategias que pueden aumentar el rendimiento del proceso, como sistemas de captación y filtración solar y dilución espacial de la luz, así como estrategias de floculación, granulación, homogenización y automatización del sistema que pueden resultar útiles para la reducción de costes, pero que deben ser investigadas en mayor profundidad.

En conjunto, este trabajo ha propuesto y probado una fotobiorefinería a TRL < 3 con el objetivo de valorizar FORSU en PHA y otros productos de alto valor añadido como el biogás, el H_2 o la proteína microbiana. Además, los resultados de este trabajo ayudan a entender mejor el proceso fotoheterotrófico de producción de PHA mediante BFP con el objetivo de preparar el camino para su escalado industrial.

RESUMO

Esta Tese de Doutoramento realizouse no Departamento de Tecnoloxía Química e Ambiental da Universidade Rey Juan Carlos, incluída na liña de investigación “Valorización e caracterización de materiais residuais no marco da economía circular”, sendo financiada principalmente pola BIOTRES. proxecto (S2018/EMT-4344 BIOTRES-CM, <https://madrid.bio3project.es/>) da Comunidade de Madrid. Así mesmo, realizouse unha estancia predoutoral no Instituto de Investigación en Biociencias da Université de Mons do 3 de maio ao 3 de agosto de 2021 durante a realización da Tese Doutoral.

O paso da economía lineal actual a unha economía circular é un dos grandes retos da nosa sociedade. Un dos principais motores deste cambio de paradigma é o previsible esgotamento dos recursos materiais. A xestión eficiente dos recursos faise, pois, imprescindible. O aumento da xeración de residuos sólidos urbanos supón un custo ambiental e económico para a sociedade, pero á vez tempo unha fonte de recursos que non se pode desperdiciar. Máis da metade destes residuos son material biodegradable, coñecido como a fracción orgánica dos residuos sólidos urbanos (FORSU) que constitúe unha fonte abundante de carbono.

A necesidade de garantir o abastecemento de materiais e enerxía, así como de minimizar a dependencia dos combustibles fósiles, impulsou o concepto de biorrefinerías, que é análogo ao das refinerías de petróleo, pero que empregan no seu lugar biomasa ou residuos. O obxectivo principal dunha biorrefinería é maximizar o valor derivado dos compoñentes e produtos intermedios converténdoo nunha gama de bioproductos e bioenerxía valiosos. Un destes produtos de alto valor engadido son os bioplásticos, candidatos a substituír os plásticos derivados do petróleo, omnipresentes nas nosas vidas e que causan graves problemas ambientais e dos ecosistemas. Entre os posibles substitutos, os polihidroxialcanoatos (PHA) son unha alternativa con propiedades químicas, térmicas e mecánicas semellantes aos plásticos derivados do petróleo, pero máis amigables co medio ambiente, xa que son biodegradables e compostables, polo que son un compoñente perfecto para entrar nas cadeas de produción dunha economía circular.

Actualmente, a produción de PHA non conseguiu ser economicamente competitiva fronte aos plásticos tradicionais. A produción industrial de PHA consiste na actualidade en procesos con cultivos puros e materias primas sinxelas como os azúcreos, o que encarece a produción polos altos custos de esterilización e desta materia prima. Para reducir custos, nos últimos anos estudáronse procesos con cultivos mixtos, que non precisan de esterilización, e a utilización de residuos como materia prima. Para reducir aínda máis os custos, o uso de bacterias fototróficas vermellas (BFV) constitúe

un mecanismo prometedor para a industria debido á súa alta versatilidade metabólica e ao feito de que non necesitan osíxeno para a acumulación de PHA.

O metabolismo máis común das BFV é o fotoheterótrofo, co que son capaces de utilizar os fotóns emitidos polo sol como fonte de enerxía e os compostos orgánicos como fonte de carbono e electróns. Este perfil metabólico optimiza o uso de compostos orgánicos, xa que non teñen que derivar unha parte para a produción de enerxía, como teñen que facer os cultivos quimiotróficos, podendo así obter maiores rendementos de recuperación de carbono. É por isto que os cultivos de BFV mixtos poden reducir os custos de produción de PHA e abrir novas vías biotecnolóxicas, xa que poden utilizar ácidos carboxílicos de cadea curta, derivados de procesos de fermentación, como substratos baratos e de fácil acceso e, ademais, utilizar o sol como fonte de enerxía.

Nunca antes se intentou realizar a valorización completa de FORSU utilizando cultivos mixtos BFV como tecnoloxía central para producir produtos de alto valor engadido. A maioría dos traballos realizados con cultivos mixtos de BFV céntranse no tratamento de augas residuais, e os que se ocupan da acumulación de PHA empregan case exclusivamente cultivos puros. O estudo dunha fotobiorrefinería integrada, onde se concatenan pretratamentos térmicos e procesos biotecnolóxicos para valorizar o FORSU e conseguir pechar competitivamente os ciclos do carbono e da enerxía, representa un reto aínda por explotar. Ademais, outra pregunta sen resposta son as diferentes rutas de acumulación de carbono en cultivos mixtos de BFV segundo diferentes estados redox e estrés.

Como FORSU é extremadamente heteroxéneo e pode conter compostos tóxicos, o primeiro reto desta tese é verificar que un pretratamento de hidrólise térmica pode crear un fluxo líquido co que BFV pode crecer e acumular PHA. A **Sección I** propón o estudo dunha proba de concepto de biorrefinería onde o pretratamento por hidrólise térmica está vinculado cunha dixestión anaerobia da fracción sólida resultante e un proceso fotoheterótrofo con BFP da fracción líquida. Esta proba de concepto estudouse con FORSU real de recollida selectiva e preclasificada nunha depuradora, así como con residuos lignocelulósicos procedentes da poda do parque. Os resultados mostraron unha solubilización da materia orgánica (DQO) na hidrólise térmica de ata un 40%, con relacións DQO/nutrientes moi elevadas, sendo a temperatura máis importante que o tempo de reacción. Ademais, o pretratamento mellora a biodegradabilidade xeral do FORSU, compensando no seu potencial meta-noxénico a perda da maior parte do carbono da fracción líquida. O biogás producido podería alimentar unha planta de coxeración (PCG), con resultados de xeración de enerxía térmica e eléctrica que poderían facer o proceso enerxeticamente autosustentable. En canto á asimilación da corrente líquida polo cultivo mixto de BFP, conséguese un consumo de ata o 80% do DQO con

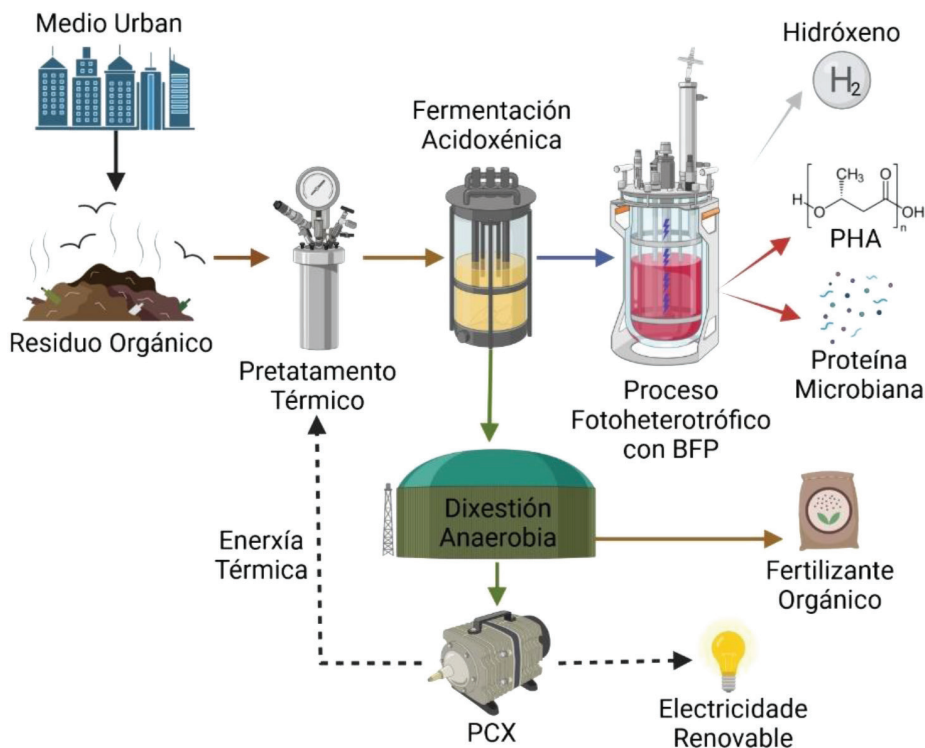
rendementos de biomasa de ata $0,5 \text{ gSSV gCOD}^{-1}$. Ademais, conseguíronse acumulacións de ata un 21% en materia seca de PHA, confirmando a viabilidade da proba de concepto proposta.

Para mellorar os rendementos de biomasa e a produción de PHA, sábese que as BFV asimilan máis facilmente compostos orgánicos reducidos como os ácidos carboxílicos de cadea curta (ácido acético, propiónico, butírico, etc.). Polo tanto, propónse un paso intermedio de pretratamento, a fermentación acidóxena. A **Sección II** estuda a viabilidade da co-fermentación a temperaturas termófilas dos dous compoñentes máis abundantes de FORSU: residuos de alimentos e residuos lignocelulósicos. Esta fermentación estúdase sen e con pretratamento térmico por explosión de vapor. O pretratamento por explosión de vapor mellora considerablemente a solubilización da materia orgánica e, tras ambos tratamentos, conséguense porcentaxes de solubilización de ata o 80% do DQO na corrente líquida. Ademais, a fermentación acidoxénica produce simultaneamente H_2 , conseguindo nestes ensaios producións de ata $162 \pm 5 \text{ mlH}_2 \text{ gDQO}^{-1}$. Os resultados mostraron claramente un efecto sinérxico positivo sobre a eficiencia global da co-fermentación entre ambos os residuos e unha forte dependencia da distribución dos ácidos carboxílicos. Co pretratamento térmico conseguíronse valores de ata $0,58 \text{ gCOD}$ de ácidos carboxílicos por gCOD engadido e unha acidificación do 93% (%COD referido aos ácidos carboxílicos).

Unha vez demostrado que a combinación de pretratamento térmico e fermentación acidoxénica termófila permite obter unha corrente líquida cunha alta carga de ácidos carboxílicos de cadea curta, na **Sección III** procedeuse a estudar a fotobiorrefinería proposta (Figura R1). Un fotobiorreactor de membrana (FBRM) úsase para tratar o efluente líquido dun fermentador acidóxeno continuo alimentado con hidrolizado FORSU despois da explosión de vapor. A fracción sólida obtida despois da fermentación é recuperada por dixestión anaerobia.

Este estudo tenta optimizar o crecemento da biomasa e a acumulación de PHA no FBRM axustando a carga orgánica recibida polo BFV. Alcanzouse unha acumulación máxima de PHA do 42% en materia seca, o máximo obtido ata agora nun cultivo mixto de BFV alimentado con residuos. Detectáronse PHA de cadea media como o polihidroxihexanoato, con mellores propiedades físico-químicas en comparación cos PHA de cadea curta, que poderían diversificar as súas aplicacións industriais. Por outra banda, móstranse por primeira vez alternativas á acumulación de PHA: almacenamento de carbono tanto en glicóxeno como en polímeros extracelulares (PE), mentres que os electróns en exceso se derivan a H_2 mesmo en presenza de amoníaco orgánico. Por último, realizouse un estudo estatístico da evolución das comunidades bacterianas para determinar a influencia das variables ambientais na súa variabilidade, como a variación de xéneros na FBRM tras un choque de carga orgánica

Figure R1. Representación esquemática da fotobiorrefinería de tratamento de residuos proposta.



ou que xéneros son os máis destacados cando PHA acumula. Finalmente, realizáronse balances de materiais e enerxía preliminares que indican que a fotobiorrefinería integrada proposta pode ser enerxeticamente sostible, mentres produce 109 kg de PHA por tonelada de sólidos FORSU totais. Estes resultados son prometedores para unha implementación a maior escala dunha fotobiorrefinería baseada en BFV.

Finalmente, a **Sección IV** mostra unha revisión crítica sobre a escala do proceso máis innovador da fotobiorrefinería proposta, o proceso fotoheterótrofo con BFV. O éxito e a viabilidade económica da produción a escala industrial de biopolímeros depende principalmente de como enriquecer cultivos mixtos de BFV capaces de acumular grandes cantidades de PHA e dos principais colos de botella para a ampliación desta tecnoloxía. Coméntanse as vantaxes e inconvenientes de diferentes estratexias para a acumulación de PHA, como o festín e fame ou o festín permanente, tendo este último a clara vantaxe de

poder recuperar ata o 100% de carbono (achegando o sistema á neutralidade de CO₂). unha alta conversión a PHA. En canto ao escalado, conclúese que, posiblemente, a mellor opción son os reactores ao aire libre, empregando principalmente a luz solar natural como fonte de enerxía. Non obstante, indícanse moitas estratexias que poden aumentar o rendemento do proceso, como os sistemas de captación e filtración solar e a dilución espacial da luz, así como estratexias de floculación, granulación, homoxeneización, automatización e modelaxe do sistema que poden ser útiles para o custo. redución, pero aínda deben ser investigados con maior profundidade.

No seu conxunto, este traballo propuxo e probou unha fotobiorrefinería en TRL < 3 co obxectivo de valorar FORSU en PHA e outros produtos de alto valor engadido como biogás, H₂ ou proteína microbiana. Ademais, contribúe a comprender mellor o proceso fotoheterótrofo da produción de PHA por parte de BFV para abrir o camiño para o seu desenvolvemento industrial.

ABSTRACT

The current Doctoral Thesis has been performed in the Department of Chemical and Environmental Technology of Rey Juan Carlos University, englobed in the research line of “Valorisation and characterization of waste materials in the framework of the circular economy”, being funded in the frame of the project BIOTRES (S2018/EMT-4344 BIOTRES-CM, <https://madrid.bio3project.es>). Likewise, a predoctoral stay in the Research Institute for Biosciences of Université de Mons from May 3rd to August 3rd 2021 has been performed during the course of this Doctoral Thesis.

The transition from the current linear economy to a circular economy is one of the big challenges facing our society. One of the main drivers of this paradigmatic shift is the foreseeable depletion of material resources. Efficient resource management, therefore, becomes essential. The increase in municipal solid waste generation represents an environmental and economic cost for society, but at the same time constitutes a source of resources that cannot be squandered. More than half of this waste is a biodegradable material, known as the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Indeed, this is an abundant source of low-cost carbon.

The need to secure the supply of materials and energy and minimize dependence on fossil fuels has promoted the development of biorefineries, which are analogous to oil-based refineries but use organic wastes instead of oil as feedstock. The main objective is to maximize the value derived from components and intermediates by converting them into a range of valuable bio-products and bioenergy. Among these high value-added products, bioplastics are potential substitutes for petroleum-based plastics, ubiquitous in our lives, and cause of severe environmental and ecosystem problems. Among the possible substitutes, polyhydroxyalkanoates (PHA) are an alternative with chemical, thermal and mechanical properties similar to petroleum-based plastics but more environmentally friendly because they are biodegradable and compostable, thus a perfect product to enter the value chains of a circular economy.

Currently, the production of PHA is not economically competitive with traditional plastics. The industrial production of PHA consists of fermentative processes with pure cultures and simple feedstocks such as sugars or carboxylic acids, which makes the process more expensive due to high sterilization and raw material costs. The development of mixed culturing processes, which avoid sterilization, and waste as feedstock, has helped to reduce costs. To further decrease costs, the use of purple phototrophic bacteria (PPB) is a promising approach because of their high metabolic versatility that allows the

treatment of heterogenous wastes and high biomass yields with no aeration requirements.

The most common metabolism of PPB is photoheterotrophy, through which they can use photons emitted by the sun as a source of energy and organic compounds as a source of carbon and electrons. This metabolic profile optimizes the use of organic compounds, as they do not have to derive a part for energy production, as chemotrophic cultures have to do, thus obtaining higher carbon recovery yields. In this way, the mixed PPB cultures can reduce the PHA production costs and open up new biotechnological pathways since they can use short-chain carboxylic acids derived from fermentation processes as cheap and readily available substrates and the sun as an energy source.

The complete valorization of OFMSW has not previously been pursued using mixed PPB cultures as a core technology to produce high value-added products. Most works with mixed PPB cultures involve wastewater treatment, and PHA accumulation is almost exclusively done with pure cultures. The study of complementary thermal and biotechnological pretreatments to transform the OFMSW into a suitable substrate, closing the carbon and energy cycles through anaerobic digestion processes, and optimizing PPB cultivation to achieve competitive yields of PHA and other high value-added products, represents a challenge yet to be exploited. Furthermore, the carbon accumulation pathways and the electron allocation in mixed PPB cultures according to different redox and stress states are also challenging.

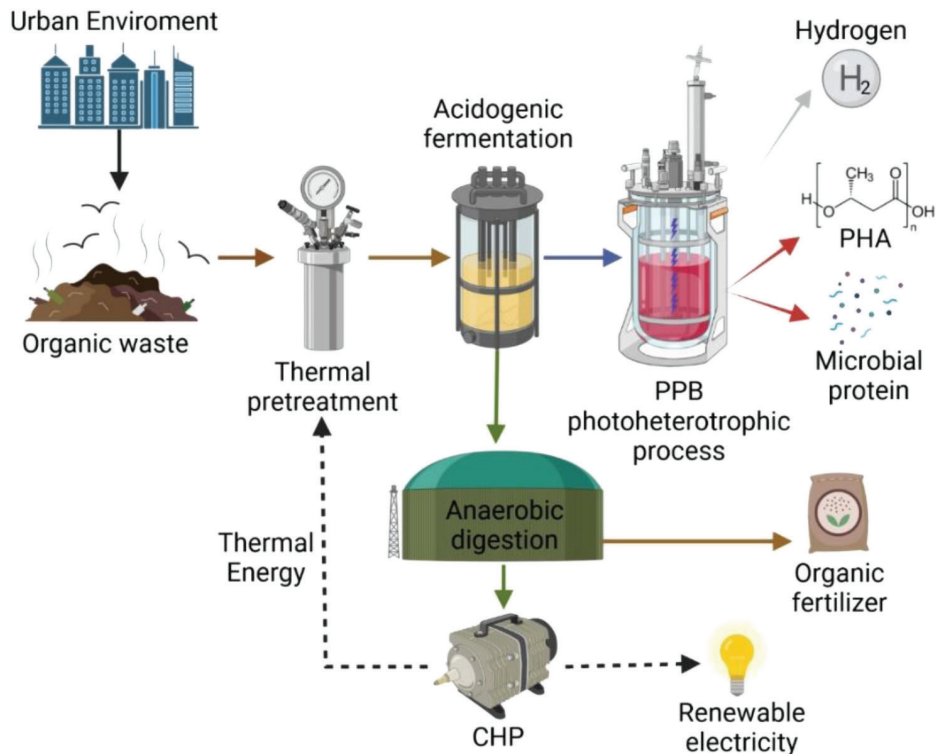
As the OFMSW is highly heterogeneous and may contain toxic compounds, the first challenge of this Thesis was to ascertain that a thermal hydrolysis pretreatment could create a liquid stream upon which PPB could grow and accumulate PHA. **Section I** analyzes a biorefinery proof-of-concept where the thermal hydrolysis pretreatment links with the anaerobic digestion of the resulting solid fraction and a photoheterotrophic process of the liquid fraction with PPB. This proof of concept was studied with a real OFMSW from selective and pre-sorted collection from a waste treatment plant and lignocellulosic waste from pruning. The results showed solubilization of organic matter (COD) in thermal hydrolysis of up to 40%, with very high COD/nutrient ratios, with the temperature being more critical than reaction time. The pretreatment also improves the biodegradability of the OFMSW, compensating the loss of the majority of the carbon present in the liquid fraction through biogas production. This biogas may feed to a cogeneration plant (CHP), resulting in thermal and electrical energy generation that might make the process energetically self-sustainable. Regarding the liquid stream assimilation by the PPB mixed cultures, up to 80% of the COD consumption were achieved with biomass yields around 0.5 gVSS gCOD⁻¹. Furthermore, accumulations of up to 21% dry mass of PHA confirmed the feasibility of the proposed proof-of-concept.

To increase biomass yields and PHA production, the PPB readily assimilate reduced organic compounds such as short-chain carboxylic acids (like acetic, propionic, butyric, and valeric). Therefore, an intermediate pretreatment step, acidogenic fermentation, is proposed in **Section II**. The feasibility of thermophilic co-fermentation of the two most abundant components of the OFMSW is studied: food waste and lignocellulosic residue. This fermentation is studied without and upon thermal pretreatment by steam explosion. The steam explosion pretreatment considerably improves the solubilization of organic matter, and after both processes, percentages of up to 80% of COD in the soluble stream are achieved. In addition, the acidogenic fermentation simultaneously produces H_2 , yielding up to $162 \pm 5 \text{ mlH}_2 \text{ gCOD}^{-1}$. The results clearly showed a positive synergistic effect on the overall efficiency of the co-fermentation between the two wastes and a strong dependence on the distribution of carboxylic acids. Values of up to 0.58 gCOD carboxylic acids per gCOD added with the thermal pre-treatment and acidification extent of 93% (%COD carboxylic acids) were achieved.

Understanding that the combination of thermal pretreatment and thermophilic acidogenic fermentation provides a liquid stream with a high loading of short-chain carboxylic acids, the modified photobiorefinery is proposed in **Section III** (Figure R1). A membrane photobioreactor (MPBR) was used to treat the liquid effluent coming from a continuous acidogenic fermenter fed with the OFMSW hydrolysate obtained after the steam explosion. The solid fraction of the fermentate is recovered through anaerobic digestion.

In this work, we attempted to optimize biomass growth and PHA accumulation in the MPBR by adjusting the organic load of the PPB. A maximum PHA accumulation of 42% (gPHA gVSS⁻¹) was achieved, which is the highest obtained so far in a mixed culture of waste-fed PPB. Medium-chain PHA such as polyhydroxyhexanoate have been detected, which can theoretically improve their physicochemical properties compared to short-chain PHA and could diversify their industrial applications. Furthermore, the section shows, for the first time, alternatives to PHA accumulation: carbon storage in both glycogen and extracellular polymers (EPS) while deriving excess electrons in H_2 even in the presence of ammonium. Finally, a statistical study about bacterial population dynamics has been carried out to establish the environmental variables with the most significant influence on the variability of these bacterial communities. Finally, preliminary material and energy balances were carried out indicating that the proposed integrated photobiorefinery can be energetically sustainable. This work demonstrates the importance of acquiring a thorough understanding of the carbon accumulation and electron allocation strategies of PPB under stressful environmental conditions and shows promising results for a larger scale implementation of a PPB-based photobiorefinery.

Figure R1. Graphical abstract of the proposed waste valorization photobiorefinery.



Finally, **Section IV** critically reviews the scale-up of the most innovative process of the proposed photobiorefinery, the photoheterotrophic process with PPB. The success and economic viability of an industrial-scale production of biopolymers depend mainly on enriching mixed PPB cultures capable of accumulating large amounts of PHA and the main bottlenecks for the scale-up of this technology. The advantages and disadvantages of feast-and-famine vs. permanent feast strategies are discussed, with the latter having advantages such as the possibility of recovering up to 100% carbon (bringing the system close to CO_2 neutrality) with high conversion to PHA. It is concluded that outdoor reactors, with mainly natural solar illumination, are probably the best option for the scaling-up of this technology. However, many strategies can increase the performance of the process, such as solar collection and filtration systems and spatial light dilution, flocculation, granulation, homogenization, automation, and system modeling strategies that can be useful for cost reduction, but still, need to be further investigated.

Overall, this work has proposed and tested at a TRL < 3 photobiorefinery with the aim of valorizing FORSU into PHA and other high-value-added products such as biogas, H₂ and microbial protein. Furthermore, it helps to better understand the photoheterotrophic process of PHA production using PPB to pave the way for its industrial deployment.

ACKNOWLEDGMENT

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. Juan Antonio Melero (Mele) y el Dr. Daniel Puyol (Dani) por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en una disciplina que yo apenas conocía. A Mele le quiero dar las gracias por eliminar con facilidad pasmosa cualquier barrera que yo pudiera delante, por su talante, buen humor y enfoque técnico. A Dani por su paciencia, confianza e innumerables y expertos consejos. A los dos por elevar el nivel de esta tesis por encima de lo que yo solo hubiera sido capaz.

Quiero agradecer también a todos los miembros de Grupo de Ingeniería Química y Ambiental de la universidad, en especial al grupo de tratamiento de aguas. Entre ellos al grupo ASAB: Javier, que me ha enseñado lo necesario para empezar mi tesis, y ha tenido tiempo también de ponerle la guinda; a Sara, la compañera imprescindible, la que me mantuvo cuerdo; a Jerez, la mas madura, pese a su insultante juventud; y Sandra, por su alegría perenne. Pero también a Cintia, ya que esta tesis es tan tuya como mía; y a María por su paciencia, confianza y por dar una visión a esta tesis que nadie más tenía.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de la 230, en especial Igor, persona con la que más horas he compartido y que se ha convertido en un gran amigo. A Plácido, por siempre darme una visión diferente a la mía, a Alex por tu simpatía y a Elena por tus energías de última hora. Pero también a Bea, Mara, Angela, Jorge, Dani F., Miriam y tantos más por enseñarme a ser mejor científico y persona.

Je ne peux oublier de remercier le Dr. Baptiste Leroy pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un séjour de recherche à l'Université de Mons. Merci pour votre aide et vos conseils avisés. Aussi à la déjà Dr. Paloma Cabezas pour votre gentillesse, disponibilité et intelligence, et en bref à tout le laboratoire de protéomique et microbiologie pour votre accueil chaleureux, j'espère vous revoir.

A todos mis amigos, pero especialmente a Álvaro, Juan, Hugo y Román, por compartir alegrías e penas. Y a Fer, Violi e Zugui, porque non esperabais que acabara haciendo esto. Estoy igual de sorprendido que vosotros. A Jarabo, por los apuntes, a las Elenas y a Minho.

A Sara, por ser mi compañera y mejor amiga tantos años. Por soltar el testigo en la última recta para que pudiera correr más rápido. A baxinha, otra vez, y nunca serán suficientes.

Y por último y más importante a mi familia. A mi madre, la persona más inteligente y buena que conozco; a mi padre cuya pasión por aprender

algo me debió de contagiar; a Chichí, mi segunda madre; a mi hermana, por ser la única que me entiende; a mi hermano por el reto y la calma; a Fiz, por tus recursos; a mi abuelo, por ser ejemplo y a Mecía y Celtia, por ser alegría. A todos por darme sostén, seguridad, tranquilidad. Esto es tan vuestro como mío.

LIST OF ABBREVIATIONS

AD = Anaerobic Digestion
ATP = Adenosine Triphosphate
BMP = Biochemical Methane Potential
 B_o = Biodegradable Extent
CA = Carboxylic Acids
CHP = Combined Heat and Power
COD = Chemical Oxygen Demand
Crl = Crystalline Index
CSTR = Continuously Stirred Tank Reactor
DRX = X-Ray Diffraction
ED = Entner-Doudoroff
EMP = Embden-Meyerhof-Parnas
EPS = Extracellular Polymers
FTIR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FW = Food Waste
GC = Gas Chromatography
GHG = Greenhouse Gases
 H_E = Hydrolysis Extent
HRT = Hydraulic Retention Time
HTC = Hydrothermal Carbonization
HTL = Hydrothermal Liquefaction
 K_h = Hydrolysis Constant
 K_M = Specific Phototrophic Activity
LW = Lignocellulosic Waste
MMC = Mixed Microbial Cultures
MPBR = Membrane Photobioreactor
MSW = Municipal Solid Waste
NADH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide
OFMSW = Organic Fraction of Municipal Solid Waste
OLR = Organic Loading Rate
ORP = Oxidation and Reduction Potential
PAR = Photosynthetically Active Radiation
PPS = Pentose-Phosphate Shunt
PCA = Principal Component Analysis
PHA = Polyhydroxyalkanoate
PHB = Polyhydroxybutyrate
PHH = Polyhydroxyhexanoate
PHV = Polyhydroxyvalerate
PPB = Purple Phototrophic Bacteria
 q_{EPS} = EPS Production Rate
 q_{GLY} = Glycogen Production Rate
 q_{PHA} = PHA Production Rate

q_s = Specific Substrate Uptake Rate
RDA = Redundant Analysis
SCCA = Short-Chain Carboxylic acids
SCOD = Soluble Chemical Oxygen Demand
SRT = Sludge Retention Time
TCOD = Total Chemical Oxygen Demand
TKN = Total Kjeldahl Nitrogen
TP = Total Phosphorus
TS = Total Solids
TSS = Total Suspended Solids
UASB = Upflow Anaerobic Sludge Blanket
VS = Volatile Solids
VSS = Volatile Suspended Solids
 Y_{EPS} = Extracellular Polymer Yield
 Y_{GLY} = Glycogen Yield
 Y_{PHA} = PHA Yield
 $Y_{X/S}$ = Biomass Yield

PUBLICATIONS, ORAL AND POSTER COMMUNICATIONS

Publications

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2020). Food waste valorization by purple phototrophic bacteria and anaerobic digestion after thermal hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105803. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105803>

Impact factor 5.06, ranking 36 out of 159 in Biotechnology and Microbiology (Q1).

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2020). Novel approach for the treatment of the organic fraction of municipal solid waste: Coupling thermal hydrolysis with anaerobic digestion and photo-fermentation. *Science of the Total Environment*, 714, 136845. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136845>

Impact factor 7.93 ranking 25 out of 274 in Environmental Sciences (Q1).

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2021). Synergistic thermophilic co-fermentation of food and lignocellulosic urban waste with steam explosion pretreatment for efficient hydrogen and carboxylic acid production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16, 499-509. <https://doi.org/10.1002/bbb.2318>

Impact factor 4.75 ranking 11 out of 91 in Agronomy (Q1).

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2021). Integrated sustainable process for polyhydroxyalkanoates production from lignocellulosic waste by purple phototrophic bacteria. *GCB Bioenergy*, 13, 862-875. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12807>

Impact factor 4.10 ranking 54 out of 160 in Biotechnology and Applied Microbiology (Q2).

Fradinho, J., **Allegue, L. D.**, Ventura, M., Melero, J. A., Reis, M. A. M., and Puyol, D. (2021). Up-scale challenges on biopolymer production from waste streams by Purple Phototrophic Bacteria mixed cultures: A critical review. *Bioresource Technology*, 327, 124820. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124820>

Impact factor 9.64 ranking 12 out of 159 in Biotechnology and Applied Microbiology (Q1).

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2021). Unravelling PHA production from urban organic waste with purple phototrophic bacteria via organic overload. *Renewable and Sustainable Energy Reviews. Provisionally Accepted*.

Impact factor 14.98 ranking 7 out of 114 in Energy and Fuels (Q1).

In Progress

Villamil, J. A., **Allegue, L. D.**, Pérez-Elvira, S., Martinez, F., Melero, J. A., and Puyol, D. (2022). New concept for valorization of OFMSW : coupling steam explosion pretreatment with PHA production by purple phototrophic bacteria, and anaerobic digestion. *In preparation*

Gamboa, M., **Allegue, L. D.**, Puyol, D., Dugour, J., and Melero, J. A. (2022). Environmental life cycle assessment of polyhydroxyalkanoates production by purple phototrophic bacteria. *In preparation*.

Other publications

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., Baptiste, L. and Puyol, D (2022). Release of crotonic acid in anaerobic photoheterotrophs: a new metabolic mechanism for attaining redox homeostasis in high organic conditions. *In preparation*.

Allegue, L. D., Molina, R., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2022). Electron and carbon allocation as the key for modelling polyhydroxyalkanoates production by purple phototrophic bacteria mixed cultures. *In preparation*.

Oral Communications

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2019). Integrated photo-biorefinery for OFMSW valorisation to high value-added products and energy in *3rd ANQUE-ICCE International Congress of Chemical Engineering*, Santander, Spain.

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2020). Nonlinear parameter and uncertainty estimation of anaerobic digestion kinetics on hydrothermally pretreated lignocellulosic waste in *Conference on Biogas Production and Digestate Valorisation* (online), Madrid, Spain.

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2020). Valorización de biorresiduos urbanos mediante el acoplamiento de procesos de hidrólisis térmica, digestión anaerobia y fotosíntesis anaerobia in *XIV Conference on Biomethanisation of solid urban waste* (online), Barcelona, Spain.

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2020). Maximizing PHA production from acetate, propionate and butyrate using Purple Phototrophic Bacteria in Workshop 2020 Innovative technologies for sustainable management of urban and industrial waste streams (online), Madrid, Spain.

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2021). A cost-effective integrated process for PHA production from lignocellulosic waste: A new anaerobic

biorefinery in *8th International Conference on Sustainable Solid Waste Management* (online), Thessaloniki, Greece.

Villamil, J. A., **Allegue, L. D.**, Pérez-elvira, S., Martinez, F., Melero, J. A., and Puyol, D. (2021). Optimization of steam explosion pretreatment to improve anaerobic biodegradability of municipal solid organic waste in *8th International Conference on Sustainable Solid Waste Management*, Thessaloniki (online), Greece.

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2022). Organic load affects carbon and electron allocation in OFMSW photobiorefinery of purple phototrophic bacteria for PHA accumulation in *9th International Conference on Sustainable Solid Waste Management*, Corfu, Greece.

Allegue, L. D., Ventura, M., Melero, J. A., and Puyol, D. (2022). Alternative carbon and electron allocation hold the key to the production of PHA terpolymer in high organic load domestic streams by purple bacteria in *12th Micropol and Ecohazard Conference*, Santiago de Compostela, Spain.

Poster Presentation

Allegue, L. D., Puyol, D., and Melero, J. A. (2019) Foto-biorefinería para la conversión de residuos orgánicos urbanos en productos de alto valor añadido in *IWA Young Water Professionals Spain Conference 2019*, Madrid, Spain.

Zamora, P., Marín, E., **Allegue, L.D.**, Villamil, J., Martínez, F., Melero, J.A., Puyol, D., Rogalla, F., Monsalvo, V. (2020). DEEP PURPLE: Purple Phototrophic Bacteria for the development of low-cost treatment of mixed urban bio-wastes in *IWA World Water Congress and Exhibition*, Copenhagen, Denmark.

Projects

The research carried out in this Thesis was performed in the frame of the **BIOTRES project** (Urban Bioeconomy: biowaste to biofuels and highly added-value bioproducts) [S2018/EMT-4344 BIOTRES-CM, <https://madrid.bio3project.es>]. Co-financed by the Regional Government of Madrid, the European Social Fund and the European Regional Development Fund.

In addition, some results of this Thesis have been incorporated into **the DEEP PURPLE project** (Conversion of diluted mixed urban biowastes into sustainable materials and products in a flexible purple photobiorefinery) [Grant agreement No 837998, <https://deep-purple.eu/>] which have been funded by the Bio Based Industries Joint Undertaking under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program by grant agreement No.: 837998.