



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y
Control de Calidad Químicos.

**“EFECTO DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES Y LAS
CONDICIONES DE CULTIVO EN LA VALORIZACIÓN DE
MICROALGAS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA”**

Autora: Irene Piedra Sola

Tutoras: Elena María Rojo de Benito / María del Sol Vega Alegre

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	2
2.1.	Introducción a las Microalgas.....	2
2.2.	Aplicaciones de Microalgas.....	4
2.3.	Uso de fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales.....	5
2.4.	Ruptura de la pared celular de microalgas: un gran desafío.....	7
2.5.	Hidrólisis enzimática.....	9
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	11
3.1.	Biomasa utilizada.....	11
3.2.	Hidrólisis enzimática.....	11
3.2.1.	Procedimiento.....	12
3.3.	Métodos de Análisis.....	13
3.3.1.	Análisis de sólidos totales y sólidos volátiles ⁶²	13
3.3.2.	Análisis de proteínas.....	13
3.3.3.	Análisis de Carbohidratos.....	14
3.3.4.	Análisis de Lípidos.....	15
3.4.	Cálculos realizados.....	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1.	Composición inicial de las microalgas.....	17
4.2.	Hidrólisis Enzimática.....	19
4.3.	Análisis del residuo de biomasa de microalga tras hidrólisis enzimática.....	19
4.3.1.	Solubilización de biomasa total.....	19
4.3.2.	Solubilización de proteínas y carbohidratos.....	21
4.4.	Análisis Estadístico.....	26
4.4.1.	ANOVA sobre el grado de solubilización.....	27
4.4.2.	ANOVA sobre el impacto del proceso de hidrólisis enzimática sobre la composición del residuo de biomasa de microalga.....	30
4.4.3.	Elección de las condiciones óptimas.....	34
5.	CONCLUSIONES.....	36
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	37

Lista de Tablas

Tabla 1. Aplicaciones de microalgas en el tratamiento de aguas residuales.	4
Tabla 2. Aplicaciones de microalgas cultivadas en aguas residuales.....	5
Tabla 3. Condiciones y parámetros de cada ensayo	12
Tabla 4. Factores de corrección HPLC para monosacáridos.....	24
Tabla 5. Valores p de los ANOVA realizados sobre los resultados de solubilización...	27
Tabla 6. Valores p de los ANOVA realizados sobre los resultados del porcentaje de proteínas y carbohidratos contenidos por los residuos de biomasa microalgal.....	31

Lista de Figuras

Figura 1. Proceso de la oxigenación fotosintética de microalgas en los procesos de eliminación de DBO ²³	6
Figura 2. Composición biomasa algal inicial en base seca (%), siendo A1 biomasa cultivada en medio de purines y A2 en medio sintético.	17
Figura 3. Composición biomasa algal inicial en base seca exenta de cenizas (%), siendo A1 biomasa cultivada en medio de purines y A2 en medio sintético.	18
Figura 4. Producto final hidrólisis enzimática.	19
Figura 5. Solubilización de biomasa total tras el proceso de hidrólisis enzimática. Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).	20
Figura 8. Resultados de solubilización de proteínas y carbohidratos en la hidrólisis enzimática (%). Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).	21
Figura 6. Composición biomasa residual en base seca exenta de cenizas (%). Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).	23
Figura 7. Contenido de monosacáridos en biomasa residual en base seca sin cenizas. Ensayos 1-9 en biomasa A1 y ensayos 10-18 en biomasa A2.	26
Figura 9. Respuestas medias de grado de solubilización total de biomasa para los niveles de los factores enzima y tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.	28
Figura 10. Respuestas medias del grado de solubilización de proteínas para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.	29
Figura 11. Respuestas medias del grado de solubilización de carbohidratos para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.	30
Figura 12. Respuestas medias del porcentaje proteico de las biombras residuales para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.	32
Figura 13. Respuestas medias del porcentaje en carbohidratos de las biombras residuales para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.	33
Figura 14. Línea de calibrado para la cuantificación de glucosa mediante HPLC.	45
Figura 15. Línea de calibrado para la cuantificación de xilosa mediante HPLC.	45
Figura 16. Línea de calibrado para la cuantificación de arabinosa mediante HPLC.	46
Figura 17. Línea de calibrado para la cuantificación de celobiosa mediante HPLC.	46

Lista de Anexos

Anexo 1. Líneas de calibrado para la determinación de carbohidratos mediante HPLC.	45
---	----

1. RESUMEN

This work studies the effect of operating conditions on the solubilization of the main macromolecular compounds contained in algal biomass (proteins, carbohydrates and lipids) by enzymatic hydrolysis. The study proposes the valuation of biomass based on the microalgae *Scenedesmus almeriensis*, a microalgae species with a very resistant cell wall which is often used for the treatment of wastewater on photobioreactors. In this type of bioreactors, microalgae and bacteria grow symbiotically, forming consortia; bacteria use the O₂ generated by the microalgae to degrade organic matter, generating CO₂ and other compounds used by the microalgae for their growth. The presence of bacteria in the biomass generated in these treatment plants can considerably affect subsequent recovery processes. Thus, in this work, the results of the valorization are compared, using enzymatic hydrolysis of mixed biomass of microalgae and bacteria grown in pig slurry (A1 biomass) and pure microalgae grown in synthetic medium (A2 biomass). The operational factors studied were type of enzyme (Alcalase, Protamex and Celluclast) and hydrolysis time (1, 3 and 5 h). Although the extraction of both proteins and carbohydrates and lipids is being studied, this work is oriented towards the extraction of proteins, the majority component of the biomass under study.

The two types of biomass (A1 and A2) were subjected to enzymatic hydrolysis combining the levels of the two control factors, resulting in a total of 18 different experiments. The analysis of the residual biomass of each experiment showed a total solubilization with values between 16 and 26 %, depending on the experimental conditions. Of the total solubilized mass, proteins represented between 9 and 55% and carbohydrates between 16 and 37%. The analysis of variance (ANOVA) of the results indicated that the most influential factors are biomass and type of enzyme used, achieving protein solubilizations with the use of the enzyme Alcalase of between 26 and 55% and with the use of the A2 microalgae biomass between 13 and 55%.

2. ANTECEDENTES

2.1. Introducción a las Microalgas

Las algas constituyen un grupo variado de organismos fotosintéticos que abarcan desde el reino procariota hasta el reino eucariota¹. Se pueden dividir en dos grupos, macroalgas (con una estructura multicelular y un tamaño de hasta 60 m) y microalgas (especies unicelulares de pequeño tamaño, hasta 0,2 μm)². Dentro de las microalgas se estima la existencia de unas 200.000 a 800.000 especies, estando documentadas únicamente unas pocas decenas de miles de ellas³.

Las microalgas contienen varios componentes, pero los mayoritarios son proteínas, carbohidratos y lípidos. El contenido de estos compuestos macromoleculares es diferente según la especie de microalga y las condiciones de cultivo⁴, variando entre un 6-71% de proteínas, 8-64% de carbohidratos y 2-22% de lípidos⁵.

El uso de microalgas se remonta a cientos de años atrás por poblaciones indígenas⁶. Varios datos bibliográficos¹ indican que las microalgas se consumen para la supervivencia humana en China desde hace 2.000 años. Aunque esto muestra que se han utilizado como alimento desde bastante tiempo atrás, el inicio del cultivo de microalgas a gran escala no ocurrió hasta comienzos de 1960⁷.

A principios de los años 50, el incremento de la población y las predicciones de una falta de suministro de proteínas encendió las alarmas y propició la búsqueda de fuentes de proteína alternativas⁶. Esto impulsó de forma importante el estudio del cultivo de las microalgas y sus posibles usos y aplicaciones. Para el año 1980 había 46 fábricas en Asia que producían más de 1.000 kg de microalga al mes y a estas le siguieron otras en lugares como Israel y Estados Unidos⁶.

Múltiples características de las microalgas hacen destacar a este tipo de biomasa sobre otras. Entre ellas están su capacidad de crecimiento en ambientes adversos⁸ (aguas residuales, agua salada, hielo o aguas termales) debido a su elevada tolerancia a un amplio rango de pH, salinidad, temperatura y contaminantes; su capacidad de rápida reproducción que permite tanto la producción de biomasa en unas 3,5 horas durante el crecimiento exponencial, como la acumulación de biocompuestos en cortos períodos de tiempo; y su bajo requerimiento de suministro nutricional, que hace que el cultivo de microalgas no interfiera ni compita con el uso de tierras cultivables o fértiles que se

utilizan para la agricultura convencional⁹. Así mismo, el cultivo de microalgas no requiere pesticidas o herbicidas¹⁰.

Respecto al rápido crecimiento que se ha mencionado anteriormente, éste es debido a la estructura simple que presentan las microalgas y a su gran relación superficie / volumen. Esta elevada superficie específica favorece la absorción de la luz y transferencia de masa, que a su vez resulta en una captación rápida de CO₂ y consecuentemente en una fotosíntesis eficiente¹¹.

Estas características son el resultado de la evolución realizada para sobrevivir en entornos adversos que, en adición, ha desembocado en la producción de una amplia gama de biomoléculas funcionales para apoyar el crecimiento en dichas circunstancias desfavorables¹.

Después de décadas de investigación, las microalgas son ahora una realidad comercial¹² y existe una industria global de microalgas principalmente enfocada en el cultivo de especies como *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* y *Skeletonema*¹.

Actualmente, las instalaciones comerciales para la producción de microalgas están dispersas por todo el mundo. Taiwán, Japón, Estados Unidos, China, Brasil, España, Israel, Alemania y Myanmar son los principales productores de la biomasa de microalgas, llevando la producción anual de biomasa microalgal seca a un valor aproximado de 19.000 toneladas¹³.

Esta comercialización ha sido favorecida por las biorrefinerías de microalgas, que han desarrollado el proceso de transformación de la biomasa de estos abundantes organismos fotosintéticos en biocombustibles, cosméticos, bioproductos químicos, alimentos, piensos y compuestos de valor añadido¹⁴. Aunque el concepto de biorrefinería sigue aún en proceso de investigación y desarrollo, en un futuro éste será fundamental para poder alcanzar la denominada bioeconomía circular.

2.2. Aplicaciones de Microalgas

La biorrefinería es un proceso para obtener biocombustibles, energía y productos de alto valor a través de equipos de transformación y procesamiento de biomasa; en este marco las microalgas se consideran fuentes renovables de biomasa y son candidatas óptimas para procesos de biorrefinería al ser capaces de producir múltiples materiales¹⁴. Las microalgas producen una gama de sustancias funcionales que incluyen ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, pigmentos naturales, minerales esenciales, vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y enzimas, así como moléculas bioactivas¹⁵. Las microalgas también se consideran una fuente alternativa de biopolímeros. Industrias como PetroSun, Dow Chemical o CerePlast han comenzado la investigación para la síntesis de biopolímeros a base de microalgas¹⁶. Otro campo de aplicación, que está siendo investigado, lo constituye la interacción entre microplásticos (constituyentes de un problema emergente de contaminación global) y microalgas en referencia a la bioeliminación de estos contaminantes¹⁷.

Por otro lado, la industria, agricultura y áreas residenciales generan grandes flujos de residuos enriquecidos con contaminantes que, sin un tratamiento adecuado, amenazan al medio ambiente¹⁸. Un importante campo de aplicación de las microalgas se encuentra en el tratamiento de aguas residuales puesto que éstas, como se recoge en la Tabla 1, contienen unas características que le permiten una amplia gama de usos sobre las aguas residuales.

Tabla 1. Aplicaciones de microalgas en el tratamiento de aguas residuales.

Aplicación	Descripción
Captación de nutrientes ¹⁹⁻²¹	Las microalgas pueden utilizar nutrientes de la mayoría de las aguas residuales, ricas en mayor o menor medida dependiendo de su origen en carbono, nitrógeno y fósforo.
Eliminación de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) ^{22,23}	La elevada producción fotosintética de oxígeno de las microalgas favorece la eliminación de la DBO y propicia la degradación de la materia orgánica.
Eliminación de metales pesados ²³⁻²⁵	La capacidad de adsorción de metales pesados, un importante grupo de contaminantes, por las microalgas ha sido reportada en varios estudios.
Eliminación de patógenos ²⁰	Las microalgas pueden propiciar la eliminación de patógenos modificando el pH, concentración de oxígeno disuelto o segregando metabolitos inhibidores.

La capacidad de las microalgas de captar nutrientes (carbono, nitrógeno y otros minerales) de las aguas residuales ha llevado a pensar en el uso de este medio como sustrato para el cultivo de microalgas puesto que esto conllevaría una reducción en el coste relacionado con el suministro de agua y nutrientes necesarios en el proceso de cultivo²⁶. Aunque ciertas aplicaciones de la biomasa crecida en este medio se ven restringidas por varios factores: su composición se ve afectada por tan adversas circunstancias de cultivo resultando en microalgas con bajo contenido en lípidos y una pared celular muy resistente y, además, la biomasa microalgal se encuentra en consorcio con bacterias. Junto a esto, se le añade que los campos de aplicación clínica, de fabricación de alimentos, cosméticos y cuidado de la piel, entre otros, deben prestar atención a la seguridad y la toxicidad de los productos químicos utilizados para el cultivo, extracción y purificación de los compuestos de la biomasa de microalgas. Sin embargo, este tipo de biomasa microalgal cultivada en aguas residuales pueden tener otras múltiples aplicaciones, estando algunas de ellas recogidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Aplicaciones de microalgas cultivadas en aguas residuales.

Aplicación	Descripción
Biofertilizantes ^{23,26-29}	El elevado contenido en nitrógeno y fósforo de las microalgas cultivadas en aguas residuales hacen de éstas una prometedora fuente de fertilizantes.
Alimentación animal ³⁰⁻³³	Especies de microalgas <i>Scenedesmus</i> , <i>Spirulina</i> y <i>Chlorella</i> entre otras se utilizan como suplemento alimentario animal, incluyéndose múltiples especies acuáticas.
Biocombustibles ³³⁻³⁵	Microalgas cultivadas en aguas residuales es la opción más barajada como alternativa económica y sostenible para la producción de biocombustibles a escala comercial.
Bioplásticos ³⁶	Se ha conseguido producir bioplásticos a partir de biomasa microalgal cultivada en aguas residuales, aunque con propiedades mecánicas reducidas en comparación con otros bioplásticos.

2.3. Uso de fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales

Las microalgas tienen la capacidad de asimilar carbono orgánico, así como nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo, de las aguas residuales para su crecimiento³⁷ por lo que su uso para producir biomasa útil (la producción de biomasa de microalgas en el tratamiento de aguas residuales aporta un valor adicional al reducirse los costes del cultivo) mientras elimina fuentes orgánicas y de contaminación de aguas residuales tiene un gran potencial tanto económico como ambiental³⁸, como se ha mencionado

brevemente en el apartado anterior. El uso de fotobiorreactores en el tratamiento de aguas residuales con microalgas está siendo ampliamente investigado debido a ventajas como su alta productividad de biomasa en áreas de cultivo limitadas y su capacidad de mantener controladas las condiciones operacionales como luz, pH y temperatura³⁸, en el caso de fotobiorreactores cerrados.

Además de nutrientes y compuestos orgánicos, las aguas residuales contienen una gran diversidad de microorganismos como bacterias que influyen de forma directa en las microalgas³⁹. Se ha demostrado que la relación simbiótica entre microalgas y bacterias favorece tanto la producción de biomasa microalgal como la eliminación de contaminantes de las aguas residuales²⁰. La relación principal entre bacterias y microalgas aparece esquematizada en la Figura 1. La biodegradación de la materia orgánica que ejercen las bacterias aporta CO₂ y nutrientes como nitrógeno y fósforo a las microalgas, promoviendo en éstas la acumulación de biomasa. Por otro lado, las microalgas generan oxígeno a partir de la fotosíntesis, pudiendo ser éste usado en el metabolismo aeróbico de las bacterias.

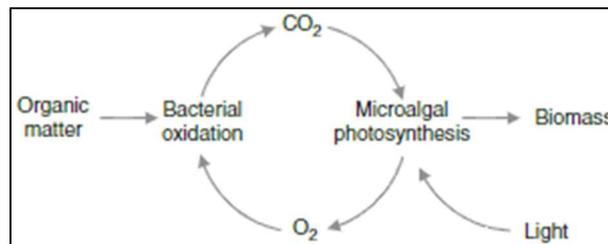


Figura 1. Proceso de la oxigenación fotosintética de microalgas en los procesos de eliminación de DBO²³.

Surge así un campo complejo de estudio en la interacción entre bacterias y microalgas puesto que las interacciones microalga-bacteria pueden ser tanto beneficiosas (como la representada en la Figura 1) como perjudiciales, al poder las microalgas inhibir la actividad bacteriana a través del aumento del pH o mediante la producción de metabolitos inhibidores, y las bacterias por otro lado liberar sustancias algicidas⁴⁰.

La presencia de bacterias en la biomasa algal, por tanto, puede producir desde una aceleración en la productividad de biomasa hasta una ruptura de la pared celular mediante, entre otros mecanismos, la segregación de sustancias como glucosidasas, quitinasas, celulasas y otras enzimas con el objetivo del robo de nutrientes⁴¹.

Estos hechos han puesto en el punto de interés a la interacción bacteria-microalga puesto que, una vez comprendidos los mecanismos de acción de estos consorcios, se podría utilizar para aumentar la rentabilidad de los procesos de valorización de las microalgas. El efecto de aceleración del crecimiento que producen ciertas bacterias sobre las microalgas podría tener aplicaciones en cultivo de microalgas a gran escala⁴², mientras que la capacidad de las bacterias de segregar sustancias que debilitan la pared celular de las microalgas podría utilizarse como pretratamiento en los procesos de extracción de componentes de las microalgas⁴³.

2.4. Ruptura de la pared celular de microalgas: un gran desafío

Las microalgas son microorganismos microscópicos de células individuales cubiertas por una pared celular relativamente recalcitrante cuyos compuestos intracelulares se encuentran principalmente en glóbulos o unidos a membranas complejas, lo que hace que la extracción del contenido celular sea una etapa complicada¹⁵.

Esta pared celular tiene como objetivo preservar la integridad de la célula y sirve como barrera protectora contra los invasores y el ambiente hostil. Sus envolturas celulares son generalmente más rígidas que las envolturas celulares de otros microorganismos o plantas superiores¹⁵.

Las paredes celulares de la mayoría de las especies de microalgas contienen una proporción relativamente grande de celulosa, lo que confiere estabilidad estructural y rigidez a la célula y, adicionalmente, también se puede encontrar una vaina trilaminar que contiene *algaenan* (biopolímero muy resistente) en ciertas especies de microalgas, haciéndolas altamente resistentes a la degradación¹⁵. Además, las paredes celulares de las microalgas son fuertes debido a la existencia de una mezcla de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals que mantienen unidas todas las moléculas¹⁵.

Una ruptura celular efectiva constituye un paso esencial y crítico de pretratamiento en la maximización de la recuperación de compuestos de la biomasa de microalgas⁴⁴. Esto constituye uno de los factores que más dificultan el uso comercial de las microalgas al influir en gran medida en el coste total del proceso, debido a que la ruptura de la pared celular es una etapa que necesita un elevado aporte energético para realizarse⁴⁵, sobre todo en el caso de las microalgas cultivadas en aguas residuales, puesto que éstas se caracterizan por tener una pared celular muy resistente.

Un método de ruptura ideal es aquel que libera selectivamente el producto objetivo mientras usa la menor energía posible. La elección del método depende de la estructura de la pared celular de las especies de microalgas, la ubicación del producto, el tamaño, la solubilidad y la energía aplicada⁴⁶.

Los métodos de ruptura celular pueden clasificarse en físicos (engloba a los métodos térmicos y mecánicos)⁴⁷ y químicos / biológicos (ácidos, bases y enzimas)⁴⁶.

Los métodos térmicos rompen las células de microalgas mediante la aplicación de calor o frío. Se pueden dividir en métodos de temperatura alta (> 100 ° C), suave (50–100 ° C) y de congelación⁴⁷. Entre las ventajas de este tipo de métodos se encuentra su disponibilidad, rentabilidad y el no uso de productos químicos.

Por otra parte, los métodos mecánicos rompen la pared celular a través de la aplicación de una fuerza física⁴⁷. Entre los múltiples métodos mecánicos se encuentra el método de ultrasonidos, microondas, molino de bolas y campo eléctrico pulsado.

El método de ultrasonidos utiliza sonido de frecuencia mayor de 15-20 kHz (inaudible para el oído humano) y se basa en los fenómenos de cavitación provocados por ultrasonidos. La cavitación consiste en la formación, crecimiento y colapso de burbujas de gas y vapor como consecuencia a la acción de ondas sonoras intensas⁴⁸. Se ha demostrado la utilidad de los tratamientos con ultrasonido para la ruptura de las paredes celulares de varias especies de microalgas⁴⁹.

Por su parte, el método de microondas, a diferencia de los métodos de calentamiento convencionales, calienta la biomasa por microondas a través de la vibración de moléculas dipolares como el agua. En un estudio realizado sobre la microalga *Chlorella vulgaris*, el tratamiento con microondas (100 °C y 2450 MHz durante 5 min) resultó ser el método más eficaz para la ruptura celular en comparación con otros métodos (autoclavado, molino de bolas, sonicación y choque osmótico)⁵⁰.

Respecto al molino de bolas, este método se considera uno de los más eficientes para la ruptura celular. Consiste en el uso de pequeñas bolas (de vidrio, cerámica, plástico o acero) mediante un molino, las cuales golpean contra la biomasa microalgal. Utiliza fuerza mecánica para extraer el contenido de la célula⁴⁷. El uso de esta técnica como pretratamiento previo a la hidrólisis enzimática de la microalga *Chlorella vulgaris*

aumentó el rendimiento de recuperación de sus componentes un 44% respecto al tratamiento sin molino de bolas⁵¹.

El método de campo eléctrico pulsado consiste en la introducción de células biológicas en un campo eléctrico externo provocando un aumento del voltaje transmembrana, que desemboca en la permeabilización de la membrana celular. Esto se traduce en la aparición de daños en la pared celular que dependerán de la fuerza del campo eléctrico aplicado⁵².

Respecto a los métodos químicos, el ácido sulfúrico es el ácido más comúnmente utilizado mientras que el hidróxido de sodio es la base más popular⁴⁷.

Dentro de los métodos químicos también se encuentra el uso del choque osmótico. Éste se produce cuando hay un cambio en la concentración que rodea a la célula. La pared celular se rompe como resultado de la permeación que sufre para alcanzar el equilibrio con el medio. El uso de esta técnica obtuvo resultados positivos en un estudio que tenía como objetivo la extracción de proteínas en la microalga *Chlorella vulgaris*⁵³.

Los tratamientos mecánicos y térmicos requieren un gran consumo de energía, y los métodos químicos pueden causar algunos problemas como biotoxicidad, y degradación de compuestos de interés. Se hace pues necesario desarrollar métodos de ruptura celular de microalgas de alta eficiencia, benignos para el medio ambiente y no tóxicos⁴⁵. Sin embargo, el principal desafío de extraer todos los productos posibles de la biomasa de algas es maximizar el rendimiento de la extracción de cada producto por separado mientras se preserva la integridad del resto⁵⁴. Todo esto se puede conseguir mediante la hidrólisis enzimática.

2.5. Hidrólisis enzimática

Se entiende por hidrólisis enzimática a la hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas⁴⁷.

El tratamiento enzimático generalmente se realiza en condiciones suaves y es una alternativa ecológica, no peligrosa y que consume menor energía en comparación con las técnicas mecánicas y químicas¹⁵ mencionadas anteriormente.

Como ventaja frente a otros métodos presenta⁵⁵:

- *Selectividad*. Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace, por tanto no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca

selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conducen a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.

- *Condiciones moderadas de temperatura y pH.* La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8.
- *No se añaden sustancias extrañas.* Esto no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales y cenizas en los productos obtenidos.
- *Se mantiene el valor nutritivo,* ya que no se produce degradación de los componentes extraídos, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

Teniendo en cuenta la composición de la pared celular de las microalgas, entre las enzimas más utilizadas con este propósito se encuentran las proteasas (enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas) y celulasas (enzima especializada en descomponer celulosa, transformándola en múltiples monómeros de glucosa).

En contrapartida a todas las ventajas que supone el uso de este método, como principales inconvenientes se encuentra el elevado coste de las enzimas y la dificultad de hallar la combinación de enzimas y dosis óptimas para conseguir los resultados deseados⁵⁶. En base a estos inconvenientes surge el empleo de microorganismos (como bacterias) que alteren la estructura de las paredes celulares de las microalgas a través de la segregación de compuestos químicos y enzimas propias, para disminuir el coste asociado al tratamiento enzimático⁵⁶.

Con todo lo anterior presente, en este trabajo se estudiará la solubilización de los componentes macromoleculares de las microalgas mediante hidrólisis enzimática. Se evaluó el efecto de dos parámetros operacionales a tres niveles (Alcalasa, Protamex y Celluclast como enzimas y tiempos de hidrólisis enzimática de 1,3 y 5 horas) utilizando dos tipos de microalgas (*Scenedesmus almeriensis* pura y biomasa de consorcio de microalgas, principalmente *Scenedesmus almeriensis*, y bacterias cultivadas en purines de cerdo). *Scenedesmus almeriensis* es una microalga verde (Chlorophyceae) perteneciente a la familia Scenedesmaceae que posee una pared celular gruesa y dura muy resistente⁵⁷, lo que la hace especialmente adecuada para su empleo en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales. Los resultados del diseño experimental serán

interpretados mediante el análisis de la varianza, ANOVA, para identificar los factores que influyen significativamente en la recuperación de nutrientes, especialmente proteína, e identificar los niveles que producen el mayor rendimiento de extracción.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Biomasa utilizada

Se llevaron a cabo ensayos con biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, utilizándose dos lotes con medios de crecimiento diferentes: consorcio de microalgas (principalmente *Scenedesmus almeriensis*) y bacterias crecido en purines de cerdo (etiquetada como A1) y *Scenedesmus almeriensis* pura crecida en medio de cultivo sintético (denominada A2). La primera se cultivó en un fotobiorreactor abierto de capa fina, que trata aguas residuales del estiércol de cerdo diluido al 10% como alimento, durante septiembre-octubre de 2016 conservada liofilizada, mientras que la segunda biomasa de *Scenedesmus almeriensis* utilizada en este trabajo fue cultivada en fotobiorreactores tubulares estériles, como se describe en el artículo “*Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain Scenedesmus almeriensis*⁵⁷” y fue amablemente proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería, España).

3.2. Hidrólisis enzimática

Para cada biomasa se realiza una hidrólisis enzimática con tres enzimas diferentes: Alcalasa 2.4L (E1), Protamex (E2) y Celluclast 1.5L (E3) (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca). La enzima Alcalasa es una serina endopeptidasa producida a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* que consiste principalmente en subtilisina A. Ésta es adecuada para la hidrólisis de proteínas y muestra una actividad mínima de 2.4 UA/g⁵⁸. Por su parte, la enzima Protamex es una endo y exoproteasa, combinación de cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, que presenta una actividad enzimática de 1,7 UA/g⁵⁹, también adecuada para la hidrólisis de proteínas. Por último, la enzima Celluclast es una preparación enzimática proveniente de una cepa de hongo denominada *Trichoderma reesei*⁶⁰. Es una celulasa que descompone la celulosa en glucosa y tiene una actividad enzimática de 65 FPU/mL⁶¹.

Cada enzima se utilizó a tres tiempos de hidrólisis diferentes (1, 3 y 5 horas) con el objetivo de determinar las condiciones bajo las cuales se obtiene un mayor rendimiento de recuperación de los diferentes macrocompuestos presentes en la microalga. Los niveles

de los factores enzima, tiempo y tipo de biomasa se combinaron dando lugar a los 18 ensayos diferentes que se muestran en la Tabla 3. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Tabla 3. Condiciones y parámetros de cada ensayo

<i>A1</i>			<i>A2</i>		
<i>Ensayo</i>	Enzima	Tiempo (h)	<i>Ensayo</i>	Enzima	Tiempo (h)
<i>1</i>	E1	1	<i>10</i>	E1	1
<i>2</i>	E1	3	<i>11</i>	E1	3
<i>3</i>	E1	5	<i>12</i>	E1	5
<i>4</i>	E2	1	<i>13</i>	E2	1
<i>5</i>	E2	3	<i>14</i>	E2	3
<i>6</i>	E2	5	<i>15</i>	E2	5
<i>7</i>	E3	1	<i>16</i>	E3	1
<i>8</i>	E3	3	<i>17</i>	E3	3
<i>9</i>	E3	5	<i>18</i>	E3	5

3.2.1. Procedimiento

Se prepararon disoluciones con una concentración del 5 % p/v de microalga en matraces de 500 ml. A cada ensayo se le ajustó el pH al óptimo recomendado por el fabricante para cada enzima con disoluciones de NaOH 1M o HCl 1M. Para la enzima Alcalasa se ajustó la disolución a pH 8, para la enzima Protamex pH 6,5 y para la enzima Celluclast pH 4,8. En el caso de los ensayos con enzima Celluclast se añadió 12,5 ml de una disolución tampón de ácido cítrico 0,05M.

Las disoluciones preparadas se introdujeron en una incubadora a 50°C. Tras adquirir esta temperatura, se añadieron a las disoluciones sus correspondientes enzimas a una concentración determinada (5:100 v/w de Alcalasa, 1:100 w/w de Protamex y 10 FPU de Celluclast), reportadas como adecuadas en otros estudios similares y de acuerdo con la experiencia previa del grupo. A continuación, se incubaron las suspensiones con agitación (300 rpm) durante 1,3 o 5 horas, dependiendo del ensayo.

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se centrifugaron (centrífuga ThermoScientific Sorvall Leyenda RT+) 5 minutos a 10.000 rpm para separar la fase sólida de la líquida y se conservaron ambas fases por separado, habiéndolas pesado previamente para los posteriores balances de materia. Se analizó el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y el contenido tanto de sólidos totales como volátiles en

la biomasa residual de microalga tras el tratamiento de hidrólisis enzimática. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

3.3. Métodos de Análisis

3.3.1. Análisis de sólidos totales y sólidos volátiles⁶²

Para comprobar los balances de masa se determinaron los sólidos totales y volátiles (materia calcinable, principalmente materia orgánica), tanto de las muestras de microalga iniciales (A1 y A2) previas a la hidrólisis enzimática como de las fracciones sólidas obtenidas tras el proceso de hidrólisis.

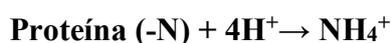
Para la determinación del contenido de humedad de cada muestra se realizó un análisis de sólidos totales, secando 2 g de biomasa a 105°C hasta peso constante (habiendo sido las muestras previamente liofilizadas). Mediante calcinación de la biomasa a 550°C durante 24 horas, se determinó el contenido de sólidos volátiles.

3.3.2. Análisis de proteínas

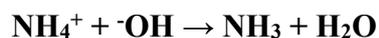
Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Kjeldahl⁶³. A partir de este método se obtiene el contenido de nitrógeno total. Multiplicando este contenido por un factor, dependiente de la matriz de la muestra, se obtiene el porcentaje de proteína presente.

El método de Kjeldahl consta de 3 etapas: digestión, destilación y valoración.

En la etapa de digestión se rompen todos los enlaces de nitrógeno de la muestra y se convierte todo el nitrógeno, previamente unido orgánicamente, en iones amonio:



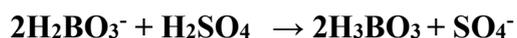
En la etapa de destilación los iones amonio se convierten en amoniaco mediante la adición de hidróxido de sodio:



El amoniaco destilado se arrastra a un matraz receptor que contenga una disolución absorbente (ácido bórico) capaz de captarlo:



Por último, en la etapa de valoración, se determina la concentración de iones borato formados, equivalentes al nitrógeno presente en la muestra, utilizando ácido sulfúrico como valorante:



Para la aplicación del método de Kjeldahl se añadieron en un tubo de digestión 0,05 g de muestra seca junto con 6 ml de H₂SO₄ 98% y una pastilla de catalizador de Kjeldahl (0,3% CuSO₄·5H₂O). Se pusieron estos tubos en el digestor, donde se llevó a cabo un programa de calentamiento escalonado en tres etapas hasta alcanzar una temperatura final de 370°C y se dejó digerir durante 1 hora.

Una vez las muestras estaban digeridas y enfriadas se pasó a la unidad de destilación (KjeFlex K-360), recogiendo el destilado sobre un exceso de ácido ortobórico al que se añadió unas gotas de indicador mixto (rojo de metilo y azul de metileno). Una vez concluido el destilado, se pasó a la valoración. Se añadió ácido sulfúrico de concentración 0,025 o 0,05 M (dependiendo de la cantidad de nitrógeno se usó uno u otro de forma que el volumen gastado de ácido durante la valoración fuera aceptable) hasta viraje del color de la disolución de verde a violeta, indicativo del punto final de la valoración.

Con estos datos se calculó el porcentaje de nitrógeno de las muestras. Multiplicando ese resultado por un factor de 5.95 (valor reportado en otros estudios con la microalga *Scenedesmus almeriensis* como adecuado)⁴⁹ se obtuvo el contenido de proteínas de las muestras.

3.3.3. Análisis de Carbohidratos

Los carbohidratos son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas. Están compuestos por una o varias unidades de monosacáridos. Son solubles en agua e insolubles en disolventes apolares.

Todos los carbohidratos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La hidrólisis se ve favorecida con un aumento de la temperatura.

El procedimiento para la determinación de carbohidratos en sólidos consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en las muestras de residuo de biomasa de microalga y la posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para la hidrólisis ácida se pesaron 0,3 g de muestra seca en tubos de vidrio y se les añadió 3 ml de H₂SO₄ 72% p/p. Se taparon con aluminio y se introdujeron en un baño termostático a 30°C durante una hora. Durante este tiempo se va agitando cada 5-10 minutos para favorecer la solubilización. Una vez transcurrido el tiempo, se transvasaron

a botes de autoclave y se les añadió 84 ml de agua destilada MilliQ para diluir la concentración del ácido sulfúrico del 72% al 4%. Se introdujeron los botes en un autoclave durante una hora a 121°C. Una vez enfriadas las muestras, se filtró la fase líquida con filtros de nylon de 0,22 µm.

Mediante cromatografía líquida (HPLC) se determinó el contenido de los azúcares presentes en los filtrados. Para la cuantificación del contenido de carbohidratos se utilizó una columna de exclusión de iones Bio-Rad HPX-87H instalada en un módulo de separación Waters e2695. Se utilizó un detector de índice de refracción (Waters 2414) para cuantificar la concentración de monosacáridos obtenida en las muestras líquidas. Como fase móvil se usó una disolución acuosa de 25 mM de H₂SO₄ a un flujo de 0,6 ml/min y 50°C.

Para la cromatografía se utilizaron como patrones disoluciones de glucosa, arabinosa, xilosa y celobiosa. Los patrones se eligieron en base a datos bibliográficos de los carbohidratos más comúnmente abundantes en la mayoría de las microalgas⁴⁹.

Los patrones utilizados para la calibración corresponden a disoluciones de glucosa de concentración 0,5, 0,75, 1, 3 y 4 mg/ml, disoluciones de arabinosa y xilosa de concentraciones 0,25, 0,5, 0,75, 1, 3 y 4 mg/ml. Por último, también se utilizaron disoluciones de celobiosa de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mg/ml.

Adicionalmente, para calcular los posibles factores de corrección debido a la posible degradación producida durante la hidrólisis ácida de cada uno de los monosacáridos, para el cálculo final del contenido de carbohidrato de las muestras, se sometieron al tratamiento de hidrólisis muestras de glucosa, arabinosa, xilosa y celobiosa puras comerciales y también se analizaron por HPLC.

3.3.4. Análisis de Lípidos

Los lípidos son cadenas hidrocarbúricas muy largas. Se caracterizan por ser insolubles en agua (hidrófobos) y solubles en disolventes orgánicos.

La adición de sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente y de ese modo precipitar.

Para el análisis de lípidos, se pesó 0,1 g de muestra seca en un tubo cónico falcon junto con 0,1 g de alúmina y se trituraron durante varios minutos para homogeneizar la muestra. A esta mezcla se le añadió 2 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) y se centrifugó 5 min a

10.000 rpm. Se separó la fase líquida en otro tubo y al precipitado se le vuelve a añadir 1 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió cinco veces para extraer toda la fase lipídica.

Una vez extraída toda la fase lipídica, al sobrenadante recogido se le añadieron 3 ml de HCl 0,1 M y 0,3 ml de MgCl₂ para separar las proteínas. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Se forman así tres fases, una superior acuosa transparente, una blanquecina inferior con las proteínas precipitadas y una oscura que es la que contiene los lípidos. Ésta última se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio de cuello largo y se vertió en un vial limpio previamente pesado. Éste se puso a secar, al aire en campana y a temperatura ambiente, hasta pesada constante y el peso final será el de los lípidos totales.

3.4. Cálculos realizados

Las siguientes fórmulas fueron utilizadas para la determinación de las solubilizaciones (total, de proteínas y de carbohidratos) durante el proceso de hidrólisis enzimática.

$$\text{Solubilización total} = \left(1 - \frac{g \text{ biomasa en fase sólida}}{g \text{ biomasa inicial}} \right) \times 100$$

$$\text{Solubilización proteínas} = \left(1 - \frac{g \text{ proteínas en fase sólida}}{g \text{ proteínas en biomasa inicial}} \right) \times 100$$

$$\text{Solubilización carbohidratos} = \left(1 - \frac{g \text{ carbohidratos en fase sólida}}{g \text{ carbohidratos biomasa inicial}} \right) \times 100$$

Por último, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los resultados, tanto de solubilización de proteínas y carbohidratos como para el contenido en proteína y carbohidrato obtenido de la biomasa de microalga residual tras el proceso de hidrólisis enzimática, con objeto de determinar los factores (biomasa algal, enzima y tiempo de hidrólisis) que ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre la solubilidad y evaluar la selectividad del proceso de hidrólisis realizado. Así mismo, se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores y se identificaron los niveles que producen mejores rendimientos de extracción.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición inicial de las microalgas

Para ambos tipos de alga, la composición porcentual en base seca queda recogida en el siguiente gráfico (Figura 2).

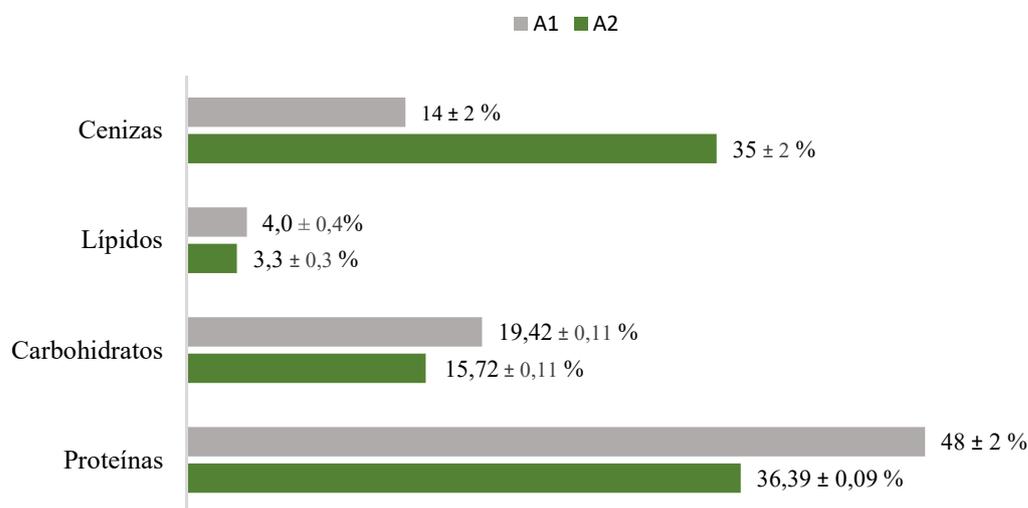


Figura 2. Composición biomasa algal inicial en base seca (%), siendo A1 biomasa cultivada en medio de purines y A2 en medio sintético.

El contenido de cenizas es bastante elevado en ambos tipos de alga, especialmente el del alga A2 (35%). Hay antecedentes bibliográficos de elevado contenido de ceniza en la especie de microalga *Scenedesmus almeriensis* (57.61%)⁶⁴ y *Scenedesmus obliquus* con 36.2%⁶⁵. Una posible explicación aportada en un estudio referido a la microalga *Scenedesmus almeriensis* en el que encuentra un contenido de ceniza del 19.4%, achaca el elevado contenido de ceniza al alto contenido de metales alcalino y alcalino-térreos⁶⁶. En nuestro caso, el alto porcentaje de cenizas en A2 se debería a la elevada concentración de fertilizantes en el medio de cultivo.

Cabe mencionar, además, respecto a la presencia de cenizas en biomasa microalgal, que se ha encontrado una posible relación entre el pH de las disoluciones 5% p/v de biomasa inicial con el contenido en cenizas. Pudiendo ser el pH un indicativo previo al análisis composicional de la presencia de cenizas. Se ha llegado a esta conclusión puesto que el pH inicial de las disoluciones preparadas a partir del alga A2 se ha encontrado alrededor a 8, mientras que en el alga A1 el pH inicial de las disoluciones preparadas fue de 6,5.

Debido a esto, se decide realizar los cálculos con las composiciones en base seca exenta de cenizas, obteniendo una composición similar en ambas (Figura 3). Este resultado permite realizar una comparación efectiva del efecto de los parámetros en la hidrólisis enzimática en los dos tipos de microalgas, diferenciándose solo en la presencia o no de bacterias.

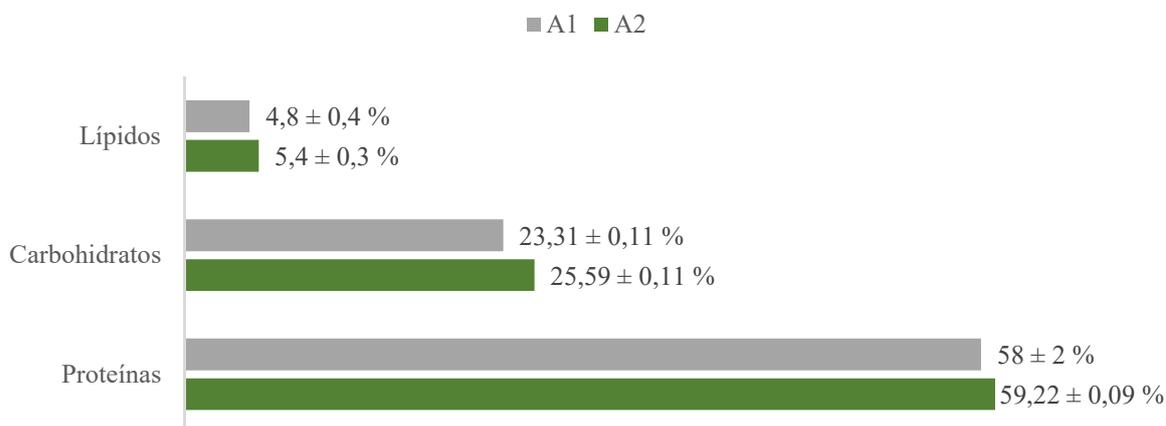


Figura 3. Composición biomasa algal inicial en base seca exenta de cenizas (%), siendo A1 biomasa cultivada en medio de purines y A2 en medio sintético.

Por otro lado, ambas algas presentan un bajo contenido de lípidos (3,3 y 4,0% en base seca). Son valores bajos ya que normalmente el contenido de lípidos de la especie *Scenedesmus almeriensis* se encuentra alrededor del 10-15%, dándose casos con incluso valores algo menores⁵⁷. El bajo contenido de lípidos en el caso del alga A1 se explica además por su crecimiento en un ambiente poco ideal con la competencia de otros múltiples microorganismos y condiciones adversas que hacen que el estrés al que estén sometidos desemboque en una baja cantidad de lípidos en su composición total (el análisis composicional en otro estudio de la *Scenedesmus almeriensis* cultivada en purines de cerdo reportó un contenido de lípidos del 4%).

En general, la microalga *Scenedesmus almeriensis* tiende a mostrar una composición en la que predominan proteínas y carbohidratos; posiblemente relacionado con su gruesa pared celular⁴⁹.

4.2. Hidrólisis Enzimática

Respecto a la hidrólisis enzimática, se obtienen hidrolizados como los mostrados en la Figura 4.



Figura 4. Producto final hidrólisis enzimática.

Los hidrolizados obtenidos de biomasa de microalga A1 presentan un color más oscuro que los de A2. Varios estudios exponen que los pigmentos presentes en las microalgas pueden ser fácilmente degradados por causas como la temperatura, luz u otros microorganismos⁴⁹. La temperatura de hidrólisis y la presencia de los microorganismos propios del crecimiento bajo ambiente de purines puede ser la causa de la variación de la coloración entre los hidrolizados de ambas muestras de microalga.

4.3. Análisis del residuo de biomasa de microalga tras hidrólisis enzimática

Una vez realizada la hidrólisis enzimática, el residuo de biomasa de microalga resultante se convierte en el objetivo de los siguientes análisis a fin de determinar la eficacia y selectividad de la hidrólisis bajo las diferentes condiciones realizadas.

4.3.1. Solubilización de biomasa total

En la Figura 5 aparece representada la solubilización de biomasa total obtenida tras el proceso de hidrólisis enzimática bajo las condiciones correspondientes a cada ensayo realizado.

Se observa cómo no se consiguen valores demasiado elevados de solubilización. Las solubilizaciones obtenidas se encuentran entre 16,4 y 26,4%, obteniendo mayores solubilizaciones con la biomasa cultivada en medio de purines (A1) y la enzima Alcalasa (E1). Estos grados de solubilización podrían indicar la necesidad de un pretratamiento previo a la realización del proceso de hidrólisis enzimática que rompa la pared celular de la microalga *Scenedesmus almeriensis* para mejorar la solubilización de sus compuestos.

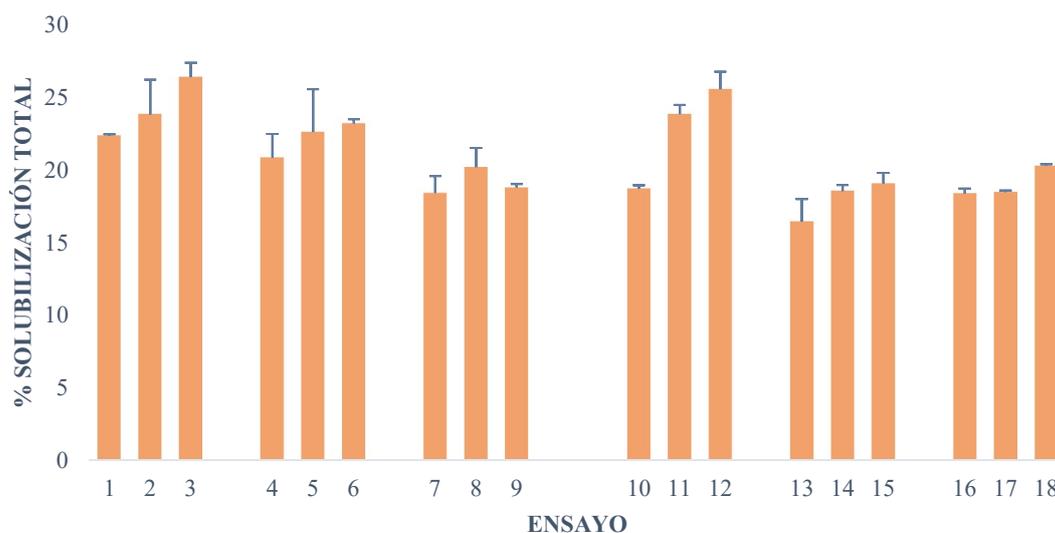


Figura 5. Solubilización de biomasa total tras el proceso de hidrólisis enzimática. Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).

La solubilización total sobre la microalga A1 se encuentra entre un 18,4 y 26,4% mientras que sobre la microalga A2 está sobre un 16,4 y 25,5%. No se aprecia por tanto grandes diferencias sobre la solubilización total respecto al uso de una microalga u otra. Esto podría llevar a pensar que las bacterias presentes en A1 no influyen significativamente sobre la solubilización.

Por otro lado, de todas las enzimas utilizadas, la que parece provocar una mayor solubilización es la enzima Alcalasa, presentando un rango de solubilización que abarca del 18,7 al 26,4% mientras que las enzimas Protamex y Celluclast presentan rangos de 16,4-23,1% y 18,4-20,3%, respectivamente. Esto podría indicar una mayor penetración sobre la pared celular de la enzima Alcalasa, permitiendo así mayores solubilizaciones.

En cuanto a la influencia del tiempo de hidrólisis sobre la solubilización total, en la Figura 5 se puede apreciar como un mayor tiempo de hidrólisis conlleva un mayor grado de solubilización conseguido. Se alcanzaron intervalos de solubilización del 16,4 al 22,4% para ensayos con un tiempo de hidrólisis de 1 h mientras que con tiempos de hidrólisis de 5 h se alcanzaron solubilizaciones del 18,8 al 26,4%. Sobre todo, tanto para los ensayos con enzima Alcalasa como Protamex se aprecia la diferencia en la solubilización obtenida entre tiempos cortos y largos de hidrólisis.

4.3.2. Solubilización de proteínas y carbohidratos

Las solubilizaciones obtenidas tanto de proteínas como carbohidratos (calculadas siguiendo las ecuaciones del apartado 3.4) aparecen recogidas en la Figura 8.

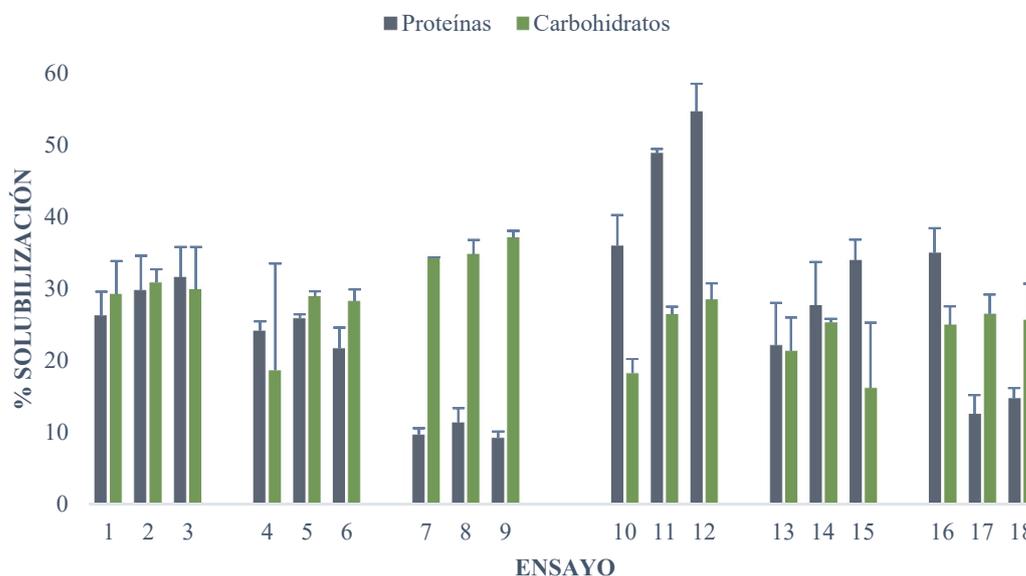


Figura 6. Resultados de solubilización de proteínas y carbohidratos en la hidrólisis enzimática (%). Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).

Respecto a las proteínas y según se aprecia en la Figura 8, el grado de solubilización conseguido comprende del 9,2% obtenido en el ensayo 9 (con el alga A1, Celluclast y cinco horas de hidrólisis) al 54,7% obtenido en el ensayo 12 (con el alga A2, Alcalasa y cinco horas de hidrólisis). En la representación de la Figura 8 se puede apreciar que la solubilización de proteínas se ve favorecida sobre la microalga A2, consiguiéndose en ésta una solubilización de proteínas del 12,5 al 54,7%, frente a la solubilización del 9,2 al 31,6% conseguida sobre la microalga A1. Parece así que la solubilización de proteínas se ve perjudicada por la presencia de bacterias, como se explicará más detalladamente en siguientes apartados.

En cuanto al papel de las enzimas utilizadas, los ensayos en los que la enzima Alcalasa es utilizada destaca por mostrar unas solubilizaciones de proteínas (26,2-54,7%) más elevadas que en las obtenidas en los ensayos en los que se utilizan la enzima Protamex (21,7-34%) y Celluclast (9,2-35%), siendo especialmente bajas con el uso de ésta última. Algo esperado y que concuerda con la naturaleza de cada enzima, puesto que mientras

que la enzima Celluclast es una celulasa (rompe los enlaces de carbohidratos), tanto la enzima Alcalasa como Protamex son proteasas (rompen los enlaces de proteínas).

Se aprecia una tendencia a aumentar el grado de solubilización progresivamente al aumento del tiempo de hidrólisis. Este comportamiento se puede apreciar con más claridad fijándonos en los ensayos en los que se ha utilizado a enzima Alcalasa donde la solubilización conseguida en tiempos de 1 h (26,2-36%) son bastante menores a los presentados con tiempos de 5 h (31,6-54,7%). Esto indicaría que, con tiempos cortos de hidrólisis, las enzimas no tienen tiempo de actuar sobre todos los sitios activos y no se consigue producir toda la hidrólisis posible, desembocando en menores grados de solubilización de, en este caso, proteínas.

En el caso de los carbohidratos, el grado de solubilización abarca del 16,1 al 37,1%, encontrándose esta solubilización favorecida sobre la microalga A1, presentando ésta una solubilización de carbohidratos del 18,6 al 37,1% frente al menor grado de solubilización (16,1-28,5%) presentado en el caso de A2. En esta situación, por tanto, al contrario que en el caso de las proteínas, la presencia de bacterias parece favorecer la solubilización de este componente.

Respecto a las enzimas, también al contrario que el caso de proteínas, en los ensayos en los que se utiliza Celluclast se observa un mayor grado de solubilización (26,5-37,1%) que en los utilizados las enzimas Alcalasa (18,2-30,9%) y Protamex (16,2-28,9%). Estos resultados concuerdan con la diferente naturaleza de cada una de estas enzimas.

Por último, comentar que, en el caso de los carbohidratos, al contrario que en las proteínas, no se aprecia una tendencia clara de la solubilización obtenida en función del tiempo de hidrólisis llevado a cabo. Esta influencia se podrá apreciar con más claridad en los ANOVA realizados.

4.3.3. Composición de la biomasa microalgal residual

Tras llevar a cabo los análisis explicados en el apartado 3.3 se obtiene la siguiente composición en base seca exenta de cenizas de la biomasa de microalga residual tras el proceso de hidrólisis (Figura 6) de todas las muestras analizadas (se exponen los valores medio de los duplicados y las desviaciones típicas).

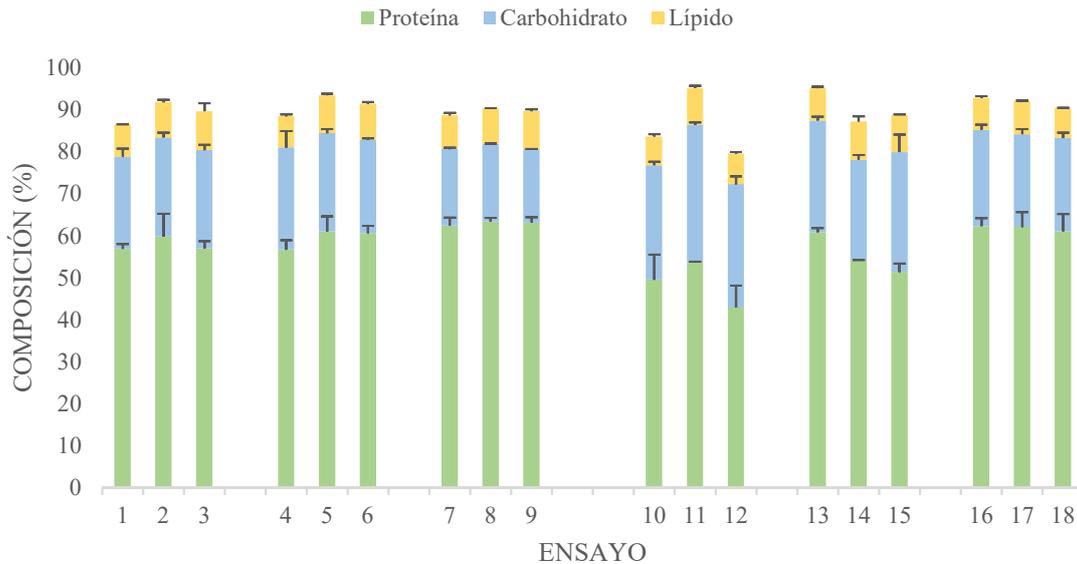


Figura 7. Composición biomasa residual en base seca exenta de cenizas (%). Ensayos 1-9 en biomasa A1 (cultivada en purín) y ensayos 10-18 en biomasa A2 (cultivada en medio sintético).

Esta composición (Figura 6) nos permite comparar la selectividad en el proceso de extracción de las diferentes condiciones bajo las cuales se ha llevado a cabo las hidrólisis enzimáticas. En los siguientes apartados procedemos a comentar los resultados obtenidos para proteínas, carbohidratos y lípidos.

4.3.3.1. Proteínas

En cuanto a la composición proteica de la biomasa residual (Figura 6), se obtiene en todos los ensayos que el contenido proteico de dicha biomasa abarca valores desde el 42,9 al 63,4%.

Respecto a la selectividad en la extracción según la biomasa utilizada, se observa un mayor contenido proteico en los residuos de biomasa de la microalga A1, abarcando ésta contenidos desde el 56,9 al 63% frente al 42,9-62,3% de proteínas de la microalga A2. Por otro lado, en cuanto a la selectividad en la extracción según el tipo de enzima, ésta se muestra favorecida en los ensayos en los que se ha utilizado la enzima Alcalasa. El uso de esta enzima muestra contenidos en la biomasa residual de entre el 42,9 y 59,8%, mientras que el uso de las enzimas Protamex y Celluclast abarcan valores del 51,3 al 61% y del 61,1 al 63,4%, respectivamente. La mayor selectividad de la Alcalasa frente al trabajo de otras enzimas ha sido reportada en otros trabajos⁵².

En cuanto a la mayor extracción de proteínas de la biomasa A2 que de la biomasa cultivada en purines, debe considerarse que el cálculo de las enzimas proteasas se realizó en base a la biomasa total sometida a hidrólisis. Los análisis realizados posteriormente mostraron un mayor porcentaje de cenizas en la muestra de microalga pura, lo que supone una mayor concentración relativa de enzimas respecto a la cantidad de proteínas en los experimentos con A2. Esta podría ser la razón de la mayor solubilización de proteínas en los ensayos de hidrólisis usando proteasas en alga pura que en biomasa crecida en purines. La reacción de hidrólisis está ligada a la formación del complejo enzima-sustrato, que a su vez depende de la concentración de la enzima activa⁶⁷. Actualmente se están realizando nuevos ensayos, refiriendo la cantidad de enzima añadida a los sólidos volátiles (calcinables) de la biomasa, en lugar de a los sólidos totales.

4.3.3.2. Carbohidratos

Las rectas de calibrado obtenidas a partir de las cuales se han realizado los cálculos para determinar el contenido de carbohidrato mediante HPLC se presentan en el anexo 1 (Figuras 14-17). Así mismo, se obtienen los siguientes factores de corrección (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de corrección HPLC para monosacáridos.

Monosacárido	Factor de corrección
<i>Glucosa</i>	0,997
<i>Arabinosa</i>	0,950
<i>Xilosa</i>	0,843
<i>Celobiosa</i>	0,993

Los factores de corrección obtenidos muestran que tanto la glucosa como celobiosa no se degradan durante el proceso de hidrólisis ácida; sin embargo, la arabinosa y xilosa sí sufren cierta degradación. Mientras que la arabinosa muestra una degradación leve, la xilosa muestra una degradación más pronunciada. De ahí la importancia de tener en cuenta estos factores.

Respecto a la composición de carbohidratos en la biomasa residual tras el proceso de hidrólisis enzimática (Figura 6), se observa un contenido de entre el 17,5 y 32,8%. Como cabía esperar, la mayor selectividad en la solubilización de carbohidratos parece estar favorecida por el uso de la enzima Celluclast, encontrándose un contenido de carbohidratos en el residuo del 17,8 al 22,9% en los ensayos en los que se utilizó dicha enzima frente a los rangos 21,9-32,8% y 22,2-28,6% en los ensayos en los que se utilizó

la enzima Alcalasa y Protamex, respectivamente. Esto concuerda con la naturaleza de ambas enzimas y pone de manifiesto las posibilidades de la selectividad del proceso de hidrólisis enzimática.

Mientras que en el caso de las proteínas la selectividad de extracción se encuentra favorecida en las muestras de alga A2, en los carbohidratos ésta se encuentra favorecida en muestras de alga crecida en medio de purines, encontrándose un contenido de carbohidratos en biomasa residual de los ensayos sobre A1 de entre un 17,8 y 24,3% frente a un contenido de entre un 22,1 y 32,8% en los ensayos sobre A2. Esto puede ser debido a varias razones. Por un lado, diversos estudios indican la estrecha relación entre bacterias y microalgas, resultando en interacciones tanto mutuamente favorecedoras como en interacciones de naturaleza parasitaria^{41,68}. En estas últimas, las bacterias mediante la producción de glucosidasas, quitinasas, celulasas y otras enzimas son capaces de dañar la pared celular de las microalgas con el objetivo de robarles nutrientes. Esto en principio nos llevaría a pensar que la extracción se vería favorecida en la microalga crecida en medio de purines donde hay presencia de bacterias, como se da en el caso de los carbohidratos, sin embargo, no en las proteínas (en este caso probablemente hay presencia de bacterias que segregan principalmente inhibidores de proteasas⁶⁹). Esto evidenciaría un papel favorecedor de las bacterias respecto a los carbohidratos, pero perjudicial para el caso de las proteínas en los cultivos de alga que se tratan en este trabajo.

Por otro lado, el medio de purines puede contener metales habitualmente usados para potenciar el crecimiento del ganado porcino, principalmente cobre y cinc. La microalga A1 puede haber acumulado cierta cantidad de metales que, al interaccionar con las enzimas, modifiquen la actividad de éstas de forma diferente dependiendo de la enzima y de ahí la diferencia entre el grado de extracción de proteínas y carbohidratos en cada biomasa. Habría que realizar un estudio en más profundidad para determinar la razón exacta de estos resultados.

Respecto al porcentaje de monosacáridos en los carbohidratos totales, en la Figura 7 aparecen representados los correspondientes al del residuo de biomasa microalgal de cada ensayo. En cuanto al contenido de monosacáridos inicial, previo al proceso de hidrólisis, para el caso de A1 correspondería a un 49% de glucosa, 47% de xilosa, 1% de arabinosa y 3% de celobiosa mientras que para el caso de A2, ésta se compone por un 56% de glucosa, 41% de xilosa y 3% de celobiosa.

Los resultados del contenido de glucosa y arabinosa se obtienen con una desviación típica del 0,012%, los de xilosa con un 0,02% y los de celobiosa con un 0.007%.

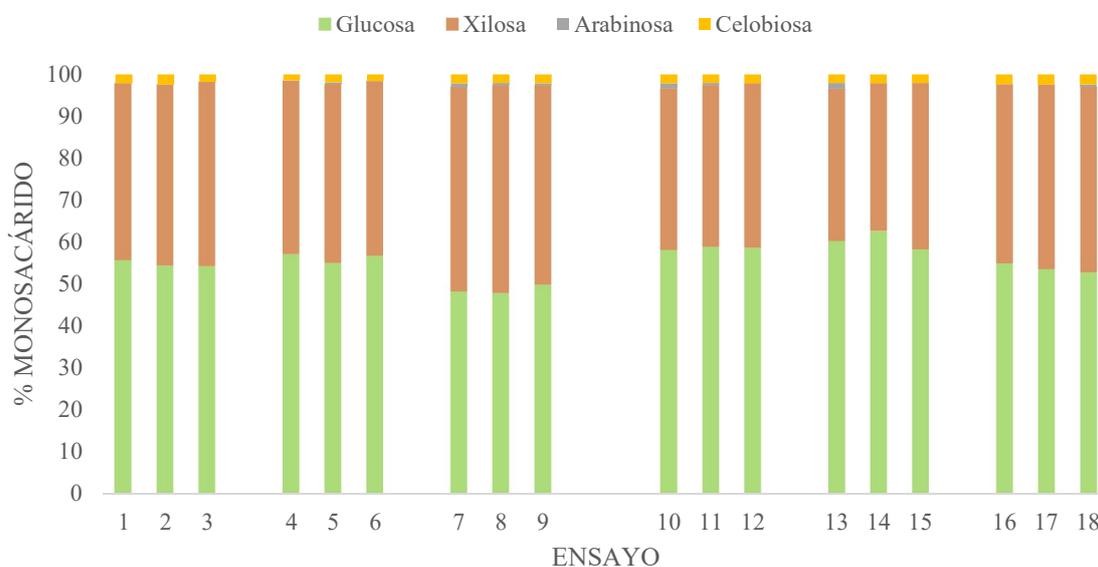


Figura 8. Contenido de monosacáridos en biomasa residual en base seca sin cenizas. Ensayos 1-9 en biomasa A1 y ensayos 10-18 en biomasa A2.

Se observa que predominan los monosacáridos glucosa y xilosa mientras que la presencia de arabinosa y celobiosa es casi inexistente. El alto contenido en glucosa de la *Scenedesmus almeriensis* concuerda con datos bibliográficos⁴⁹.

4.3.3.3. Lípidos

Respecto al contenido lipídico, el balance de materia realizado sobre el contenido de lípidos resultó en solubilidades muy bajas y, en ocasiones, negativas. Este resultado está relacionado con la baja concentración de lípidos en las biomásas empleadas en este trabajo y los errores inherentes al método de análisis empleado. Dada la escasa fiabilidad de los resultados respecto a estos compuestos y su no relevancia en la valorización de las biomásas de estudio, se decide no incluir ni en cálculos de solubilidad ni en análisis de varianza a los lípidos.

4.4. Análisis Estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) permite separar las contribuciones de uno o más factores a la varianza global de los resultados⁷⁰. Mediante este análisis se determinará la influencia de los factores estudiados (biomasa algal, enzima y tiempo de hidrólisis), tanto sobre la selectividad de la hidrólisis como sobre el grado de solubilización de estos

componentes y consecuentemente se llegará a la combinación de factores óptima para el proceso de extracción.

Los valores F son el cociente entre la media de cuadrados de cada factor y la media de cuadrados de los residuos e indican el grado de variabilidad que cada factor aporta a los resultados. El valor-p indica el nivel de significación de cada factor, calculado a partir del valor F. Valores p pequeños (menores que 0,05) indica que el factor tiene un efecto estadísticamente significativo. Los valores obtenidos mediante este análisis se obtienen con un nivel de confianza del 95%. Los valores p de los ANOVAS realizados se encuentran recogidos en las Tablas 5 y 6.

4.4.1. ANOVA sobre el grado de solubilización

En la siguiente tabla (Tabla 5) aparecen recogidos los valores p de los ANOVA realizados sobre el grado de solubilización tanto total como de proteínas y carbohidratos.

Tabla 5. Valores p de los ANOVA realizados sobre los resultados de solubilización.

<i>Fuente</i>	<i>Solubilización</i>		
	<i>Total</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Carbohidratos</i>
<i>Efectos Principales</i>			
<i>Enzima</i>	0,0626	0,0000	0,0047
<i>Tiempo de Hidrólisis</i>	0,0383	0,6858	0,0767
<i>Biomasa Algal</i>	0,0169	0,0004	0,0009
<i>Interacciones</i>			
<i>Enzima-Tiempo de Hidrólisis</i>	0,3430	0,0504	0,1755
<i>Enzima- Biomasa Algal</i>	0,6249	0,0689	0,8963
<i>Tiempo de Hidrólisis- Biomasa Algal</i>	0,3767	0,2344	0,8498

4.4.1.1. ANOVA sobre la solubilización total de biomasa

Del ANOVA realizado sobre los valores de solubilización total de biomasa conseguidos se obtiene que, mientras que el tipo de enzima utilizada no influye significativamente sobre resultado, sí lo hace tanto la biomasa como el tiempo de hidrólisis. No se encuentra ninguna interacción significativa entre los factores ensayados, presentando todas valores p bastante mayores a 0,05.

Respecto a la variabilidad dentro de los niveles de cada factor, en este caso se encuentra diferencia significativa entre la biomasa (A1 y A2) y entre el tiempo de 1 h con los tiempos de 2 y 5 h.

De entre los factores significativos obtenidos, la biomasa, con un valor p 0,0169, es el que aporta mayor variabilidad a los resultados, presentando el tiempo de hidrólisis un valor p de 0,0383. Esos valores tan próximos a 0,05 implican que no se puede rechazar la hipótesis nula con mucha fuerza, es decir, que el efecto, aunque significativo, es muy poco acusado.

En la siguiente gráfica (Figura 9) aparecen representados los efectos sobre la solubilidad total de los diferentes factores en función de la biomasa, apareciendo señalados en rojo los niveles que implican un mayor grado de solubilización.

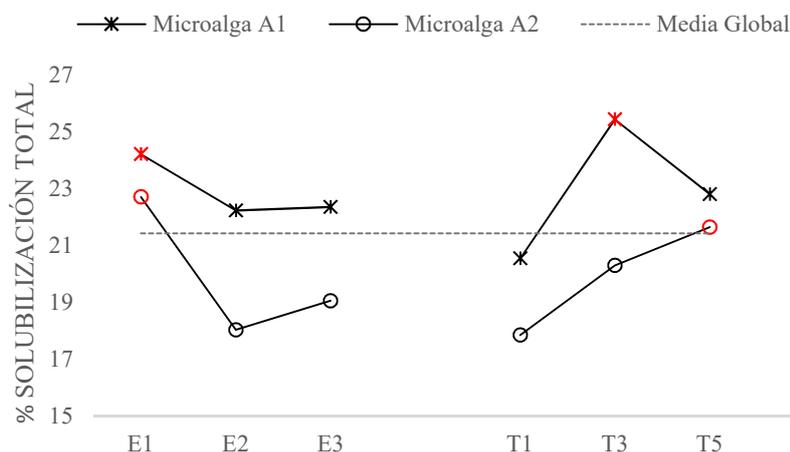


Figura 9. Respuestas medias de grado de solubilización total de biomasa para los niveles de los factores enzima y tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.

En esta representación se observa claramente cómo, aunque la variación en el porcentaje de solubilización es pequeña, se obtienen mayores solubilizaciones en los ensayos realizados sobre la microalga A1. Al llevarse a cabo los ensayos de ambas microalgas bajo las mismas condiciones, la diferencia en la respuesta obtenida sobre el grado de solubilización se puede achacar a la presencia de bacterias, siendo éstas favorecedoras para la solubilización de los componentes de la microalga durante el proceso de hidrólisis enzimática.

En cuanto al factor enzima, aunque su efecto no es significativo, se obtiene con un valor p de 0,0626, muy cercano al límite de 0,05. En ambas microalgas el uso de la enzima Alcalasa resulta en mayores solubilizaciones, denotando su capacidad para atacar a los

enlaces peptídicos de la pared celular de la microalga y logrando solubilizaciones como se ha comentado en apartados anteriores de hasta un 26%, confirmando así lo sospechado en aparados anteriores.

Respecto al tiempo de hidrólisis, se observa que las solubilizaciones se encuentran favorecidas por largos tiempos de hidrólisis, alcanzándose máximos de solubilización para los tiempos de 3 y 5 h.

4.4.1.2. ANOVA sobre la solubilización de proteínas

Del ANOVA realizado sobre la solubilidad de proteínas se obtiene que tanto el tipo de enzima utilizada como la biomasa ejercen un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%. De entre estos dos factores, el tipo de enzima muestra una mayor influencia sobre la variabilidad de los resultados ($p = 0,0000$) que el tipo de biomasa ($p = 0,0004$).

En la siguiente gráfica (Figura 10) aparecen representados los efectos sobre la solubilidad de proteínas de los diferentes factores en función de la biomasa, apareciendo señalado en rojo los niveles que implican un mayor grado de solubilización.

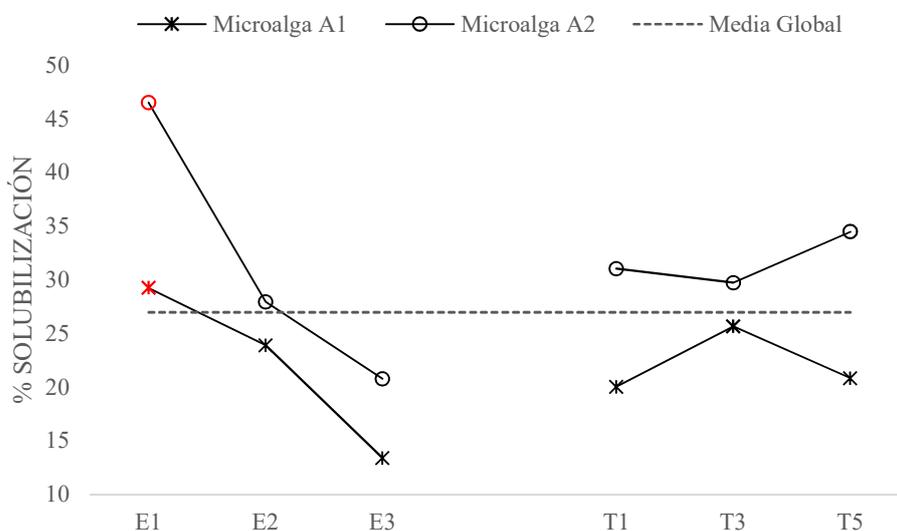


Figura 10. Respuestas medias del grado de solubilización de proteínas para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.

Se observa que la combinación que aporta una solubilización de proteínas más elevada sería la combinación de **enzima Alcalasa y biomasa A2** (ya justificado con anterioridad).

4.4.1.3. ANOVA sobre la solubilización de carbohidratos

Del ANOVA realizado sobre la solubilidad de carbohidratos se obtiene que tanto la biomasa algal ($p = 0,0009$) como la enzima utilizada ($p = 0,0047$) ejercen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Respecto a la variabilidad dentro de los niveles de cada factor, en este caso, se encuentra diferencia significativa entre la biomasa (A1 y A2) y el tipo de enzima (únicamente entre Celluclast y Protamex).

La siguiente gráfica (Figura 11) representa el grado de solubilización medio de carbohidratos para los diferentes niveles de los factores considerados en función de la biomasa.

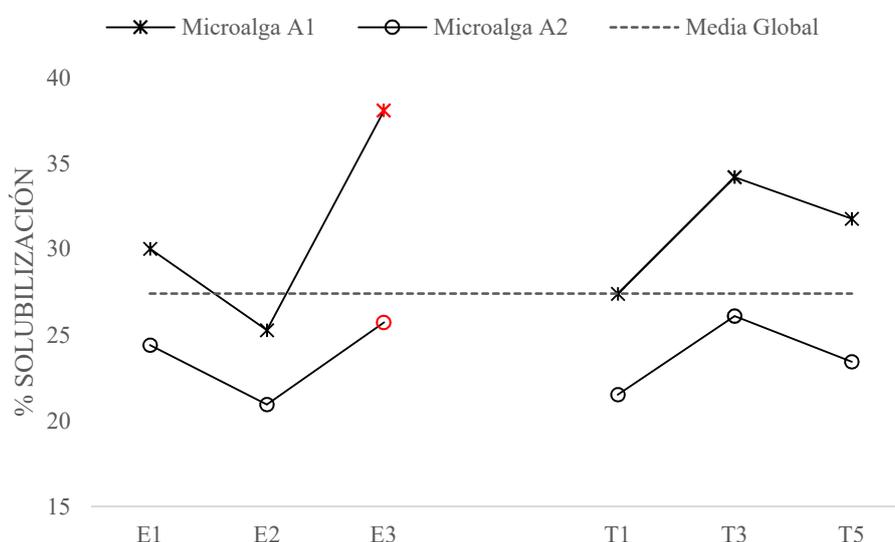


Figura 11. Respuestas medias del grado de solubilización de carbohidratos para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.

Como se puede observar en la Figura 11, las condiciones en las que el grado de solubilización de carbohidratos es más elevado son la combinación del uso de enzima **Celluclast, biomasa A1**. Aunque el tiempo resultó ser un factor no significativo, se obtiene una solubilización de carbohidratos ligeramente superior con hidrólisis de 3 h de duración.

4.4.2. ANOVA sobre el impacto del proceso de hidrólisis enzimática sobre la composición del residuo de biomasa de microalga

Los valores p aportados por el ANOVA realizado sobre el porcentaje de proteína y carbohidratos de los residuos de biomasa microalgal se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores p de los ANOVA realizados sobre los resultados del porcentaje de proteínas y carbohidratos contenidos por los residuos de biomasa microalgal.

<i>Fuente</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Carbohidratos</i>
<i>Efectos Principales</i>		
<i>Enzima</i>	0,0000	0,0000
<i>Tiempo de Hidrólisis</i>	0,0471	0,5934
<i>Biomasa Algal</i>	0,0000	0,0000
<i>Interacciones</i>		
<i>Enzima-Tiempo de Hidrólisis</i>	0,2688	0,0005
<i>Enzima- Biomasa Algal</i>	0,0025	0,0009
<i>Tiempo de Hidrólisis- Biomasa Algal</i>	0,0102	0,2478

4.4.2.1. ANOVA sobre el impacto en el contenido proteico

Del ANOVA realizado sobre el contenido de proteína en el residuo de biomasa de microalga tras el proceso de hidrólisis se obtiene que los tres factores introducidos (tipo de enzima, tiempo de hidrólisis y biomasa) afectan significativamente a los resultados (todos los valores-p son menores de 0.05).

En cuanto a la variabilidad dentro de los niveles de cada factor, respecto al tipo de enzima se encuentra diferencia significativa entre todas las combinaciones de niveles, especialmente entre la enzima Alcalasa y Celluclast. Dentro del factor tiempo aparece únicamente diferencia significativa entre el tiempo de hidrólisis de 3 y 5 h. Dentro la biomasa también se encuentra diferencia significativa.

De entre los factores significativos obtenidos, la biomasa ($p = 0,0000$) y el tipo de enzima ($p = 0,0000$) son los que aportan una mayor variabilidad a los resultados, teniendo el tiempo de hidrólisis un efecto significativo menos acusado con un valor p de 0,00471.

La siguiente gráfica (Figura 12) aparecen representados los efectos sobre el porcentaje de proteínas de los diferentes niveles de los factores considerados en función de la biomasa.

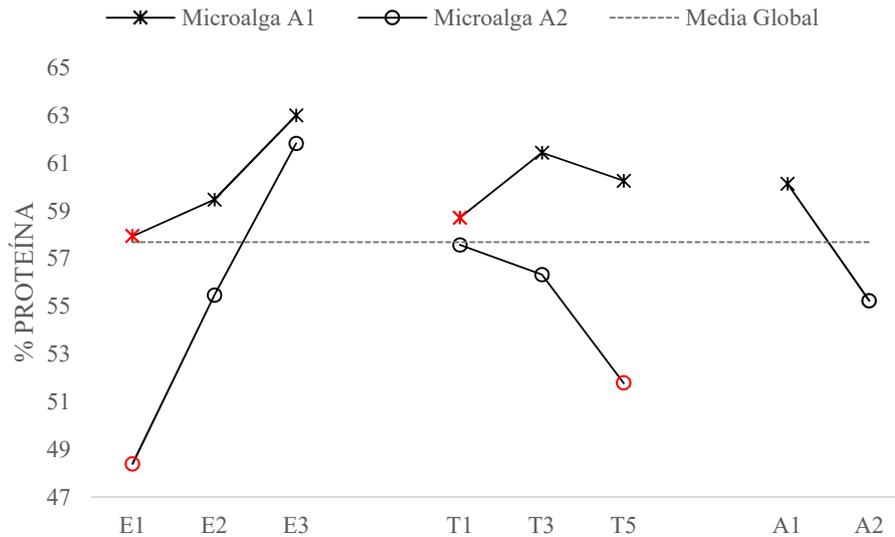


Figura 12. Respuestas medias del porcentaje proteico de las biomosas residuales para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.

Valores menores de proteína en el residuo de biomasa indica una mayor selectividad en la solubilización de proteínas, tal y como se ha explicado en los apartados anteriores. En la Figura 12 aparece señalado en rojo los niveles de los factores que conllevan un menor contenido de proteína en la biomasa residual tras el proceso de hidrólisis enzimática.

Se observa como la extracción se produce de forma más selectiva sobre la biomasa A2. Además, fijándonos en la enzima más efectiva (E1, Alcalasa) se muestra una diferencia bastante pronunciada entre las respuestas medias del contenido de proteínas en cada biomasa. La microalga cultivada en medio de bacterias presenta una menor selectividad para la solubilización de proteínas.

Respecto a la diferencia entre el uso de los dos tipos de proteasas, la enzima Alcalasa (E1) es una endoproteasa del tipo serina que tiene una especificidad de sustrato muy amplia, siendo capaz de hidrolizar a la mayoría de los enlaces peptídicos dentro de una molécula de proteína^{71,72} mientras que la enzima Protamex (E2) es una mezcla de endo y exoproteasa⁷¹ por lo que cierta cantidad de enzima requiere de grupos amino o carboxilos terminales libres para hidrolizar la unión peptídica. Esto podría indicar que las proteínas de la *Scenedesmus almeriensis* sean de cadena bastante larga y, en ese caso, su hidrólisis se vería favorecida por enzimas endo, de ahí el mejor resultado obtenido con el uso de la enzima Alcalasa.

En resumen, este análisis denota como la **enzima Alcalasa, un tiempo de hidrólisis de cinco horas y la biomasa A2** favorecen la extracción selectiva de proteínas al presentar los valores más bajos de contenido de proteína.

4.4.2.2. ANOVA sobre el impacto en el contenido de carbohidratos

Puesto que carbohidratos y proteínas son los dos componentes mayoritarios de ambas algas, cabe esperar para los carbohidratos un efecto contrapuesto al encontrado para la selectividad de las proteínas.

Nuevamente, se encuentra efecto significativo para los factores tipo de enzima y biomasa ($p = 0,0000$ en ambos casos). Dentro de cada factor se vuelve a encontrar diferencia significativa entre los niveles del factor tipo de enzima (especialmente entre Alcalasa y Celluclast) y entre las diferentes biombras.

La siguiente gráfica (Figura 13) muestra las respuestas medias del porcentaje en carbohidratos de las biombras residuales para los diferentes niveles de los factores considerados.

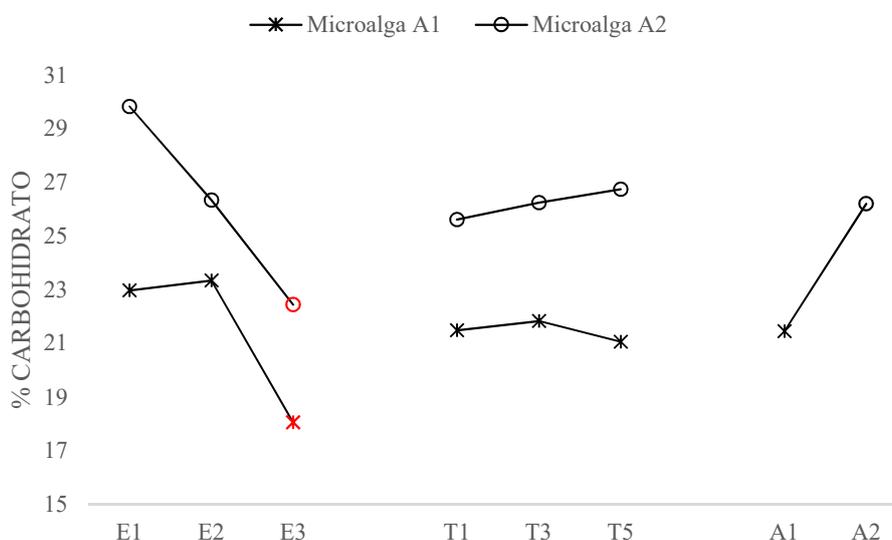


Figura 13. Respuestas medias del porcentaje en carbohidratos de las biombras residuales para los niveles de los factores enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de biomasa.

Al igual que en caso de las proteínas, un menor contenido de carbohidratos en el residuo de biomasa tras el proceso de hidrólisis indica una mayor selectividad en la solubilización de estos compuestos. En este caso, de nuevo señalado en rojo, las condiciones en las que

se obtiene una mejor selectividad conllevan el uso de la **enzima Celluclast y biomasa A1**.

La presencia de bacterias favorece la extracción de carbohidratos. El papel favorecedor de las bacterias lo denotan varios factores. Por un lado, la ya comentada mejor extracción de carbohidratos sobre el alga cultivada en presencia de bacterias y, por otro lado, fijándonos en la respuesta en el caso del uso de la enzima Alcalasa (E1) se observa que mientras en el alga A2 provoca una respuesta muy pobre en la extracción de carbohidratos, en el alga A1 la respuesta media coincide prácticamente con la respuesta media observada en el uso de la enzima E3 sobre el alga A2. Esto indicaría la presencia de alguna sustancia en el alga A1 que de por sí favorece la extracción de carbohidratos y nos lleva directamente a la presencia de las bacterias como factor clave. Se ha reportado la secreción en diferentes bacterias de enzimas como xilanasa y celulasas que actúan directamente en la ruptura de polisacáridos en microalgas⁴³. Puede que las bacterias de nuestro cultivo de microalgas A1 produzcan este tipo de enzimas, favoreciendo así la extracción de carbohidratos.

4.4.3. Elección de las condiciones óptimas

El análisis estadístico realizado ha aportado información sobre las condiciones óptimas bajo las que realizar el proceso de hidrólisis enzimática. Como se ha comentado en apartados anteriores, una de las características del proceso de hidrólisis enzimática es su selectividad. Dependiendo del tipo de enzima utilizada, la solubilización de determinados componentes se ve favorecida. Este hecho se ha visto claro durante este estudio.

Para la solubilización de proteínas, las condiciones de hidrólisis enzimática favorecedoras son la combinación de largos tiempos de hidrólisis, uso de la enzima Alcalasa y además está favorecida en el tipo de biomasa algal A2, crecida en medio sintético, siendo el tiempo de tratamiento un factor no determinante. Por el contrario, las condiciones que propician una mayor solubilización de carbohidratos son el uso de la enzima Celluclast, el tipo de alga crecida bajo ambiente de purines (A1) y tiempo de hidrólisis de tres horas.

Los ANOVA realizados también han mostrado la posible influencia de la presencia de bacterias sobre las solubilizaciones, habiéndose analizado las respuestas medias obtenidas por los niveles de los factores en función de la biomasa utilizada, diferenciándose principalmente a cada microalga por la presencia o no de bacterias y mostrando un papel

favorable en el caso de solubilización de carbohidratos, pero desfavorable en el caso de las proteínas.

El objetivo final de este estudio está orientado a la optimización de la solubilización de proteínas por lo que las condiciones que se aplicarían para futuros ensayos serían las más favorables en dicho caso.

5. CONCLUSIONES

Se llevaron a cabo múltiples ensayos considerando la influencia de tres factores: tipo de enzima, tiempo de hidrólisis y tipo de cultivo de microalga sobre el proceso de hidrólisis enzimática con el objetivo de solubilizar la mayor cantidad de proteína posible y determinar las condiciones más favorables.

El análisis de varianza (ANOVA) denotó que el uso de la enzima Alcalasa junto con largos tiempos de hidrólisis y alga cultivada sintéticamente resultaron ser las condiciones óptimas para la solubilización de proteínas de la microalga *Scenedesmus almeriensis*.

La selectividad de la hidrólisis enzimática también quedó reflejada en este estudio al presentarse mejores resultados del proceso de hidrólisis enzimática sobre la solubilización de proteínas o carbohidratos dependiendo de la enzima utilizada (proteasa o celulasa).

La presencia de bacterias también reflejó un papel importante en la eficacia de las solubilizaciones, mostrándose favorecedora para el caso de los carbohidratos, pero contraria en el caso de las proteínas. Se hace necesario un estudio más exhaustivo sobre el papel de la interacción bacteria-microalga en el caso del cultivo de microalga en medio de purines y su efecto en la valorización de la biomasa.

También, se ha puesto de manifiesto la necesidad de incorporar un tratamiento previo al proceso de hidrólisis enzimática que debilite la pared celular de las microalgas previamente para conseguir mejores resultados en el proceso de hidrólisis. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que pretratamientos innovadores como ultrasonidos⁴⁹, campo eléctrico pulsado⁷³ o choque osmótico⁵³ han mejorado en gran medida la eficacia de procesos de extracción posteriores como la hidrólisis enzimática en las microalgas. Sería interesante la incorporación de alguno de estos pretratamientos en estudios futuros.

La investigación sobre la valorización de las microalgas está actualmente en pleno desarrollo. Las diversas características de las microalgas como su cultivo no invasivo, rápido crecimiento y posesión de infinidad de componentes con aplicaciones en una amplia gama de campos resultan en las altas expectativas de futuro que actualmente tienen estos microorganismos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ejike CECC, Collins SA, Balasuriya N, Swanson AK, Mason B, Udenigwe CC. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends Food Sci Technol*. 2017;59:30-36. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.026
2. Krishna A, Wayne K, Rambabu K, Tao Y, Chu D, Show P. Microalgae : A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci Hum Wellness*. 2019;8(1):16-24. doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001
3. Barbosa MJ, Kleinegris DMM, Bosma R. *Microalgae : The Green Gold of the Future ? Large-Scale Sustainable Cultivation Of*. (Paulien H, ed.). Wageningen UR; 2011.
4. Martín J, Lorenzo A, Muñoz R, Blanco S, Bolado S. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis . Effect of alkaline-peroxide pretreatment. 2016;218:265-271. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.087
5. Becker EW. Micro-algae as a source of protein. 2007;25:207-210. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
6. Spolaore P, Joannis-cassan C, Duran E, Isambert A, Génie L De, Paris EC. Commercial Applications of Microalgae. 2006;101(2):87-96. doi:10.1263/jbb.101.87
7. Borowitzka MA. Commercial production of microalgae : ponds , tanks , tubes and fermenters. 1999;70:313-321.
8. Shiong K, Wayne K, Yong G, Hong W, Ho Y. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. *Bioresour Technol*. 2020;304(February):122996. doi:10.1016/j.biortech.2020.122996
9. Ying D, Tang Y, Shiong K, Wayne K, Tao Y, Ho S. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresour Technol*. 2020;304(February):122997. doi:10.1016/j.biortech.2020.122997
10. Yin Z, Zhu L, Li S, et al. A comprehensive review on cultivation and harvesting

- of microalgae for biodiesel production : Environmental pollution control and future directions. *Bioresour Technol.* 2020;301(November 2019):122804. doi:10.1016/j.biortech.2020.122804
11. Irenius Y, Cheirsilp B, Srinuanpan S, Maneechote W. Zero-waste biorefinery of oleaginous microalgae as promising sources of biofuels and biochemicals through direct transesterification and acid hydrolysis. *Process Biochem.* 2020;(February):0-1. doi:10.1016/j.procbio.2020.02.011
 12. Gonzalez EG, Carvalho JC De, Tatiana D, et al. Bioprospection of green microalgae native to Paraná , Brazil using a multi-criteria analysis : Potential for the production of lipids , proteins , and carotenoids. *Bioresour Technol Reports.* 2020;10(February):100398. doi:10.1016/j.biteb.2020.100398
 13. Jacob-lobes E, Maroneze MM, Depra MC, Sartori RB, Dias RR, Zepka LQ. Bioactive food compounds from microalgae : an innovative framework on industrial biorefineries. 2019:1-7. doi:10.1016/j.cofs.2018.12.003
 14. Wayne K, Ying J, Loke P, et al. Microalgae biorefinery : High value products perspectives. 2017;229:53-62.
 15. Nee W, Loke P, Chuan T, Ching J, Ng E, Chang J. Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae — Recent developments and future perspectives. *Algal Res.* 2018;31(April 2017):506-516. doi:10.1016/j.algal.2017.04.005
 16. Tiwari ON, Gayen K, Kumar T. Downstream processing of microalgae for pigments , protein and carbohydrate in industrial application : A review Saumyakanti Khanra a , Madhumanti Mondal b , Gopinath Halder b ., *Food Bioprod Process.* 2018;110:60-84. doi:10.1016/j.fbp.2018.02.002
 17. Song C, Liu Z, Wang C, Li S, Kitamura Y. Different interaction performance between microplastics and microalgae : The bio-elimination potential of *Chlorella sp . L38* and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025. *Sci Total Environ.* 2020;723:138146. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138146
 18. Solovchenko A, Lukyanov A, Ravishankar GA, Pleissner D, Ambati RR. Recent developments in microalgal conversion of organics-enriched waste streams. *Curr Opin Green Sustain Chem.* 2020. doi:10.1016/j.cogsc.2020.03.006

19. Cai T, Park SY, Li Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae : Status and prospects. *Renew Sustain Energy Rev.* 2013;19:360-369. doi:10.1016/j.rser.2012.11.030
20. Li K, Liu Q, Fang F, et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery : A review. *Bioresour Technol.* 2019;291(June):121934. doi:10.1016/j.biortech.2019.121934
21. Pena ACC, Agustini CB, Trierweiler LF. Influence of period light on cultivation of microalgae consortium for the treatment of tannery wastewaters from leather finishing stage. *J Clean Prod.* 2020;263:121618. doi:10.1016/j.jclepro.2020.121618
22. Grobbelaar JU, Soeder J, Groeneweg J, Stengel E, Hartig P. Rates of biogenic oxygen production in mass cultures of microalgae, and oxygen availability for wastewater treatment. 1988;22(11):1459-1464.
23. Mun R, Guieysse B. Algal – bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants : A review. 2006;40:2799-2815. doi:10.1016/j.watres.2006.06.011
24. Site SR, Beach V. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. 1993;11.
25. Chojnacka K. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue – green algae *Spirulina* sp. : kinetics , equilibrium and the mechanism of the process. 2005;59:75-84. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.10.005
26. Li Y, Zhou W, Hu B, Min M, Chen P, Ruan RR. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment : Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresour Technol.* 2011;102(23):10861-10867. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.064
27. Siqueira J De, Lúcia M, Ferreira J, Peixoto P, José V. Microalgae based biofertilizer : A life cycle approach. 2020;724. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138138
28. Marks EAN, Miñón J, Pascual A, Montero O, Manuel L, Rad C. Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth. *Sci Total Environ.* 2017;605-606:610-617.

doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.169

29. Siqueira J De, Lúcia M, Marcio E, José V, Peixoto P. Algal biomass from wastewater : soil phosphorus bioavailability and plants productivity. *Sci Total Environ.* 2020;711:135088. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135088
30. Zhang L, Pei H, Yang Z, Wang X, Chen S, Li Y. Microalgae nourished by mariculture wastewater aids aquaculture self- reliance with desirable biochemical composition. *Bioresour Technol.* 2019;278(November 2018):205-213. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.066
31. Vizcaíno AJ, López G, Sáez MI, et al. Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream , *Sparus aurata* , juveniles. *Aquaculture.* 2014;431:34-43. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.010
32. Larrán AM, Mercado E De, Hernández D, Riaño B. *Scenedesmus almeriensis* from an integrated system waste-nutrient , as sustainable protein source for feed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2018;497(August):422-430. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.08.011
33. Javed F, Aslam M, Rashid N, Shamair Z. Microalgae-based biofuels , resource recovery and wastewater treatment : A pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel.* 2019;255(July):115826. doi:10.1016/j.fuel.2019.115826
34. Uk H, Moon J. Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. *Bioresour Technol.* 2018;256(December 2017):502-508. doi:10.1016/j.biortech.2018.02.010
35. Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol.* 2011;102(1):17-25. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035
36. Javier L, Rosa M, Estrada Y, et al. Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater. 2020;263(February). doi:10.1016/j.jenvman.2020.110353
37. Wang L, Li Y, Chen P, et al. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp . *Bioresour Technol.* 2010;101(8):2623-2628. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.062

38. Lee CS, Lee S, Ko S, Oh H, Ahn C. Effects of photoperiod on nutrient removal , biomass production , and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. 2014;8. doi:10.1016/j.watres.2014.10.029
39. Unnithan V V, Unc A, Smith GB. Mini-review : A priori considerations for bacteria – algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *ALGAL*. 2014;4:35-40. doi:10.1016/j.algal.2013.11.009
40. Vu LTK, Loh K. Symbiotic hollow fiber membrane photobioreactor for microalgal growth and bacterial wastewater treatment. *Bioresour Technol*. 2016;219:261-269. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.105
41. Ramanan R, Kim B, Cho D, Oh H, Kim H. Algae – bacteria interactions : Evolution , ecology and emerging applications. *Biotechnol Adv*. 2016;34(1):14-29. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.003
42. Dao G, Wang S, Wang X, Chen Z. Enhanced Scenedesmus sp. Growth in Response to Gibberellin Secretion by Symbiotic Bacteria. *Sci Total Environ*. 2020;140099. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140099
43. Wang M, Chen S, Zhou W, Yuan W, Wang D. Algal cell lysis by bacteria : A review and comparison to conventional methods. *Algal Res*. 2020;46(January):101794. doi:10.1016/j.algal.2020.101794
44. Günerken E, Hondt ED, Eppink MHM, Garcia-gonzalez L, Elst K, Wijffels RH. Cell disruption for microalgae biorefineries. 2015;33:243-260. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.008
45. Zhang Y, Kong X, Wang Z, Sun Y. Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae Scenedesmus sp . *Renew Energy*. 2018;125:1049-1057. doi:10.1016/j.renene.2018.01.078
46. Soto-sierra L, Stoykova P, Nikolov ZL. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. 2018;36(October):175-192.
47. Bolado S, Kasperoviciene J, Koreiviene J, Sulcius S, Elst K, Bastiaens L. Cell disruption technologies. 2017. doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6
48. Chisti Y, Moo-young M. Disruption of microbial cells for intracellular products.

- 1986;8:194-204.
49. Martínez-sanz M, Garrido-fernández A, Mijlkovic A, et al. Composition and rheological properties of microalgae suspensions : Impact of ultrasound processing. *Algal Res.* 2020;49(March):101960. doi:10.1016/j.algal.2020.101960
 50. Sandani WP, Kankanamalage G, Hasara S, et al. Comparative assessment of pretreatment strategies for production of microalgae- based biodiesel from locally isolated *Chlorella homosphaera*. *J Biosci Bioeng.* 2020;xxx(xxx). doi:10.1016/j.jbiosc.2020.03.004
 51. Shafiei R, Karimi K, Wijffels RH, Berg C Van Den, Eppink M. Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids , proteins , and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresour Technol.* 2020;309(April):123321. doi:10.1016/j.biortech.2020.123321
 52. Akaberi S, Gusbeth C, Silve A, et al. Effect of pulsed electric field treatment on enzymatic hydrolysis of proteins of *Scenedesmus almeriensis*. *Algal Res.* 2019;43(August):101656. doi:10.1016/j.algal.2019.101656
 53. Koyande AK, Tanzil V, Dharan HM, et al. Integration of osmotic shock assisted liquid biphasic system for protein extraction from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biochem Eng J.* 2020;157(September 2019):107532. doi:10.1016/j.bej.2020.107532
 54. Sierra LS, Dixon CK, Wilken LR. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Res.* 2017;25(March):149-159. doi:10.1016/j.algal.2017.04.004
 55. Tecnol P, Control TDE, La EN, Prote LDE. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. 2000:79-89.
 56. Demuez M, González-fernández C, Ballesteros M. Algicidal microorganisms and secreted algicides : New tools to induce microalgal cell disruption. *Biotechnol Adv.* 2015;33(8):1615-1625. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.003
 57. Acie FG, Rueda A, Pe J, Sa JF, Urbano S. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. 2008;43:398-405. doi:10.1016/j.procbio.2008.01.004

58. Chemicals S. Novozymes Protease Products. :1-5.
https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3110tech.pdf.
59. Sifuentes-penagos G, León-vásquez S, Castillo A. Hidrólisis de las proteínas de anchoveta (*Engraulis ringens*) entera por acción de la enzima Protamex. 2018;9(1):93-102. doi:10.17268/sci.agropecu.2018.01.10
60. Kilo O. Enzyme information.
https://bioenv.gu.se/digitalAssets/1608/1608318_enzyme-information.pdf.
61. Tsai C, Meyer AS. Enzymatic Cellulose Hydrolysis: Enzyme Reusability and Visualization of β -Glucosidase Immobilized in Calcium Alginate. 2014:19390-19406. doi:10.3390/molecules191219390
62. Wychen S Van, Laurens LML. Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass. 2015;(December).
63. PanReac AppliChem ITW Reagents. Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl. https://www.itwreagents.com/uploads/20180122/A173_ES.pdf. Published 2018.
64. Molino A, Iovine A, Casella P, et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food , Animal Feed and Nutraceuticals. 2018:1-21. doi:10.3390/ijerph15112436
65. Lopes M, Soares J, Bezerra B, Batista-silva W. Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. *Bioresour Technol*. 2020;307(March):123190. doi:10.1016/j.biortech.2020.123190
66. Valverde JL. Kinetic analysis and thermal characterization of the microalgae combustion process by thermal analysis coupled to mass spectrometry. *Appl Energy*. 2014;114:227-237. doi:10.1016/j.apenergy.2013.09.055
67. Figueroa OA, Zapata ÉJ, Albeiro Gutiérrez G. ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DEL PLASMA BOVINO. *EIA*. 2012:71-84.
68. Fuentes JL, Garbayo I, Cuaresma M, Montero Z, González-del-valle M, Vílchez C. Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and. 2016. doi:10.3390/md14050100

69. Carlos RJ. Microalgal proteins for feed, food and health. 2017.
doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00015-7
70. Jurado JM. *Aplicación de Microsoft Excel a La Química Analítica: Validación de Métodos Analíticos.*; 2008. <http://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf>.
71. Samarakoon K, Jeon Y. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *FRIN*. 2012;48(2):948-960. doi:10.1016/j.foodres.2012.03.013
72. Benítez R, Ibarz A, Pagán J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2008;42(June):227-236.
73. Buchmann L, Brändle I, Haberkorn I, Hiestand M, Mathys A. Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. *Bioresour Technol*. 2019;291(June):121870.
doi:10.1016/j.biortech.2019.121870

ANEXOS

Anexo 1. Líneas de calibrado para la determinación de carbohidratos mediante HPLC.

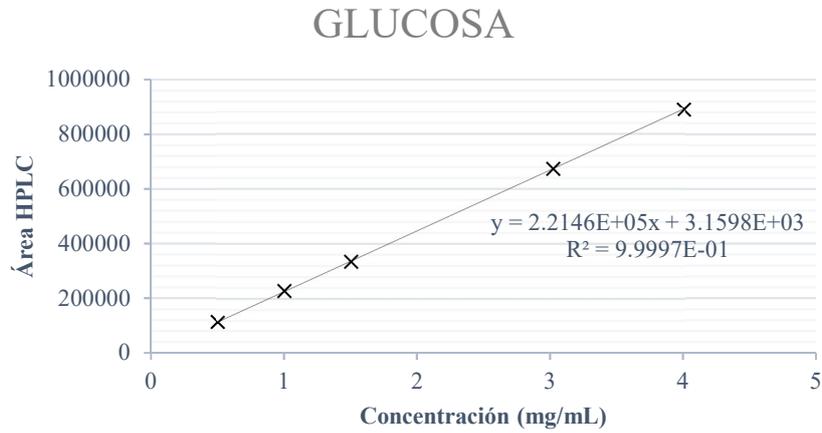


Figura 14. Línea de calibrado para la cuantificación de glucosa mediante HPLC.

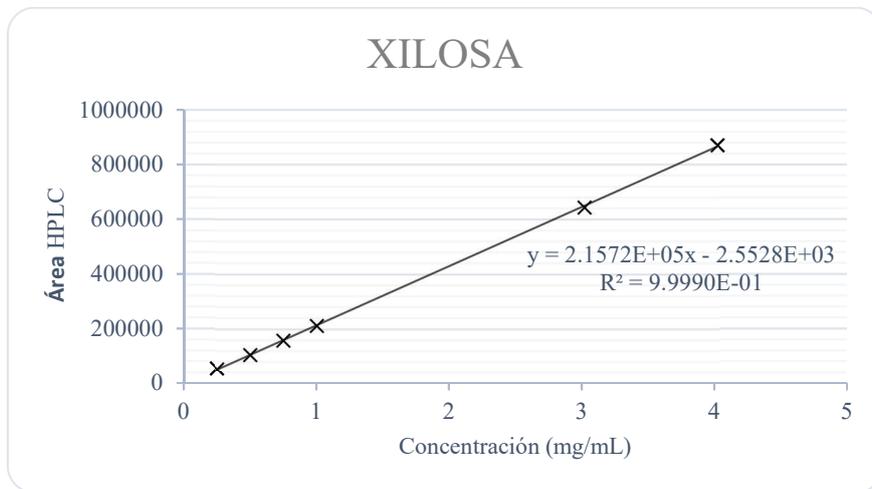


Figura 15. Línea de calibrado para la cuantificación de xilosa mediante HPLC.

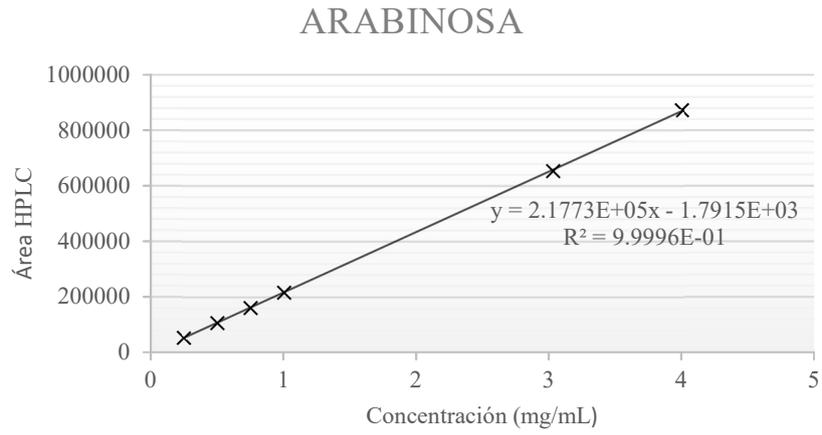


Figura 16. Línea de calibrado para la cuantificación de arabinosa mediante HPLC.

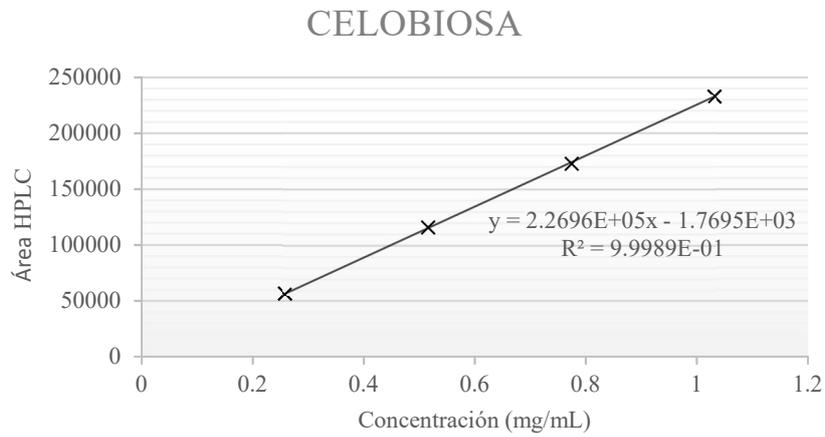


Figura 17. Línea de calibrado para la cuantificación de celobiosa mediante HPLC.