

Treball de Fi de Grau Experimental

Valorització de subproductes de la indústria de begudes vegetals com a medi de cultiu per la producció de proteïnes unicel·lulars

ANNA PABÓN LLORENTE

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Pablo Martin Binder

Co-tutor: Laura Foix Pericot

Vic, juny de 2023

Agraïments

Vull expressar el meu sincer agraïment a Beta Technological Center per donar-me l'oportunitat de realitzar aquest projecte. Remarcar la gran ajuda que m'han brindat Pablo Binder Martin i Laura Foix Pericot durant totes les fases del projecte. Durant aquesta estada he après el que implica elaborar un projecte d'investigació i totes les consideracions que comporta. M'han ensenyat com elaborar un estudi experimental des de 0 i com construir tots els passos de la fase prèvia, la fase experimental, el processament de les dades i l'elaboració d'aquest treball. A més, agraeixo totes les vegades que han escoltat i tingut en compte la meva opinió durant aquesta etapa. M'he sentit molt ben acollida i recomanaria molt l'experiència.

També m'agradaria agrair el recolzament que he rebut per part dels meus amics i parella en els moments més durs. La seva empenta m'ha fet seguir endavant i no rendir-me tot i els entrebancs.

Per últim m'agradaria agrair a la meva família pel recolzament que m'han donat en aquest treball i durant tota la carrera, sense ells no hagués estat possible. I a la meva germana que ha escoltat tants cops la lectura d'aquest treball.

Resum

Títol: Valorització de subproductes de la indústria de begudes vegetals com a medi de cultiu per la producció de proteïnes unicel·lulars

Autora: Anna Pabón Llorente

Co-Tutors: Pablo Martin Binder i Laura Foix Pericot

Data: Juny de 2023

Paraules clau: Aprofitament de subproductes, Bioprocés anaerobic, *Cereibacter sphaeroides*, Economia circular, PNSB, Proteïnes Alternatives.

Segons les xifres de la Unió Europea (UE), es generen 88 milions de tones a l'any de residus alimentaris que suposen un 20% dels aliments produïts. D'aquests 88 milions, un 19% prové del processament de productes. Per intervenir en aquest problema i trobar una solució per reduir els residus del processament de productes s'ha identificat un sector de la indústria emergent com són les begudes vegetals amb uns subproductes rics en matèria orgànica.

Alhora, els Bacteris Porpra No Sulfurosos (PNSB, en anglés *Purple Non-Sulphur Bacteria*) són capaços de degradar àcids orgànics amb molta facilitat i produir Proteïna Unicel·lular o SCP (Single Cell Protein). Els PNSB constitueixen un grup altament heterogeni on la seva principal característica és l'habilitat per fer fotosíntesi anoxigènica o foto-fermentació, ja que tots els membres del grup PNSB poden sobreviure en absència d'oxigen quan hi ha una font de llum disponible o amb presència d'oxigen.

Inicialment, en aquest projecte s'ha avaluat diferents medis de cultiu potencials per al creixement del bacteri *Cereibacter Sphaeroides*, pertanyent a PNSB, a base de subproductes de la indústria de les begudes vegetals. S'han determinat l'*input* i l'*output* de cada batch i s'han analitzat els nutrients essencials per donar resposta als resultats obtinguts. A més, s'observa una productivitat i una producció proteïna estadísticament igual substituint el 50% del medi sintètic amb extractes del subproducte de soja i de diferents cereals de la indústria. També s'ha aconseguit fer créixer el bacteri en un medi amb un 95% de subproducte i només suplementant amb un 5% d'àcids orgànics.

D'aquesta manera, reduïm no només els subproductes del segon sector que més residus genera a nivell europeu, sinó que també reduïm els costos de producció de proteïna alternativa com a mínim a la meitat.

Summary

Title: Valorization of by-products from the plant-based beverage industry as a culture medium for the production of Single Cell Proteins

Author: Anna Pabón Llorente

Co-Supervisors: Pablo Martin Binder and Laura Foix Pericot

Date: June 2023

Keywords: Alternative Proteins, Anaerobic bioprocess, By-products utilization, *Cereibacter sphaeroides*, Circular economy, PNSB.

According to the European Union (EU), 88 million tonnes of food waste are generated each year, which accounts for 20% of the food produced. Of these 88 million tonnes, 19% comes from product processing. To address this issue and find a solution to reduce waste from product processing, an emerging sector in the industry has been identified, such as plant-based beverages, which generate organic-rich waste.

At the same time, Purple Non-Sulphur Bacteria (PNSB) are capable of easily degrading organic acids and producing Single Cell Protein (SCP). They constitute a highly heterogeneous group, and their main characteristic is the ability to perform anoxygenic photosynthesis or photo-fermentation. All members of the PNSB group can survive in the absence of oxygen when a light source is available or in the presence of oxygen without performing photosynthesis.

Thus, this project has used by-products from the plant-based beverage industry to cultivate *Cereibacter Sphaeroides*, where similar protein productivity and production have been observed by replacing 50% of the synthetic medium with extracts from soybean waste and different cereal waste from the industry. We have also achieved bacterial growth in a medium containing 95% by-products and only supplemented with 5% organic acids. Analytical methods have been used to determine the concentrations of Nitrogen, Ammonia, Phosphorus, Carbon, and protein in the input and output of each batch. Additionally, the growth rate has been determined, and a comparison has been made between the different variables of the culture medium and the reference medium, considering all the measured parameters such as productivity, percentage of protein produced, Nitrogen removal, COD removal, turbidity, pH.

In this way, we not only reduce waste from the second highest waste-generating sector in Europe but also cut alternative protein production costs by at least half.

Índex de Continguts

1. Introducció.....	1
1.1. La necessitat de fonts de proteïna alternativa per a alimentació humana i animal.....	1
1.2. Biomassa microbiana com a font de proteïna alternativa.....	2
1.3. L'ús de <i>Cereibacter sphaeroides</i> com a font potencial de proteïna alternativa.....	4
1.4. Valorització de subproductes de la indústria alimentària per a la producció de proteïna alternativa.....	5
2. Objectius.....	7
3. Metodologia.....	8
3.1. Disseny d'estudi.....	8
3.2. Entorn.....	8
3.3. Intervencions.....	9
3.3.1. Expansió del cultiu.....	9
3.3.2. Inoculació del medi.....	9
3.3.3. Tractament dels subproductes de la indústria de begudes vegetals i preparació dels medis de cultius.....	10
3.3.4. Set Up Bioreactors.....	12
3.3.5. Cultiu de <i>Cereibacter sphaeroides</i>	13
3.3.6. Control i quantificació de la biomassa.....	14
3.3.7. Concentració de biomassa microbiana.....	14
3.3.8. Determinació del pes fresc, pes sec i percentatge de sòlids.....	16
3.3.9. Anàlisis fisicoquímics.....	16
3.3.9.1. Determinació de pH, Conductivitat Elèctrica, Demanda química d'oxigen.....	16
3.3.9.2. Determinació de Nitrogen.....	17
3.3.10. Determinació de fòsfor.....	18
3.3.11. Tests estadístics.....	18
4. Resultats.....	20
4.1. Composició del medi.....	20
4.2. Cinètica de creixement segons el medi de cultiu.....	21
4.3. Paràmetres de rendiment de diferents medis per al cultiu fotoheterotròfic de <i>C. sphaeroides</i>	24
5. Discussió.....	27
6. Conclusions.....	29
6.1. Limitacions i millores a realitzar en projectes futurs.....	30
7. Bibliografia.....	31

Llistat d'acrònims

BETA: Biodiversitat, Ecologia, Tecnologia Ambiental i Alimentària.

BHI: *Brain Heart Infusion*

CA: Medi d'extracte de cereals suplementat al 5% amb Acetat de Sodi

CARG: *Compound Annual Growth Rate*, Taxa de creixement anual

CE: Conductivitat Elèctrica

CM: Medi d'extracte de cereals suplementat al 50% amb medi sintètic (Medi Glucosa)

COD: *Chemical Oxygen Demand*, Demanda química d'oxigen

DO: Densitat Òptica

DW: *Dry Weight*, Pes Sec

EU: *European Union*, Unió Europea

FW: *Fresh Weight*, Pes humit

GM: Medi Glucosa

PNSB: *Purple Non-Sulphur Bacteria*, Bacteris Porpres No Sulfurosos

PPB: *Purple Phototrophic Bacteria*, Bacteris fototròfics liles

PSB: *Purple Sulfur Bacteria*, Bacteris Porpres del Sofre

SCP: *Single Cell Protein*, Proteïna Unicel·lular

SM: Medi d'extracte de soja suplementar al 50% amb medi sintètic (Medi Glucosa)

SB: Medi d'extracte de soja

1. Introducció

1.1. La necessitat de fonts de proteïna alternativa per a alimentació humana i animal

La població mundial està en augment i es preveu que arribi als 9.800 milions l'any 2050 (National Geographic, 2017). Aquest creixement de la població preveu una producció ramadera de 455 milions de tones el 2050, que és un 40% més alta que la xifra reportada el 2019 (Organization for Economic Co-operation and Development/Food and Agricultural Organization, 2022). A més, la producció ramadera contribueix en un 14,5% a les emissions de gasos d'efecte hivernacle, els quals tenen un major potencial d'escalfament global que el diòxid de carboni i per tant representen un dels problemes climàtics d'urgència. Per aquest mateix motiu són necessàries solucions més radicals per garantir la disponibilitat d'aliments d'una manera ambientalment sostenible. A més, la creixent demanda mundial de carn, juntament amb els impactes ambientals associats a la producció de carn convencional, ha conduït a la recerca de noves tecnologies per a la producció de proteïnes alternatives (Datar & Betti, 2010).

Algunes fonts de proteïna alternativa són la carn cultivada, els anàlegs de la carn a base de vegetals, les proteïnes d'insectes i les proteïnes de cèl·lules individuals (Lynch et al., 2020).

En el cultiu de carn a partir de cèl·lules s'obtenen mostres de cèl·lules animals, com ara cèl·lules mare o cèl·lules musculars, de manera no invasiva. Aquestes cèl·lules es col·loquen en un medi de cultiu ric en nutrients i factors de creixement per promoure la seva proliferació i multiplicació. A mesura que les cèl·lules es multipliquen, passen per diferents etapes de diferenciació per convertir-se en teixit muscular. A continuació, es transfereixen a un biorreactor o un entorn similar on poden continuar creixent i desenvolupant-se. Un cop el teixit muscular cultivat ha assolit la maduresa i ha adquirit les característiques desitjades, es pot recol·lectar i utilitzar per a la producció d'aliments, com ara hamburgueses o altres productes càrnics (Mironov & Levenberg, 2006).

Els anàlegs de carn de base vegetal són productes dissenyats per mimetitzar la carn animal, però elaborats exclusivament amb ingredients d'origen vegetal. Actualment, per a la seva producció solen emprar-se ingredients com proteïnes vegetals (soja, gluten de blat), cereals, llegums i altres fonts vegetals riques en nutrients. Cal tenir en compte, que la producció d'aquests implica l'ús de sòl fèrtil i recursos hídrics. En quant als mètodes de producció, existeixen diverses tecnologies i processos utilitzats per obtenir una textura i una aparença similars a la carn animal. Aquests processos inclouen l'extrusió, la texturització i l'ús de tècniques de fermentació per millorar les propietats organolèptiques i nutricionals del producte final (Sánchez, Vázquez, Soto & Sáenz, 2020).

Els insectes són una font rica en proteïnes, aportant una alternativa sostenible i més eficient en termes de recursos en comparació amb altres fonts de proteïnes convencionals. Els insectes tenen un alt contingut de nutrients, com àcids grassos essencials, vitamines i minerals, que els fa una opció nutricionalment interessant. Es troben molts beneficis del consum d'insectes des d'un punt de vista ambiental, destacant que requereixen menys aigua, terra i aliments per créixer en comparació amb la producció de carn tradicional. Això podria tenir un impacte positiu en la seguretat alimentària global, especialment en regions amb recursos limitats (van Huis, 2013). Per altra banda, malgrat les autoritats europees estan facilitant la introducció d'aquest tipus de productes, l'acceptació del consumidor és una qüestió limitant.

Per últim, la biomassa microbiana, que inclou una àmplia varietat de microorganismes com a bacteris, llevats i fongs, és rica en proteïnes i pot ser cultivada eficientment en diverses fonts de nutrients, incloent-hi subproductes agrícoles i residus orgànics. Aquesta capacitat de produir proteïna o energia (Muñoz & Olivares, 2013) a partir de recursos no convencionals ofereix una alternativa prometedora i més sostenible als mètodes tradicionals de producció de proteïna, com ara la cria d'animals o els cultius de proteïna vegetal (Santos, Gouveia & Raymundo, 2020, Muñoz & Olivares, 2013).

1.2. Biomassa microbiana com a font de proteïna alternativa

La producció de biomassa microbiana pot ser realitzada a través de diversos processos, com ara la fermentació i la fotobiosíntesi, i aquesta biomassa pot ser utilitzada posteriorment per a la producció de bioenergia o com a proteïnes alternatives. Hi ha factors clau que afecten la producció, com ara les condicions de cultiu, el tipus de microorganisme utilitzat i les fonts de nutrients (Muñoz & Olivares, 2013).

La biomassa microbiana destaca per la seva capacitat de ser produïda eficientment a partir de recursos no convencionals i la seva composició nutricional conté un ampli espectre d'aminoàcids essencials i altres nutrients essencials, com ara àcids grassos omega-3 i vitamines del grup B (Santos, Gouveia & Raymundo, 2020).

Així doncs, tot i que existeixen diferents tipus de gèneres i famílies bacterianes per la producció de proteïnes microbianes, com ara les Enterobacteries, *Pseudomonas* o *Bacillaceae*, el grup dels Bacteris fototròfics liles (*Purple Phototrophic Bacteria, PPB*) i els dels Bacteris Porpres No Sulfurosos (*Purple Non-Sulfur Bacteria, PNSB*) presenten unes característiques molt esperançadores.

Els PPB són un grup divers de bacteris anoxigènics. Els PPB tenen la capacitat de realitzar la fotosíntesi anoxigènica, el que les fa aptes per a entorns amb poca o cap disponibilitat d'oxigen. A més, els PPB poden fixar el nitrogen atmosfèric i convertir-lo en compostos nitrogenats utilitzables pels organismes vius, el que és important en ecosistemes amb limitació de nitrogen. També són capaços d'utilitzar diferents fonts de

llum per a la seva fotosíntesi, el que els permet adaptar-se a diverses condicions ambientals. Els PPB exhibeixen una gran plasticitat metabòlica, sent capaços d'adaptar-se a canvis en les condicions ambientals i aprofitar les fonts d'energia disponibles. Això fa que els PPB tinguin un potencial aplicatiu en àmbits com la biotecnologia, amb aplicacions com la producció de biocombustibles o altres fonts d'energia, fertilitzants o alimentació animal (Artikel et al., 2014). Dins el grup dels PPB s'hi poden diferenciar els Bacteris Porpres del Sofre (*Purple Sulfur Bacteria*, PSB) i els PNSB. Els primers són principalment fotoautotròfics i utilitzen compostos de sofre reduït com a font donadora d'electrons (Capson Tojo et al., 2020). D'altra banda, els

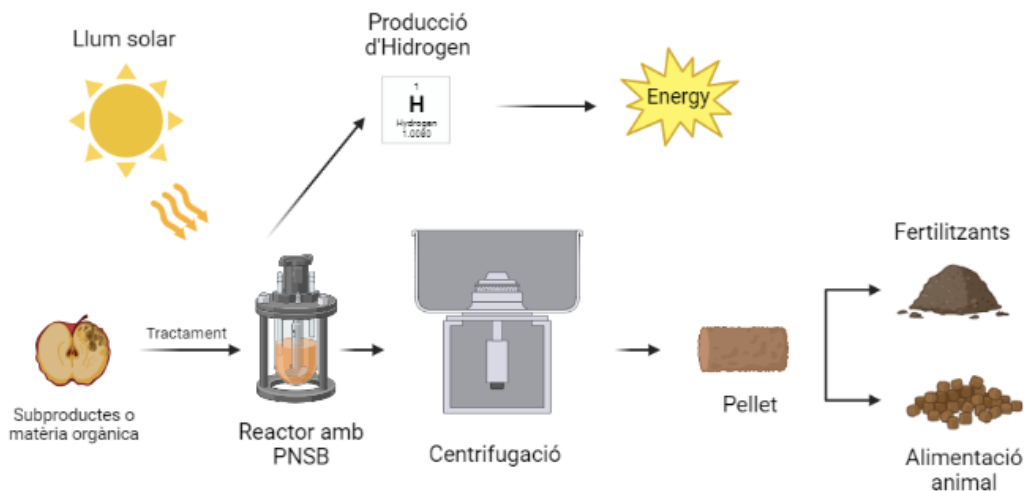


Figura 1. Possibles aplicacions de l'ús de PPB (Purple Phototrophic bacteria) (Capson Tojo 2020). Realització pròpia amb BioRender

PNSB són un grup de bacteris principalment fotoheterotròfics que tenen la capacitat de produir proteïnes de qualitat i destaquen per la seva capacitat per adaptar-se a diferents condicions ambientals i fonts de nutrients.

Els PNSB poden ser cultivats de manera sostenible i por produir una font alternativa prometedora de proteïna de qualitat (gràcies a la seva composició en aminoàcids essencials i alt valor biològic) per a l'alimentació animal, especialment en el context de la necessitat creixent de trobar alternatives als recursos tradicionals. Alhora poden produir altres fonts d'energia com l'Hydrogen (Figura 1). Per tant, són molts els beneficis potencials d'utilitzar les PNSB com a font de proteïna, com ara la seva disponibilitat, la capacitat per adaptar-se a diferents condicions ambientals i fonts de nutrients, la sostenibilitat i baixa empremta ambiental (Barros, Gonçalves, Simões & Pires, 2019). Alguns tipus de PNSB (per exemple, *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* i *Rhodospirillum rubrum*) han servit de model durant segles per l'estudi dels fonaments de la generació d'energia biofotòtica i la fixació de carboni i nitrogen (Capson Tojo et al., 2020).

1.3. L'ús de *Cereibacter sphaeroides* com a font potencial de proteïna alternativa

Cereibacter sphaeroides, anteriorment conegut com *Rhodobacter sphaeroides*, és un bacteri fototròfic amb nivell de bioseguretat 1 que normalment es troba al sòl o en ambients aquàtics com estancs i llacs. Té forma esfèrica i es mou mitjançant flagels. Aquest bacteri té una sèrie de característiques úniques que el fan interessant per a la investigació en biotecnologia, com ara la seva capacitat d'adaptació a diferents condicions ambientals i la capacitat de sobreviure en ambients extrems, com en aigües contaminades amb metalls pesants. A més, té diferents tipus de metabolisme amb diferents tipus d'aplicacions (Kumar & Gayen, 2021):

1. Metabolisme fotoheterotròfic: El bacteri és capaç de realitzar la fotosíntesi anoxigènica i obtenir energia de la llum, però també necessita una font d'energia orgànica per al seu creixement i metabolisme.
2. Metabolisme quimioheterotròfic: Amb aquest metabolisme, el microorganisme es capaç de realitzar la fotosíntesi anoxigènica i obtenir l'energia a través de reaccions químiques amb compostos orgànics o inorgànics.
3. Metabolisme fotoautotròfic: Realització de la fotosíntesi anoxigènica i aprofitament de la llum com a font d'energia, així com fixació del diòxid de carboni per a la pròpia biosíntesi, obtenint els carbonis necessaris per al seu creixement.
4. Metabolisme quimioautotròfic: Pot realitzar la fotosíntesi anoxigènica i obtenir l'energia de reaccions químiques amb compostos inorgànics, mentre fixa el diòxid de carboni pel seu creixement i biosíntesi.

Una altra característica important de *Cereibacter sphaeroides* és la seva capacitat per metabolitzar una àmplia varietat de compostos orgànics, incloent hidrocarburs, alcohols i àcids orgànics. Això fa que aquest bacteri sigui útil per a la bioremediació de sòls contaminats per compostos orgànics tòxics o pel tractament d'aigües o de residus de composició orgànica, tot i que també s'ha fet servir en estudis de biodegradació i en la producció de bioplàstics (Parshina et al., 2017).

La característica més interessant pel tipus de projecte de revalorització que es planteja és el metabolisme fotoheterotròfic de *Cereibacter sphaeroides*, del qual destaca la seva capacitat per dur a terme la fotosíntesi bacteriana (Frigaard & Sakurai, 2004) a partir de l'absorció i l'ús tant la llum visible (400-700 nm) com la regió infraroja (700-900 nm) (Fuentes et al., 2018). D'aquesta manera, aquest bacteri pot produir energia a partir de la

llum solar, gràcies pigments fotosintètics que son capaços de captar la llum i convertir-la en energia a més de produir productes de valor, com pigments, àcids orgànics i compostos antioxidants.

A més, *Cereibacter sphaeroides* és capaç de produir altres compostos d'interès biotecnològic, com ara proteïnes, polisacàrids o hidrogen. Aquests molècules poden ser utilitzades en la producció d'aliments, medicaments, materials biodegradables (Amoozegar et al., 2011), biofuels o neteja d'aigües. A més dels compostos que se'n pugui extreure, la pròpia biomassa microbiana, la qual és rica en contingut proteic, és potencialment aplicable en alimentació animal o com a fertilitzant.

En resum, *Cereibacter sphaeroides* és un bacteri amb una àmplia gamma de característiques i d'aplicacions que el converteixen en un gran candidat per la realització d'aquest projecte de revalorització de subproductes.

1.4. Valorització de subproductes de la indústria alimentària per a la producció de proteïna alternativa

Podríem dir que el segle XXI és el període històric on s'estan registrant els nivells més alts de contaminació i, d'entre altres raons es troba la sobreproducció i del poc aprofitament de moltes matèries i residus. És el segle on estem veient les conseqüències dels nostres actes en l'àmbit climàtic i econòmic.

Tot i que molts d'aquests canvis probablement no són reversibles, podem col·laborar a reduir l'impacte ambiental de les nostres activitats a partir d'ara i així minimitzar el ritme en què sobreexplotem la terra. És clar que no canviarem el sistema econòmic o polític, i que les grans empreses del sector agro-alimentari seguiran produint a grans masses per alimentar una part de la població mundial. La qüestió està en el fet que la producció i/o processament d'aquests aliments generen grans quantitats de residus i subproductes.

Segons les xifres de la Unió Europea (UE) es generen 88 milions de tones a l'any de residus alimentaris que suposen un 20% dels aliments produïts (Infografia, 2017). Com a solució la UE promou el reciclatge i la reutilització de residus o subproductes amb tota classe d'ajuts com per exemple *l'European rural development strategies* (Infografia, 2017).

Així i tot, el processament de productes alimentaris s'identifica com a gran part del problema, ja que aquest sector s'emporta el segon percentatge més alt amb un 19% de malbaratament, després de les llars que suposen un 50% (Infografia, 2017). És per això que, donades aquestes dades i tenint en compte que aquest no és un factor en el qual poguem influir des d'aquest treball, els resultats obtinguts podrien buscar la solució per minimitzar l'impacte en els residus del sector agro-alimentari que és l'encarregat del

processament dels aliments i reutilitzar els residus d'aquest com a matèria primera. La biotecnologia presenta alternatives a l'explotació de matèries primeres per un major aprofitament dels recursos i un menor malbaratament d'aquests.

D'altra banda, el consum de llet o els seus derivats, és un grup d'aliment àmpliament consumit arreu del món degut al seu potencial nutricional. Tot i així, cada cop hi ha més consum de begudes vegetals, sobretot en països més desenvolupats. El mercat mundial de la llet d'origen vegetal és un mercat emergent amb una previsió de futur d'augmentar una CAGR de l'11,9% des del 2022 fins al 2029 per assolir els 42.860 milions de dòlars el 2029, per tant, podem assegurar que hi haurà disponibilitat de matèria primera un llarg temps (Yumda, 2022). Algunes empreses de begudes vegetals els llencen i han de pagar per aquest rebuig, per tant, intentar valoritzar-lo és una molt bona alternativa, a més, podria contribuir a la disminució de costos de producció.

La família PNSB, i en particular *Cereibacter sphaeroides*, presenten unes característiques metabòliques d'interès per tractar aquest tipus de subproductes i alhora, produir SCP com una font de proteïnes alternativa. A més, tenint en compte que aquests subproductes són rics en nutrients com Nitrogen i Carboni, i són potencialment bons candidats pel cultiu de PSNB, en concret *C. sphaeroides*.

2. Objectius

- Contribuir a l'economia circular i a la reducció del malbaratament de recursos a través de l'aplicació de biotecnologia en l'aprofitament de subproductes del sector agroalimentari.
- Explorar les possibilitats de reutilització dels subproductes de la indústria de begudes vegetals com a matèria primera d'un medi de cultiu per *Cereibacter sphaeroides*.
- Estudiar el rendiment, creixement i la producció fotoheteròtrofa de *Cereibacter sphaeroides* emprant dos subproductes representatius de la indústria de begudes vegetals del nostre territori.
- Evaluar la qualitat de la biomassa de *C. sphaeroides* obtinguda en diferents condicions de cultiu com a possible font de proteïna per a consum animal.

3. Metodologia

En el següent apartat es reflexa la metodologia per l'elaboració del Treball de Fi de Grau. Concretament, es detalla el disseny experimental, el disseny dels bioreactors, diversos anàlisis fisicoquímics, la composició dels medis emprats i altres dades d'interès.

3.1. Disseny d'estudi

L'experiment que s'ha dut a terme és un experiment controlat on, sota les condicions òptimes de creixement de *Cereibacter sphaeroides*, s'ha provat diferents extractes a base de subproductes de la indústria de begudes vegetals i a diferents concentracions, com a base de medi de cultiu pel bacteri.

L'estudi s'ha realitzat amb diferents composicions de medi per tal de provar la seva viabilitat i eficàcia. Tots els subproductes a partir dels quals s'ha obtingut els extractes utilitzats com a medis de cultiu per a *C. sphaeroides*, provenen de la mateixa empresa. Concretament, s'ha utilitzat dos tipus de subproductes, la diferència dels quals roman en la seva composició, ja sigui en únicament subproducte de beguda vegetal a base de soja, o bé d'una mescla de cereals representativa de tot el ventall de productes que processen a la indústria en qüestió.

Per l'etapa de cultiu es va dissenyar un espai on mantenir les condicions òptimes de creixement per *Cereibacter sphaeroides*. Aquest disseny comprèn un entorn aïllat d'unes dimensions de 40 x 40 x 40 cm on s'hi van situar els reactors per al cultiu fotoheteròtrof de *C. sphaeroides*. Tant les condicions de llum com de temperatura eren proporcionades per una font de llum infraroja (Philips PAR38 IR 100W E27 230V Red 1CT/12) que a més d'emetre la longitud d'ona òptima de 700-900 nm (Fuentes et al., 2018) pel creixement de *Cereibacter sphaeroides*, proporcionava la calor necessària per mantenir la temperatura adequada d'entre 26 °C i 30 °C (Fuentes et al., 2018). Per evitar sobre-escalfaments del sistema, es va incorporar un ventilador a un extrem superior. El pH òptim pel bacteri es de 6,5-9 (Fuentes et al., 2018), el que sotmet el cultiu a un control constant de pH.

Tots els cultius de *Cereibacter sphaeroides* es van dur a terme emprant el metabolisme anaeròbic i fotosintètic, i es van fer en format *batch* de duració variable segons el tipus d'experiment, contemplant sempre 2 o 3 replicats per tal d'avaluar degudament els resultats obtinguts.

3.2. Entorn

Aquest projecte es va dur a terme al Centre Tecnològic en Biodiversitat, Ecologia, Tecnologia Ambiental i Alimentària (BETA). Aquest centre va néixer al juny de 2014

per donar impuls a l'activitat investigadora en el camp de les tecnologies ambientals a la Universitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC). La principal missió del Centre Tecnològic BETA és ser un actor rellevant per al desenvolupament tecnològic, la millora de la competitivitat i la qualitat de vida de les societats rurals. (Beta Tech Center, s. f.)

3.3. Intervencions

3.3.1. Expansió del cultiu

Es duu a terme la sembra de *Cereibacter sphaeroides* (Colección Española de Cultivos Tipo (n.d.)) a una placa de petri amb medi Brain Heart Infusion (BHI) Agar i es deixa créixer durant 72 h a 27.5 °C, en condicions de foscor i aerobiosi. A continuació, amb una nansa de *kolle* es recol·lecten totes les colònies crescudes (si s'observa el cultiu amb unes característiques adequades i homogeneïtat). Aquesta nansa s'introdueix al *kit* d'ultracongelació que conté unes boles que s'impregnen amb el bacteri. Aquest *kit* es congela per tenir disponible el bacteri per inocular i utilitzar-lo tantes vegades com boles hi hagi, només caldrà traspasar-ne una al medi de cultiu.

3.3.2. Inoculació del medi

La inoculació del medi comporta un període de creixement de 3 dies a 27,5 °C, en condicions d'aerobiosi, foscor i agitació (120 rpm, P-Selecta Rotabit). Prèviament a aquest període es prepara medi BHI estèril amb una concentració de 37 g/L. S'introdueix una bola del *kit* d'ultracongelació mencionat a l'apartat 3.3.1 *Expansió del cultiu* a un erlenmeyer amb 50 mL de medi BHI doblement estèril (autoclavat en P-Selecta Presoclave-II i filtrat amb un filtre de xeringa estèril de 0,22 µm) i es tapa amb un tap que permet l'intercanvi de gasos. Alhora es prepara un control negatiu del medi BHI.

Un cop passat aquest període de creixement de 3 dies, el contingut es centrifuga a 1 °C i 4200 rpm (ThermoScientific SL Plus Series) per separar el medi BHI dels bacteris. El pellet es renta amb aigua destil·lada estèril, i es torna a centrifugar. Seguidament, es resuspén el pellet de biomassa en el medi en que creixerà el bacteri al reactor. Per últim amb aquest volum resuspès s'inocula el bioreactor per aconseguir una proporció 1:10 (v:v).

3.3.3. Tractament dels subproductes de la indústria de begudes vegetals i preparació dels medis de cultius

Per tal d'aconseguir un medi de cultiu òptim per al creixement de *Cereibacter sphaeroides* es duen a terme diferents procediments. Aquests ens serveixen per reduir la terbolesa de la solució de soja o cereals, aquest segon té una composició no únicament a base de fibra de soja, sinó d'una mescla representativa del conjunt de subproductes sòlids del processament de tot el ventall de begudes vegetals que genera una companyia en concret, incloent soja, civada i arròs. Al tractar-se d'un cultiu fotosintètic si el medi conté moltes partícules en suspensió o té una elevada terbolesa, el bacteri no té accés a la llum. És per aquest mateix motiu que es formulen diferents medis amb una determinada composició. A continuació es detallen els passos seguits per a l'elaboració dels diferents medis de cultiu emprats en aquest projecte.

- Extracció de nutrients:

Consisteix en resuspendre el subproducte sòlid de la indústria de begudes vegetal en aigua (1:10, p:p) i deixar-lo en agitació 24-72 h a temperatura ambient (P-Selecta Rotabit).

- Esterilització dels extractes:

Abans del procés d'esterilització en d'autoclau, es filtren els extractes (filtres de paper de 22 µm) dues vegades per retirar totes les impureses (bàsicament, fibres vegetals) que hi pugui haver. A continuació, els extractes s'autoclaven a 121 °C durant 20 minuts (P-Selecta Presoclave-II).

- Composició del medi:

Després d'esterilitzar tot el material (reactors, tubs, agitador magnètic), es procedeix a preparar la mescla dels cultius en els propis reactors i seguidament, aquests s'inoculen 1:10 (v:v). Aquests processos es duen a terme en condicions d'esterilitat en una campana de flux laminar (Telstar BioII Avance Plus).

- Desplaçament de l'oxigen:

Tenint en compte que ens interessa garantir el metabolisme anaeròbic fotosintètic de *Cereibacter sphaeroides*, un cop s'han inoculat el reactors, aquests es bombegen amb nitrogen durant 10 min per tal de desplaçar tot l'oxigen.

Per conèixer els patrons, estudiar la corba de creixement i suplementar els extractes s'ha elaborat un medi sintètic (Medi Glucosa o GM, modificat de Novak et al., 2017) amb tots els nutrients necessaris per un creixement òptim. La composició d'aquest medi es troba detallada a la Taula 1.

Taula 1. Composició del medi sintètic (GM) òptim per al cultiu fotoheteròtrof de *Cereibacter sphaeroides* modificat de Novak et al., 2017. Composició per a la formulació d'1 L de medi.

Medi sintètic	Quantitat	Unitats
$MnSO_4 \times 1 H_2O$	0,001	g
$CaCl_2$	0,053	g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,2	g
K_2HPO_4	0,5	g
KH_2PO_4	0,5	g
$(NH_4)_2SO_4$	0,8	g
Glucosa	1	g
Yeast extract	1,5	g
Trace elements solution 1 g/L	1	mL

A partir del medi sintètic (GM) i dels extractes de subproducte de la indústria de begudes vegetals, es van formular un seguit de medis de cultiu potencials per al cultiu de *Cereibacter sphaeroides*. A la Taula 2 es mostren els diferents medis emprats durant l'estudi i la seva composició.

Taula 2. Proporcions dels diferents tipus de medi per al cultiu de *Cereibacter sphaeroides*.

Nom del medi	Medi sintètic	Extracte de soja (1:10)	Aigua	Extracte de Cereals (1:10)	Acetat de Sodi
GM	100%	-	-	-	-
SM	50%	50%	-	-	-
SB	-	50%	50%	-	-
CM	50%	-	-	50%	-
CA	-	-	-	95%	5%

3.3.4. Set Up Bioreactors

Previ als assajos esmentats anteriorment es va determinar la velocitat de creixement de *Cereibacter sphaeroides* en reactors de 100 ml amb un septum que garanteix l'esterilitat (Figura 1). L'extracció de mostra i el bombolleig de Nitrogen es va fer a partir d'agulles i xeringues estèrils. L'agitació es va donar amb un agitador orbital (P-Selecta Rotabit).



Figura 1. Set Up bioreactors per l'estudi de cinètica microbiana.

Per dur a terme aquest bioprocés s'han fet servir els bioreactors de 500 mL que es mostren a la Figura 2. Aquest consta d'un circuit d'entrada d'aire (amb un filtre de 0,22 μm) i sortida de mostra en forma de Y que permet bombollejar nitrogen per desplaçar l'oxigen i alhora possibilita la presa de mostra, el forat d'un dels taps permet l'entrada d'un tub segellat amb silicona que garanteix l'esterilitat.

En tot cas, per obtenir el pellet, es recol·lecta biomassa cada 24h de manera discontinua. Durant l'extracció del cultiu es recol·lecta el 90% de la biomassa produïda, el 10% restant és la inoculació pel següent cultiu.

Un cop acabat el *batch* es centrifuga la biomassa per tal de concentrar-la (ThermoScientific SL Plus Series).

En el cas del cultiu amb medi sintètic, el número de rèpliques era 3 ja que aporta més robustesa a l'experiment. Més tard, degut a les limitacions i per aprofitar les capacitats màximes del sistema, es va reduir el número de rèpliques a dos de cada variació del medi permetent la simultaneïtat de dos tipus de medis. Els reactors van ser escollits a l'atzar amb tots els medis i la posició d'aquests a l'estructura també era aleatòria i variava amb cada presa de mostra.

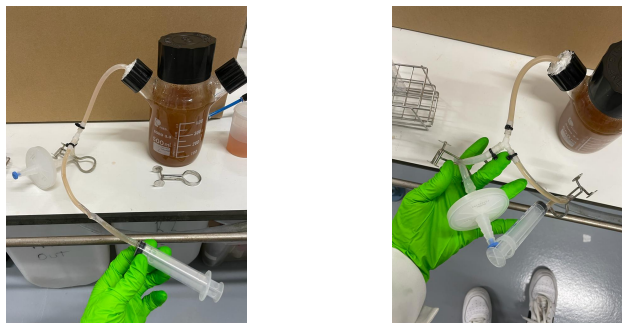


Figura 2. Circuit de presa de mostra i de bombolleig de Nitrogen en forma de Y.

L'agitació va ser magnètica (Velp MST) a partir d'una mosca introduïda en el pas previ a l'autoclau (P-Selecta Presoclave-II). El muntatge dels bioreactors es sota campana (Telstar BioII Avance Plus), un cop introduït el medi i l'inòcul, l'últim pas és el bombolleig.

3.3.5. Cultiu de *Cereibacter sphaeroides*

El producte d'aquest bioprocés serà la pròpia biomassa produïda a partir del bacteri *Cereibacter sphaeroides* cultivat de manera anaeròbica fotoheteròtrofa. Els reactors s'han situat en el sistema de llum i temperatura controlada per tal de garantir les condicions ambientals necessàries per al cultiu de *Cereibacter sphaeroides*. Tal i com s'ha mencionat a l'apartat 3.1, es va garantir una temperatura constant de 26-30 °C, i unes condicions de llum infraroja (Philips PAR38 IR 100W E27 230V Red 1CT/12) (700-900 nm).



Figura 3. Set Up dels bioreactors. Il·lustració del muntatge.

L'objectiu dels assajos en bioreactors de 100 mL era estudiar la cinètica microbiana, la durada l'experiment va ser de 24 h en total dividides en dues franges de 12 h. En canvi, l'objectiu dels reactors de 500 mL era l'obtenció de biomassa i es van maximitzar la producció d'aquesta, es van fer diferents *batch* fins l'obtenció de suficient biomassa pels diversos anàlisis.

La temperatura òptima pel cultiu és d'uns 26-30 °C (Instituto Politécnico Nacional, s. f.). Alhora, són capaços d'absorbir i utilitzar tant la llum visible (400-700 nm) com la regió infraroja (700-900 nm) (Fuentes et al., 2018). La segona és la longitud d'ona més òptima pel creixement del bacteri tenint en compte que farà la fotosíntesi. Aquests dos aspectes es poden resoldre amb un fotobioreactor i una camisa per controlar la temperatura, tot i així en aquest cas, s'ha instal·lat una llum infraroja (Philips PAR38 IR 100W E27 230V Red 1CT/12) que emet llum a la longitud d'ona òptima i a més permet mantenir una temperatura adequada pel creixement bacterià.

3.3.6. Control i quantificació de la biomassa

La quantificació de *Cereibacter sphaeroides* és mesurada amb diferents objectius: si l'objectiu és observar la cinètica de creixement, es mesura la densitat òptica (DO 600 nm) a espectrofotòmetre (Hach Lange, DR 3900) cada hora i es construeix una corba de creixement com a la Figura 7; en canvi, si l'objectiu és la producció de biomassa, mesurarem la DO quan el color vermell dels pigments fotosintètics ens indiquin que s'aproxima la fase plató. Un cop els nivell de DO deixen d'augmentar de forma exponencial es recol·lecta.

3.3.7. Concentració de biomassa microbiana

Cal separar la biomassa crescuda del medi de cultiu per poder treballar amb pellet de bacteris ja sigui per veure el pes (fresc o sec) i poder quantificar-la o fer els anàlisis fisicoquímics adients. Interessa conservar el pellet ja que és on es troba la proteïna. A la Figura 4 es mostra un esquema del procés detallat, des de la recol·lecció del cultiu fins l'obtenció de la biomassa concentrada.

Aquest procediment contempla diferents centrifugacions (ThermoScientific SL Plus Series) que permeten separar el pellet del sobrenedant (SN):

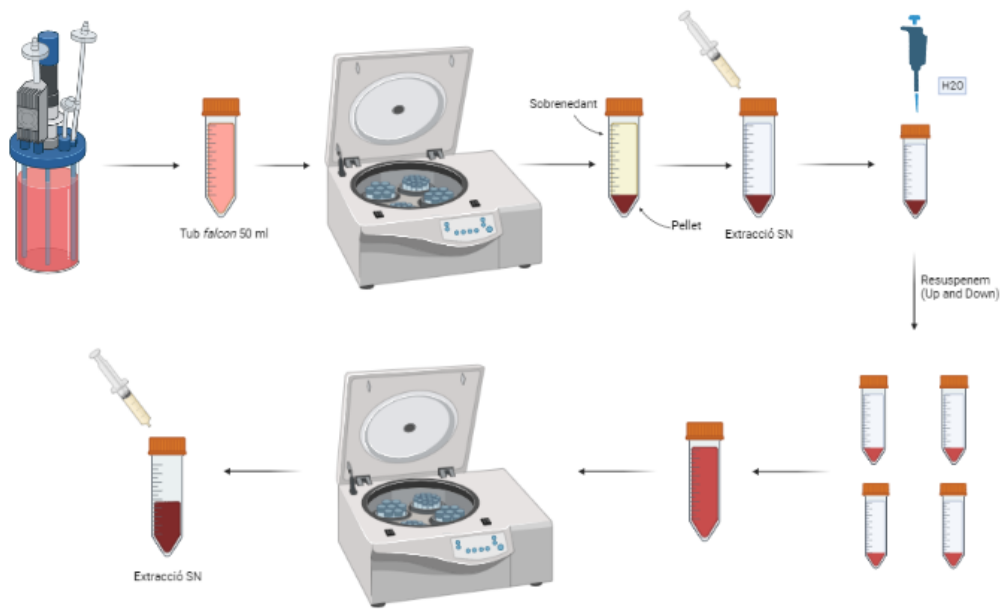


Figura 4. Procés de centrifugació pas a pas. Realització pròpia amb BioRender.

1. Amb el cultiu recol·lectat s'omplen tubs *falcon* de 50 mL i els centrifuguen 15-30 minuts a 4200 rpm i a 3-8°C (una menor temperatura durant la centrifugació proporciona un pellet més sòlid i facilita l'extracció de medi).
2. Extracció del sobrenedant amb pipeta o xeringa (s'extreu la màxima quantitat de medi). Aquest sobrenedant es conserva per analitzar-lo i comparar l'input i l'output dels reactors, el que ens proporcionarà informació sobre què limita el creixement i què consumeixen els bacteris.
3. S'afegeixen 5-10 mL d'aigua destil·lada i es resuspen el pellet. Els pellets resuspesos s'ajunten en un tub *falcon*.
4. Es centrifuga 30-40 min, a 4200 rpm, a 3-8 °C i s'extreu el sobrenedant.
5. La biomassa concentrada s'emmagatzema a -20 °C fins al moment que s'hagi d'analitzar.

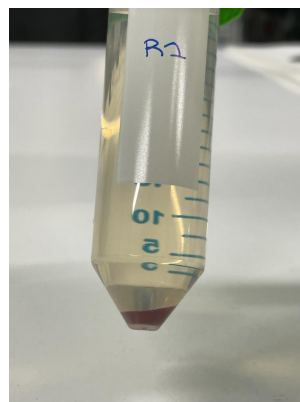


Figura 5. Resultat de la centrifugació. S'analitza el SN i el pellet per separat.

3.3.8. Determinació del pes fresc, pes sec i percentatge de sòlids

El pes fresc, el pes sec, mesurats amb la balança analítica FisherBrand Analytical Series, i el percentatge de sòlids de la biomassa microbiana obtinguda contribueixen, juntament amb la determinació del nitrogen total, en el càlcul de la quantitat proteica de la mostra.

- Pes fresc (FW): Pes del pellet després de la centrifugació. Mesurat amb l'equip FisherBrand Analytical Series.
- Pes sec (DW): Pes del pellet multiplicat pel percentatge de sòlids reals de la mostra.
- Percentatge de sòlids: Quantificació dels sòlids sense tenir en compte la quantitat d'aigua que contenen. Per a la determinació, s'introdueix una quantitat coneguda de pellet a un cressol (de pes conegut), i aquest es situa a l'estufa (P>Selecta Incubat) durant el temps necessari fins que s'evapora tota l'aigua, a 105 °C. A continuació es determina el pes del pellet sec, i la diferència respecte el pellet humit ens proporcionarà el percentatge de sòlids que conté la mostra.



Figura 6. Cressol amb biomassa (pellet) abans de l'assecat.

3.3.9. Anàlisis fisicoquímics

3.3.9.1. Determinació de pH, Conductivitat Elèctrica, Demanda química d'oxigen

Determinació de pH: És una mesura que indica el grau d'acidesa o alcalinitat d'una substància o solució. Es realitza utilitzant un elèctrode (Hanna HI 5521) que registra la concentració d'ions d'hidrogen en una escala de 0 a 14.

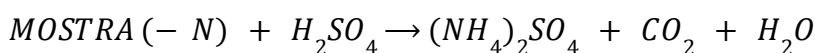
Conductivitat Elèctrica (CE): Aquest mètode mesura la capacitat d'una solució per conduir electricitat, la qual depèn de la presència d'ions dissolts. Es va mesurar amb un conductímetre (Hanna HI 5521) que alhora mesura pH.

Demanda química d'oxigen (COD): Aquest mètode mesura la quantitat d'oxigen necessària per oxidar els compostos orgànics presents en una mostra d'aigua o efluents industrials. És un indicador de la càrrega de matèria orgànica i contaminants en una mostra i s'utilitza per avaluar la qualitat de l'aigua residual. Per mesurar la COD de les mostres obtingudes en aquest projecte es va fer servir el kit HI-93754A-25 LOW RANGE COD REAGENTS de Hanna i el calefactor Hach COD Reactor.

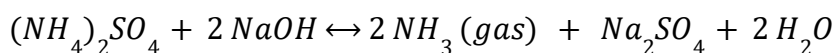
Tots tres procediments s'han fet seguint els protocols d'APHA (2017).

3.3.9.2. Determinació de Nitrogen

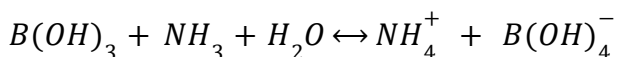
Per determinar la quantitat de nitrogen total dels medis de cultiu, inputs, outputs i de la biomassa microbiana, es va emprar el mètode *Kjeldahl*. Aquest consisteix en tres passos: una digestió seguida d'una destil·lació i una valorització àcid-base. L'objectiu de la digestió (P-Selecta Bloc Digest 12, P-Selecta RAT 2) és convertir tot el nitrogen orgànic en ions amoni (NH_4^+). Aquest procediment trenca tots els enllaços de nitrogen de la mostra, de tal manera que aconseguim determinar tot el nitrogen present. Per dur a terme aquest procés, la mostra es mescla amb àcid sulfúric a 350-380 °C, a més també s'afegeix sulfur de potassi per augmentar el punt d'ebullició de l'àcid sulfúric i catalitzadors. Un cop acabada la digestió, les mostres es deixen refredar abans de passar al següent pas.



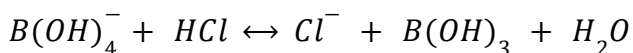
A continuació es duu a terme la destil·lació (P-Selecta PRO-NITRO M), on hi ha la separació per arrossegament addicionant NaOH a la dissolució d'amoni obtinguda prèviament i s'allibera NH_3 i vapor d'aigua. Durant aquest pas del procés de determinació de nitrogen els ions amoni (NH_4^+) es converteixen en amoníac (NH_3) per l'addició del NaOH que és un alcalí.



Finalment el NH_3 és arrossegat per la corrent de vapor d'aigua fins a l'erenmeyer que conté una solució d'àcid bòric de solució aquosa al 3% .



El següent pas és la valorització àcid-base que tant es pot dur a terme amb HCl 0,5 M com amb HCl 0,1 M, la utilització d'un o l'altre depèn de la concentració que s'espera trobar a la mostra. S'anoten els mil·lilitres addicionats.



Per últim, es duu a terme la següent fórmula per saber la quantitat de nitrogen que hi ha a la mostra.

$$TKN = \frac{(V_i - V_o) * N * 14}{W_{wh}} \quad (Eq. 1)$$

Per quantificar l'amoni d'una mostra, s'usa el mateix procediment però evitant el pas de la digestió (APHA, 2017)

3.3.10. Determinació de fòsfor

Per determinar la quantitat de fòsfor dels medis de cultiu, inputs, outputs i de la biomassa microbiana, es van emprar dos mètodes de quantificació del fòsfor. Ambdós mètodes convergeixen en els passos finals però es diferencien en l'inicial. Si es vol determinar la quantitat de fòsfor total de la mostra cal de fer una digestió (P-Selecta Bloc Digest 12, P-Selecta RAT 2) prèvia. Els següents passos és on convergeixen tots dos protocols, es preparen un matràs aforat i un erlenmeyer per mostra i 7 extres de cada un per la recta patró. A continuació es prepara els mil·lilitres adequats de mostra (segons la concentració que esperem trobar tenint en compte que la recta patró va de 0,04 ppm el més petit sense contar el 0 fins a 1 ppm) i enrasem al matràs fins a 50 mL amb aigua destil·lada. El següent pas és preparar els reactius 1 i 2 per posar a la mostra, aquests reaccionaran amb el fòsfor (fòsfor total en cas d'haver digerit i fòsfor "disponible" en cas de no haver digerit prèviament la mostra) i es tenyeixen de color blau segons la concentració que tinguin. Per preparar la recta patró afegim la quantitat indicada a cada mostra i enrasem fins a 50 mL. Un cop tenim tots els matràs els aboquem als erlenmeyer el contingut i afegim 8 ml del reactiu a cada un.

Un cop afegit el reactiu hem d'esperar 20 min fins que ha acabat de reaccionar i després podem anar al espectrofotòmetre a mirar la absorbància a 880 nm. Amb la recta patró es construeix una recta de regressió i interpolant els resultats de les mostres, podem saber la concentració de fòsfor determinada (APHA, 2017).

3.3.11. Tests estadístics

Per tal d'analitzar degudament tots els resultats obtinguts al llarg del projecte, s'han emprat alguns tests estadístics. Per aquells grups de valors els quals interessa determinar si hi ha diferències significatives o no, s'ha determinat amb una ANOVA d'un factor amb la plataforma estadística IMB SPSS 29.0. Prèviament, en primer lloc, s'ha determinat la distribució normal de les dades amb un test Shapiro Wilk, així com l'homogeneïtat de variàncies mitjançant un test Kruskal Wallis. Conseqüentment, s'ha dut

a terme l'ANOVA corresponent i les proves post-hoc Tukey B, ($\alpha=0,05$) per tal d'identificar aquells grups de dades amb diferències significatives.

4. Resultats

En aquesta secció es recullen tots els resultats que s'han obtingut durant l'execució del projecte, des de la caracterització dels medis de cultiu potencials per al creixement de *C. sphaeroides*, fins a l'estudi dels paràmetres relatius al rendiment, productivitat i cinètica en tots els casos.

4.1. Composició del medi

L'objectiu d'analitzar la composició del medi roman en conèixer els nutrients disponibles i les concentracions d'aquests, i en aconseguir una millor interpretació i discussió dels resultats.

Prèviament a l'estudi de la viabilitat d'obtenció de biomassa de *Cereibacter sphaeroides* en diferents tipus de medis de cultiu, es va fer una determinació inicial de diferents paràmetres fisicoquímics d'aquests (Taula 3).

Taula 3. Determinació inicial de diferents paràmetres fisicoquímics dels medis emprats.

Paràmetre fisicoquímic	COD (mg/L)		NKT (mg/L)		NH_4^+ (mg/L)		pH		CE ($\mu\text{s}/\text{cm}$)		TP (mg/L)		TERBOLESA (NFU)	
	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD	Promig	SD
Medi de cultiu														
Extracte soja (Dilució 1:5)	-	-	-	-	84,10	6,60	7,53	0,10	937,00	12,00	-	-	3100,00	24,00
Extracte soja (Dilució 1:10)	1020	1,00	220	5,00	37,30	6,50	7,67	0,20	535,00	7,00	5,91	0,56	1550,00	11,00
Medi sintètic (GM)	1467	2,82	670	20,00	1,00	0,02	6,08	0,10	2575,00	8,00	150,41	7,19	1,93	0,10
Extracte cereals (Dilució 1:10)	6170	0,00	50	0,01	10,00	0,01	4,69	0,01	615,50	1,77	0,04	0,00	145,00	0,00
Extracte cereals (Dilució 1:10) + Acetat de Sodi 1g/L	3540	0,00	30	0,01	10,00	0,00	5,50	0,04	1198,00	2,12	0,04	0,00	148,00	0,00

Per tal d'identificar els diferents paràmetres clau per al creixement de *C. sphaeroides*, prendrem de referència el medi sintètic (GM), ja que és un medi òptim per al creixement de *Cereibacter sphaeroides*. Així doncs, d'aquí van sorgir dos dels nostres medis de cultiu, basats en substituir en un 50% en volum aquest medi sintètic per uns medis a base d'extractes de subproductes de begudes vegetals: el medi SM i CM (Taula 2). La formulació d'aquests dos medis i el seu ús com a medi de cultiu per a *Cereibacter sphaeroides* permetrà determinar si reemplaçant el 50% del medi sintètic s'obté un creixement equivalent al control i, en cas contrari, l'anàlisi del SN de l'output permetrà

determinar què limita el creixement. Per altra banda, el medi SB (50% extracte de soja i 50% aigua) es formula amb tres objectius: disminuir la terbolesa de l'extracte de soja 1:10, veure si els nutrients són suficients i fent un anàlisi del SN del output per veure quin component és el limitant pel creixement de *Cereibacter sphaeroides*.

Primer de tot es va dur a terme l'anàlisi dels extracte de soja. Com podem veure a la Taula 3, hi han valors com l'amoni, la conductivitat i la terbolesa (mesurada en l'equip Hach DR/2010) que disminueixen quan la concentració d'extracte es redueix. Degut als alts valors de terbolesa de l'extracte de soja 1:5 (3100 NFU) descartem utilitzar-lo com a medi de cultiu ja que dificultaria el pas de la llum ultraroja cap a l'interior dels reactors, així limitant la font d'energia a *C. sphaeroides*. A conseqüència, es va escollir treballar amb l'extracte de soja 1:10. Per altra banda, es va analitzar el subproducte a base diversos cereals de la mateixa indústria de begudes vegetals.

Per tal d'avaluar el potencial d'aquest extracte de cereals com a medi de cultiu de *C. sphaeroides*, es va seguir el mateix procediment que en el cas de la soja. Cal destacar que en primer lloc, els valors de terbolesa eren considerablement més baixos. Per altra banda, tot i que la concentració de nitrogen, amoni i fòsfor era inferior envers l'extracte de soja, el contingut de carboni (COD) era superior. Cal mencionar que el pH de partida també era inferior als valors òptims i es va haver d'ajustar al pH òptim en el pas previ a l'esterilització en autoclau.

Tenint en compte el conjunt de paràmetres mencionats, es van formular un seguit de medis de cultiu a base dels extractes de subproducte d'indústria de begudes vegetals els quals es mostren a la Taula 2. A més, tenint en compte la complexitat de la matèria orgànica dels extractes en qüestió, és a dir, de la naturalesa dels carbohidrats presents a la cel·lulosa, es va formular el medi de cultiu CA a base d'extracte de cereals suplementat amb un àcid orgànic, com és l'acetat, per tal d'aportar una font de carboni de fàcil assimilació per part de *C. sphaeroides* (Fuentes et al., 2018).

Els medis de cultiu que finalment han estat avaluats per al cultiu de *C. sphaeroides* es mostren a la Taula 2 a l'apartat 3.3.3.

4.2. Cinètica de creixement segons el medi de cultiu

L'objectiu de determinar la cinètica de creixement és conèixer la duració aproximada de cada una de les tres fases del cultiu i obtenir les velocitats de creixement específiques segons la composició del medi per comparar-les a la discussió. Les cinètiques de creixement es van determinar en un experiment independent per obtenir aquests resultats, emprant els reactors amb un volum de treball de 100 mL, i prenent mesures de la quantificació de biomassa (DO 600 nm) al llarg de 24 h per a tots els medis de cultiu

d'interès (GM, SM, SM, CA, SB). La presa de mostres va ser més discontinua durant les primeres 12 h degut al coneixement previ de la cinètica de *C. sphaeroides*. Durant les hores prèvies a la fase exponencial la presa de mostra va ser més continua (1h).

A la Figura 7 es mostra l'exemple d'una de les corbes obtingudes, en aquest cas, pel medi SM, i es distingeixen tres fases a la corba de creixement de *C. sphaeroides*.

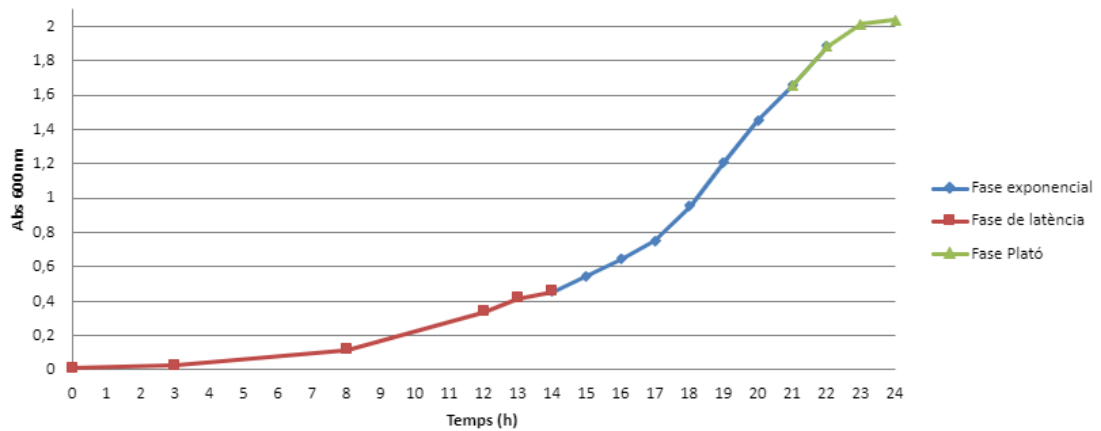


Figura 7. Corba de creixement de *Cereibacter sphaeroides* en medi SM.

Per tal d'estudiar les cinètiques i la velocitat de creixement s'ha calculat el logaritme neperià de les dades d'absorbància a 600 nm amb les dades de la fase exponencial del creixement. Aquestes dades s'han graficat i s'ha obtingut la R^2 i el pendent, el qual es relaciona directament amb la taxa de creixement (μ) del microorganisme (Figura 8).

Per calcular la velocitat de creixement (μ) de *C. sphaeroides* es recupera l'Equació 2 de la presentació sobre cinètica microbiana de Marta Culler Dalmau (2021). On observem els termes d'interès com són μ , que fa referència a la velocitat de creixement; x que fa referència a la quantitat de biomassa en un determinat moment i $\frac{dx}{dt}$ (Eq. 2), que fa referència a la taxa de creixement en funció del temps.

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x \quad (Eq. 2)$$

Si integrem l'equació tenint en compte les característiques del cultiu obtenim l'Equació 3. Com μ és constant l'equació ens permet aïllar-la:

$$\ln x = \mu * t + \ln x_0 - \mu * tlat \quad (Eq. 3)$$

On:

$$\ln x = y; (\mu * t) = ax; (\ln x_0 - \mu * tlat) = b \quad (Eq. 4)$$

Tlat fa referència al temps de latència i el terme x pot ser substituït pel valor absorbància (600 nm) corresponent tenint en compte la relació directament proporcional entre aquests dos termes.

Per tant, a la regressió lineal de Ln Abs (600 nm) respecte el temps (valors de la fase exponencial), a , que és el pendent, es correspon al terme μ (Figura 8).

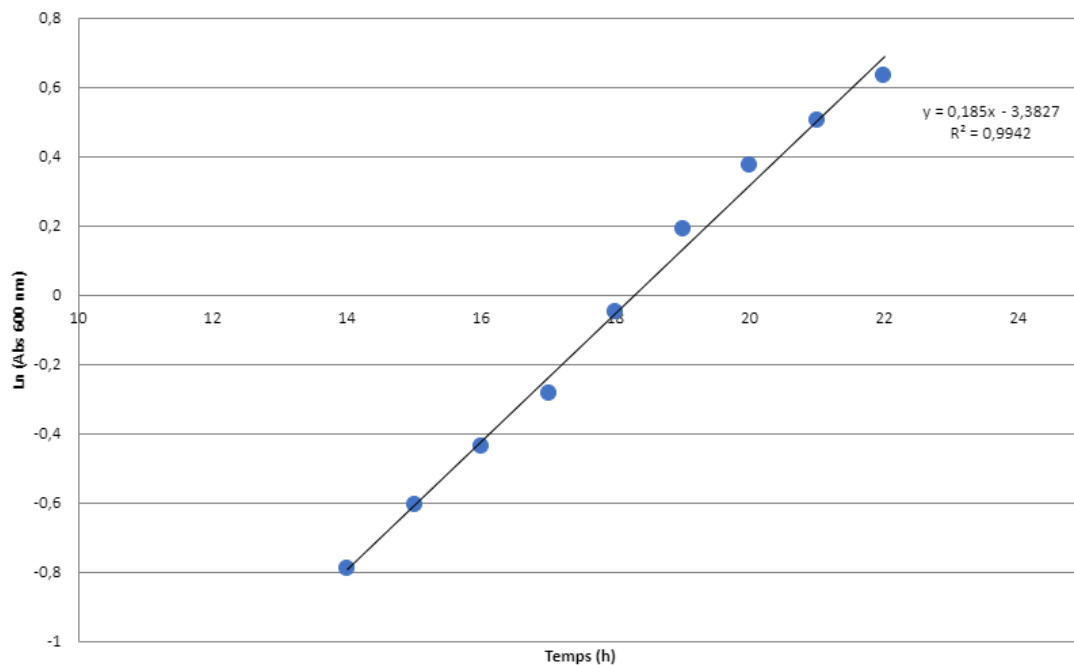


Figura 8. Recta de regressió que relaciona el Ln de l'Abs 600 nm respecte el temps en la fase exponencial, en aquest cas, de *C. sphaeroides* cultivat en medi SM. Es mostra el coeficient de determinació (R^2) i l'equació de la recta que relaciona el pendent amb la velocitat de creixement (μ). S'ha fet servir el mateix mètode per estudiar totes les corbes de creixement dels diferents medis de cultiu emprats.

Els valors de la velocitat de creixement obtinguts per a tots els medis de cultiu estudiats es mostren en la Taula 4.

Taula 4. Valors de velocitat de creixement segons el medi de cultiu. Es mostren els valors promitjos i les desviacions estàndard.

Medi de cultiu	GM	SM	CM	CA	SB
Velocitat de creixement (h^{-1})	0,18±0,01	0,19±0,03	0,08±0,01	0,06±0,02	0,02±0,00

Tal com mostren els resultats de la Taula 4, GM i SM mostren una velocitat de creixement similar amb uns valors de $0,18 h^{-1}$ i $0,19 h^{-1}$, respectivament. Aquest fet

demostra que malgrat substituir un 50 % del medi sintètic amb extracte de soja 1:10, *C. sphaeroides* ha pogut créixer seguint la mateixa dinàmica, el que demostra el potencial del subproducte de soja. D'altra banda CM, CA i SB mostren uns valors de $0,08 \text{ h}^{-1}$, $0,06 \text{ h}^{-1}$ i $0,02 \text{ h}^{-1}$ respectivament, el que mostra una velocitat de creixement d'un 56,5%, 67,4% i 89,13% inferior a GM, respectivament.

4.3. Paràmetres de rendiment de diferents medis per al cultiu fotoheterotròfic de *C. sphaeroides*.

Mitjançant la determinació de diferents paràmetres fisicoquímics de la biomassa obtinguda, inputs i outputs dels reactors, es va estudiar el rendiment dels diferents medis emprats per al cultiu de *C. sphaeroides*. L'objectiu d'obtenir el valor del percentatge de sòlid, roman en la confirmació de la repetibilitat de l'experiment i el càlcul de la productivitat i la productivitat màxima. Els valors de productivitat informen sobre els grams per litre generats en un dia de biomassa, amb aquestes dades es fa una comparació entre els diferents valors segons el medi a l'apartat de discussió. Per últim el percentatge de nitrogen consumit i el percentatge de matèria orgànica consumida ens informen de l'aprofitament dels nutrients per part del bacteri i ens podria indicar un possible factor limitant. El conjunt de paràmetres de rendiment obtinguts per a tots els medis de cultiu estudiats es mostren a la Taula 5.

Taula 5. Paràmetres de rendiment de diferents medis per al cultiu fotoheterotròfic de *C. sphaeroides*. Es mostra percentatge de sòlids en la biomassa concentrada, productivitat, productivitat màxima de *C. sphaeroides*, percentatge de nitrogen consumit i percentatge de carboni consumit (matèria orgànica).

Medi de cultiu	% DW	Productivitat (g DW L ⁻¹ d ⁻¹)	Màx Productivitat (g DW L ⁻¹ d ⁻¹)	% N removal	% COD removal
GM	17,7%	0,75 ± 0,18	1,12	40%	53%
SM	15,0%	0,37 ± 0,11	0,64	29%	-
SB	-	0,05 ± 0,01	0,05	-	-
CM	16,4%	0,72 ± 0,07	0,87	25%	93%
CA	21,2%	0,33 ± 0,05	0,41	33%	74%

En tots els casos es va aconseguir concentrar la biomassa de tal manera que el percentatge de biomassa seca va correspondre entre un 15 i 21%. Aquest rang demostra la repetibilitat del mètode de recol·lecció de biomassa. La productivitat màxima informa de la quantitat màxima de biomassa que es genera al cultiu durant una unitat de temps, en aquest cas al dia, i recull el valor màxim. D'altre banda la productivitat és el promig entre les productivitats de tots els dies de cultiu.

També s'observen dades de *N removal* i *COD removal* que ens informen sobre el percentatge de Nitrogen i Carboni que el bacteri consumeix durant el cultiu (s'analitza el SN), els nivells de Carboni informen sobre la quantitat de matèria orgànica present al SN.

Els paràmetres de més interès en el present estudi, tenint en compte els objectius plantejats, es reuneixen en la Figura 9.

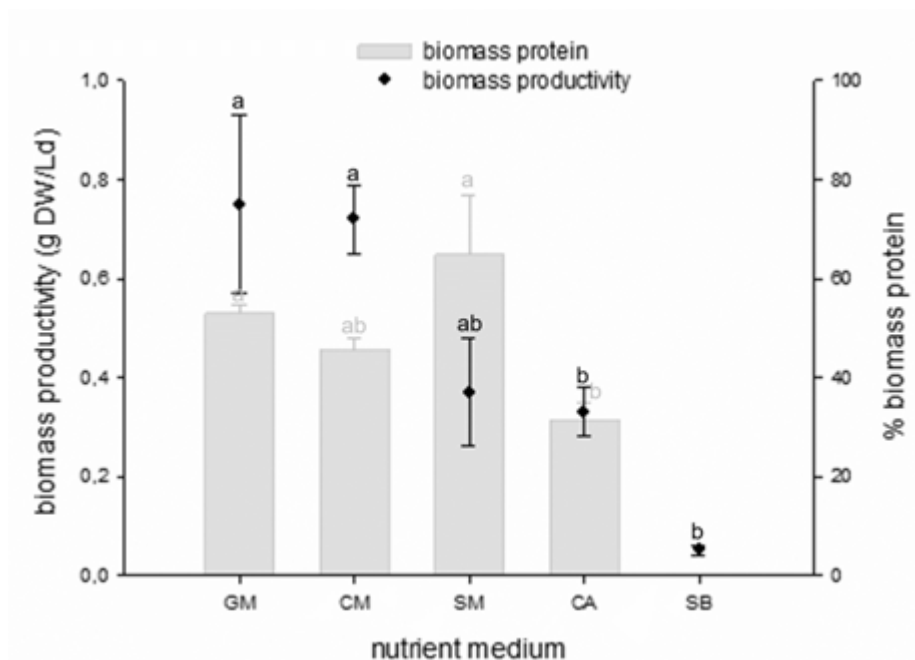


Figura 9. Rendiment (productivitat, g DW/Ld, en punts negres) i percentatge proteic (barres grises) de la biomassa de *C. sphaeroides* cultivada en diferents medis. Les lletres a, b mostren diferents grups estadístics.

Tal i com es mostra a la Taula 5 i a la Figura 9, els medis que ofereixen una productivitat de *C. sphaeroides* estadísticament comparable al medi sintètic òptim són els medis CM i SM (ANOVA, $\alpha > 0,05$). Aquests dos medis, els quals contenen un 50 % d'extractes de begudes vegetals, han permès obtenir una productivitat de biomassa de 0,72 i 0,37 g DW/ L d, respectivament. Cal destacar que en el cas de CM, la productivitat ha estat només un 4% inferior que el control (GM), el que demostra el potencial d'aquest medi.

Per altra banda, la productivitat obtinguda amb el medi CA és d'un 0,33 g DW/ L d i un 66% inferior al control. En el cas del medi fet únicament a base de soja (SB), la productivitat ha estat molt inferior que la resta de medis. En els *batch* preparats per fer aquest experiment es fa la prova de l'extracte que volem fer servir com a medi amb i sense suplementació. En el cas de l'extracte de soja no es va observar creixement bacterià sense suplementació, el que ens va portar a suplementar l'extracte de cereals un

cop vam formular la hipòtesi de que el problema principal podia ser la quantitat d'àcids orgànics disponibles.

Malgrat CA mostra un rendiment significativament menor que el control, conté un 95 % de l'extracte de cereals, per tant tot i que es significativament menor, és estadísticament igual (ANOVA, $\alpha > 0,05$) que SM on hi ha una suplementació del 50 % amb medi sintètic.

En termes de producció de biomassa, GM, CM i SM són estadísticament iguals (ANOVA, $\alpha > 0,05$). D'altra banda trobem que CM, CA i SB també són estadísticament iguals en termes de producció de biomassa. D'aquest últim no es va obtenir suficient biomassa per a la quantificació de proteïnes.

5. Discussió

En una primera fase de l'estudi, es va dur a terme un experiment utilitzant un sòlid de subproductes derivats de la indústria de begudes vegetals. El sòlid es va sotmetre a agitació emprant diferents dilucions i es va determinar aquella proporció que permet una menor turbidesa possible, així com una concentració dels nutrients clau, com el Nitrogen, l'Amoni i el Fòsfor per al cultiu de *Cereibacter sphaeroides* (Dong, Zeng, & Yu, 2021). Els resultats obtinguts es presenten detalladament a la Taula 3. A continuació, es realitza una comparació entre els resultats obtinguts dels diferents extractes i el medi sintètic. Aquesta comparació es va dur a terme amb la finalitat d'establir una referència en quant al creixement i la producció màxima que pot assolir *Cereibacter sphaeroides* en el marc d'aquest experiment.

La dilució de l'extracte de soja (1:5) no va permetre realitzar l'anàlisi dels nutrients a causa de la seva alta turbidesa, la qual cosa va descartar aquesta dilució abans de l'anàlisi de Nitrogen, Fòsfor i COD. En canvi, es va diluir més aquest extracte i, tot i que els nivells d'aquests nutrients van disminuir, es va comprovar si l'extracte encara en tenia una concentració suficient. Malgrat això, la terbolesa mostrava valors molt elevats, per la qual cosa es va optar per preparar un medi de cultiu que combinés aquest extracte amb medi sintètic al 50%, per una banda, i amb extracte de soja 1:10, obtenint una dilució final de 1:20 de l'extracte de soja (medi SM). El medi SM no presenta diferències significatives envers GM en termes de productivitat i biomassa (Figura 9), el que demostra el seu potencial. No obstant això, aprofita menys el nitrogen disponible, el que suggereix que aquest no és el factor limitant (Taula 3).

En canvi, amb el medi íntegrament formulat amb extracte de soja, el medi SB, no s'observa creixement bacterià. Per identificar el factor limitant es mesura el percentatge de Nitrogen consumit, que com es pot observar a la Taula 3, no és limitant. Degut a les característiques del cultiu, es formula la hipòtesi per la qual *C. sphaeroides* no és capaç de créixer en medis amb residus molt complexos com és la cel·lulosa (Fuentes et al., 2018), i s'estudia la possibilitat de suplementar l'extracte de cereals amb àcids orgànics com l'acetat.

Així doncs, al *batch* de CM i CA s'inclou una distinció respecte el *batch* de SM i SB, degut a la manca de creixement en aquest últim. Els nutrients estudiats abans del cultiu amb l'extracte de soja es van tornar a avaluar amb l'extracte de cereals. Tot i que els nivells d'aquests nutrients eren més baixos, es va voler comprovar si només amb la suplementació d'acetat de sodi, que aporta els àcids orgànics que no estaven disponibles a SB, *Cereibacter sphaeroides* podia créixer.

Fuentes et al., 2018 basa el seu estudi en els bacteris de la família de PNSB, els quals tenen diverses aplicacions ja que són capaços de metabolitzar àcids orgànics per al seu creixement, però també assenyala la complexitat de alguns residus: "L'ús de substractes

residuals per a BPNS es pot realitzar directament quan predominen àcids orgànics”. Quan els substractes són altament complexes, com ara cel·lulosa o midó, es pot optar per un sistema combinat per a l'aprofitament i tractament del substrat (Fuentes et al., 2018). A més, l'article suggereix una solució per a aquests subproductes complexos, una fermentació fosca que descomposaria els àcids orgànics de cadena llarga, que els bacteris no poden metabolitzar si no es troben disponibles (Fuentes et al., 2018). Així doncs, es va formular la hipòtesi de que *Cereibacter sphaeroides* era incapaç de descompondre els àcids orgànics de cadena llarga de l'extracte de soja. Tot i que l'opció de la fermentació fosca (Fuentes et al., 2018) és una alternativa excel·lent a la suplementació, per falta de temps, es va decidir suplementar amb acetat de sodi, ja que l'àcid acètic és un dels àcids orgànics que ofereix millors resultats. D'aquí va sorgir l'extracte CA.

En reiniciar l'experiment amb CA i CM, es va observar que el pH d'aquest tipus de residu era molt baix (Taula 3), per la qual cosa és necessari ajustar-lo abans del procés d'esterilització (Seifter et al., 2010). El medi CM no presenta diferències significatives respecte GM (Figura 9) en quant a productivitat i biomassa produïda, el que confirma la viabilitat i el potencial d'aquest medi. En canvi, CA presenta diferències significatives respecte GM en termes de producció de biomassa i productivitat (Figura 9). Tot i els resultats esmentats, cal tenir en compte la substitució quasi total del medi sintètic per subproductes i la disminució de costos d'un 25-30% que suposaria tot i l'augment del temps de producció (Fasaei et al., 2018).

CM, CA i SB mostren una velocitat de creixement inferior i estadísticament diferent a GM (Figura 9). En els casos de CM i CA, formulem una nova hipòtesi en que a causa de les característiques del medi i la poca quantitat de Nitrogen que presenta (Taula 3) existeixi una dificultat per part del bacteri per adaptar-se. En el cas de SB, pràcticament no es va observar creixement, ja que, com s'ha esmentat anteriorment, es creu que hi ha una manca d'àcids orgànics disponibles.

Tenint en compte els resultats mostrats, s'ha aconseguit un medi de cultiu fet a partir d'una font disponible de nutrients i carboni que substitueix els medis convencionals agregant un 5% d'acetat de sodi, que és un producte de baix cost. Tot i que CA presenta uns valors de productivitat menor, i un contingut en percentatge de proteïna d'un 22% menor que el control (GM), cal considerar la davallada de costos que suposa aquesta substitució de medi sintètic per a la producció de biomassa microbiana com a potencial font de proteïna alternativa.

6. Conclusions

- La producció d'una font de proteïna alternativa amb subproductes de la indústria de begudes vegetals és una alternativa potencial a les proteïnes d'origen animal i contribueix a l'economia circular i a la reducció del malbaratament de recursos.
- Els medis de cultiu a partir dels subproductes mostrats en aquest projecte mostren viabilitat pel creixement de *Cereibacter sphaeroides* i la producció de SCP.
- Els subproductes de la indústria de begudes vegetals són bons candidats per substituir de manera parcial o total amb suplementació la matèria primera d'un medi de cultiu.
- No hi ha diferències significatives entre la productivitat i el contingut proteic de la biomassa microbiana obtinguda reemplaçant un 50% del medi sintètic per extractes de subproductes de la indústria de begudes vegetals.
- La substitució total del medi comercial emprat convencionalment per extractes de subproductes de la indústria de begudes vegetals és factible amb una petita suplementació d'un producte de baix cost econòmic per la producció de proteïnes alternatives en forma de SCP.

6.1. Limitacions i millores a realitzar en projectes futurs

Per tal d'analitzar més al detall les variables que influeixen al creixement de *C. sphaeroides* en els medis de cultiu emprats, hi ha una sèrie de paràmetres que poden ser potencialment interessants d'estudiar, com ara el tractament previ a la fermentació dels subproductes, altres subproductes de la indústria, o altres tractaments de subproductes més òptims.

Altres experiments d'interès han sorgit durant l'elaboració d'aquest treball a causa de les hipòtesis formulades durant la discussió. La primera hipòtesi sobre la disponibilitat al cultiu d'àcids orgànics es confirmaria amb un *batch* amb SB suplementat amb acetat de sodi. En el cas que es presentés creixement, implicaria que el factor limitant per aquest medi era la insuficient presència d'àcids orgànics disponibles.

Una segona hipòtesi suggereix una pitjor adaptació als medis amb extracte de cereals degut a la quantitat de Nitrogen disponible, la resolució d'aquesta hipòtesi es podria comprovar suplementant amb una font de Nitrogen. S'espera un possible augment de la velocitat de creixement si es compleix la hipòtesi en els medis CM i CA.

Hi ha dos paràmetres analítics significatius que ajudarien a determinar potencial dels medis de cultiu estudiats i la qualitat de la biomassa microbiana obtinguda en cada cas. Per una banda, seria interessant determinar el perfil d'aminoàcids de la biomassa microbiana obtinguda per cadascun dels medis de cultiu estudiats. La qualitat d'aquesta varia en funció dels aminoàcids essencials presents a la biomassa, i per tant, seria clau per a valorar amb més criteri el potencial dels medis de cultiu emprats. D'altra banda, també caldria una determinació de metalls pesants per tal d'assegurar l'absència d'aquests a la biomassa microbiana obtinguda amb els diferents medis de cultiu. L'absència d'aquests garantiria la viabilitat de la biomassa de *C. sphaeroides* obtinguda per a fins d'alimentació, en el nostre cas, animal..

Per últim, en aquest projecte brindo les bases pel creixement de *C. sphaeroides* en medis recuperats del subproducte de les begudes vegetals, i, tot i que a nivell de costos aporta molts beneficis, cal estudiar amb més detall aquest aspecte i contemplar alhora els costos de l'escalat d'aquest prometedori projecte.

En conclusió, crec que és una idea innovadora i que presenta una gran aplicació de cara al futur i que val la pena seguir treballant per optimitzar-la.

7. Bibliografia

- Amoozegar, M., Shahinpei, A., Sepahy, A. A., Makhdoumi-Kakhki, A., Schumann, P., & Ventosa, A. (2011). Exopolysaccharides production by *Rhodobacter sphaeroides* and its correlation to osmotic stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3).
- APHA (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). Washington DC: American Public Health Association.
- Artikel, T., Schirmer, A., & Maldener, I. (2014). Synthetic Biology of Purple Phototrophic Bacteria: Tools and Applications. *Bioengineered*, 5(5).
- Beta Tech Center. (s. f.). Biodiversity, ecology, environmental & food technology. Recuperat el 23 de maig del 2023, de <https://betatechcenter.com/>
- Beta Tech Center. (s. f.). ¿Quiénes somos? Recuperat del 23 de maig del 2023, de <https://betatechcenter.com/es/quienes-somos/>
- Busquets, A. (2022). Standard Operation Procedure (SOP) Total Phosphorus Determination (Rev. 02) (I.GP:6.18).
- Busquets, A. (2022). Standard Operation Procedure (SOP) Nitrogen determination by Kjeldahl method (Rev. 01) (I.GP:6.09).
- Capson-Tojo, G., & Muñoz, R. (2020). Purple phototrophic bacteria for resource recovery: Challenges and opportunities. *Biotechnology Advances*, 43, 107570. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107570>
- Cullel Dalmau, M. (2021). T.1.b Cinètica microbiana [PowerPoint]. Recuperat el 23 de maig del 2023 <https://campus.uvic.cat/aules/mod/resource/view.php?id=613715>
- Datar, I., & Betti, M. (2010). Possibilities for an in vitro meat production system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Dong, Y., Zeng, M., & Yu, H. (2021). Purple phototrophic bacteria for resource recovery: Challenges and opportunities. *Biotechnology Advances*, 46, 107672. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107672>
- EUFIC. (2023). 5 fuentes de proteínas alternativas a la carne que marcan tendencia en Europa. Recuperat el 23 de maig del 2023: <https://www.eufic.org/es/produccion-de-alimentos/articulo/5-fuentes-de-proteinas-alternativas-a-la-carne-que-marcan-tendencia-en-europa>
- Fasaei, F., Samani, M. R., & Aghbashlo, M. (2018). Microalgae harvesting and dewatering: A review of recent advances. *Bioresource Technology*, 266.

- Fuentes, S., Hernández, M., & Moreno, R. (2018). El potencial de las bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS) en la producción biológica de hidrógeno. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 38(1).
- Frigaard, F., & Sakurai, K. (2004). Phototrophic pigment-protein complexes in purple bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4).
- Gaspá, J., & Lambruschini, N. (2010). Diagnóstico de la intolerancia a la lactosa. Prueba del hidrógeno espirado. *Anales de Pediatría Continuada*, 8(2). Recuperat el 26 de maig del 2023 [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(10\)70014-7](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(10)70014-7)
- Huisman, G. W., & Madison, L. L. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1).
- Instituto Politécnico Nacional. (s. f.). Selección de un medio de cultivo de *Rhodobacter sphaeroides* para la producción de hidrógeno con diversas fuentes de carbono y nitrógeno [PDF]. Recuperat el 23 de maig del 2023, de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18125/tesina%20mejorada.pdf?sequence=1>
- Kumar, M., & Gayen, K. (2021). Purple bacteria as microbial protein source: Technology development, community control, economic optimization and biomass valorization. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100758.
- Lynch, H., et al. (2020). Environmental impacts of plant-based alternative proteins. *Environmental Science & Technology*, 54(10).
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1).
- Mironov, V., & Levenberg, S. (2006). Towards the industrial production of meat from tissue-engineered animals. *Trends in Biotechnology*, 24(8).
- Muñoz, R., & Olivares, J. (2013). Microbial biomass as a promising sustainable feedstock for bioenergy production. *Microbial biotechnology*, 6(4).
- Novak, J. T., Kim, S. Y., & Pfeifer, B. A. (2017). *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 40, 112-120.
- Organization for Economic Co-operation and Development/Food and Agricultural Organization. (2022). OECD-FAO Agricultural Outlook. Recuperat el 29 de maig de 2023, de <https://www.oecd.org/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-19991142.htm>
- PurpleGain (s. f.). Recuperat el 4 d'abril del 2023, de <https://purplegain.eu/about/>

- Santos, M. P., Gouveia, L., & Raymundo, A. (2020). Microbial biomass: An alternative protein source. *Trends in Food Science & Technology*, 95.
- Trullols, O. (s. f.). Mapping sector agroalimentari a Catalunya.
- United Nations Population Division. (n.d.). World Population Prospects. Recuperat el 29 de maig del 2023, de <https://population.un.org/wpp/>
- UVic-UCC. (s. f.). Centro Tecnológico BETA. Recuperat el 23 de maig del 2023, de <https://www.uvic.cat/es/investigacion/centro-tecnologico-beta>
- van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58.
- Yumda. (s. f.). El mercado de la leche de origen vegetal se valorará en 42.860 millones de dólares en 2029. Recuperat el 3 d'abril de 2023, de <https://www.yumda.com/es/noticias/1176635/el-mercado-de-la-leche-de-origen-vegetal-se-valorara-en-42-860-millones-de-dolares-en-2029.html>.
- Residuos de leche vegetal, el reciclaje de ingredientes—The Food Tech. (s. f.). Recuperat el 3 d'abril de 2023, de <https://thefoodtech.com/industria-alimentaria-hoy/residuos-de-leche-vegetal-el-eciclaje-de-ingredientes/>