



**Universidad de Valladolid**

*Facultad de Ciencias*



Institute of Sustainable Processes  
UNIVERSITY OF VALLADOLID

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

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

### **“VALORIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE MICROALGAS Y BACTERIAS: COMPARACIÓN DE MÉTODOS CONVENCIONALES Y NUEVOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA”**

*Autor: Ángel Alejandro Filipigh*

*Dirigido y tutorizado por:*

*Elena María Rojo de Benito / Silvia Bolado Rodríguez*

*Septiembre del 2021*

# INDICE

---

ABSTRAC-----	I
RESUMEN-----	I
<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES -----</b>	<b>1</b>
1.1¿QUÉ SON LAS MICROALGAS?-----	1
1.2  APLICACIONES DE LAS MICROALGAS-----	4
1.3  COMPOSICIÓN DE BIOMASA ALGAL -----	12
<b>2. MECANISMOS Y TECNOLOGÍAS PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR DE LAS MICROALGAS.....</b>	<b>23</b>
2.1  LA PARED CELULAR DE LAS MICROALGAS Y SU COMPOSICIÓN -----	23
2.2  MÉTODO Y TÉCNOLOGÍAS DE RUPTURA CELULAR EN MICROALGAS ----	26
<b>3. OBJETIVOS -----</b>	<b>37</b>
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ANALÍTICOS -----</b>	<b>38</b>
4.1  BIOMASA UTILIZADA -----	38
4.2  MÉTODOS DE EXTRACCIÓN -----	38
4.3  CÁLCULOS REALIZADOS -----	41
4.4  MODELADO CINÉTICO -----	42
4.5  MÉTODOS DE ANÁLISIS -----	43
<b>5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>49</b>
5.1  COMPOSICIÓN INICIAL DE LA BIOMASA-----	49
5.2  EFECTO DEL PRETRATAMIENTO Y LA HIDRÓLISIS EN LA SOLUBILIZACIÓN TOTAL DE LA BIOMASA -----	51
5.3  SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE CARBOHIDRATOS -----	54
5.4  SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS -----	61
5.5  SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS-----	67
5.6  RECUPERACIÓN DE PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS -----	72
5.7  MODELADO CINÉTICO -----	79
<b>6. CONCLUSIONES -----</b>	<b>86</b>
<b>7.ANEXO.....</b>	<b>88</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA -----</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EMPLEANDO MICROALGAS.....	7
<b>TABLA 2:</b> APLICACIÓN DE CONSORCIOS MICROALGAS/BACTERIAS PARA LA RECUPERACIÓN DE NUTRIENTES (C, N Y P) DE AGUAS RESIDUALES DE DIFERENTES ORÍGENES.....	11
<b>TABLA 3:</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA (PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS EN % BASE SECA) DE DIFERENTES TIPOS DE MICROALGAS PURAS.....	12
<b>TABLA 4:</b> COMPOSICIONES TÍPICAS DE AGUAS RESIDUALES UTILIZADAS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS EN TÉRMINOS DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO.....	13
<b>TABLA 5:</b> PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR.....	36
<b>TABLA 6:</b> RESUMEN DE LA EXPERIMENTACIÓN EN LA VALORIZACIÓN DEL CONSORCIO MICROALGA-BACTERIAS PROPUESTA EN ESTE TRABAJO..	39
<b>TABLA 7:</b> ECUACIONES DE LOS MODELOS CINÉTICOS EMPLEADOS EN UAEE.....	43
<b>TABLA 8:</b> COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS (%) DE LA BIOMASA INICIAL Y DE LAS FRACCIONES SÓLIDAS Y LÍQUIDAS SELECCIONADAS TRAS LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, EN REFERENCIA A LA MASA TOTAL DE AMINOÁCIDOS.....	74
<b>TABLA 9:</b> PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS EN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CON ULTRASONIDOS Y ULTRASONIDOS ASISTIDO POR ENZIMAS. ....	83

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA CÉLULA MICROALGAL, DESTACANDO LAS REACCIONES FOTOSINTÉTICAS QUE TIENEN LUGAR EN EL CLOROPLASTO .....	2
FIGURA 2: PROCESO DE FOTOSÍNTESIS EN LAS MICROALGAS .....	5
FIGURA 3: PRINCIPALES ETAPAS DEL PROCESO DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Y MÉTODOS APLICADOS ACTUALMENTE .....	6
FIGURA 4: ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES FENÓMENOS QUE TIENEN LUGAR CUANDO SE EMPLEAN CONSORCIOS MICROALGAS-BACTERIAS PARA LA RECUPERACIÓN DE NUTRIENTES DE AGUAS RESIDUALES.....	9
FIGURA 5: VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE MICROALGAS CRECIDAS EN AGUAS RESIDUALES. CÓDIGO .....	14
FIGURA 6: APLICACIONES DE LA BIOMASA MICROALGA GENERADA DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	22
FIGURA 7: APLICACIONES DE LA BIOMASA MICROALGAL GENERADA EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	22
FIGURA 8: ESQUEMA DE LA PARED CELULAR DE <i>SCENEDESMUS</i> Y <i>CHLORELLA</i> .....	24
FIGURA 9: CÉLULA MICROALGAL DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	26
FIGURA 10: MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR EMPLEADOS E PARA LA VALORIZACIÓN DEL CONSORCIO <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i> -BACTERIA CULTIVADA EN AGUAS RESIDUALES DE PURINES DE CERDO.	27
FIGURA 11: TIPOS DE FUERZAS QUE ACTÚAN DURANTE LA RUPTURA CELULAR DE LAS MICROALGAS EMPLEANDO EL MÉTODO MECÁNICO DE MOLINO DE BOLAS .....	28
FIGURA 12: PRINCIPIO DE CAVITACIÓN ACÚSTICA .....	29
FIGURA 13: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS FENÓMENOS DE CAVITACIÓN, COLAPSO Y LIBERACIÓN DEL MATERIAL CELULAR EMPLEANDO ULTRASONIDOS. ....	30
FIGURA 14: DISRUPCIÓN CELULAR EMPLEANDO MICROONDAS.....	31
FIGURA 15: DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO KJELDAHL .....	44
FIGURA 16: RESULTADO POSITIVO Y NEGATIVO EN EL TEST DE NINHIDRINA PARA LA PRESENCIA Y/O AUSENCIA DE AMINOÁCIDOS. ....	46
FIGURA 17: DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE EL MÉTODO CLOROFORMO-METANOL .....	48
FIGURA 18: COMPOSICIÓN MACROMOLECULAR DEL CONSORCIO MICROALGAS-BACTERIAS COMPUESTA POR <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i> (96%). ....	49
FIGURA 19: RENDIMIENTOS DE SOLUBILIZACIÓN TOTAL.....	51
FIGURA 20: PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN DE SÓLIDOS VOLÁTILES (SV) Y CENIZAS .....	52
FIGURA 21: PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS (A) Y RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS (B). ....	55
FIGURA 22: PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA .....	62

<b>FIGURA 23:</b> PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	67
<b>FIGURA 24:</b> DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES (EAA) Y NO ESENCIALES (NEAA) PARA LA BIOMASA EVALUADA EN ESTE TRABAJO FRENTE A OTRAS MICROALGAS. ....	73
<b>FIGURA 25:</b> PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%) DE AMINOÁCIDOS T.....	76
<b>FIGURA 26:</b> CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	82

## ABSTRACT

---

The microalgae biomass grown in wastewater becomes an interesting renewable raw material able to metabolize the nutrients of waste streams and transform them into high added products such as proteins and carbohydrates. Despite the actual interest in the use of this biomass to improve the viability of conventional wastewater treatment processes, the research carried out on the fractional valorization of these macrocompounds is still very scarce. In the present work, a comparison of several conventional methodologies is developed (chemical hydrolysis, enzymatic hydrolysis and pretreatments coupled with enzymatic hydrolysis) against novel methodologies of enzymatic hydrolysis assisted by ultrasound and microwaves for the solubilization and recovery of macrocompounds, such as proteins and carbohydrates, from a consortium of *Scenedesmus almeriensis*-bacteria cultivated in a thin-film photobioreactor fed with manure wastewater.

The acid hydrolysis with HCl 2M at 120°C enhanced the carbohydrates solubility (86,6%) with high fermentable monosaccharide recoveries (60.7%). The alkaline hydrolysis with NaOH 2M at 120°C achieved almost complete solubilization of the biomass components with high solubilization (88.3%) and recovery yields (61.5%) of proteins with peptide size less than 11 kDa, but with high carbohydrates losses. The enzymatic hydrolysis with proteases gave rise to moderate carbohydrates recoveries (14.9%) and peptides (17.6%), while the addition of cellulases to the enzymatic cocktail achieved an improvement in the yields of proteins, although, in both cases, the sizes of the recovered peptides were found in the range of 20-135 kDa. The sequential application of pretreatments (bead mills or ultrasound) coupled with enzymatic hydrolysis with proteases improved the solubilization of carbohydrates (35%) and proteins (28.2%) of the biomass but, the recovery yields obtained were within the range obtained only with enzymatic hydrolysis with proteases in a single stage (15% and 24%).

Finally, regarding the novel enzymatic hydrolysis methods with proteases and the cocktail of proteases and cellulases, the use of microwaves enhanced the release of carbohydrates with a maximum yield of 57.9% and 56.2% respectively, while ultrasounds enhanced the release of proteins up to 49.6% and 44.5% with recovered peptide sizes greater than 48 kDa. In both cases, the yields were much higher than those of the individual enzymatic hydrolysis using a single stage, despite the fact that it was operated with treatment times of only 1h. The presence of bacteria in this biomass could be related to the high losses obtained.

## RESUMEN

---

La biomasa de microalgas cultivada en aguas residuales resulta ser un interesante material renovable capaz de metabolizar los nutrientes de los residuos y transformarlos en productos con valor añadido como son las proteínas y los carbohidratos. A pesar del reciente interés en el empleo de esta biomasa para mejorar la viabilidad de los procesos convencionales del tratamiento de aguas residuales, la investigación desarrollada sobre la valorización fraccionada de sus macrocomponentes es aún muy escasa. En el presente trabajo se desarrolla una comparación de diferentes metodologías convencionales (hidrólisis química, enzimática y pretratamientos acoplados a hidrólisis enzimática) frente a nuevas metodologías de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos y microondas en la solubilización y recuperación de macrocomponentes, proteínas y carbohidratos, a partir de un consorcio de *Scenedesmus almeriensis*-bacterias cultivado en un fotobiorreactor de capa fina alimentado con aguas residuales de purines de cerdo.

La hidrólisis ácida con HCl 2M a 120°C potenció la solubilización de carbohidratos (86.6%) con altas recuperaciones de monosacáridos fermentables (60.7%). La hidrólisis alcalina con NaOH 2M a 120°C consiguió una solubilización casi completa de los componentes de la biomasa con una alta solubilización (88.3%) y recuperación (61.5%) de proteínas con tamaños de péptidos inferiores a 11 kDa, pero con elevadas pérdidas de carbohidratos. La hidrólisis enzimática con proteasas dio lugar a recuperaciones moderadas de carbohidratos (14.9%) y péptidos (17.6%) mientras que la adición de celulasas al cóctel enzimático consiguió una mejora en los rendimientos de proteínas aunque los tamaños de los péptidos recuperados se encontraron en el rango de 20 – 135 kDa. La aplicación secuencial de pretratamientos (molienda o ultrasonidos) acoplados a la hidrólisis enzimática con proteasas dio lugar a un incremento en la solubilización de carbohidratos (35%) y proteínas (28.2%) de la biomasa pero finalmente las recuperaciones obtenidas se encontraron dentro del rango obtenido únicamente con hidrólisis enzimática con proteasas en una única etapa (15% y 24%)

Finalmente, en relación a los novedosos métodos de hidrólisis enzimática con proteasas y combinación de proteasas con celulasas asistidos, el uso de microondas potenció la liberación de carbohidratos con un rendimiento máximo de 57.9% y 56.2% a mientras que la asistencia con ultrasonidos potenció la liberación de proteínas en un 49.6% y 44.5% con péptidos recuperados con tamaños superiores a los 48 kDa. En ambos casos, los rendimientos fueron muy superiores a los de las hidrólisis enzimáticas individuales empleando una única etapa, a pesar de que se operó con tiempos de tratamiento de tan solo 1h. La presencia de bacterias en esta biomasa podría estar relacionada con las elevadas pérdidas registradas.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

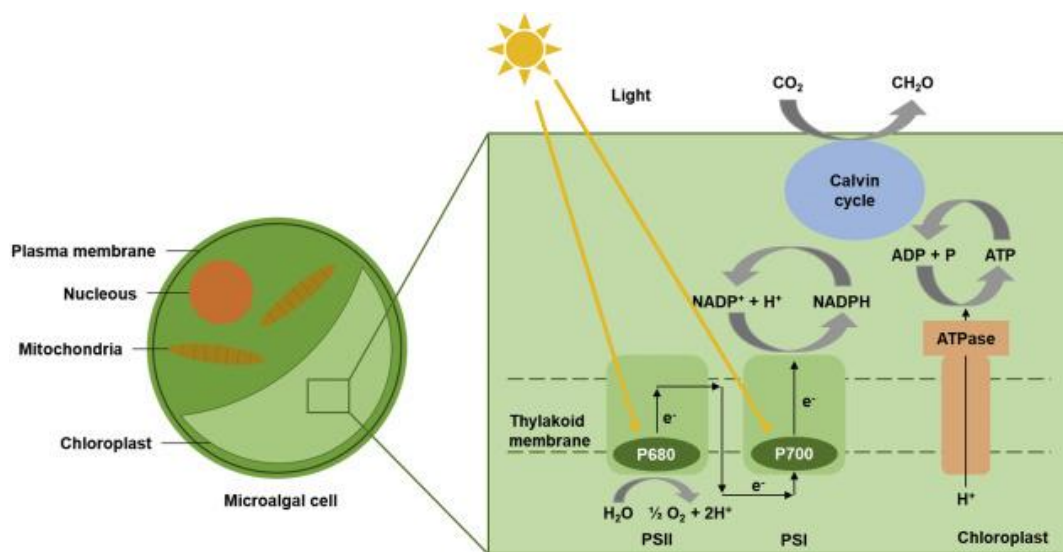
### 1.1 ¿QUÉ SON LAS MICROALGAS?

Las algas son un grupo de organismos autótrofos fotosintéticos que normalmente crecen en diversos tipos de masas de agua, como lagos, ríos y mares. Son responsables de la producción de oxígeno atmosférico mediante la fotosíntesis. El grupo de organismos es diverso y abarca numerosos filos diferentes con sus propias características y propiedades únicas que van desde las cianobacterias unicelulares procariotas hasta las algas eucariotas multicelulares más complejas (Sen Tan et al., 2020). Dentro del grupo de las algas, las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que suelen vivir en entornos acuáticos de agua dulce o marina, con un diámetro celular que oscila entre una y cientos de micras (Abu-Ghosh et al., 2021). A menudo se utiliza este término para referirse tanto a las bacterias procariotas verde-azuladas o cianobacterias (reino Monera y división Cyanophyta), como a las diatomeas y microalgas eucariotas (reino Protista). A pesar de la ausencia de estructuras y orgánulos complejos en comparación con las plantas terrestres, las microalgas son capaces de realizar la fotosíntesis utilizando la luz solar, el dióxido de carbono y el agua debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos, como las clorofilas, en sus células (Sen Tan et al., 2020). La diversidad de las microalgas es enorme y se estima la existencia de entre 200.000 y varios millones de especies, en comparación con las 250.000 especies de plantas superiores (Singh & Saxena, 2015).

Al igual que las plantas superiores, las microalgas son microorganismos fotoautótrofos y tienen cloroplastos. Aunque éstas no tienen raíces, tallos ni hojas como las plantas superiores, presentan ciertas características similares a los orgánulos celulares. Al igual que todos los eucariotas, pero a diferencia de los dominios de las bacterias y las arqueas, las células de las microalgas contienen orgánulos unidos por membranas, incluidos los núcleos que contienen su información genética. Aun así, cada célula es única y puede mantener la vida por sí misma, ya que posee una pared celular rígida formada por una estructura en capas que rodea a la célula con un elevado contenido en polisacáridos a diferencia de las células animales (Singh & Saxena, 2015). Las microalgas poseen también cuerpos lipídicos, que es una fuente de energía almacenada generada por la fotosíntesis. Estas características, combinadas con su naturaleza fotosintética, las distinguen de las bacterias y otros microorganismos unicelulares (Sen Tan et al., 2020). Así mismo, las algas, son vitales por su capacidad de producir sus propios nutrientes a través de la fotosíntesis siendo el cloroplasto el orgánulo que lo hace posible. El cloroplasto tiene una compleja disposición interna con una molécula de clorofila en el centro y, mediante una serie de



reacciones bioquímicas (fotosíntesis), la clorofila utiliza el dióxido de carbono de la atmósfera y la energía luminosa para la producción de glucosa (Singh & Saxena, 2015). La fotosíntesis es un proceso metabólico que llevan a cabo algunas células de organismos autótrofos para sintetizar sustancias orgánicas a partir de otras inorgánicas. La fotosíntesis de las algas (Figura 1) se basa principalmente en el ciclo de Calvin, en el que la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) reacciona con el  $\text{CO}_2$  para sintetizar ácido 3-fosfoglicérido (3-PGA) que se consume durante la producción de glucosa y otros metabolitos (Teuling et al., 2017). Este proceso es imprescindible para la vida de nuestro planeta ya que, a partir de la luz y materia inorgánica, se sintetiza materia orgánica, permitiendo fijar dióxido de carbono y liberar oxígeno.



**Figura 1:** Representación esquemática de una célula microalgal, destacando las reacciones fotosintéticas que tienen lugar en el cloroplasto (Vale M et al., 2020)

Según datos bibliográficos, los primeros cultivos de algas puras fueron realizados por el microbiólogo holandés Beijerinck en 1890 con *Chlorella vulgaris* y el uso de dichos cultivos para estudiar la fisiología de las plantas fue desarrollado más tarde por Warburg a principio del siglo XX. El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, enfocada a la producción de lípidos, para los que se emplearon las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* (Borowitzka, 1999). Después de la II Guerra Mundial se comenzó a considerar la biomasa microalgal como un suplemento importante e incluso capaz de reemplazar a las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre acortando la ineficiente cadena alimenticia proteica. El cultivo comercial a gran escala de microalgas comenzó a principios de la década de 1960 en Japón con el cultivo de *Chlorella*, seguido a principios de la década de 1970 por el establecimiento de una instalación de cosecha y cultivo de *Spirulina* en el lago Texcoco, México, por parte de Sosa Tzcoco S.A. En 1977, Dai Nippon Ink and Chemical Inc. establecieron una planta comercial de *Spirulina* en Tailandia, y en 1980 había ya 46 fábricas a gran escala en Asia que producían más

de 1000 kg de microalgas (principalmente *Chlorella*) al mes y en 1996 se comercializaron unas 2.000 toneladas de *Chlorella* sólo en Japón (Borowitzka, 1999; Munro et al., 1999). La producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de  $\beta$ -caroteno se convirtió en la tercera industria más importante de microalgas cuando Western Biotechnology Ltd y Betatene Ltd establecieron instalaciones de producción en Australia en 1986. Pronto les siguieron otras plantas comerciales en Israel y Estados Unidos (Borowitzka, 1999; Matsunaga et al., 1999). Además de estas microalgas, la producción a gran escala de cianobacterias (algas verde-azuladas) comenzó en la India más o menos al mismo tiempo (Borowitzka, 1999). Así, en un breve periodo de sólo 30 años, la industria de la biotecnología de las microalgas ha crecido y se ha diversificado considerablemente. No obstante, el potencial interés de las microalgas no se basó únicamente en su utilidad como fuente alternativa de alimentos funcionales. Ya en la década de los 50 en Berkeley (Universidad de California) sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y la producción simultánea de proteínas (Matsunaga et al., 1999). Oswald y Golueke en 1960 desarrollaron asimismo sistemas de producción masiva de algas para la bioconversión de la energía solar en metano y comenzaron a implementar la tecnología para la depuración de agua residuales con microalgas y posterior valorización de la biomasa generada lo que conllevaría a un abaratamiento del proceso de producción de estas microalgas y una ventaja competitiva frente a los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales (Mehariya et al., 2021). Sin embargo, esta prometedora tecnología se ha mantenido inexplorada durante décadas y ha resurgido con fuerza en los últimos años, como resultado de la búsqueda de procesos sostenibles y nuevas alternativas de biorrefinería.

Las microalgas son “convertidores” de energía solar muy eficientes, y tienen una gran variedad de metabolitos incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos fenólicos entre otros que podrían ser una gran fuente de varios compuestos útiles en alimentación y/o productos naturales para la salud (Xu et al., 2020). Los aceites de microalgas también se han considerado durante mucho tiempo adecuados para la producción de biodiésel (Raheem et al., 2018). Sin embargo, los estudios económicos de estos procesos parecen sugerir que, en la actualidad, el cultivo de algas a escala industrial únicamente para la producción de biocombustible no es económicamente rentable (Shahid et al., 2020; Xu et al., 2020). Por lo tanto, numerosos investigadores están apostando por la integración del tratamiento de aguas residuales, utilizadas como medio de cultivo para las microalgas, y la producción de biocombustible, junto con la obtención de otros productos químicos de alto valor añadido, aplicando el concepto de biorrefinería y la bioeconomía circular.

En los últimos años, se ha desarrollado ampliamente el proceso de tratamiento de aguas residuales con microalgas, que han demostrado tener una alta capacidad de absorción de nutrientes y producción de oxígeno, para purificar eficazmente aguas residuales con poca o

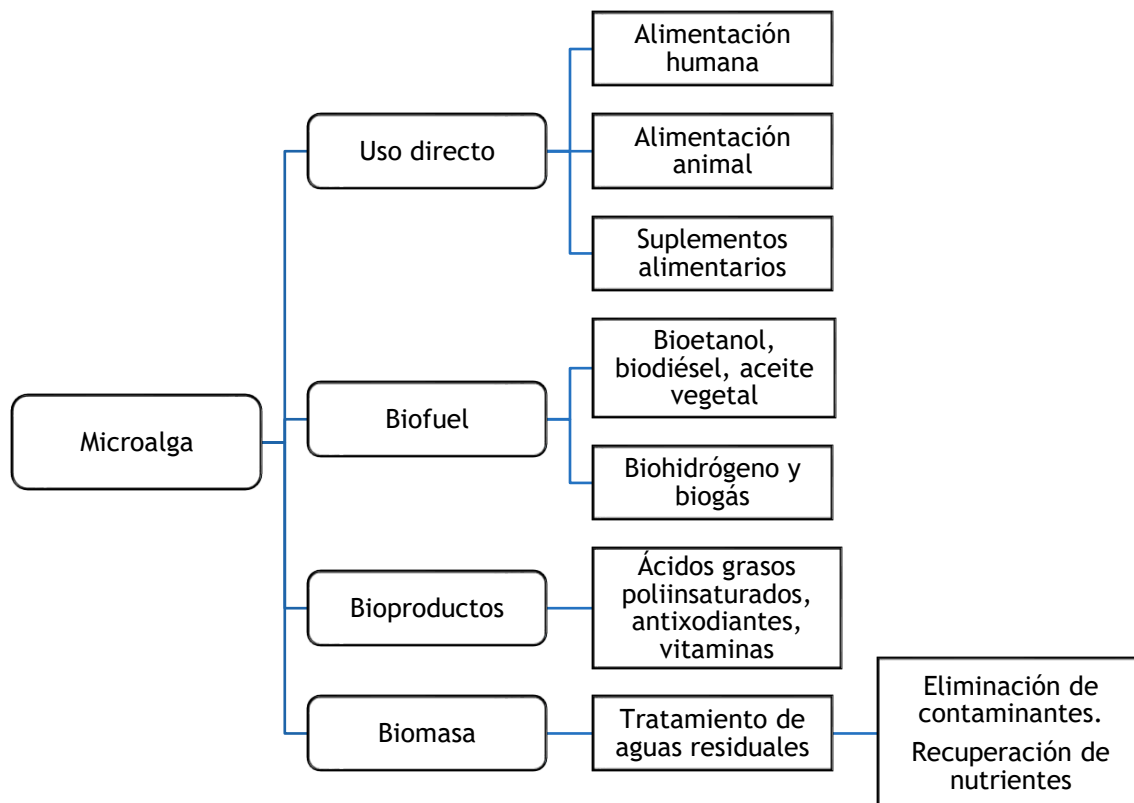
ninguna aireación mecánica (Cao et al., 2018). El mayor interés es el tratamiento de aguas residuales ricas en nitratos, fósforo y otros oligoelementos, puesto que las microalgas son capaces de asimilar y utilizar estos nutrientes para producir biomasa con elevados contenidos en proteínas y carbohidratos (Mehariya et al., 2021). Además, la eficiencia de conversión fotosintética de las microalgas es mucho mayor que la de otras plantas superiores, lo que se debe principalmente a la falta de diferenciación y a la presencia de estructuras de revestimiento en las células microalgales (Shahid et al., 2020; Xu et al., 2020). En los últimos años se ha demostrado que el uso de consorcios de microalgas-bacterias para el tratamiento de aguas residuales de origen agroindustrial puede ser una alternativa eficaz a las plantas de tratamientos convencionales (Fuentes et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; D. Hernández et al., 2016). En estos sistemas, las microalgas proporcionan oxígeno durante la fotosíntesis que es utilizado por el metabolismo bacteriano, mientras que las bacterias degradan los complejos compuestos orgánicos y liberan CO<sub>2</sub> y sustancias simples, necesarias para el crecimiento de las microalgas. De este modo, los sistemas microalgas-bacterias no requieren la suplementación externa de oxígeno, disminuyendo los costes energéticos y permitiendo la recuperación de nutrientes y CO<sub>2</sub> como biomasa valorizable (D. Hernández et al., 2016). Varios estudios (Cao et al., 2018; Gouveia, 2011; Hussain et al., 2021) avalan la viabilidad económica del acoplamiento del tratamiento de aguas residuales con microalgas y la posterior valorización de la biomasa generada (WGMB).

### 1.2 APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas pueden ser una rica fuente de compuestos de carbono, que pueden ser utilizados como biocombustibles, suplementos para la salud, productos farmacéuticos y cosméticos entre otros (Figura 2), ya que producen una amplia gama de bioproductos, como polisacáridos, lípidos, pigmentos, proteínas, vitaminas, compuestos bioactivos y antioxidantes (Khan et al., 2018). El interés por las microalgas como materia prima renovable y sostenible para la producción de biocombustible y otros productos de valor añadido ha inspirado un nuevo enfoque en la biorrefinería. Sin embargo, a pesar del alto potencial que presentan las microalgas, el desarrollo de un proceso eficiente para su producción sigue siendo un reto importante para la implantación comercial tanto técnica como económicamente (Levasseur et al., 2020).

Debido al creciente deterioro del medio ambiente y a la necesidad de energía y materias primas renovables, la investigación se ha centrado en el reciclaje y la recuperación de recursos mediante la aplicación de la bioeconomía circular. En este contexto, las microalgas se han estudiado como una respuesta adecuada a los problemas medioambientales actuales debido a los potenciales beneficios que ofrecen entre las que se pueden citar:

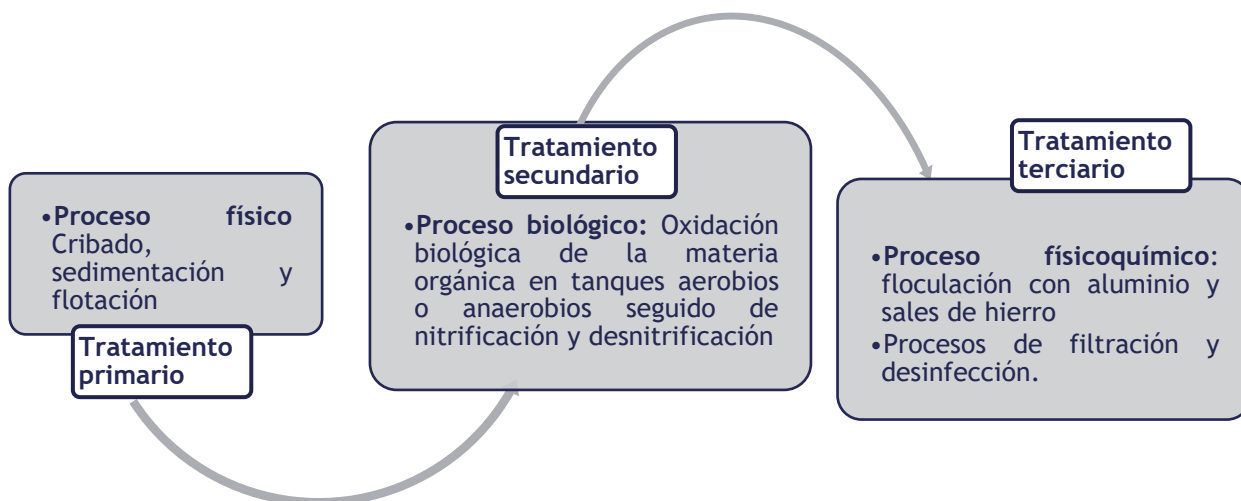
- Su capacidad para integrar el carbono de los gases de combustión como fuente de carbono para su crecimiento y desarrollo (Gonçalves et al., 2017).
- Su alta tasa de crecimiento superior a  $1 \text{ día}^{-1}$  (Acién Fernández et al., 2018).
- Su potencial para crecer en aguas residuales e incorporar contaminantes a su metabolismo como nutrientes (Gonçalves et al., 2017; Levasseur et al., 2020).
- No requieren de tierra fértil ni agua potable para su crecimiento, creciendo incluso en aguas residuales. (Acién Fernández et al., 2018; Gonçalves et al., 2017).
- Su valiosa composición bioquímica en macrocomponentes (alto contenido de proteínas y carbohidratos) para la producción de bioproductos de valor añadido (Chai et al., 2021).
- Su potencial aplicación como biofertilizante debido a su rico perfil en nutrientes (nitrógeno, potasio y fósforo) (Borowitzka, 1999; Yaakob et al., 2021)



**Figura 2:** Las microalgas convierten el  $\text{CO}_2$  atmosférico en hidratos de carbono, lípidos y otros bioproductos valiosos utilizando la luz. La biomasa de microalgas es una rica fuente de biocombustibles y compuestos bioactivos (Khan et al., 2018)

### 1.2.1 MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Debido al crecimiento de la población mundial, a la agricultura y ganadería intensiva y a la rápida industrialización, está aumentando rápidamente el consumo de agua dulce, lo que ha dado lugar a una enorme generación de aguas residuales (Fito & Alemu, 2019). Estas aguas residuales contienen cantidades sustanciales de nutrientes orgánicos e inorgánicos, que causan desequilibrios en los ecosistemas debido a su alta demanda biológica y química de oxígeno (DBO y DQO). Además, la presencia excesiva de nutrientes, como el nitrógeno (N) y el fósforo (P), provoca la eutrofización de las masas de agua y, por tanto, perturba la salud de los sistemas acuáticos (Chai et al., 2021). Este fenómeno da lugar a problemas medioambientales que comprenden la generación de residuos sólidos y subproductos, la emisión de productos no deseados al aire, el crecimiento excesivo de microorganismos indeseables que ponen en peligro la forma de vida acuática y el empeoramiento de la calidad del consumo de agua que contribuye a la generación de problemas relacionados con la salud humana en las zonas cercanas al área de descarga del efluente (Amenorfenyo et al., 2019; Chai et al., 2021).



**Figura 3:** Principales etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales y métodos aplicados actualmente (Gonçalves et al., 2017; Zhang et al., 2020).

El sistema convencional de tratamiento de aguas residuales se centra principalmente en la eliminación de los sólidos suspendidos y la reducción de la DBO mediante el sistema de fangos activados como se indica en la Figura 3 (Chai et al., 2021). Este proceso está basado principalmente en la acción de bacterias heterótrofas y nitrificantes en procesos oxigenados mediante aireación mecánica que involucra una serie de etapas aerobias, anóxicas y anaerobias interconectadas en diferentes configuraciones. Aunque esta tecnología es capaz de llevar a cabo la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo marcado por la legislación vigente, producen un alto consumo energético e impacto medioambiental (alta huella de carbono y pérdida de nutrientes). En este sentido, aunque los procesos basados en digestión anaerobia han permitido el

tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales, su bajo rendimiento de eliminación de nutrientes requiere de costosos tratamientos posteriores para la eliminación de N y P (Acién Fernández et al., 2018; Fuentes et al., 2016;)

Según lo descrito anteriormente, un importante campo de aplicación de las microalgas se encuentra en el tratamiento de aguas residuales. La Tabla 1 recoge algunas de las características de los sistemas de tratamiento de aguas residuales empleando microalgas.

**Tabla 1:** Características de los sistemas de tratamiento de aguas residuales empleando microalgas

<b>Características</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>Captación de nutrientes</b>	Las microalgas absorben los nutrientes (carbono, nitrógeno y fosforo) de las aguas residuales y los incorporan a su metabolismo para la producción de biomasa, produciendo proteínas, carbohidratos y lípidos.	(Levasseur et al., 2020; Shahid et al., 2020)
<b>Eliminación de DBO</b>	La elevada tasa fotosintéticas de las microalgas permite la eliminación de la materia orgánica presente en las aguas residuales.	(Chai et al., 2021; Muñoz & Guieysse, 2006)
<b>Eliminación de metales pesados</b>	Al igual que los nutrientes, las microalgas pueden absorber ciertos metales pesados e incorporarlos a su metabolismo como micronutrientes o cofactores de crecimiento.	(Mohd Udaiyappan et al., 2017; Muñoz & Guieysse, 2006;)
<b>Eliminación de patógenos</b>	Eliminación de patógenos modificando el pH y concentración de oxígeno inducidos por la fotosíntesis de las microalgas, y a la acción de la radiación UV.	(Salama et al., 2017)

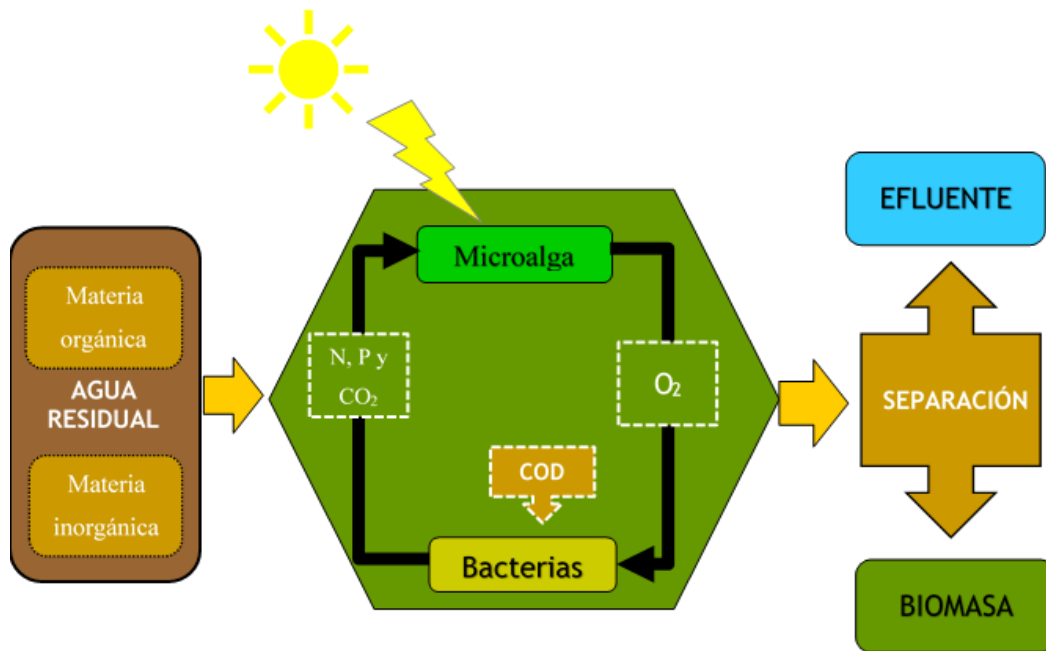
Las tecnologías de aguas residuales basadas en algas ofrecen una solución convincente y sostenible debido a su eficaz fijación de compuestos inorgánicos, incluidos el dióxido de carbono y los metales pesados (Chai et al., 2021). Éstas muestran gran capacidad de captación de nutrientes inorgánicos, ya que requieren de nitrógeno y fósforo para la síntesis de proteínas y metales pesados como micronutrientes para su crecimiento (Chai et al., 2021; Rambabu et al., 2021). En este sentido, el uso de algas como agentes de biorremediación de aguas residuales puede eliminar eficazmente el nitrógeno y el fósforo de las aguas residuales, mantener el contenido de oxígeno disuelto y ayudar a reducir los patógenos y bacterias presentes en las aguas residuales (Salama et al., 2017). El tratamiento con microalgas resulta también un enfoque más eficiente

para el tratamiento de aguas residuales, ya que es capaz de tratar las aguas residuales en una sola etapa en contraste con el tratamiento convencional que requiere de una secuencia de procesos para fijar las proporciones de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) (Liu et al., 2020; Mehariya et al., 2021; Shetty et al., 2019).

En los últimos años se ha mostrado un especial interés por las aguas residuales generadas en la industria porcina (Boursier et al., 2005; Su et al., 2020). La UE es uno de los mayores productores de ganado porcino generando entre  $215-430 \cdot 10^6 \text{ m}^3/\text{año}$  (4-8 L/día/porcino) de aguas residuales provenientes de las explotaciones porcinas. Su carga estimada en materia orgánica y nutrientes en 2018 se encuentra alrededor de 8.000.000 t DQO/año, 890.000 t N/año, y 220.000 t P/año. Sin embargo, a pesar de la demostrada eficiencia del tratamiento para la eliminación de materia orgánica y nutrientes, los estudios sobre la valoración y recuperación de estos nutrientes a partir de la biomasa generada en el tratamiento de agua residual (WGMB) de la industria porcina aún son limitados. Dado que las microalgas pueden recuperar los nutrientes de las aguas residuales, en los últimos años se ha propuesto el uso de biorreactores fotosintéticos como plataforma favorable para el tratamiento de aguas residuales como alternativa a los procesos convencionales basados en la tecnología de los fangos activos (D. García et al., 2018).

No obstante, al considerar la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales hay que tener en cuenta que lo que en realidad crece en estos fotobiorreactores es un consorcio de microalgas y bacterias (Gonçalves et al., 2017; Shahid et al., 2020). Las algas y las bacterias reducen los niveles de materia orgánica y nutrientes en las aguas residuales mediante la oxidación aeróbica del carbono y la asimilación de nutrientes en la biomasa (García et al., 2018). Como en estos sistemas no son posibles las condiciones de esterilidad, el consorcio que finalmente prevalezca en los reactores será el que se produzca de forma natural en función de la composición del agua residual, las condiciones ambientales, el diseño del reactor y las condiciones de operación (Acién Fernández et al., 2018).

Independientemente de la composición biológica del consorcio, se puede asumir un patrón general del proceso en la Figura 4. Así, las bacterias existentes en el cultivo oxidan la materia orgánica a compuestos inorgánicos, consumiendo oxígeno en este paso, mientras que las microalgas utilizan la luz para captar los nutrientes inorgánicos que han sido liberados por las bacterias y producir biomasa liberando a su vez el oxígeno requerido por las bacterias para el paso de oxidación (Acién et al., 2016; Muñoz & Guieysse, 2006). Gracias a este proceso, se establece un equilibrio “natural” entre las microalgas y las bacterias sean cuales sean las condiciones del reactor.



**Figura 4:** Esquema de los principales fenómenos que tienen lugar cuando se emplean consorcios microalgas-bacterias para la recuperación de nutrientes de aguas residuales (Adaptado de Ación Fernández et al., 2018 y Zang et al., 2020). Las bacterias degradan la materia orgánica aportando  $\text{CO}_2$  y nutrientes (N, P) a las microalgas promoviendo así la acumulación de biomasa. Por otro lado, las microalgas generan oxígeno a partir de la fotosíntesis, siendo usado éste en el metabolismo aerobio de las bacterias

Aprovechando las interacciones cooperativas entre las microalgas y las bacterias, se puede mejorar el rendimiento del tratamiento de aguas residuales, ya que las interacciones permiten el intercambio de metabolitos y soportan periodos de limitación de nutrientes, resisten la invasión de otras especies y mantienen la estabilidad de la colonia, proporcionan robustez a las oscilaciones ambientales y, mejoran la captación global de nutrientes. En la Tabla 2 se resumen algunos estudios sobre el uso de consorcios microalgas-bacterias para la eliminación de carbono y nutrientes. Los procesos de microalgas y bacterias aportan otras grandes ventajas en el tratamiento de aguas apoyados en que:

- Pueden duplicar su biomasa en 24h, crecer exponencialmente en 3.5 h y prosperar en cualquier condición ambiental en presencia de suficientes nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo) (Fito & Alemu, 2019)
- Usan energía solar para la oxigenación fotosintética (Salama et al., 2017)
- Asimilan mayor cantidad de nutrientes en comparación con los procesos convencionales de fangos activos (como resultado de la combinación de metabolismos autótrofo y heterótrofo). Básicamente, las microalgas utilizan grandes cantidades de carbono, nitrógeno y fósforo para su crecimiento y almacenan el exceso de nutrientes dentro de sus células para su uso futuro (Ación Fernández et al., 2018)



- El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales requiere un mínimo de equipo mecánico y relativamente poca energía para su funcionamiento, lo que reduce el coste de capital (Fito & Alemu, 2019).
- La aireación externa, que suponía hasta el 45-75% del coste energético total durante el tratamiento convencional de las aguas residuales, puede suministrarse de forma gratuita a partir de los procesos simbióticos en los sistemas de aguas residuales basados en consorcio microalga-bacterias (Fito & Alemu, 2019).
- Una eficaz eliminación de patógenos y contaminantes emergentes; debido a los altos pH y concentración de oxígeno inducidos por la fotosíntesis de las microalgas, y a la acción de la radiación UV (Levasseur et al., 2020; Salama et al., 2017).
- La biomasa algal recogida tras el tratamiento de las aguas residuales, puede convertirse en una amplia gama de productos de medio/alto valor añadido, como bioenergía, biofertilizantes o bioestimulantes para plantas o alimentación animal, entre otras aplicaciones (Gonçalves et al., 2017; Zhang et al., 2020).

**Tabla 2:** Aplicación de consorcios microalgas/bacterias para la recuperación de nutrientes (C, N y P) de aguas residuales de diferentes orígenes (Gonçalves et al., 2017; Zhang et al., 2020)

Consortio microalgas/bacteria	Agua residual	Sistema	Días de operación	Carbono		Nitrógeno		Fósforo	
				C <sub>i</sub> (mg/L)	%R	C <sub>i</sub> (mg/L)	%R	C <sub>i</sub> (mg/L)	%R
<i>Chlorella sorokiniana</i> y fangos activados	Explotación porcina	PBR, V=3.5 L	13	550 TOC	47	350 NH <sub>4</sub> -N	21	19 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	54
<i>Buglena viridis</i> y fangos activados	Explotación porcina	PBR, V=3.5 L	13	450 TOC	51	320 NH <sub>4</sub> -N	34	19 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	53
<b>Consortio (las microalgas predominantes cambian de <i>Chlamydomonas</i> a <i>Microspora</i>, <i>Chlorella</i> y <i>Achnanthes</i> durante diferentes fases).</b>	Explotación porcina	HRAP, V = 464 L	245	F1: 526 COD; F2: 1221 COD; F3: 2316 COD	F1: 59 F2: 77; F3: 53	F1: 59 TN; F2: 154 y F3: 170	F1:78; F2: 90; F3: 62	n.a	n.a
<b>Un consorcio de microalgas y bacterias derivado de las aguas residuales municipales, principalmente compuesto por <i>Chlorella</i>, <i>Scenedesmus</i> y <i>Stigeoclonium</i></b>	Municipal, después del tratamiento primario	HRAP, V = 60 L; HRT = 2 días	28	110 COD	85	45TN	93	5 TP	83
<b>Consortio de microalgas de aguas residuales municipales compuestos por <i>Chlorella</i>, <i>Scenedesmus</i> y <i>Stigeoclonium</i></b>	Explotación porcina después del tratamiento primario	PBR, V = 3L, HRT = 27 días	180	459-482 TOC	86-87	165-174 TN	82-85	2-2.4 TP	90-92
<i>Scenedesmus</i> sp y bacterias de aguas municipales	Explotación porcina	PBR, V = 0.8L	14	296 COD	92	41 TN	96	7 TP	98
<i>C. vulgaris</i> y <i>Proteobacteria</i> y fangos activados	Industrial	PBR anóxico-aeróbico, HRT = 2 días, V=2.7 L	180	205 TOC, 253 IC	86-90 TOC, 57-98 IC	123 TN	68-79	n.a	n.a
<b>Consortio microalgas compuesto por <i>Ulothrix zonata</i>, <i>Ulothrix aequalis</i>, y <i>Oedogonium</i> sp</b>	Digestato de explotación vacuna	Biofilm Reactor SBR, V = 220 L	7	n.a	n.a	64 TN	60	14 TP	93
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i>, <i>Scenedesmus rubescens</i> y <i>Chlorella vulgaris</i></b>	Efluente primario municipal	CSS, Batch, V= 5 L	5-14	n.a	n.a	53-99 TN	41-100	4-12 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	12-100

C<sub>i</sub> = concentración inicial (en mg/L); %R = Eficacia de eliminación; V- Volumen de trabajo; NO<sub>3</sub>-N – nitrógeno nitrato (mg N/L); NH<sub>4</sub>-N- nitrógeno amónico (mg/L); TN- nitrógeno total; PO<sub>4</sub>-P- fósforo-fosfato (mg P/L); TP: fosfato total; COD- demanda química de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/L); PBR: fotobiorreactor; HRT- tiempo de retención hidráulico; SBR- reactor semicontinuo; CCS: closed suspended system; HRAP: High-Rate Algal; F1, F2, F3: Fase 1, 2, 3; n.a- no aplica.

### 1.3 COMPOSICIÓN DE BIOMASA ALGAL

Los principales componentes de las microalgas son proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos (R. Ma et al., 2020). Sin embargo, el contenido de cada biocompuesto en la especie de microalga es variable y depende en gran medida de la especie, las condiciones ambientales para su crecimiento o bien de los parámetros operacionales relacionadas con su cultivo. Se han publicado varios análisis de la composición química bruta de diferentes microalgas y con el fin de ofrecer una visión general de los principales componentes, en la Tabla 3 se recopilan la composición bioquímica de varias especies de microalgas (Becker, 2007; Dolganyuk et al., 2020; R. Ma et al., 2020). De forma general, las microalgas están compuestas principalmente por un 20-60% de proteínas, 20-30% de carbohidratos y 5-25% de lípidos en función de la especie de alga que predomine y de las condiciones de cultivos.

**Tabla 3:** Composición química (proteínas, carbohidratos y lípidos en % base seca) de diferentes tipos de microalgas puras (Azizi et al., 2018; Becker, 2007; Ma et al., 2020)

Microalga	% Proteínas	% Carbohidratos	%Lípidos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flas-aqua</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gacilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Arthrospira máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	44.2	25.2	24.6
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	40.5	25.1	26.3
<i>Nannoloropsis oculata</i>	39	20	17
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	61.3	21.69	2.8
<i>C.vulgaris remnants</i>	61.24	20.34	5.71
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	30
<i>Tetraselmis sp.</i>	60	24	15

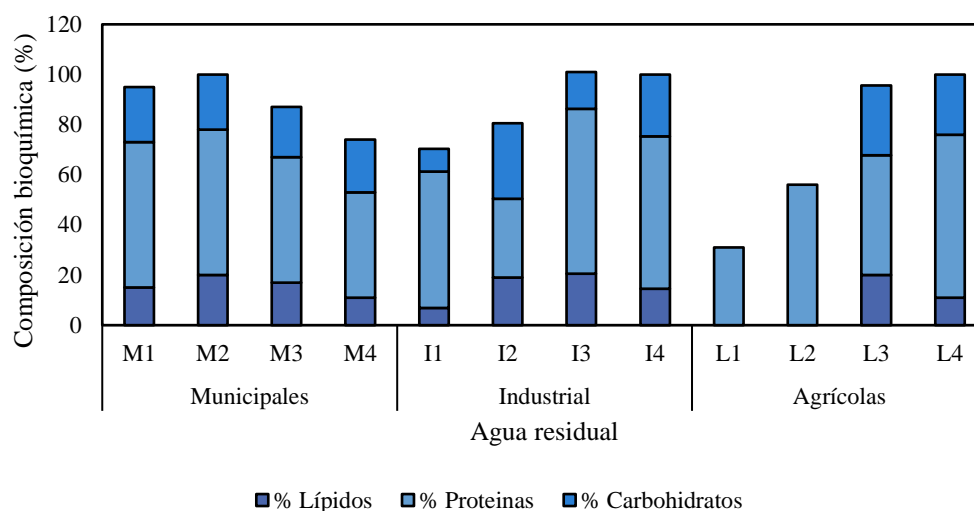
Como se indicó anteriormente, los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas son el carbono, nitrógeno, fósforo y, en menor medida, cantidades trazas de metales como micronutrientes. Dado que las aguas residuales presentan concentraciones considerables de estos nutrientes (Tabla 4), varios estudios han informado del potencial de crecimiento de las microalgas en aguas residuales de diferentes orígenes: domésticas (Sutherland et al., 2015; Weizheng Zhou et al., 2018), municipales (Das et al., 2019; Gao et al., 2019;

Mehrabadi et al., 2016), agrícolas (Boursier et al., 2005; D. García et al., 2018; Salama et al., 2017; Zhu et al., 2013) e industriales (Assemay et al., 2020; Choudhary et al., 2020; Hongyang et al., 2011). Los medios de crecimiento y las condiciones de cultivo (nutrientes, intensidad de la luz, temperatura, pH, etc.) pueden producir un efecto notable en la composición bioquímica de las microalgas. Las condiciones de cultivos de las microalgas son factores importantes que influyen en el metabolismo de estos microorganismos, dirigiendo así la síntesis de compuestos específicos de interés como proteínas, lípidos y carbohidratos. Por lo tanto, los cambios en los parámetros operacionales y la composición del medio de cultivo pueden afectar considerablemente su composición. En la Figura 5 se indica la composición bioquímica de biomazas de diferentes microalgas crecidas en agua residual (WGMB) como medio de cultivo.

**Tabla 4:** Composiciones típicas de aguas residuales utilizadas para el cultivo de microalgas en términos de nitrógeno, fósforo y carbono (Choudhary et al., 2020; Levasseur et al., 2020; Sutherland et al., 2015).

Tipo de agua residual	Fuente	Nitrógeno (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Carbono (mg/L)
Agrícolas	Patatas	54 NO <sub>3</sub> -N 12 NH <sub>4</sub> -N	48 PO <sub>4</sub> -P	745 COD
	Arroz	25-95 TN	12-94 PO <sub>4</sub> -P	2578-6480 COD
Digestato	Purín	< 1 NO <sub>3</sub> -N 1279-1961 NH <sub>4</sub> -N	240 TP	4855-4945 COD
	Municipal	646 NH <sub>4</sub> -N	101 PO <sub>4</sub> -P	76 TOC
Industrial	Porcino	303-495 NH <sub>4</sub> -N	n.a	n.a
	Cerveza	2-11 NO <sub>3</sub> -N 3-106 NH <sub>4</sub> -N	57-326 TP	565-7837 COD
	Láctea	<1 NO <sub>3</sub> -N 120-350 NH <sub>4</sub> -N	35-350 TP	2000-20000 COD
	Petróleo, metal y química	1.9 NO <sub>3</sub> -N 1.1 NH <sub>4</sub> -N	n.a	1200 COD
	Porcina	324-656 NH <sub>4</sub> -N	117 PO <sub>4</sub> -P	1247 TOC
Municipal	Lixiviadas	49-115 NH <sub>4</sub> -N	50-385 TP	2470-15500 COD
	Domésticas	25-66 NH <sub>4</sub> -N	7-12 PO <sub>4</sub> -P	400-500 COD
	Residuales	1 NO <sub>3</sub> -N 23-219 NH <sub>4</sub> -N	1-12 PO <sub>4</sub> -P	183-380 COD

NO<sub>3</sub>-N: nitrógeno-nitrato (mg N/L); NH<sub>4</sub>-N-nitrógeno amónico (mg N/L) TN: nitrógeno total; PO<sub>4</sub>-P-fósforo-fosfato (mg P/L), TP- fósforo total, COD: demanda química de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/L), TOC-carbono orgánico total.



**Figura 5:** Variación en la composición bioquímica de microalgas crecidas en aguas residuales. Código: **M:** Agua residuales municipales, **I:** Aguas residuales industriales; **L:** Aguas residuales de explotaciones ganaderas. (Choudhary et al., 2020)

Las aguas residuales municipales se han estudiado ampliamente para el cultivo de biomasa algal. Por lo general, comprenden desechos orgánicos, desechos humanos, productos químicos utilizados en el hogar, etc., aunque su composición varía de una región a otra. Además, la concentración de nutrientes disponibles en las aguas residuales municipales para el cultivo de microalgas dependerá de la etapa de purificación del efluente, es decir, si se trata de un efluente primario o secundario (Sutherland et al., 2015; Weizheng Zhou et al., 2018). Se sabe que junto a la concentración de nutrientes disponibles en las aguas residuales primarias también existe una alta concentración de materia orgánica y sólidos en suspensión, que pueden inhibir el crecimiento de microalgas debido a la competencia con bacterias heterotróficas y una menor disponibilidad de luz (Choudhary et al., 2020). A pesar de ello, las microalgas son capaces de asimilar N y P en ambos efluentes. Sin embargo, esta variación en las características pueden dar lugar a diferentes composiciones de biomasa cultivada (Weizheng Zhou et al., 2018). Muchos estudios han demostrado que la acumulación de lípidos aumenta en condiciones de privación de nitrógeno y, por tanto, se convierte en una materia prima atractiva para la producción de biocombustible a base de lípidos. Mehrabadi et al. (2016) analizaron cómo la composición de la biomasa microalgal variaba con la temporada estacional, ya que estos autores observaron un mayor contenido de lípidos (45% en peso) en verano cuando la concentración de amonio era la más baja en las aguas residuales (12 mg/L  $\text{NH}_4\text{-N}$ ) mientras que el contenido de lípidos disminuyó en un 20% en los meses de invierno cuando la concentración de amonio era de 30.7 mg/L. Gao et al. (2019), evaluando el crecimiento de microalgas en aguas residuales municipales secundarias con 12.2 mg/L de nitrógeno total (TN), obtuvo hasta un 40% de lípidos en biomasa seca. Por otro lado, Passos et al. (2014) al producir *Chlorella* y *Scenedesmus* en reactores microalgales HRAP (High Rate Algal Ponds) con aguas residuales domésticas con un contenido entre 30-60 mg/L  $\text{NH}_4$  y

7-12 mg P/mL, obtuvieron una composición de biomasa con 49% proteínas, 17% de lípidos y 20% de carbohidratos, es decir, poca diferencia en comparación con la composición de cultivos puros de *Scenedesmus obliquus* (compuestos de 50% de proteínas, 12 a 14 % de lípidos y 10 a 17% de carbohidratos). A partir de estos estudios se demuestra que el contenido de proteínas disminuye en condiciones de privación de nitrógeno y en contraposición aumenta la composición de lípidos. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que con la disminución del contenido de proteínas, el crecimiento de la microalga también disminuye y por tanto la producción de biomasa y la eficiencia del proceso (Choudhary et al., 2020; Sutherland et al., 2015).

Las aguas residuales industriales, principalmente los procedentes de la industria alimentaria proporcionan las condiciones óptimas para el crecimiento de las algas ya que carecen de metales pesados y productos químicos tóxicos (Chong et al., 2000; Choudhary et al., 2020). Los molinos de procesamiento de soja generan aguas residuales que contienen proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y otros nutrientes (Choudhary et al., 2020). Según lo informado por Hongyang et al. (2011) las aguas residuales de procesamiento de soja (SPW) tienen una composición de nutrientes muy altas con una demanda química de oxígeno (DQO) de 13.215 mg/L, nitrógeno amoniacal total (TAN) de 267 mg/L y fósforo total (TP) de 56 mg/L promoviendo el crecimiento de microalgas. Debido a su alto contenido de nutrientes, el SPW es un medio adecuado para la producción de algas como *Chlorella pyrenoidosa* con un alto contenido en proteínas (48-55 % en peso). Chinnasamy et al. (2010) informaron que la biomasa de algas (*Botryococcus braunii*, *Cricosphaera carterae* y *Phaeodactylum tricorutum*) cultivada en aguas residuales lixiviadas no tratadas, procedentes de la industria textil, contiene altas concentraciones de proteínas (54.5% w/w), y bajos lípidos (6.8% w/w) y carbohidratos (8.9% w/w). De manera similar, las aguas residuales de las industrias de procesamiento cárnico también han sido estudiadas por Lu et al. (2015) y Choudhary et al. (2020) como fuente de medio de cultivo para algas y se encontró que la biomasa producida era rica en proteínas (60.87 - 68.65% w/w). Esto demuestra que el alto contenido de nitrógeno en el medio da como resultado un alto contenido de proteínas en la biomasa que podría utilizarse como complemento alimenticio para animales, aves de corral, acuicultura, ganado, etc. Assemany et al. (2020) reportaron un 30.2% de carbohidratos en *Scenedesmus obliquus* cultivada en efluentes de la industria cervecera usando HRAP (*High Rate Algae Ponds*) como un reactor de tratamiento/crecimiento mientras que los contenidos de proteínas, carbohidratos y lípidos eran de 31.4, 30.2 y 17.9 %, respectivamente. Sin embargo, cuando emplearon un reactor de columna de burbujas (*Bubble Column Reactors*) y el mismo efluente de cervecería la biomasa obtenida sólo contenía un 36.9% de proteínas, 4.3% de carbohidratos y 31.6% de lípidos. Estos resultados sugieren que, junto con el medio de cultivo, el reactor de cultivo y las condiciones promovidas durante el crecimiento pueden tener un papel importante en la composición de la biomasa.

Las aguas residuales procedentes de las explotaciones ganaderas se han utilizado desde la década de los 80 para el cultivo de microalgas. Algunos estudios muestran como los desechos de estiércol procedentes de la explotación lechera son ricos en nitrógeno y fósforo y, cuando se utilizan como medio para el cultivo de algas, proporcionan una alta productividad de biomasa (Choudhary et al., 2020; Hussain et al., 2021). Además, se ha observado un alto contenido de proteínas (30-56% en peso) en dicha biomasa según lo reportado por Wilkie & Mulbry (2002). Zhu et al. (2013) utilizaron diferentes diluciones de aguas residuales procedentes de la explotación porcina como medio de cultivo de algas y encontraron un aumento en el contenido proteínas (de 11.3 a 47.8% en peso) y carbohidratos (de 24.8 a 27.8% en peso) en la biomasa mientras que se redujo el contenido de lípidos (de 45 a 20 % en peso) con el aumento de la concentración de nutrientes de 30 a 160 mg NH<sub>4</sub>-N/L.

Los estudios citados junto a los datos indicados en la Tabla 2 han revelado que el uso de aguas residuales para el cultivo de microalgas promueve un tratamiento efectivo de estas aguas a la vez que contribuye a la producción de biomasa microalgal a costo reducido y con menor impacto medioambiental, ya que no se requiere el suministro de nutrientes y agua dulce (Gonçalves et al., 2017; Zhang et al., 2020). Además, se puede deducir que en condiciones de exceso de nutrientes las microalgas crecerán en mayor medida desarrollando una mayor fracción proteica, mientras que en condiciones de privación de nutrientes como el nitrógeno, su crecimiento se verá limitado favoreciendo un mayor contenido de lípidos y/o carbohidratos (Ho et al., 2012; Li et al., 2020; Ogbonda et al., 2007; Qiu et al., 2017) lo que convierte a la biomasa de microalgas procedentes del tratamiento de aguas residuales en una fuente muy versátil de biomasa destinada a múltiples aplicaciones (Figura 6).

A pesar de sus numerosas ventajas, es evidente que el cultivo de microalgas en aguas residuales resulta en limitaciones importantes para su valorización. El crecimiento de las microalgas y su composición bioquímica (contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos) está influenciado por la composición del agua residual resultando, en gran parte de los casos, una biomasa con un bajo contenido en lípidos y una pared celular muy resistente. El origen de esta biomasa limita la producción de biocombustibles a base de lípidos, pero también impide su aplicación en sectores como la alimentación humana, nutracéutico o cosmético debido a la presencia de bacterias o contaminantes en la biomasa. Es necesario, en cualquier propuesta de valorización, prestar especial atención a la seguridad y toxicidad de los productos extraídos de este tipo de biomasa algal (Al-Jabri et al., 2021). Sin embargo, muchos estudios han revelado que este tipo de biomasa puede tener otras múltiples aplicaciones como las indicadas a continuación y resumidas en la Figura 6.

## 1.4 APLICACIONES DE LA BIOMASA MICROALGAL CULTIVADA EN AGUAS RESIDUALES (WGMB)

### 1.4.1 Biofertilizantes y bioestimulantes

La aplicación de microalgas cultivada en agua residuales (WGMB) podría mejorar principalmente el contenido de nitrógeno y fósforo del suelo, además de otros minerales necesarios para las plantas (Ca, K, Fe, Mn, etc) (Al-Jabri et al., 2021). En estudios a pequeñas escalas, se empleó la biomasa algal crecida en aguas residuales como biofertilizantes para cultivar trigo, maíz, pepino y cebada (Das et al., 2019; Mulbry et al., 2005) . La biomasa algal también se considera un fertilizante de liberación lenta y la adición de microalgas como biofertilizantes podría mejorar el contenido orgánico del suelo contribuyendo a retrasar o controlar la liberación de nutrientes al mismo, reduciendo así las pérdidas por lixiviación, volatilización o adsorción por las partículas del suelo (Dineshkumar et al., 2019). La WGMB puede añadirse a los fertilizantes, como biomasa completa o en forma de aminoácidos, con el fin de aumentar la eficiencia de absorción de nutrientes (P y N) por parte de las plantas con el objetivo de promover una sincronización entre la liberación de nutrientes y la demanda de las plantas, evitando así que los nutrientes aportados por los fertilizantes se adsorban rápidamente a las partículas del suelo (Castro et al., 2020). Dependiendo de la especie, la biomasa de microalgas podría introducir varios compuestos estimulantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Al-Jabri et al., 2021). Recientemente se ha publicado un artículo titulado “*Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Production*”, Ronga et al., (2019) resumen la actividad biológica de los extractos de microalgas y como la aplicación de éstos pueden ayudar a mitigar los efectos perjudiciales del estrés abióticos como la salinidad, temperatura, pH, etc. En el citado artículo, los autores informan de que las especies dominantes de microalgas con acción bioestimulantes pertenecen a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Spirulina* y *Calothrix*. La actividad bioestimulante de los extractos de microalgas se ha asociado al contenido de metabolitos primarios (principalmente péptidos y carbohidratos), aminoácidos (arginina y triptófano), vitaminas, polisacáridos como  $\beta$ -glucano y fitohormonas. Aunque el tratamiento basado en una sola especie de microalgas o bacterias se utilizan habitualmente en la agricultura, cada vez hay más pruebas experimentales que sugieren que una relación simbiótica entre microalgas y bacterias afecta sinérgicamente a los procesos fisiológicos y metabólicos de cada una. Sin embargo, aún queda mucho por explorar en lo que respecta a las interacciones microalgas-bacterias para aplicaciones agrícolas (Abu-Ghosh et al., 2021; Gonçalves, 2021; Kang et al., 2021).



### 1.4.2 Producción de energía

La digestión anaerobia del WGMB se ha estudiado ampliamente como medio para generar energía, que podría compensar las necesidades energética de la planta de tratamiento. La producción de biometano a partir de WGMB dependerá de la composición de la biomasa; se ha informado de que la conversión de metano a partir de carbohidratos y compuestos proteicos es mayor que la de las moléculas lipídicas. Por tanto, las cepas de microalgas con bajo contenido en lípidos, como la evaluada en este trabajo, serían preferibles para tratar las aguas residuales si el biogás es el producto final que se desea obtener (Milledge & Heaven, 2017). Durante el proceso de conversión de metano en electricidad se generaría CO<sub>2</sub> que podría integrarse con el cultivo de microalgas en aguas residuales (Ter Veld, 2012).

La digestión anaerobia (AD) puede considerarse como una de las principales rutas de conversión y valorización energética de la biomasa algal producida en las aguas residuales (WGMB). La AD es un proceso complejo con gran variedad de rutas metabólicas y microorganismos, y que puede ser considerada por sí misma como una biorrefinería, ya que al final se pueden obtener varios productos. El digestato es rico en nutrientes ya que contiene todo el N, P y oligoelementos de la biomasa inicial y puede utilizarse como fertilizante (Uggetti et al., 2014). Las opciones para la extracción de nutrientes del digestato son la extracción de amoníaco para la producción de sulfato de amonio y la precipitación de fósforo mediante la formación de estruvita. Además, el digestato se puede utilizar en el sistema de producción de biomasa como medio de cultivo de microalgas. Las principales limitaciones de esta alternativa son el alto contenido de amonio que puede ser tóxico para las algas en forma de amoníaco libre y la alta concentración de sólidos en suspensión, que puede comprometer la disponibilidad de luz (Choudhary et al., 2020; Uggetti et al., 2014).

Varios estudios han explorado la producción de biodiésel mediante el cultivo de microalgas ricas en lípidos en aguas residuales. Sin embargo, la biomasa necesita ser secada para una extracción eficiente de los lípidos (Weizheng Zhou et al., 2018). La pirólisis es otra técnica que podría aplicarse en la biomasa algal seca para producir bioaceite (Adamczyk & Sajdak, 2018). En la última década, la licuefacción hidrotérmica (HTL) surgió como una técnica muy potencial para convertir la biomasa en bioaceite. Sin embargo, a diferencia de la pirólisis, la técnica HTL no requiere biomasa seca y en su lugar, el agua dentro de la biomasa podría utilizarse como medio de reacción (Adamczyk & Sajdak, 2018). Algunos de los elementos de la biomasa (N, P y otros oligoelementos) se asocian a la corriente líquida como subproducto del biogás y del biocrudo; esta corriente líquida podría contener compuestos orgánicos tóxicos. Las microalgas no sólo podrían tratar el flujo de residuos, sino también reciclar los nutrientes de este flujo de residuos (Cheng et al., 2019; Mishra & Mohanty, 2020).

### 1.4.3 Bioproductos

Otra aplicación emergente de la biomasa microalgal es la producción de bioplásticos. Varias cepas de cianobacterias podrían producir polihidroxialcanoatos intracelulares (PHA) con propiedades similares a las del plástico además de ser biodegradable y biocompatible con el medio ambiente. Por lo tanto, el cultivo de cianobacterias específicas en aguas residuales podría ser una materia prima potencial para los bioplásticos (Arias et al., 2020; López Rocha et al., 2020), además, el residuo obtenido tras la extracción de proteínas es un excelente medio de cultivo para microorganismos capaces de almacenar PHAs (García et al., 2020). Fradinho et al., (2013) evaluaron la viabilidad de un cultivo mixto de bacterias y microalgas, inoculados con los sedimentos de un estanque de aguas residuales en el que las *Alfaproteobacterias* y las *Gammaproteobacterias* son las bacterias más abundantes, para acumular PHA en un SBR fotosintético sin aireación. Se pudo alcanzar un contenido de PHA de hasta el 20% con un rendimiento de almacenamiento de PHA similar al de los sistemas aeróbicos, lo que sugiere que los consorcios microalgas-bacterias pueden ser una propuesta atractiva para la producción de PHA impulsadas por la radiación solar en la que los costes se minimizan significativamente.

Como subproducto de la producción de biodiésel a partir de lípidos de microalgas, se produce también bioglicerol (10 % del peso de los lípidos). Así mismo, las microalgas y las cianobacterias producen exopolisacáridos (EPS) que pueden utilizarse como agentes gelificantes, espesantes, estabilizantes y como biolubricantes (Xiao & Zheng, 2016). Los péptidos recuperados de la fracción proteica pueden ser empleados como proteínas de uso industrial debido a sus propiedades funcionales como agentes tensoactivos, emulsionantes y espumantes (Reddy & Santosh, 2016; Wadhwa & Bakshi, 2016). Los hidrolizados de proteínas pueden producirse y comercializarse como mezclas heterogéneas de péptidos de distinto peso molecular (MW) o como fracciones purificadas de péptidos en un rango específico de MW (Kose & Oncel, 2015; Soto-Sierra et al., 2021). Aunque se ha demostrado que la hidrólisis enzimática parcial mejora las propiedades de emulsión y espumabilidad de los hidrolizados proteicos, la hidrólisis extendida (péptidos de < 5 kDa) reduce significativamente dichas propiedades. Por lo tanto, cuando se desea una buena capacidad de emulsión y/o espumación y estabilidad, se deben buscar hidrolizados de proteínas que contengan péptidos de tamaño superior a > 10 – 20 kDa (Schröder et al., 2017). Por otro lado, las fracciones que contienen péptidos pequeños con un tamaño entre 2 y 5 kDa suelen presentar propiedades bioactivas y pueden purificarse a partir de los hidrolizados de proteínas y comercializarse como productos nutracéuticos. La hidrólisis prolongada se recomienda para los hidrolizados utilizados en alimentos funcionales, como las bebidas y los suplementos proteicos que se benefician del valor nutricional de los aminoácidos y de su alta solubilidad en agua. La mayoría de los hidrolizados producidos a partir de microalgas que tienen un grado de hidrólisis

que oscila entre el 15% y 25% se desean por su valor bioactivo más que por sus propiedades funcionales (Medina et al., 2015; Soto-Sierra et al., 2021).

Por otro lado, la biomasa de microalgas ha recibido también un gran interés como fuente renovable y viable para la producción de bioalcoholes (Mehariya et al., 2021). Las microalgas cultivadas en aguas residuales pueden ser una materia prima adecuada para la fermentación microbiana y la producción de bioalcohol debido a su mayor actividad fotosintética, su composición química favorable y sus propiedades estructurales en comparación con otras materias primas terrestres (Bhatia et al., 2021). Asimismo, las microalgas pueden almacenar grandes cantidades de carbohidratos, como triacilglicerol y almidón, dentro de sus células. Estos carbohidratos pueden ser utilizados como fuente de carbono o sustrato durante la fermentación para generar bioetanol además carecen de lignina y tienen bajos niveles de hemicelulosa, lo que hace que los rendimientos de la hidrólisis y la fermentación sean más eficientes (Jayaseelan et al., 2021; Mehariya et al., 2021). Rizza et al., (2019) utilizaron un cultivo mixto de *Desmodesmus* sp y cianobacterias *Nostoc* (que asimilan el N<sub>2</sub> atmosférico) en un reactor de bucle semicerrado y fueron capaces de acumular un 60% en peso de carbohidratos. La biomasa microalgal generada se cosechó, se pretrató con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido (2% v/v) durante 30 minutos a 120°C y se fermentó con un cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para producir 50 g/L de etanol con un rendimiento de 0.25 g etanol/g biomasa. *Nannochloropsis gaditana* cultivada en varias concentraciones de aguas residuales (0-100%), fue pretratada empleando varios métodos (tratamiento alcalino, ácido y enzimático) para la producción de etanol empleando *S.cerevisiae* y se registró una máxima producción de etanol de 11.2 g/L utilizando biomasa pretratada enzimáticamente (Onay, 2018). Para un consorcio compuesto por microalgas (*Scenedesmus*, *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Micromonas*, y *Chlamydomonas*) y bacterias (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4) crecida en aguas residuales se optimizó la liberación de azúcares mediante hidrólisis ácidas para su posterior fermentación a acetona, butanol y etanol (ABE). El pretratamiento por hidrólisis ácida del 10% de las microalgas secas utilizando ácido sulfúrico 1 M durante 120 minutos a 90°C resultó ser el parámetro óptimo, con un rendimiento de azúcares totales de 166.1 g/kg<sub>biomasa seca</sub> con concentraciones de 5.23 g/L de ABE total y 3.74 g/L de butanol. Finalmente, cabe señalar que, a pesar de las numerosas ventajas, sólo unos pocos estudios han informado de la conversión comercial de la biomasa microalgal-bacteria en bioproductos. Un paso crítico hacia ese objetivo es evaluar con precisión el coste de capital y las demandas del mercado, y evaluar convincentemente la aceptación pública, junto con los posibles riesgos ambientales y sanitarios.

#### 1.4.4 Alimentación animal

Las propiedades nutricionales de varias biomásas de microalgas podrían estar a la par o superar la calidad de muchos ingredientes empleados en los piensos para animales mejorando la calidad de los mismos. Además, el coste del cultivo de microalgas en aguas residuales ricas en nutrientes sería muy bajo, ya que no se requiere de la adición externa de éstos para el crecimiento de la biomasa (Al-Jabri et al., 2021). Por ejemplo, la biomasa de *Spirulina* sp producida en las aguas residuales de sagú (palmera de la que se extrae el almidón o fécula en forma de harina) y digeridas anaeróbicamente en un reactor HRAP es adecuado para la alimentación animal (Phang et al., 2000). En las aguas residuales de estiércol de purines diluidos, se exploró la viabilidad de producir biomasa de microalgas ricas en ácidos grasos omega-3 como fuente de ingrediente para piensos (Wenguang Zhou et al., 2012). Así mismo, la biomasa de microalgas, producida en el efluente de la acuicultura, podría utilizarse como ingrediente de pienso para peces (Hernández et al., 2018).

Las microalgas provenientes del tratamiento de agua residuales de purines se han planteado como una buena alternativa para su valorización debido a la carga de nutrientes (nitrógeno, carbono y fosforo) que posee este tipo de agua residual lo que conlleva, junto con la presencia de bacterias, a altas productividades de biomasa. Estos hechos han puesto un punto de interés en la valorización de esta biomasa: el efecto del crecimiento acelerado que producen ciertas bacterias sobre las microalgas podría tener aplicaciones en cultivos de microalgas a gran escala mientras que la capacidad de las bacterias de segregar sustancias que debilitan la pared celular de las microalgas (glucosilasas, quinalasas, y celulasas) podrían emplearse como pretratamiento en los procesos de lisis celular para la extracción de componentes de las microalgas (Ramanan et al., 2016; Xu et al., 2020). Por tanto, para poder valorizar esta biomasa y conseguir unos productos de alto/medio valor añadido es necesarios varios métodos o pretratamientos para conseguir romper la pared celular y liberar los metabolitos del interior de las células al medio (Nitsos 2020).

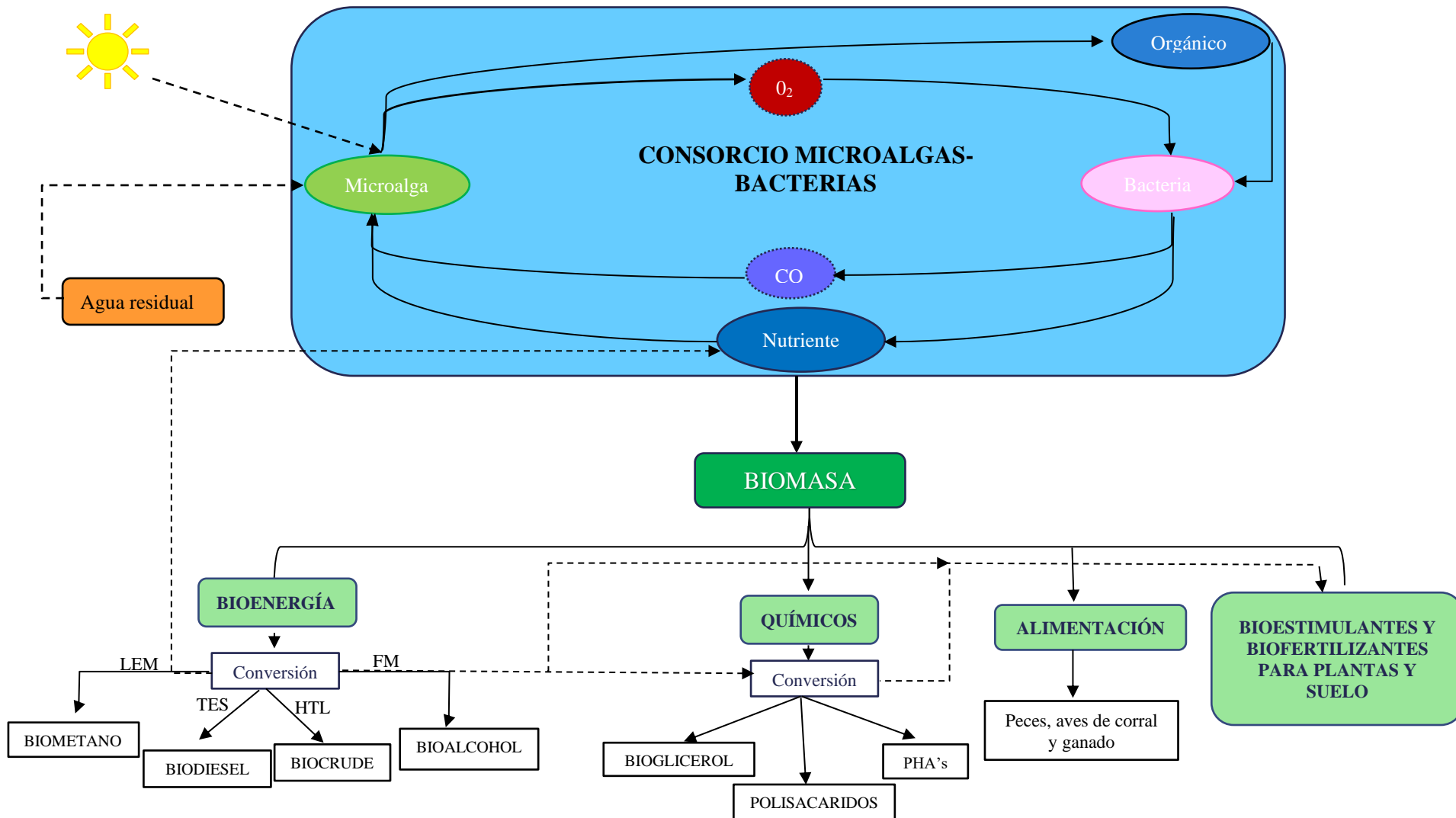


Figura 6: Aplicaciones de la biomasa microalga generada durante el tratamiento de aguas residuales. Adaptado de Al-Jabri et al., (2021)

## 2. MECANISMOS Y TECNOLOGÍAS PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR DE LAS MICROALGAS

---

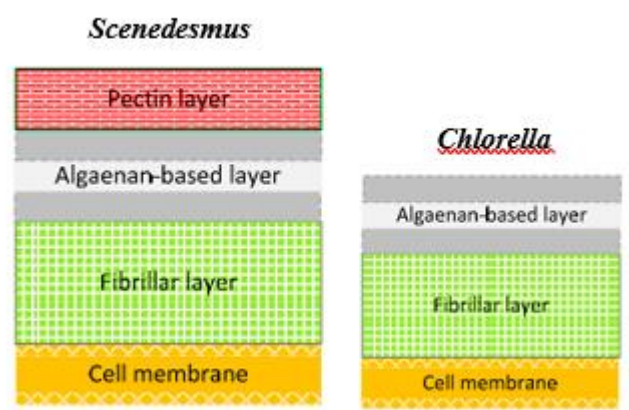
### 2.1 LA PARED CELULAR DE LAS MICROALGAS Y SU COMPOSICIÓN

Las microalgas son microorganismos unicelulares cubiertos por una pared celular recalcitrante que separa el contenido interno de la célula del medio ambiente. La mayor parte de los compuestos intracelulares se encuentran en glóbulos o unidos a membranas complejas, lo que hace que la extracción del contenido celular sea un gran reto (D'Hondt et al., 2017; Phong et al., 2018). Esta pared celular es compleja, preserva la integridad de la célula y sirve como principal barrera protectora contra los invasores y el entorno adverso. Las envolturas celulares de las microalgas son generalmente más rígidas que las de otros microorganismos o plantas superiores. Por ejemplo, se ha informado de que la resistencia a la tracción de la pared celular de las microalgas puede ser de hasta 9.5 MPa que es aproximadamente tres veces mayor que la de la zanahoria *Daucus carota* (Lee et al., 2012; Phong et al., 2018).

Aunque varían mucho en función de la especie, estas complejas paredes celulares suelen tener una estructura tricapa con alta resistencia mecánica y química compuesta por: polisacáridos, como celulosa, pectina, manosa, xilano; minerales, concretamente calcio o silicatos, así como glucoproteínas. Algunas especies de microalgas como las crisofitas, las rafidofitas, las algas verdes *Dunaliella* y las haptofitas *Isochrysis* poseen una estructura más simple formada únicamente por una membrana celular simple consistente en una bicapa lipídica con proteínas integrales y periféricas (D'Hondt et al., 2017). En la mayoría de las especies de microalgas, las paredes celulares contienen una proporción relativamente grande de celulosa, que confiere estabilidad estructural y rigidez a la célula. En algunas especies de microalgas como *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella homosphaera*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis*, *Chlamydomonas*, *Haematococcus* y *Polytomella* también se puede encontrar una vaina trilaminar (TLS) adicional que contiene algaenan, un biopolímero alifático, que las hace muy resistente a la degradación. Los algaenos de *Nannochloropsis* están formados por compuestos alifáticos altamente saturados de cadena recta ( $\sim C_{30}$ ), reticulados por enlaces tipo éter en las posiciones terminales y en una o dos de la cadena media. Mientras que en *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* y *Pediastrum boryanum*, probablemente se compone de ácidos (di)carboxílicos monoméricos de cadena muy larga (hasta  $C_{120}$ ); en *Botryococcus braunii*, se compone de poliacetales reticulados o no por epóxidos terpénicos (D'Hondt et al., 2017; Kröger et al., 2018). Además, la alta resistencia de la pared celular se debe también en muchos casos a la existencia de una mezcla de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno e interacciones de fuerzas de Van der Waals que

mantienen unidas las moléculas de la pared celular (Phong et al., 2018). Por tanto, las paredes extracelulares de las microalgas son diversas y complejas y su rigidez, grosor y composición química puede variar mucho de una especie a otra y depende de diversos factores, como la fase de crecimiento, el tiempo de recolección o las condiciones de cultivo. Por ejemplo, las microalgas del género *Scenedesmus* tienen una pared celular rígida y resistente compuesta por glucoproteínas, glucosa, manosa y galactosa en diferentes proporciones, que les proporciona la capacidad de soportar condiciones adversas como las existentes en un sistema de tratamiento de aguas residuales (D'Hondt et al., 2017; Phong et al., 2018).

Más en detalle la estructura de la pared celular de *Scenedesmus* se muestra en la Figura 8, donde se observa que consta de tres capas: una capa interna celulósica que delimita las células individuales, una fina capa intermedia a base de algaenan y una capa externa péctica que une las células en cenobios agrupadas generalmente en 4 colonias. Según la microscopía de barrido, las capas pécticas consisten en una red hexagonal de material denso en la superficie y un sistema de túbulos que irradian desde la capa media. La capa cristalina tripartita se interpone entre la capa interna compuesta por una red de estructuras fibro-granulares y un estrato fibroso externo. Ambas capas fibrosas forman probablemente una red continua. La capa de la pared externa contiene algaenan altamente resistente en concentraciones elevadas. Otras microalgas como *Chlorella vulgaris* poseen una pared celular más suave compuesta por una estructura microfibrilar fijada en una matriz de celulosa y glucano similar a la quitina. Además, la pared celular externa puede incluir una mono y/o tricapa de algaenan dependiendo de las condiciones de cultivo (D'Hondt et al., 2017; Kröger et al., 2018).



**Figura 8:** Esquema de la pared celular de *Scenedesmus* y *Chlorella* (Günerken et al., 2015; Kröger et al., 2018)

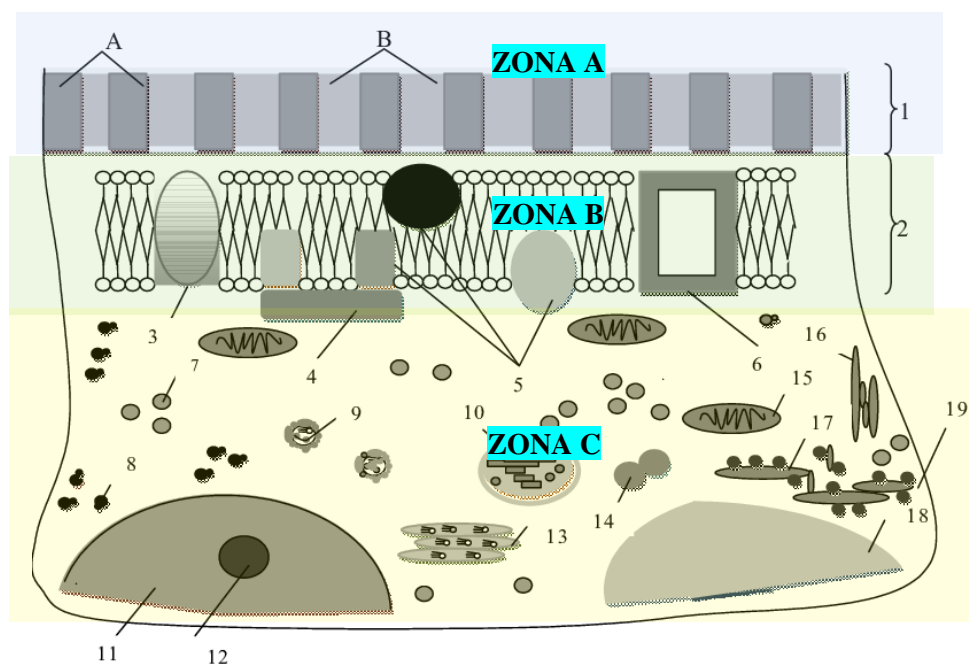
Las células microalgales contienen compuestos bioactivos, que suelen clasificarse en metabolitos primarios y secundarios, dependiendo de su origen biosintético, composición química o función. Los metabolitos primarios, se producen como resultado del crecimiento celular, el

desarrollo y la reproducción de las microalgas, e incluyen principalmente proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos fotosintéticos, mientras que los metabolitos secundarios, se acumulan de forma exclusiva para aliviar las lesiones celulares en condiciones de estrés, y consisten principalmente en carotenoides, fitoesteroles y compuestos fenólicos. Algunos carotenoides, como la luteína y la fucoxantina, son componentes del complejo captador de luz para la fotosíntesis y la fotoprotección, por lo que pueden considerarse metabolitos primarios (De Morais et al., 2015; Dolganyuk et al., 2020). Por otro lado, los lípidos de las microalgas pueden dividirse principalmente en lípidos de membrana (consisten en lípidos polares) y lípidos de almacenamiento (consisten en lípidos neutros principalmente en forma de triglicéridos). Del mismo modo, los carbohidratos pueden dividirse en carbohidratos estructurales y carbohidratos de almacenamiento (como el almidón, el glucógeno y el glucano). En general, los lípidos de la membrana y los carbohidratos estructurales están relacionados con el crecimiento celular, mientras que la acumulación de lípidos y carbohidratos de almacenamiento aumenta en condiciones de estrés (Ma et al., 2020)

Entre los macrocomponentes comunes que se encuentran en las microalgas, las proteínas representan casi la mitad del peso seco (la concentración de proteína bruta oscila, generalmente, entre el 20% y 60% dependiendo de la especie y cepa de microalga) y, por lo general, la cantidad de proteínas hidrosolubles extraídas de las células de las microalgas oscila entre el 21 y el 90% (Grossmann et al., 2020), y las ficobiliproteínas, ficobilinas unidas a proteínas, pueden representar el 50% de la proteína bruta total (Ma et al., 2020; Phong et al., 2018). Las proteínas son cruciales en el metabolismo de las microalgas y participan en los procesos de crecimiento y mantenimiento. También actúan como mensajeros químicos, reguladores y defensas contra otros microorganismos (Becker, 2007). En cuanto a su localización, las proteínas pueden estar dentro de la membrana plasmática y en la pared celular, como proteínas transmembrana, o como proteínas periféricas unidas a los lípidos de la membrana. Las proteínas transmembrana tienen una región hidrofóbica fuertemente unida a la bicapa lipídica (Becker, 2007), además, se pueden encontrar en el citoplasma o como parte de muchos orgánulos como el cloroplasto, las mitocondrias, el retículo endoplásmico o dentro del núcleo de la célula (Safi et al., 2013). La concentración de proteínas en las células microalgales dependen de su localización y de la especie de microalga estudiada. Por ejemplo, en *Chlorella vulgaris* (Figura 9) las proteínas representan el 42-58% en peso de la biomasa seca, y se estima que el 20% de sus proteínas totales se encuentran en la pared celular (A), alrededor del 30% migran activamente a través de la célula (B) y el 50% se localizan en el citoplasma (C) (Berliner, 1986). Por lo tanto, aproximadamente el 50% de las proteínas presentes en las microalgas están relacionadas con la membrana celular y para aumentar la tasa de recuperación de proteínas, es necesario la ruptura de las múltiples capas



de la pared celular para liberar los componentes y mejorar los pasos posteriores de extracción y aislamiento (Phong et al., 2018).



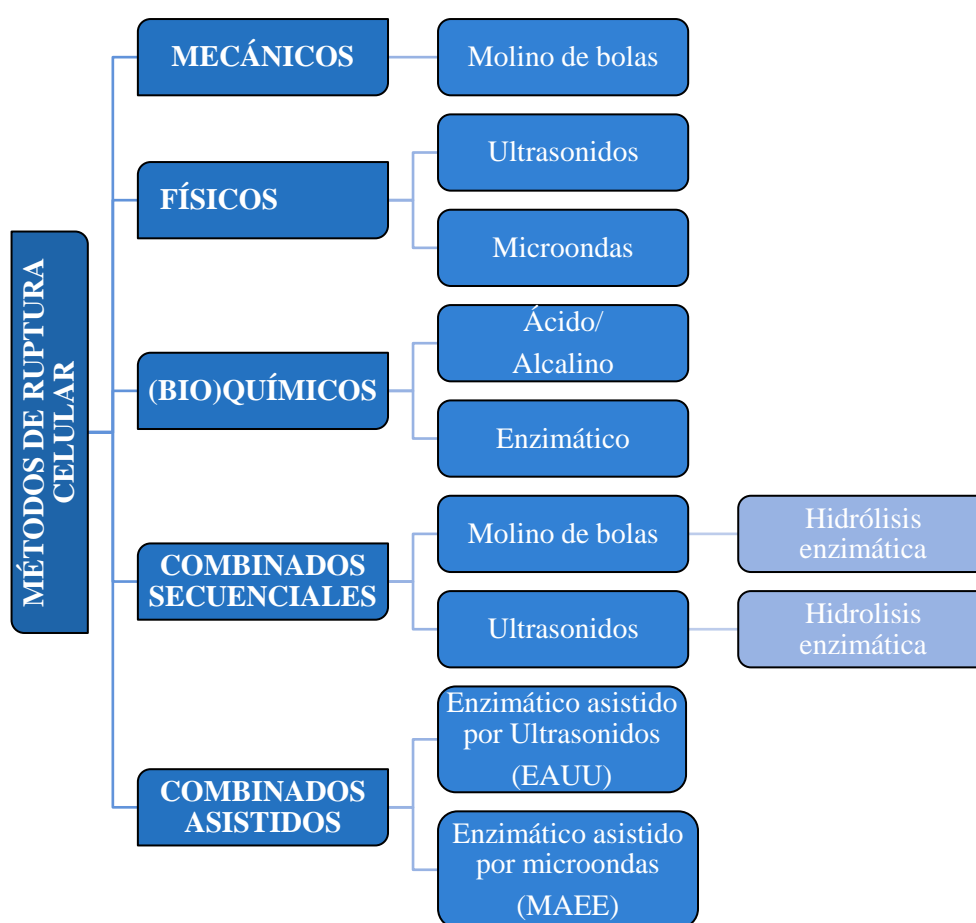
**Figura 9:** Célula microalgal de *Chlorella vulgaris* constituida por: una pared celular, que consiste en una membrana polimérica (1) con componentes como el agua, la microfibrilla A (poli-β-1,4-D-N-acetilglucosamina) [2], reticulada por enlaces de hidrógeno, y la matriz B; formada por proteínas y polisacáridos complejos (hemicelulosas y sustancias similares a la pectina); una membrana plasmática (2) formada por fosfolípidos, colesterol y proteínas transportadoras; proteínas integrales transmembrana (3); proteínas periféricas (4); proteínas integrales (5); proteínas integrales transmembrana (canal iónico) (6); cuerpos lipídicos (7); ribosomas (8); complejos proteína-lípidos (9); cloroplasto (10); núcleo (11); núcleo (12); aparato de Golgi (13); lisosomas, peroxisomas (14); mitocondrias (15); retículo endoplásmico liso (16); retículo endoplásmico rugoso (17); vacuola (18); y citoplasma (19). (Dvoretzky et al., 2016)

## 2.2 MÉTODO Y TÉCNOLOGÍAS DE RUPTURA CELULAR EN MICROALGAS

El primer paso para una valorización integral de la biomasa algal es la ruptura de la pared celular con el objetivo de maximizar la solubilización de los componentes intracelulares minimizando las pérdidas y la degradación de los componentes a extraer (Rojo et al., 2021). Esta etapa 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, ya que la extracción de la totalidad de un componente específico suele verse impedida por la rigidez intrínseca de su pared celular. Para superar esta barrera, se requiere una operación inicial de disrupción celular que permita el acceso completo a

los componentes internos y facilite el proceso de extracción (Phong et al., 2018; Rojo et al., 2021). Para un determinado producto intracelular, el tratamiento de ruptura celular ideal es aquel que libera selectivamente el producto deseado utilizando la menor energía posible. La elección de este método de ruptura celular depende de la estructura de la pared celular de las especies de algas, de la localización del metabolito de interés, tamaño, solubilidad y de la energía aplicada (Soto-Sierra et al., 2018).

Dependiendo de la naturaleza de la fuerza de ruptura y del tipo de técnica, los métodos empleados para la rotura celular durante el desarrollo de este trabajo los podemos clasificar según indica la Figura 10 aunque existen otros métodos diferentes:

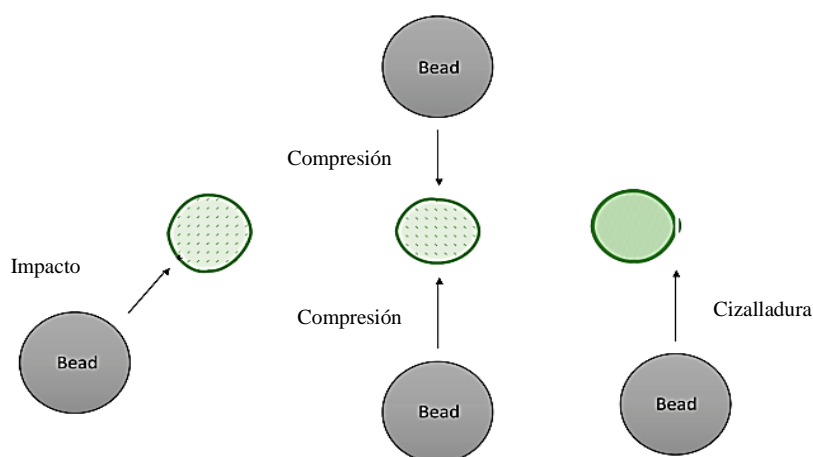


**Figura 10:** Métodos de ruptura celular empleados en este trabajo para la valorización del consorcio *Scenedesmus almeriensis*-bacteria cultivada en aguas residuales de purines de cerdo.

### 2.2.1 MÉTODOS MECÁNICOS

#### A. Molino de bolas

La técnica de molienda se ha utilizado de forma intensiva para la ruptura celular de la biomasa microalgal. El pretratamiento con molino de bolas se produce por la colisión de pequeñas esferas de vidrio, cerámica o acero que giran a gran velocidad con la biomasa durante la desintegración celular (Nitsos et al., 2020). Durante la ruptura celular son posibles varios mecanismos de disrupción (Figura 11): el esfuerzo de cizalladura debido a la aceleración de las esferas hacia la pared del molino, cizalladura debido a la aceleración centrífuga de la pared del molino, y la colisión de las células con las esferas debido a las diferencias de velocidad. El principal mecanismo de disrupción celular es este último, es decir, la rotura celular se produce a través de la colisión de las esferas debido a los gradientes de velocidad en dirección tangencial cerca de los discos de agitación que conducen a combinaciones de escisión, fractura y abrasión de las células o de las partículas dependiendo del tamaño de las mismas (Alavijeh et al., 2020; Nitsos et al., 2020).



**Figura 11:** Tipos de fuerzas que actúan durante la ruptura celular de las microalgas empleando el método mecánico de molino de bolas (Passos et al., 2015)

Los parámetros más importantes son el tiempo, la geometría del molino, la concentración de biomasa, la velocidad del agitador y la proporción, tipo y diámetro de las esferas empleadas que influyen en la eficiencia de la desintegración celular y, por tanto, en la extracción de los componentes de interés (Postma et al., 2015). Varios autores han empleado este método para la extracción y recuperación de proteínas y otros compuestos de microalgas. Alavijeh et al. (2020) consiguieron un 40%, 31% y 75% de rendimiento en la recuperación de proteínas, carbohidratos y lípidos respectivamente a partir de *Chlorella vulgaris* tras 10 minutos en un molino horizontal de bolas de 75 mL con un porcentaje de llenado del 65% con esferas de  $ZrO_2$  estabilizadas con  $Y_2O_3$  y diámetro 0.4 mm, una velocidad de agitación de 2039 rpm y una concentración de biomasa de 25 g/L. Por otro lado, Safi et al. (2017) y Garcia et al. (2018) informaron de una disrupción

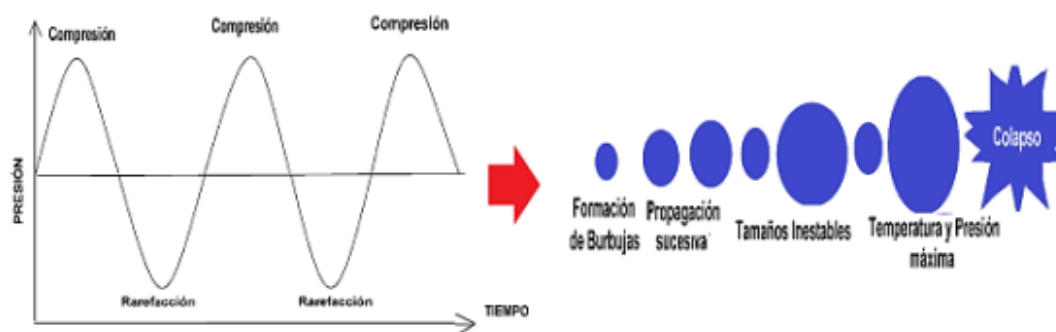
celular > 95% con una liberación de proteínas, en la fase soluble, de un 50 y 41% a partir una suspensión de 100 g/L de *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraslemis suecica* con un consumo energético de 0.5 y 0.43 kWh/kg biomasa. Dichos autores concluyen que el proceso de molienda para la disrupción celular y liberación de proteínas consume poca energía a la vez que se puede realizar en un corto periodo de tiempo y en condiciones suaves de temperatura y pH y sin la adición de disolventes.

## 2.2.2 MÉTODOS FÍSICOS

### A. Ultrasonidos

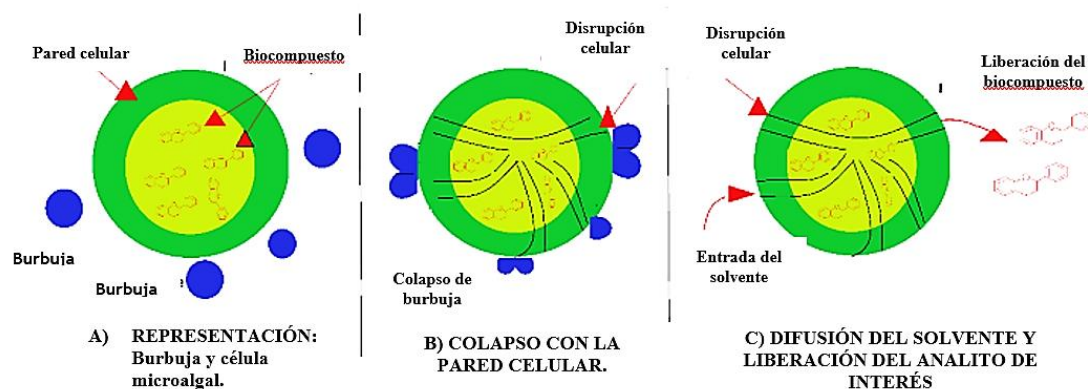
El ultrasonidos se considera un pretratamiento ecológico que presenta varias ventajas en cuanto a la reducción del tiempo de extracción, la disminución de los volúmenes de disolventes y el aumento del rendimiento de los compuestos extraídos en comparación con otros métodos convencionales (Vernès et al., 2019). La extracción con ultrasonidos utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, y como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. La sonicación de las células de microalgas permeabiliza tanto la pared celular como la membrana, una diferencia clave con otro tratamiento como el campo eléctrico pulsado (PEF) que permeabiliza solo las membranas celulares (Medina-Torres et al., 2017; Onumaegbu et al., 2018).

Los fenómenos físicos que afectan a la extracción de sustancias se ven afectadas por la sonicación, ya sea porque las sustancias de interés se encuentren en el interior de las células o en el tejido exterior. La extracción aplicando ultrasonidos tiene como principal fuerza impulsora la cavitación acústica (Figura 12), capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y presión (Chemat et al., 2011; Medina-Torres et al., 2017).



**Figura 12:** Principio de cavitación acústica (Medina-Torres et al., 2017)

En general se han identificado varios mecanismos involucrados en la extracción con ultrasonidos (Figura 13) de las cuales destacan: *fragmentación* atribuida a las colisiones entre partículas y a las ondas ultrasónicas causando la reducción en el tamaño de partículas lo que facilita la transferencia de materia; *erosión*, ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz microalgal; *sonocapilaridad* y *sonoporación*, son capaces de mejorar la penetración del líquido a través de los canales producidos por la implosión de burbujas ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y finalmente el *esfuerzo de cizalladura* que produce el colapso de las burbujas en el fluido debido al fenómeno de oscilación (Medina-Torres et al., 2017).

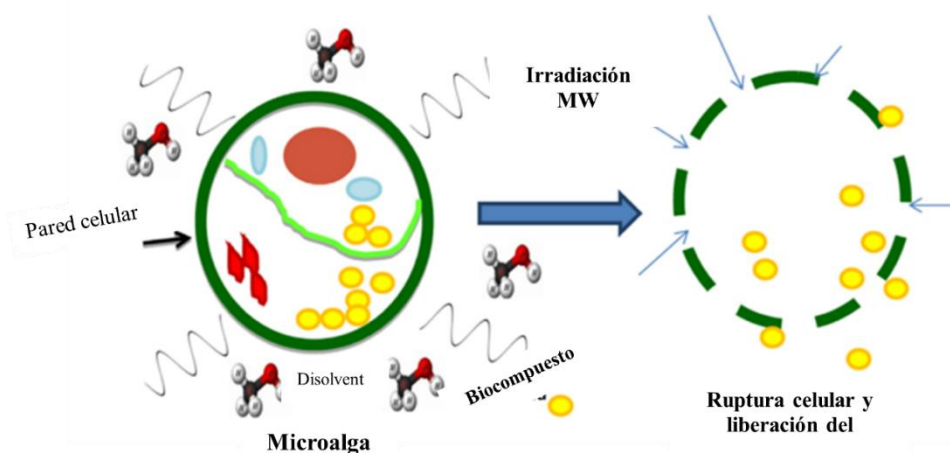


**Figura 13:** Representación gráfica de los fenómenos de cavitación, colapso y liberación del material celular. **A)** Representación de burbuja y célula microalgal; **B)** Colapso con la pared celular; **C)** Difusión del solvente y liberación del analito. Adaptado de Medina-Torres et al., (2017)

Los principales parámetros que afectan al proceso son las propiedades físicas del disolvente como la viscosidad, la presión de vapor y la tensión superficial, la potencia y la frecuencia de aplicación del ultrasonido así como el tiempo del proceso de extracción y la concentración de biomasa. Hildebrand et al. (2020) informaron de un 76.6% en la recuperación de proteínas a partir de una suspensión de 200 g/L de *Chlorella vulgaris* utilizando una sonda de ultrasonidos de 1000 W durante 10 minutos y NaOH 0.4 M como disolvente mientras que Martín Juárez et al. (2021) informaron de una solubilización de 42.2%, 27.3% y 32% de carbohidratos, proteínas y lípidos a partir de biomasa basada en microalgas de la familia *Scenedesmaceae* crecidas en un fotobiorreactor alimentado con aguas residuales de purines empleando una sonda de ultrasonidos a 115W durante 21 minutos a 20°C a partir de una suspensión acuosa al 5% g/g<sub>biomasa seca</sub>. Finalmente, varios autores concuerdan en que debido a la alta resistencia de la pared celular de la mayoría de las especies de microalgas el pretratamiento de la biomasa únicamente con ultrasonido no es muy eficaz para la extracción con agua de los compuestos intracelulares y debe ir acompañada de otros métodos como la hidrólisis enzimática (Nitsos et al., 2020; Soto-Sierra et al., 2018).

## B. Microondas

La extracción con microondas consiste en aplicar la radiación de microondas (MWs) a una frecuencia cercana a los 0.3-300 GHz provocando un calentamiento dieléctrico principalmente por absorción de la energía en el agua y otros compuestos polares disponibles en la biomasa húmeda. Las microondas provocan la vibración del agua y de otras moléculas polares dentro de la biomasa húmeda, con lo que se produce un aumento de la temperatura en los líquidos intracelulares que posteriormente, hace que el agua se evapore y ejerza presión sobre las paredes celulares, lo que conduce a la ruptura de la célula (Figura 14). Además, los MWs interrumpen los enlaces de hidrógeno e inician la migración de los iones disueltos, facilitando una mayor penetración del disolvente en la muestra. La mayor constante dieléctrica del agua garantiza que la energía térmica se transfiera a las paredes celulares de forma más eficiente con el calentamiento por microondas. A diferencia del calentamiento convencional, el calentamiento por microondas no está limitado por las corrientes de conducción o convección térmica, lo que permite un aumento más rápido y uniforme de la temperatura. Durante la irradiación del horno, los enlaces no se forman ni se rompen, pero la energía se transfiere rápidamente a la muestra de biomasa para mejorar la eficiencia de la disrupción celular (Onumaegbu et al., 2018).



**Figura 14:** Disrupción celular empleando microondas (Muley & Boldor, 2013).

### 2.2.3 MÉTODOS (BIO) QUÍMICOS

#### A. Hidrólisis ácida y alcalina

Los tratamientos ácidos y alcalinos implican la exposición de la biomasa a un medio acuoso ácido o básico. En algunos casos, este pretratamiento se combina con una temperatura elevada (120-150°C) por lo que también se puede considerar como una variación del

pretratamiento hidrotérmico con adición de un disolvente ácido y básico que actúan como catalizador (Nitsos et al., 2020). Los principales disolventes ácidos empleados son el HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una concentración entre el 1 y el 5%. Estos compuestos provocan el hinchamiento de la biomasa y la degradación de los polímeros de la pared celular liberando azúcares fermentables y otros compuestos al hidrolizado (Nitsos et al., 2020; Salakkam et al., 2021). En menor medida, otros ácidos como el HNO<sub>3</sub> también han sido ensayados aunque en este caso los rendimientos observados suelen ser muchos menores debido a que la acción oxidativa del HNO<sub>3</sub> degrada las moléculas liberadas (Shokrkar et al., 2017). En este sentido, Martín Juárez et al., (2021) informaron de una solubilización del 98.2%, 75.5 % y 55.5 % en carbohidratos, proteínas y lípidos a partir de biomasa basado en microalgas de la familia *Scenedesmaceae* crecidas en un fotobiorreactor de tratamiento de aguas residuales de purines tras un tratamiento ácido con HCl 2M a 121°C y 1 hora. Sin embargo, las solubilizaciones disminuyeron hasta valores de 71%, 47.3% y 28.2% empleando HCl 0.5 M en las mismas condiciones. El pretratamiento alcalino, que emplea principalmente NaOH a temperatura inferiores a 120°C, es un método ampliamente utilizado para eliminar la lignina de la biomasa lignocelulósica. Sin embargo, dado que la biomasa de microalgas no contiene lignina este método se utiliza con el objetivo de desintegrar y alterar la pared celular microalgal, así como para solubilizar las moléculas orgánicas, principalmente las proteínas (Salakkam et al., 2021). Así mismo, Martín Juárez et al., (2021) tras un tratamiento alcalino de la biomasa descrita previamente con NaOH 0.5 M durante 1 h a 121°C informaron de una recuperación de 73.4 %, 35.4% y 59.8% en carbohidratos, proteínas y lípidos mientras que empleando NaOH 2M en las mismas condiciones los rendimiento aumentaron hasta un 83.8%, 69.3% y 66.5% respectivamente.

Las principales ventajas de los métodos químicos incluyen una alta eficiencia, un bajo consumo de energía y una fácil escalabilidad. Sin embargo, no se consideran métodos suaves, conllevan un impacto ambiental considerable y pueden tener efectos negativos sobre las proteínas principalmente debido a la desnaturalización y racemización de las mismas y también puede conducir a la formación de complejos de aminoácidos debido a las reacciones de Maillard limitando de esta manera la disponibilidad de los mismos en los extractos (Callejo-López et al., 2020; Nitsos et al., 2020).

## B. Hidrólisis enzimática

El tratamiento enzimático es aún más específico para cada especie que los métodos descritos anteriormente. Las paredes celulares de las microalgas son químicamente complejas y pueden contener varios hidratos de carbono (celulosa, hemicelulosa, pectina, quitina), proteínas u otros polímeros orgánicos como la esporopolenina y el algaenan. La estructura y composición de las paredes celulares varían según la especie y, en consecuencia, el coctel enzimático idóneo

para distintas especies puede ser diferente (Nitsos et al., 2020). En este sentido, dado que la pared celular de las microalgas está compuesta principalmente por algaenan, proteínas y polisacáridos, las enzimas más utilizadas para los ensayos de disrupción celular han sido proteasas y celulasas (Rojo et al., 2021). Las suaves condiciones de operación de este método evitan la degradación de los componentes, aumentando el rendimiento en la recuperación y selectividad con un bajo consumo de energía (Nitsos et al., 2020; Phong et al., 2018). Varios estudios han demostrado la eficacia del método enzimático, por ejemplo, Rojo et al. (2021) informaron de una solubilización entre 25.3% y 38.5 % de carbohidratos y 13.1% y 32.7 % de proteínas tras 5h de hidrólisis enzimática con tres enzimas comerciales (Alcalase 2.5L, Protamex, y Celluclast 1.5L) a 50°C a partir de una suspensión al 5% de un consorcio microalgas-bacterias compuesto principalmente por *Scenedesmus almeriensis* cultivado en aguas residuales de purines. Además, informaron de la presencia de péptidos con tamaños de hasta 135 kDa en los hidrolizados empleando la enzima Protamex mientras que empleando la enzima Alcalasa 2.5L el tamaño de los péptidos obtenidos fueron inferiores a 10 kDa. En este sentido, el empleo de la enzima Protamex sería una buena estrategia para futuras aplicaciones de los hidrolizados proteicos como bioestimulantes o agentes emulsionantes y espumantes (Apartado 1.4). El tratamiento de *Nannochloropsis gaditana* con la enzima Alcalasa 2.5L condujo a una liberación del 35% de proteínas pero nuevamente con péptidos de pequeño tamaño (Safi et al., 2017). El principal inconveniente de la proteasa Alcalasa es la reducción de la funcionalidad de las proteínas liberadas debido a su fragmentación hidrolítica (Soto-Sierra et al., 2018), por otro lado, Protamex es una mezcla de Alcalasa y Neutrasa, una endoproteasa con una actividad enzimática de 1.4 AU-N/g capaz de proporcionar distribuciones de pesos molecular de proteínas más grande que la Alcalasa cuando se compara con el mismo sustrato (Rojo et al., 2021; Tacias-Pascacio et al., 2020). La combinación de proteasas con celulasas es una estrategia típica de tratamiento enzimático, ya que puede dirigirse a los principales componentes de la pared celular, las proteínas/péptidos y la celulosa u otros carbohidratos (Nitsos et al., 2020). En el tratamiento de *C.reinhardtii* y *C.vulgaris* con la Alcalasa 2.5L y la Vizcozima L (una multienzima con actividades de  $\beta$ -glucanasa, arabinasa, hemicelulasa, xilanasas y otras) condujeron a una solubilización casi completa de las proteínas (86%) y los carbohidratos (96%) tras 2h de hidrólisis a 50°C (Mahdy et al., 2014b).

La extracción por hidrólisis enzimática es un método simple y eficiente para extraer metabolitos naturales de microalgas. Este método también es respetuoso con el medio ambiente, ya que no emplea disolventes orgánicos u otros productos químicos tóxicos y, por tanto, hace que los extractos sean seguros para diversas aplicaciones. En este mismo contexto frente a las ventajas que supone el empleo de enzimas para la extracción de biocompuestos a partir de microalgas, éstas presentan como principal inconveniente el elevado coste de las enzimas y la dificultad de



hallar la combinación de enzimas y dosis óptima para conseguir altas solubilizaciones y recuperaciones (Bleakley & Hayes, 2017; Callejo-López et al., 2020; Rojo et al., 2021).

#### 2.2.4 MÉTODOS COMBINADOS SECUENCIALES

Las técnicas de pretratamiento pueden combinarse de forma secuencial para mejorar la eficacia de los procesos posteriores ya que la selección del método de disrupción celular depende en gran medida del grosor de la pared celular y de la localización del metabolito de interés en la microalga (Günerken et al., 2015; Postma et al., 2015).

En los últimos años se está apostando por la denominada “*biorrefinería multiproducto*” (T Lam et al., 2018; Alavijeh et al., 2020; Soto-Sierra et al., 2021) basada en el empleo de métodos físicos/mecánicos como referencia de método de disrupción celular (debido a la alta eficiencia en la disrupción de las barreras celulares, además, no requieren condiciones duras como alta temperatura y pH alto o bajo, y desde este punto de vista son suaves para mantener intactos los componentes intracelulares) con el objetivo de liberar proteínas hidrosolubles en su forma nativa con un alto valor añadido (Günerken et al., 2015) y, a continuación, después de romper la pared celular, la separación de todas las fracciones sin perder ningún producto es el objetivo principal en la biorrefinería multiproducto aplicando hidrólisis enzimática para fraccionar los carbohidratos y proteínas restantes en la fase líquida y los lípidos en la fase sólida consiguiendo de esta manera preservar la integridad de todos los componentes extraídos (Postma et al., 2016; Schwenzfeier et al., 2013). En este sentido, Alavijeh et al., (2020) desarrollaron un proceso secuencial de molino de bolas (10 min con esferas de  $ZrO_2$  estabilizadas con  $Y_2O_3$  de 0.44 mm de diámetro y velocidad de agitación de 2039 rpm) seguido de hidrólisis enzimática con diferentes enzimáticas hidrolíticas para el fraccionamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos a partir de una suspensión de 25 g/L de *Chlorella vulgaris*. Los resultados revelaron que, sin hidrólisis enzimática los rendimientos de recuperación de proteínas, carbohidratos y lípidos para la biomasa tras la molienda fueron del 40%, 31% y 75%, respectivamente, mientras que al aplicar tratamiento enzimático con proteasas y celulasas durante 24h el máximo rendimiento de recuperación para todos los componentes fue del 68%, 74% y 88%. El rendimiento de recuperación de los componentes tras la hidrólisis enzimática de la biomasa sin molienda fue un 44% inferior al de la biomasa con molienda. Por otro lado, Martín Juárez et al., (2021) evaluaron diferentes pretratamiento, ultrasonidos y molienda entre ellos, sobre la solubilización y recuperación de macrocomponentes a partir de una suspensión al 5% (g/g) de biomasa basada en *Scenedesmeceae* cultivada en aguas residuales de purines. Los resultados revelaron que los pretratamientos físicos/mecánicos aumentaron notablemente la solubilización de los componentes de la biomasa durante la etapa de hidrólisis enzimática (Celluclast 1.5L y Novozyme 188) con rendimiento de solubilización de proteínas, carbohidratos y lípidos de 43%, 83% y 60% para el pretratamiento con molino de bolas (60

minutos, esferas de vidrio de 2.5 mm y 20°C) y de 38%, 69% y 53% para el ultrasonido (21 minutos, 115W, 20°C). El rendimiento de estos macrocomponentes sin la etapa de hidrólisis enzimáticas fueron casi un 45% inferior en ambos casos.

### 2.2.5 MÉTODOS COMBINADOS ASISTIDOS

Las técnicas combinadas de pretratamiento se utilizan para la disrupción celular de la biomasa de microalgas con el fin de mejorar el rendimiento de extracción. Suelen ser más eficaces que el uso de una sola técnica, pero al mismo tiempo su proceso es muy complejo. Algunos autores han aplicado diferentes técnicas de pretratamiento para mejorar la extracción de biocompuestos utilizando biomasa de fuentes vegetales (Corrêa et al., 2021; Kadam et al., 2015) entre las que se encuentran la extracción por hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos y microondas. También hay estudios que han empleado ultrasonidos y microondas a frecuencias óptimas para mejorar la actividad catalítica de las enzimas, la eficiencia del proceso y las propiedades de los extractos obtenidos como la actividad antioxidante (Ciko et al., 2018; Ma et al., 2014; Topuz et al., 2016) en diversas matrices alimentarias (Ulug et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios que utilicen la UAEE y MAEE como método de extracción de proteínas y carbohidratos a partir de biomasa de microalgas.

#### A. Extracción con hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE)

En la extracción con hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE), las enzimas fomentan la recuperación de proteínas o carbohidratos a través de la degradación y ruptura de la pared celular mientras que la aplicación del ultrasonido mejora el rendimiento de extracción ya que el proceso de cavitación es estimulado por la potencia del ultrasonido que rompe fácilmente la pared celular y permite que se lleven a cabo las reacciones asistidas por enzimas al exponer más sitios de escisión en la biomasa favoreciendo una mayor superficie y área de contacto entre las enzima y la biomasa (Singla & Sit, 2021).

#### B. Extracción con hidrólisis enzimática asistida por microondas (MAEE)

La hidrólisis enzimática asistida por microondas (MAEE) podría utilizarse para extraer compuestos bioactivos de forma eficaz, ya que los microondas calientan el disolvente rápidamente durante el proceso de extracción, facilitando la separación de los analitos de la matriz y aceleran la hidrólisis mediante la exposición de los sitios de ruptura a las enzimas (Ulug et al., 2021).

Finalmente, en la Tabla 5 se resumen las principales características de los métodos de ruptura estudiados:

**Tabla 5:** Principales características de los métodos de ruptura celular (de Farias Silva et al., 2020; Nitsos et al., 2020; Onumaegbu et al., 2018)

MÉTODO	MECANISMO	VENTAJAS	INCONVENIENTES	CONCENTRACIÓN CELULAR	SELECTIVIDAD	REQUERIMIENTO DE ENERGÍA	PARÁMETROS DE CONTROL
<b>Molino de bolas</b>	Colisión de bolas (escisión, fractura y abrasión)	Disrupción celular efectiva	Forma emulsiones Requiere enfriamiento	Alto	Bajo	Bajo	Tamaño de esferas, velocidad de molino
<b>Ultrasonido</b>	Cavitación acústica	Simple Reduce el tiempo de extracción y consumo de disolvente Método verde	Requiere enfriamiento  Dificultad para escalar	Bajo-Medio	Bajo	Medio-Alto	Frecuencia Potencia Tiempo
<b>Químico</b>	Hidrólisis de la pared celular	Simple Efectiva ruptura celular	Poco selectivo Degradación de productos Neutralización	Medio-Alto	Bajo	Bajo	Concentración Tipo de ácido/base Temperatura Agitación
<b>Enzimático</b>	Hidrólisis/oxidación de la pared celular	No degradación Selectivo Alta especificidad extraídos Método verde	Coste de la enzima Necesidad de optimizar la dosis	Medio-Alto	Alta	Bajo	Concentración de enzima Tipo de enzima Optimizar la máxima actividad
<b>Microondas</b>	Irradiación con microondas	Reduce el uso de disolvente Método verde	Eficiencia imprevisible cuando los disolventes son no polares o volátiles.	Medio-Alto	Alta	Medio-Alto	Agitación Tiempo Potencia

### 3. OBJETIVOS

---

El objetivo general de este Trabajo Fin de Master es el estudio de pretratamientos para la valorización fraccional de un consorcio de microalgas-bacterias cultivadas en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales de purines de cerdo. El trabajo se centra en la valorización de la fracción mayoritaria y de mayor valor de la biomasa, la proteica, pero evaluando también el efecto de los procesos en la fracción de carbohidratos. El estudio se realiza teniendo en cuenta la recuperación de proteínas en forma de péptidos y aminoácidos y de carbohidratos como monosacáridos fermentables a partir de la biomasa algal generada en el tratamiento de purines de cerdo.

Se pretende, para ello, evaluar el efecto de diferentes tratamientos para una eficiente ruptura de la pared celular, liberación y recuperación de macrocomponentes de un consorcio de microalgas-bacterias compuesto principalmente por *Scenedesmus almeriensis* (96%) crecido en un fotobiorreactor de capa fina alimentado con purines de cerdo diluido al 10%.

Explícitamente se persiguen los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar las solubilizaciones de macrocomponentes contenidos en la biomasa algal mediante metodologías convencionales frente a nuevos métodos de extracción asistida que eviten el uso de disolventes orgánicos y compuestos químicos, aumentando la eficiencia y la sostenibilidad, trabajando con consorcios de microalgas y bacterias crecidos en aguas residuales.
2. Analizar y cuantificar la degradación de los componentes solubilizados, y, por tanto la recuperación de macrocomponentes, principalmente proteínas y carbohidratos, mediante balances de materia, para diferentes alternativas de valorización de biomasa algal crecida en aguas residuales.
3. Evaluar el tamaño y calidad de los péptidos y la composición de los monosacáridos recuperados para las diferentes metodologías de extracción asistida (UAEE y MAEE) frente a los métodos convencionales.
4. Aplicar la metodología del modelado cinético como herramienta útil para optimizar el proceso de extracción reduciendo el coste del mismo y analizar las características y mecanismo del proceso de extracción de proteínas empleando la metodología de la extracción con ultrasonidos asistido por enzimas.

## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ANALÍTICOS

---

El primer paso para la valorización integral de la biomasa propuesta en este trabajo consiste en la ruptura de la pared celular para facilitar la extracción de sus componentes. Por ello es necesario un estudio adecuado de esta primera y esencial etapa que jugará un papel clave en la recuperación de las macromoléculas de interés. El presente trabajo es pionero en la extracción de macromoléculas, principalmente proteínas y carbohidratos, a partir de un consorcio microalgas-bacterias mediante el uso de proceso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos y microondas como métodos novedosos. También se comparó con los tratamientos de extracción y disrupción celular convencionales, como son los tratamientos químicos de hidrólisis ácida y alcalina, tratamientos enzimáticos con cócteles de proteasas y celulasas y tratamientos secuenciales físico/mecánico seguido de hidrólisis enzimática. Se determinaron los rendimientos de solubilización y recuperación de proteínas y carbohidratos. Se evaluó el tamaño y la calidad de los péptidos liberados. Se estudió el perfil de aminoácidos de la biomasa residual y de la fase líquida de algunas muestras. Se analizaron los monosacáridos fermentables recuperados evaluando su degradación en el proceso y finalmente se aplicó la metodología del modelado cinético como un primer paso de optimización para determinar las características y mecanismos del proceso de extracción de proteínas.

### 4.1 BIOMASA UTILIZADA

Se empleó una biomasa formada por un consorcio de microalgas (96% de *Scenedesmus almeriensis* y 4% de *Scenedesmus acuminatus*) y bacterias cultivadas en un fotobiorreactor abierto de capa fina que trataba aguas residuales de purines diluidas al 10%. La biomasa se centrifugó, liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior utilización (Rojo et al., 2021). Las bacterias no fueron analizadas en este trabajo, pero investigaciones anteriores del grupo han descrito bacterias pertenecientes a los filos *Verrucomicrobium*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* y *Proteobacteria* como especies dominantes en la biomasa cultivada en aguas residuales de purines (D. García et al., 2019)

### 4.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Se emplearon diferentes métodos pretratamiento y extracción de proteínas y carbohidratos de la biomasa microalgal, incluyendo hidrólisis ácida y alcalina; hidrólisis enzimática (incluyendo pretratamiento previo con molino de bolas y ultrasonidos) así como los

métodos combinados de UAEE y MAEE. Todos los experimentos se realizaron por duplicado con una concentración de biomasa microalgal del 5% (g/g). Las condiciones experimentales fueron seleccionadas de acuerdo con (Martin Juárez et al., 2021; Rojo et al., 2021) e investigaciones anteriores del grupo. Después de cada tratamiento la suspensión de biomasa se centrifugó a 4°C y 10.000 rpm durante 10 minutos (Legend RT+, Thermo Scientific, USA) para obtener las fracciones sólidas y líquidas. Se determinaron las masas y la concentración de sólidos volátiles en ambas fracciones y se comprobaron los balances de materia. El contenido de proteínas y carbohidratos se determinó en las fracciones sólidas y en la biomasa inicial se analizó la cantidad de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas, mientras que la concentración de péptidos y monosacáridos se analizó en las fracciones líquidas junto con el tamaño de los péptidos. En algunos experimentos seleccionados, se evaluó el perfil de aminoácidos en ambas fracciones. Todos estos análisis se realizaron por duplicado. En la Tabla 6 se muestra un resumen de los experimentos ensayados y su desarrollo se describe a continuación:

**Tabla 6:** Resumen de la experimentación en la valorización del consorcio microalga-bacterias propuesta en este trabajo. Concentración de biomasa (5% g/g).

MÉTODO ENSAYADO	CONDICIONES DE OPERACIÓN
ÁCIDO/ALCALINO	HCl 2M, 1h, 120°C, 60°C y 40°C. NaOH 2M; 120°C, 60°C y 40°C.
ENZIMÁTICO	Protamex: 1: 100 g/g <sub>biomasa</sub> , 3h, 50°C. Protamex + Celluclast 1.5L: 1:100 g/g <sub>biomasa</sub> y 10 FPU/mL, 3h, 50°C.
SECUENCIAL	Molino de bolas: 1h, esferas de 2.5 mm Ultrasonidos: 10 minutos, 50% amplitud, 150 J/s. + Hidrólisis enzimática: Protamex 1:100 g/g <sub>biomasa</sub> , 3 h, 50°C.
ASISTIDO	UAEE: Protamex (1:100 g/g <sub>biomasa</sub> ) y combinación Protamex (1:100 g/g <sub>biomasa</sub> ) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL) asistido por ultrasonidos (50% amplitud, 120 J/s, 50°C), 1h. MAEE: Protamex (1:100 g/g <sub>biomasa</sub> ) y combinación Protamex (1:100 g/g <sub>biomasa</sub> ) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL) asistido por microondas (50°C, 2.5 GHz, 134 J/s), 1h.

#### 4.2.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA Y ALCALINA

Los ensayos con hidrólisis ácida y alcalina se llevaron a cabo según lo descrito por Martin Juárez et al., (2021) y Lorenzo-Hernando et al. (2019) empleando disoluciones de NaOH y HCl

2M en Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 250 mL a tres temperaturas diferentes (40°C, 60°C y 120°C) durante un tiempo de 1 hora y velocidad de agitación de 300 rpm. Se utilizaron estas concentraciones ya que fueron las que proporcionaron mayores rendimientos de extracción operando a 120°C en trabajos previos del grupo. Para este trabajo, se decidió incluir experimentos a temperaturas más bajas, para reducir la degradación y desnaturalización de las proteínas (Matos et al., 2019)

#### 4.2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los ensayos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo según lo descrito por Rojo et al., (2021). Se realizaron ensayos solo con proteasas, empleando la enzima comercial Protamex (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) en matraces Erlenmeyer de 500 mL, empleando agua destilada como disolvente y un volumen de trabajo de 250 mL. Los experimentos se llevaron a cabo en un agitador rotatorio a 300 rpm a temperatura (50°C) y pH óptimos (6) de la enzima y un tiempo de hidrólisis de 3 horas con una concentración de Protamex 1:100 g/g<sub>biomasa</sub>.

La combinación de proteasas con celulasas puede dirigir la hidrólisis a los principales componentes de la pared celular, las proteínas/péptidos y la celulosa u otros carbohidratos (Nitsos et al., 2020) y para evaluar posibles sinergias entre las enzimas, ya que la pared celular de las microalgas está compuesta principalmente por carbohidratos y glucoproteínas, se realizaron experimentos con una combinación de Protamex (1:100 g/g<sub>biomasa</sub>) y Celluclast (10 FPU/mL) en las mismas condiciones de operación descritas anteriormente, suponiendo que Celluclast 1.5L permitiría una mayor extracción de proteínas con la proteasa. La enzima Protamex es una mezcla de endo y exoproteasas, proveniente de una combinación de cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* que presenta una actividad enzimática de 1.4 AU-N/g, mientras que Celluclast 1.5L es una enzima celulasa proveniente de una cepa del hongo *Trichoderma resei* que cataliza la hidrólisis de la celulasa atacando los enlaces glicosídicos.

#### 4.2.3 COMBINADO SECUENCIAL MOLIENDA e HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para conseguir mejorar el proceso de extracción se decidió realizar un pretratamiento previo a la hidrólisis enzimática según lo descrito por Martín Juárez et al., (2018) y Alavijeh et al., (2020). La biomasa microalgal se sometió a un proceso de disrupción celular mediante un molino de bolas horizontal (Pascal Engineering Co. Ltd) con un porcentaje de llenado del 50% con esferas de vidrio de 2.5 mm durante 60 min. Posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con Protamex a 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> de concentración (Rojo et al., 2021) empleando agua destilada como disolvente y un volumen de trabajo de 250 mL. Los experimentos se llevaron a cabo en un agitador rotatorio a 300 rpm a temperatura (50°C) y pH óptimos (6) de la enzima y un tiempo de hidrólisis de 3 horas.

#### 4.2.4 COMBINADO SECUENCIAL ULTRASONIDOS e HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para conseguir mejorar el proceso de extracción se decidió realizar un pretratamiento previo a la hidrólisis enzimática según lo descrito por Martín Juárez et al., (2018) y Mahali & G., (2019). La biomasa microalgal se sometió a un proceso de disrupción celular mediante una sonda de ultrasonido (UIP1000HD, 1000W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Germany) a 50% de amplitud durante 10 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con Protamex (1:100 g/g<sub>biomasa</sub>) empleando agua destilada como disolvente y un volumen de trabajo de 250 mL. Los experimentos se llevaron a cabo en un agitador rotatorio a 300 rpm a temperatura (50°C) y pH óptimos (6) de la enzima y un tiempo de hidrólisis de 3 horas.

#### 4.2.5 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE)

La extracción por hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos se llevó a cabo utilizando la enzima Protamex (1:100 g/g<sub>biomasa</sub>) y combinaciones Protamex-Celluclast 1.5 L (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) en concentración 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> y 10 FPU/mL, respectivamente, aplicando sonicación continua (UIP1000HD, 1000W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Germany) con una amplitud al 50% durante 1h, para evitar posible desnaturalización y degradación de las proteínas liberadas, a una suspensión de biomasa al 5% en un reactor provisto de un encamisado para mantener la temperatura óptima de trabajo de las enzimas a 50°C empleando agua destilada como disolvente con un volumen de trabajo de 250 mL.

#### 4.2.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA ASISTIDA POR MICROONDAS (MAEE)

La extracción por hidrólisis enzimática asistida por microondas se llevó a cabo utilizando la enzima Protamex (1:100 g/g<sub>biomasa</sub>) y combinaciones Protamex-Celluclast 1.5 L (Novozymes A/S, Bagsværd, Denmark) en concentración de 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> y 10 FPU/mL, respectivamente, en un sistema cerrado de reacción asistida por microondas termostatado (Multiwave PRO SOLV 16HF100, Anton Paara, GmbH, Austria) durante 1h y 2.5 GHz a una suspensión de biomasa al 5% empleando agua destilada como disolvente con un volumen de trabajo de 250 mL. En cada recipiente de reacción se sumergió una sonda de temperatura y presión con el objetivo de tener un control preciso de las condiciones de la temperatura óptima de trabajo de las enzimas (50°C).

### 4.3 CÁLCULOS REALIZADOS

Para calcular la solubilización de proteínas y carbohidratos después de cada proceso de extracción, se usó la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento de solubilización (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{m_S \times S_i}{m_0 \times X_i} \right) \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$



Donde  $m_s$  es la masa de la fracción sólida después de la hidrólisis (g),  $S_i$  es la fracción en masa de cada componente en la fracción sólida después de la hidrólisis (%),  $m_o$  es la masa inicial de biomasa (g) y  $X_i$  es la fracción en masa de cada componente en la biomasa inicial (%).

Para determinar la recuperación real de monosacáridos y péptidos en la fase líquida, se empleó la Ecuación 2:

$$\text{Rendimiento de recuperacion(\%)} = \left( \frac{m_L \times L_i}{m_o \times X_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $m_L$  es la masa de la fracción líquida después de la hidrólisis (g),  $L_i$  es la fracción en masa de cada componente en la fracción líquida después de la hidrólisis (%),  $m_o$  es la masa inicial de biomasa (g) y  $X_i$  es la fracción en masa de cada componente en la biomasa inicial (%).

Durante la hidrólisis enzimática se produjeron pérdidas de macrocomponentes que se calcularon con la Ecuación 3:

$$\text{Pérdida componente i (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{m_L \times L_i + m_S \times S_i}{m_o \times X_i} \right) \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

#### 4.4 MODELADO CINÉTICO

El uso de modelos cinéticos empíricos ayuda a simplificar el estudio de sistemas complejos como la extracción de biocompuestos de materiales vegetales (Trigueros et al., 2021). Dado los buenos resultados obtenidos con UAEE, se profundizó en el estudio de las cinéticas de este método de extracción.

Los experimentos se llevaron empleando una sonda de ultrasonido (UIP1000HD, 1000W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Germany) a 50% de amplitud durante 2 horas recogiendo en eppendorf 2 mL de muestras en intervalos de 5 minutos. Se empleó una suspensión de biomasa al 5% en un reactor provisto de un encamisado para mantener la temperatura óptima de trabajo de la enzima a 50°C empleando agua destilada como disolvente con un volumen de trabajo de 250 mL. Las enzimas empleadas fueron Protamex en concentración 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> y combinación de Protamex + Celluclast 1.5L en concentración 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> y 10 FPU/mL, respectivamente. Tras la experimentación, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, y se analizó el contenido de proteínas en la fracción acuosa. El contenido total de proteínas en las fracciones líquidas para el modelado cinético se determinó utilizando el Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) basado en el protocolo del ácido biocitonínico. Se realizó una curva de calibrado utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar y se midió la absorbancia a 562 nm (*Anexo-Figura 3, pág. 89*).

Los resultados experimentales se ajustaron a diferentes modelos cinéticos (Tabla 7).

**Tabla 7:** Ecuaciones de los modelos cinéticos empleados en UAEE

Modelo	Ecuación	Referencia
Potencial	$Y \left( \frac{mg \text{ BSA protein}}{g \text{ Dw}} \right) = B \cdot t^n$	(Trigueros et al., 2021)
Difusión parabólica	$Y \left( \frac{mg \text{ BSA protein}}{g \text{ Dw}} \right) = A_0 + A_1 \cdot t^{0.5}$	(Kitanović et al., 2008)
Elovich	$Y \left( \frac{mg \text{ BSA protein}}{g \text{ Dw}} \right) = E_0 + E_1 \cdot \ln t$	(Kitanović et al., 2008; Menkiti et al., 2017)
Segundo orden	$\frac{t}{\bar{Y}} \left( \frac{g \text{ Dw} \cdot \text{min}}{mg \text{ BSA}} \right) = (k_2 Y_S^2)^{-1} + \frac{t}{Y_S}$	(Harouna-Oumarou et al., 2007; L. Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2009)

Dw: biomasa seca;

La estimación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo mediante regresión no lineal aplicando el algoritmo de Marquardt (Statgraphics X64) excepto el modelo de Segundo orden que se llevó a cabo mediante regresión lineal con Excel según lo descrito por (Harouna-Oumarou et al., 2007). Para evaluar la precisión y la concordancia de los modelos propuestos se compararon los resultados experimentales con los de la predicción del modelo mediante el valor del RMS (*Root Mean Square*) (Kitanović et al., 2008) y el coeficiente de regresión lineal (Zahari et al., 2020) descritos por la Ecuación 4 y 5, entre los rendimientos de extracción experimentales y los calculados.

$$\% \text{ RMS} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{Y_{\text{exp}} - Y_{\text{cal}}}{Y_{\text{exp}}} \right)^2} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

$$R^2 = 1 - \left[ \frac{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp}} - Y_{\text{cal}})^2}{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp}} - \bar{Y}_{\text{cal}})^2} \right] \quad \text{Ecuación 5}$$

## 4.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 4.5.1 Análisis de sólidos totales y sólidos volátiles

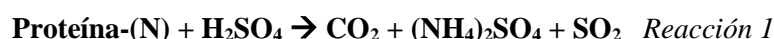
Para comprobar los balances de materia se determinaron los sólidos totales y volátiles tanto de la muestra de microalga inicial previa a la hidrólisis como de las fracciones sólidas y líquidas obtenidas tras el proceso de hidrólisis según los protocolos del NREL (Van Wychen y

Laurens, 2016). Para la determinación del contenido de humedad se llevó a cabo un análisis de sólidos totales, secando 2 g de biomasa previamente liofilizada a 105°C hasta peso constante. Mediante calcinación de la biomasa a 550°C durante 24 h se determinó el contenido de sólidos volátiles.

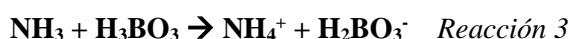
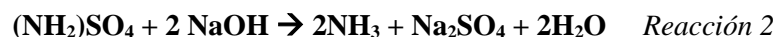
#### 4.5.2 Análisis de proteínas

El contenido de nitrógeno orgánico de la biomasa cruda y de las fracciones sólidas y líquidas se determinó mediante el método del nitrógeno total Kjeldahl, que también se utilizó para comprobar los balances de materia del nitrógeno. El método Kjeldahl consta de 3 etapas: digestión, destilación y valoración (Figura 15):

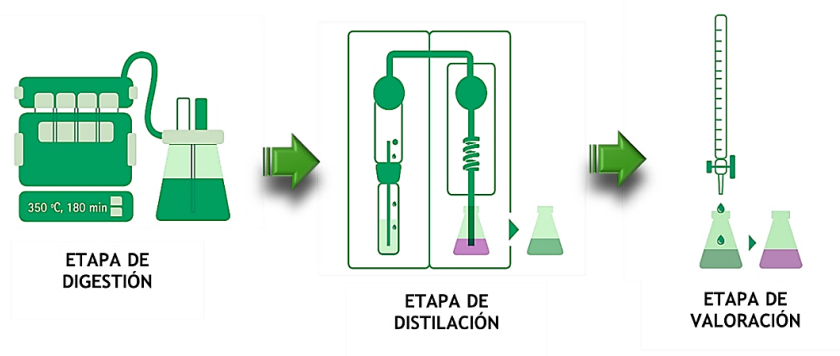
- **Etapa de digestión:** Un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ion amonio según la reacción 1. En esta etapa, el nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico caliente.



- **Etapa de destilación:** Se alcaliniza la muestra digerida con NaOH y el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco (Reacción 2). El amoníaco destilado se recoge sobre un exceso de ácido bórico según la Reacción 3:



- **Etapa de valoración:** La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formado, equivalente al nitrógeno presente en la muestra, empleando ácido sulfúrico como valorante (Reacción 4)



**Figura 15:** Determinación del nitrógeno total mediante el método Kjeldahl

Experimentalmente, el método Kjeldahl se llevó a cabo añadiendo 0.1 g de muestra sólida previamente liofilizada en un tubo digestor junto con 9 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% y una pastilla de catalizador Kjeldahl (0.3% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Los tubos se colocaron en el digestor y se llevó a cabo una digestión durante 3 horas mediante una rampa de temperatura (150, 270 y 370 °C). Finalizada la digestión se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1h. Una vez que las muestras estaban digeridas (aparencia transparente) y enfriadas se pasó a la unidad de destilación (KjeFlex K-360), recogiendo el destilado sobre un exceso de ácido bórico. Una vez concluido el destilado, se valora con ácido sulfúrico 0.05 M o 0.1 M hasta que la muestra vire de color verde a violeta indicativo del punto final de la valoración. A partir del volumen de ácido sulfúrico gastado y su concentración se puede determinar la cantidad de nitrógeno presente en la muestra.

Finalmente el contenido de proteínas de la biomasa inicial así como de las fracciones líquidas y sólidas después de cada tratamiento se calculó aplicando la relación nitrógeno:proteína (factor N/P) de 4.3 calculada a partir del perfil de aminoácidos obtenido en la biomasa inicial por HPLC según Rojo et al., (2021).

#### 4.5.3 Análisis de carbohidratos por HPLC

Los carbohidratos son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas y están compuestos por una o varias unidades de monosacáridos. Todos los carbohidratos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos siendo esta hidrólisis favorecida con el aumento de la temperatura. El contenido de carbohidratos de la biomasa inicial y de las fracciones sólida se determinó como monosacáridos totales utilizando un procedimiento del NREL descrito por Rojo et al. (2021) que consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presente en la biomasa y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC.

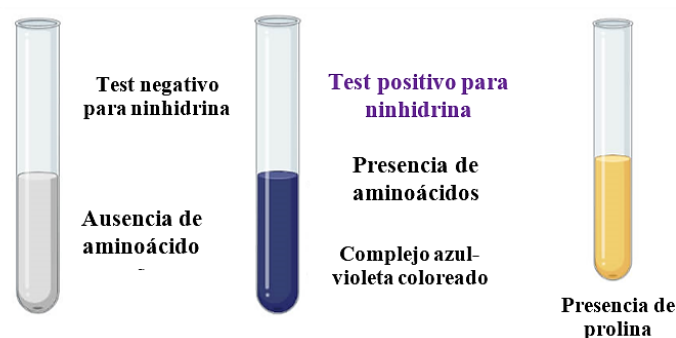
En primer lugar, se sometieron 300 mg de biomasa seca a una hidrólisis ácida concentrada durante 1 hora añadiendo 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% en peso a 30°C. A continuación, se añadieron 84 mL de agua destilada para diluir la concentración del ácido al 4% en peso y las muestras se sometieron a 121°C durante 1h en autoclave. Después se separaron las fracciones sólidas y líquida y, finalmente, la fracción líquida resultante se filtró con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm para determinar el contenido de monosacáridos mediante HPLC-IR.

Para la cuantificación del contenido de monosacáridos (glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa) se utilizó una columna de exclusión iónica Bio-RAD HPX-87H (300 x 7.8 mm, 9µm tamaño de partícula, rango de pH 1-3) instalada en un módulo de separación Waster e2695. Se utilizó un detector de índice de refracción (Waters 2414) para cuantificar la concentración de monosacáridos obtenidas en las fracciones líquidas (las fracciones líquidas de las hidrólisis y las fracciones líquidas de la hidrólisis ácida de los sólidos). Se empleó como fase móvil una solución

acuosa 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un flujo de 0.6 mL/min y a 50°C. Para la cuantificación se utilizaron estándares individuales externos de glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa disponibles comercialmente con una pureza > 95% en concentración de 0.5 mg/mL a 2 mg/mL (*Anexo-Figura 1, pág. 88*). Adicionalmente para calcular los factores de corrección (*Anexo-Tabla 1, pág. 88*) debido a la posible degradación producida durante la hidrólisis ácida de cada uno de los monosacáridos, para el cálculo final del contenido de carbohidratos, se sometieron al mismo tratamiento de hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a las muestras comerciales de glucosa, arabinosa, celobiosa y xilosa. Finalmente, el contenido de carbohidratos se calculó como la suma de todos los monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa).

#### 4.5.4 Análisis de aminoácidos

Los aminoácidos libres en las fracciones líquidas se determinaron mediante el método de reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) el cual reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico, con reducción del reactivo (ninhidrina) a hidrindantina. La hidrindantina reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta (en la prolina el grupo amino está sustituido) (*Figura 16*). El derivado coloreado presenta máximo de absorción en torno a 570 nm. La reacción se lleva a cabo en caliente y a valores de pH comprendidos entre 4 y 8. Las aminas primarias (R-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) dan también positiva la prueba de la ninhidrina, aunque en este caso no se libera CO<sub>2</sub> (*Friedman, 2004; Sun et al., 2006*).



**Figura 16:** Resultado positivo y negativo en el test de ninhidrina para la presencia y/o ausencia de aminoácidos.

Experimentalmente se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por el fabricante Sigma-Aldrich: a 2 mL de cada muestra se añade 1 mL de ninhidrina bajo atmósfera de nitrógeno. La atmósfera de nitrógeno se consigue introduciendo nitrógeno por un tubo dentro del reactivo mientras éste está abierto. Se agitó la mezcla contenida en el tubo y se incubó durante 10 minutos a 37°C enfriando a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 5 mL de etanol al 95% en cada

tubo y se midió la absorbancia a 570 nm. La cuantificación se llevó a cabo mediante una recta de calibrado de ácido aspártico-glutámico (*Anexo- Figura 2, pág.90*).

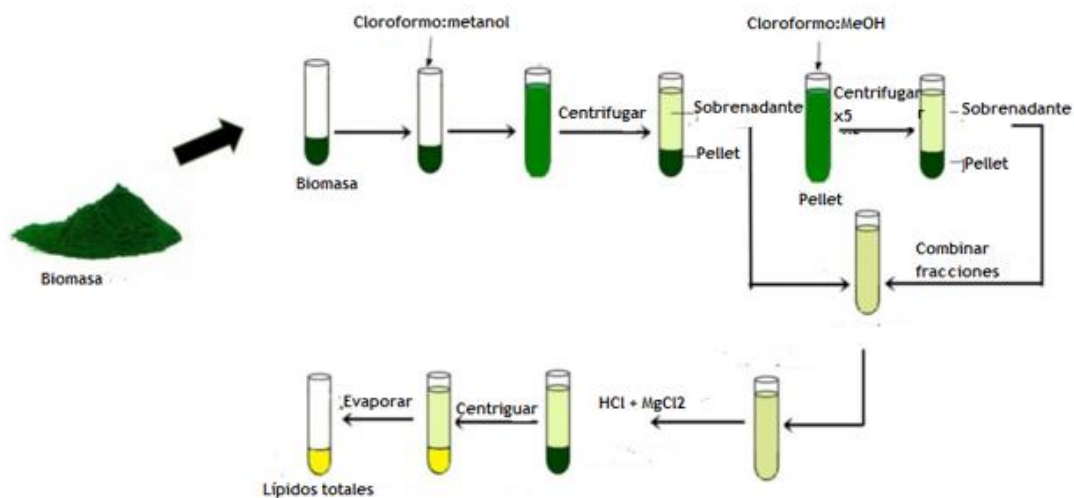
Se determinó el perfil de aminoácidos totales de la biomasa inicial y de algunas fracciones sólidas y líquidas seleccionadas para obtener la composición de aminoácidos según los estándares analíticos internos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-UVa) descrito por Rojo et al., (2021). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6 N en atmósfera inerte. A continuación, se eliminó el medio ácido utilizando N<sub>2</sub> hasta sequedad. Las muestras se volvieron a suspender en HCl 0.1M y la solución final se filtró con filtros de membrana de nylon de 0,22 µm. Las muestras se sometieron a una derivatización previa a la columna con ortoftalaldehído (OPA) y cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC). El análisis se realizó por HPLC utilizando una columna Zorbax Eclipse AAA de 4,6 × 150 mm y 3,5 µm, con fases móviles A (Buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O pH 7.8) y B (Acetonitrilo:metanol:milliQ 45:45:10), y un detector UV.

#### 4.5.5 Análisis de lípidos

Los lípidos están formados por largas cadenas hidrocarbonadas insolubles en disolvente hidrófobos como agua y soluble en disolvente orgánicos. La adición de sales elimina el agua de las proteínas hidratadas, dejando las regiones hidrofóbicas libres de combinarse intermolecularmente y de eso modo precipitar. El contenido de lípidos de la biomasa inicial y de las fracciones sólidas obtenidas tras los diferentes tratamientos se determinó mediante un protocolo modificado basado en una extracción de cloroformo-metanol 2:1 aplicando el método de Kochert (Kochert, 1978).

Para el análisis de lípidos (Figura 17) se pesaron 100 mg de biomasa en peso seco + 100 mg de alúmina en tubos falcon y se molturan manualmente durante unos minutos hasta obtener una mezcla homogénea. A cada una de ellas se añade 2 mL de una mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v). El tubo falcon se agita para que toda la mezcla quede mezclada y se centrifuga durante 5 minutos a 10.000 rpm. Tras la centrifugación se pasa la fase líquida a un nuevo tubo falcon (sin que pase la fracción sólida) y se deja precipitar nuevamente la fase sólida en el falcon original al que se le añade 1 mL de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v). Se vuelve a agitar, se centrifuga y se vuelve a separar la fase líquida. Este procedimiento se repite cinco veces hasta extraer toda la fase lipídica. Una vez extraída toda la fase lipídica, al sobrenadante (fase líquida recogida tras las sucesivas centrifugaciones) se añaden 3 mL de HCl 0.1M y 0.3 mL de MgCl<sub>2</sub> para precipitar las proteínas. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriormente descritas. Se formarán así 3 fases: una superior acuosa transparente, una blanquecina inferior con las proteínas precipitada y una oscura que es la que contiene los lípidos. Ésta última se recoge con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio de cuello largo y se vierte en un vial limpio y seco previamente

pesado. Finalmente, el vial se deja secar al aire a temperatura ambiente hasta que se evapore todo el disolvente orgánico hasta pesada constante



**Figura 17:** Determinación de lípidos mediante el método cloroformo-metanol (Yaakob et al., 2021).

#### 4.5.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-page)

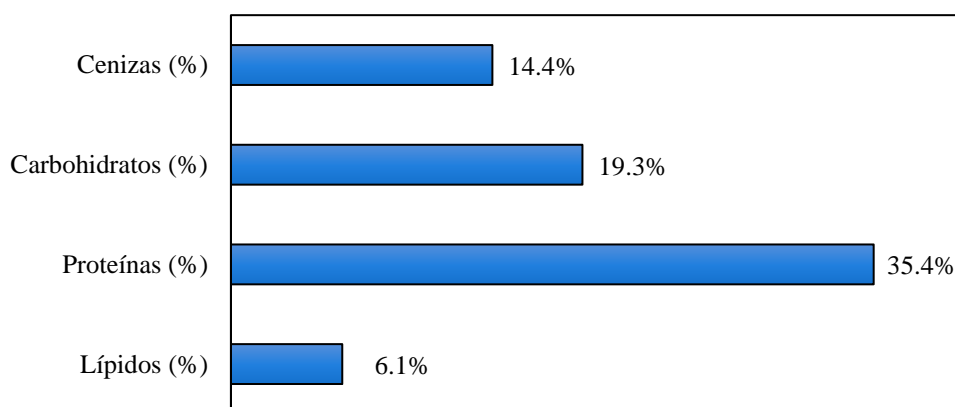
Las fracciones líquidas de algunos ensayos seleccionados se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-page) según el método descrito por (Rojo et al., 2021). La electroforesis SDS-page con Tris-Glicina se realizó utilizando una unidad de electroforesis Mini-PROTEAN (laboratorios Bio-Rad, EE.UU.) y un gel Mini-PROTEAN 10-20% Tris-Tricina Precast (laboratorios Bio-Rad, EE.UU.). La separación de proteínas se realizó según las instrucciones del fabricante. Las muestras de las fracciones líquidas (20  $\mu$ L) se mezclaron con 20  $\mu$ L de una solución compuesta por Laemmli y 50 mM de reactivo de Cleland (DTT, ditioneitol) y se calentaron a 100 °C durante 5 min. A continuación, se cargaron 30  $\mu$ L en los gels prefabricados de la unidad de electroforesis llenos de running buffer 10x Tris/Glicina/SDS (25 mM de Tris, 192 mM de tricina y 0,1% de SDS, pH 8.3). Las condiciones de funcionamiento se ajustaron a una tensión constante de 200 V. La corriente eléctrica inicial fue de 60 mA y la final de 30 mA. Se utilizó el marcador de proteínas VI (10-245 kDa) prestained (Panreac AppliChem) como marcador molecular con un rango de tamaño de proteínas de 10 - 250 kDa.

Las bandas de proteínas se fijaron durante 30 minutos con una solución fijadora (40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético), seguida de una tinción con una solución de tinción (0,1% p/p de Coomassie Blue R-250, 40% v/v de metanol y 10% v/v de ácido acético) durante 24 horas en un agitador orbital. Por último, los gels se destiñeron con una solución (destaining solution) compuesta por 400 mL metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 COMPOSICIÓN INICIAL DE LA BIOMASA

La composición de la biomasa inicial empleada en este trabajo se muestra en la Figura 18. El contenido de cenizas supuso el 14.14% de la biomasa y pudo ser debido a la presencia de material insoluble en la biomasa, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y metales como  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Zn}^{+2}$  según lo descrito por Hernández et al., (2018) para el cultivo de *Scenedesmus almeriensis* crecidas en las mismas condiciones que la biomasa evaluada en este trabajo, y es muy similar al 16.8% reportado por Martín Juárez et al. (2016) para un consorcio microalgas-bacterias compuesta por un 71% de *Scenedesmus almeriensis* cultivados en un fotobiorreactor alimentado con aguas residuales de purines diluidas al 10% y menor del 57.6% reportado por Molino et al., (2018) para la misma especie de microalgas cultivadas en medio sintético (debido principalmente al alto contenido de fertilizantes, fosfatos y nitratos, que contenía el medio de cultivo). Para obtener una comparación efectiva de los diferentes métodos de hidrólisis empleados se decide realizar los cálculos con las composiciones en base exenta de cenizas. La composición de la biomasa, exenta de cenizas, presenta una composición macromolecular de 22.6% de carbohidratos (compuesto por un 11.1% de glucosa, 10.5% de xilosa, < 1% de celobiosa y arabinosa), un 41.3% de proteínas y un 7.2% de lípidos.



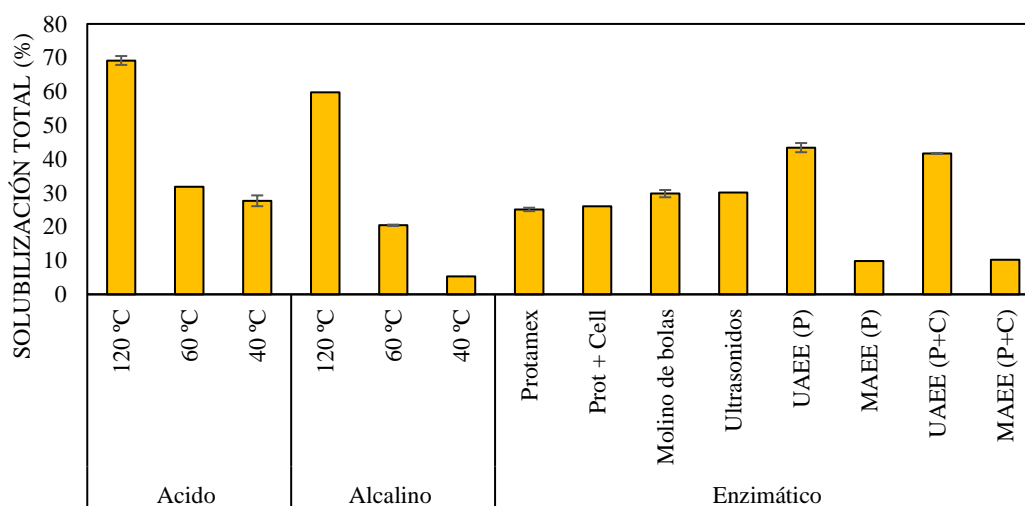
**Figura 18:** Composición macromolecular expresada en % base seca en términos de carbohidratos, proteínas y lípidos del consorcio microalgas-bacterias compuesta por *Scenedesmus almeriensis* (96%) procedente del cultivo en un fotobiorreactor abierto de capa fina alimentado con aguas residuales de purines diluidos al 10%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas. Las líneas del intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.



El alto contenido de proteínas y en contraposición, el bajo y medio contenido de lípidos y carbohidratos respecto al cultivo puro (Tabla 3) que presenta la biomasa puede deberse a los elevados contenidos de N y P del medio de cultivo con purines (Gonçalves et al., 2017). Las altas concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo conducen a una mayor productividad de biomasa y en consecuencia a una mayor acumulación de proteínas en detrimento de los lípidos y carbohidrato mientras que las condiciones de agotamiento de nitrógeno conducen, principalmente, a la acumulación de lípidos y carbohidratos de almacenamiento. En este sentido, el efecto de la adición de diferentes concentraciones de nitrógeno (0, 36, 72, 144 y 288 mg/L) sobre la productividad de biomasa y proteínas de *I. galbana* en un PBR discontinuo fue estudiado por Zarrinmehr et al. (2020). Los resultados revelaron que el porcentaje de proteína acumulado en diferentes concentraciones de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) osciló entre el 17.1 y el 36.3%. El porcentaje de proteína fue significativamente mayor en la biomasa crecida en el medio que contenía 36 y 72 mg/L en comparación con los que contenían 0 y 288 mg/L, pero no difirió estadísticamente de los que contenían 144 mg/L. La concentración máxima y mínima de proteína obtenida, 326.1 y 56.9 mg/L, se observó con una concentración de nitrógeno de 72 y 0 mg/L, respectivamente, mientras que con 288 mg/L de ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) la concentración de proteínas disminuyó hasta 150 mg/L debido a la inhibición del crecimiento por exceso de nitrógeno en el medio de cultivo. Por otro lado, las células cultivadas en 0 mg/L de nitrógeno mostraron el mayor contenido en carbohidratos y lípidos, 47% y 17.2%, respectivamente. Los resultados obtenidos por Zarrinmehr et al. (2020) estuvieron en concordancia con los reportado por Zhu et al. (2013) quienes utilizaron diferentes diluciones de aguas residuales de la industria porcina como medio de cultivo para *C. zoefingiensis* y encontraron un aumento en el contenido proteínas (de 11.3 a 47.8% en masa) y carbohidratos (de 24.8 a 27.8% en masa) en la biomasa mientras que el contenido de lípidos se redujo de un 45 a 20 % en masa con el aumento de la concentración de nutrientes de 30 a 162 mg NT/L y 400 a 2500 mg COD/L. A partir de estos estudios podemos concluir que, en general, las microalgas degradan preferentemente macromoléculas que contienen nitrógeno, como las proteínas, en respuesta a la escasez de nitrógeno en el medio de cultivo, lo que da lugar a una disminución del contenido de proteínas y a una acumulación de compuestos de carbono de reserva, como lípidos y/o carbohidratos. Otros autores (D'Hondt et al., 2017; Rojo et al., 2021) también indican que la biomasa algal procedente del tratamiento de aguas residuales suele presentar altos contenidos de proteínas y carbohidratos, y que además posee una pared celular rígida y resistente debido a su capacidad de soportar condiciones adversas compuesta principalmente por glucosa, manosa y galactosa en diferentes proporciones junto a glucoproteínas unidas a estos azúcares.

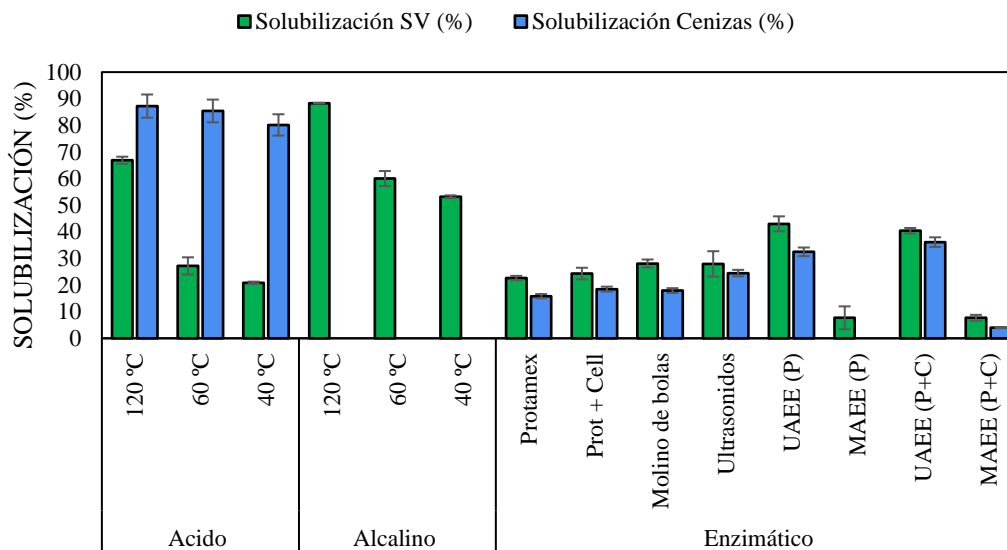
## 5.2 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO Y LA HIDRÓLISIS EN LA SOLUBILIZACIÓN TOTAL DE LA BIOMASA

La solubilización de la biomasa microalgal total tras los diferentes tratamientos aplicados se muestra en la Figura 19 donde se observa que la mayor solubilización se alcanzó para los tratamientos químicos con HCl y NaOH. Se puede observar que la solubilización obtenida con los métodos químicos es dependiente de la temperatura. Con HCl a 120°C se consigue una solubilización de la biomasa del 69.2% aunque este rendimiento disminuyó hasta aproximadamente 31.8% y 27.7% al disminuir la temperatura a 60 y 40°C. El mismo efecto se puede observar en la solubilización del tratamiento alcalino con NaOH alcanzando el valor máximo de 59.7% a 120°C mientras que este porcentaje disminuye drásticamente hasta un 20.4% y 5.3% al disminuir la temperatura a 60°C y 40°C. Estos mayores rendimientos del tratamiento ácido se deben a la mayor solubilización de las cenizas, ya que los sólidos volátiles son más solubles en medio alcalino (Figura 20). En este sentido, Lane et al. (2014) diseñaron un método de fraccionamiento en tres etapas (H<sub>2</sub>O, 1M NH<sub>4</sub>Ac y HCl 1M) para la extracción de metales presentes en la microalga *Tetraselmis* sp empleada en la biorremediación de aguas residuales ganaderas y agrícolas; y dos tipos de macroalgas (*Derbesia tenuissima* y *Oedogonium*) utilizadas para la producción comercial de biofuel. Las fracciones acuosa y ácida solubilizaron casi en un 80-90% de las cenizas presentes en las algas compuesto principalmente por sales de cloruros metálicos alcalinos y alcalinotérreos, sulfatos, fosfatos, carbonatos y silicatos.



**Figura 19:** Rendimientos de solubilización total (% base seca) de la biomasa (5% g/g en 250 mL agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimático secuencial:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y *Ultrasonidos* (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** UAEE (P): Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); MAEE(P): Protamex (1:100 g/g) asistido

por microondas ( 2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; *UAEE (P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos (50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; *MAEE(P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s,38596 J/g), 1h, 50°C. Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.



**Figura 20:** Porcentaje de solubilización de sólidos volátiles (SV) y cenizas tras los tratamientos aplicados a la biomasa (5% g/g en 250 mL de agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimático secuencial:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y *Ultrasonidos* (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** *UAEE (P)*: Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); *MAEE(P)*: Protamex (1:100 g/g) asistido por microondas ( 2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; *UAEE (P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos ( 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; *MAEE(P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s,38596 J/g), 1h. Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Sin embargo, en el caso del tratamiento alcalino el balance de masas en la solubilización de cenizas proporcionó valores negativos. El contenido de cenizas en los hidrolizados osciló entre un 73%, 58% y un 55% para las tres temperaturas ensayadas (120°C, 60°C y 40°C) y se atribuye directamente a la formación de sales durante la hidrólisis con NaOH (Nwachukwu & Aluko, 2019). Esta misma tendencia fue observada por Lorenzo-Hernando et al., (2019) quienes reportaron un contenido de cenizas > 32% en los hidrolizados tras un tratamiento alcalino (NaOH 2M, 55°C, 2h) a partir de una suspensión al 5% (g/g) de biomasa basada en *Scenedesmus almeriensis* cultivada en medio de purines con un contenido inicial de cenizas en la biomasa del

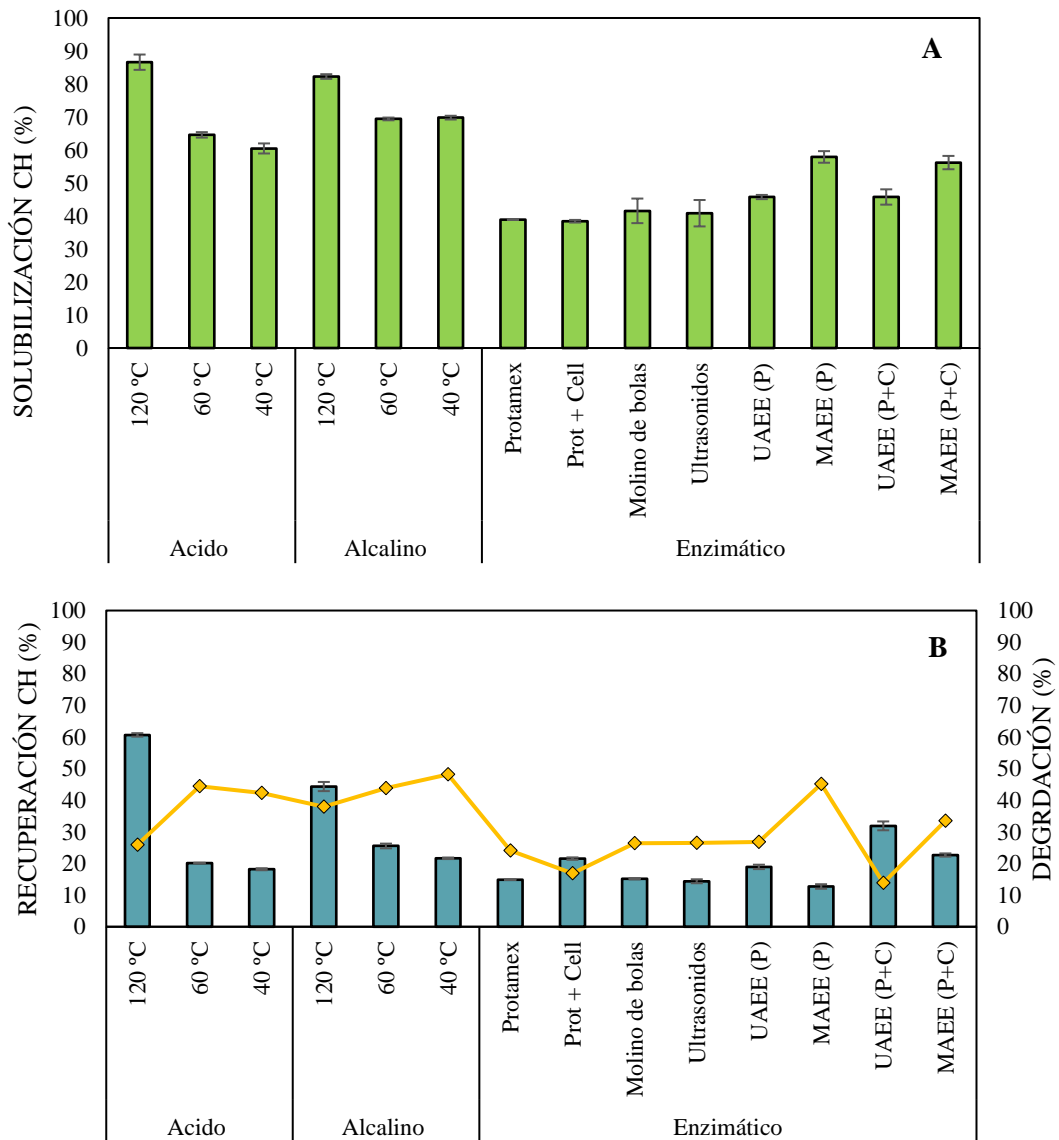
15.6%. Por otro lado, el tratamiento alcalino proporcionó altas solubilizaciones de sólidos volátiles (SV), entre un 88.4% y 53.2% para las tres temperaturas ensayadas, debido principalmente a la mayor solubilidad de éstos en medio alcalino (Gerde et al., 2013) a diferencia del tratamiento ácido donde las solubilización de SV oscilaron entre un 60% y 20% para las temperaturas ensayadas. Mahdy et al. (2014) describieron una solubilización de sólidos volátiles, en términos de DQO, entre el 6-18% para un cultivo puro de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp tras un tratamiento alcalino 0.55-5% (w/w) de NaOH a 50°C durante 24 y 48 horas concluyendo que el tiempo de incubación parece no afectar a la solubilización de la DQO siendo la concentración de NaOH el factor determinante, mientras que González-Fernández et al. (2013) describieron que no solo la concentración, sino también la temperatura es un factor crítico en la solubilización de los sólidos volátiles a partir de un cultivo puro de *Scenedesmus* sp reportando un incremento de casi el 95% al variar la temperatura de 40 a 90°C. Por último, Martín Juárez et al., (2021) obtuvieron casi el 80% y 65% de solubilización de los sólidos volátiles para el tratamiento ácido (HCl) y alcalino (NaOH), respectivamente, ambos usando 2M a 121°C durante 60 minutos, de un consorcio de microalgas-bacterias compuestas principalmente por microalgas de la familia *Scenedesmaceae* crecidas en un fotobiorreactor de capa fina alimentado con aguas residuales de purines supusieron.

En cuanto a los tratamientos enzimáticos, se observó que el empleo de la proteasa Protamex a una concentración 1:100 g/g<sub>biomasa</sub> y 3h produce únicamente una solubilización total del 25.1% con solubilizaciones de SV (22.5%) y cenizas (24.3%) debido posiblemente a que esta enzima cataliza únicamente la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas unidas a la pared celular en forma de glucoproteínas y no los enlaces glucosídicos de los polisacáridos que forman parte de la pared celular de *Scenedesmus almeriensis*. Para el consorcio de microalgas-bacterias basada en *Scenedesmus almeriensis* se encontró una solubilización de SV del 37.4% tras un tratamiento con Protamex en las mismas condiciones empleadas en este trabajo (Rojó et al., 2021) Los dos tratamientos previos de la biomasa, combinados secuencialmente con la hidrólisis enzimática (molienda durante 60 minutos y 10 minutos con ultrasonidos) proporcionaron resultados similares. La solubilización total aumentó cerca de un 20%, respecto a la hidrólisis enzimática como única etapa debido, posiblemente, a una mayor disrupción en la pared celular con el coincidente aumento en la superficie y el área de contacto de la misma para la posterior actuación de la enzima lo que supuso una mayor solubilización de SV y cenizas en comparación con la hidrólisis enzimática únicamente con Protamex. Martín Juárez et al., (2021) informaron de valores superiores al 30% en la solubilización de SV y cenizas tras un pretratamiento de molienda (60 min, esferas de 2.5 mm) y ultrasonidos (21 min) seguido de 12h de hidrólisis enzimática con Novozyme 188 a partir de biomasa basada en *Scenedesmaceae* crecida en medio de purines con un contenido de cenizas del 25%. La combinación enzimática (Protamex + Celluclast 1.5L)

mejoró la solubilización total de la biomasa hasta un 26.1%, es decir, un 6% superior a la hidrólisis únicamente con Protamex debido posiblemente a la mayor solubilización de los SV del 24.3%. El empleo únicamente de Celluclast 1.5 L condujo a rendimientos de solubilización inferiores al 10% en biomasa de *Scenedesmus almeriensis* cultivada en medio de purines (Rojo et al., 2021). En cuanto a los métodos combinados asistidos (UAEE, y MAEE), se observó que, a pesar del menor tiempo de hidrólisis aplicado, la UAEE con Protamex alcanzó un rendimiento de solubilización total del 43.1%, es decir, un aumento del 72.8% respecto a las 3h de hidrólisis con Protamex y del 44% y 45% respecto a los pretratamientos secuenciales de 10 minutos con ultrasonidos y de 60 minutos con molinos de bolas seguidos de 3h de hidrólisis enzimática con Protamex probablemente, en parte, debido a la mayor tiempo y capacidad del ultrasonido para conseguir una mayor disrupción celular en la biomasa (Chemat et al., 2017; Wang & Yuan, 2015). Por otro lado, los resultados empeoraron empleando la hidrólisis con Protamex y combinación Protamex + Celluclast 1.5L asistido por microondas, MAEE(P) y MAEE (P+C), lo que nos indica que esta combinación de tratamiento no es lo suficientemente buena como para compensar la notable diferencia en el tiempo de hidrólisis aplicado.

### **5.3 SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

La Figura 21A muestra los rendimientos de solubilización de carbohidratos obtenidos aplicando los diferentes tipos de tratamiento. Los rendimientos de solubilización de carbohidratos alcanzaron los valores máximos de 86.6% y 82.3% cuando se utilizó HCl y NaOH a 120°C mientras que estos rendimientos disminuyeron entre un 20% y 30% (64.6% - 60.5% y un 69.4% - 69.8%) al disminuir la temperatura a 60°C y 40°C para ambas hidrólisis. La capacidad de cada proceso de recuperar esos carbohidratos en forma de monosacáridos solubles viene dada por el rendimiento de recuperación (Figura 21B) dónde la línea continua representa el porcentaje de degradación total obtenida para los diferentes tratamientos aplicados. El mayor rendimiento de recuperación de monosacáridos totales (60.7%) se obtuvo para el experimento con mayor solubilización de carbohidratos (HCl 2M a 120°C) mientras que para el tratamiento alcalino a 120°C la recuperación obtenida fue menor, un 44.3%, en comparación con los rendimientos de solubilización debido a la mayor degradación de los carbohidratos. En este sentido, los resultados parecen indicar que la degradación de los azúcares liberados fue mayor para el tratamiento alcalino que para el tratamiento ácido en las mismas condiciones de operación (1h, 120°C).



**Figura 21:** Porcentaje de solubilización de carbohidratos (A) y recuperación (columnas) y degradación (línea) de monosacáridos (B) tras los tratamientos aplicados a la biomasa (5% g/g en 250 mL de agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimáticos secuenciales:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y *Ultrasonidos* (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** *UAEE (P)*: Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); *MAEE(P)*: Protamex (1:100 g/g) asistido por microondas ( 2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; *UAEE (P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos ( 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; *MAEE(P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s,38596 J/g), 1h. Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Dado que la estructura de *Scenedesmus almeriensis* está compuesta principalmente por fibras de celulosa y hemicelulosas con algunas cantidades de glucoproteínas y otros polímeros, probablemente el bajo rendimiento de recuperación se debió a una severa degradación de los mismos causada por una alta temperatura y largos tiempos de reacción que dieron lugar a la formación de compuestos de degradación formados durante la hidrólisis de los polímeros de celulosa/ hemicelulosa presente en la biomasa correlacionado con una disminución en la recuperación de los carbohidratos (Chen et al. 2013) lo que se ha traducido en un porcentaje de pérdidas del 26% y 48% para el tratamiento ácido y alcalino a 120°C. El empleo de ácidos a altas temperaturas puede promover una degradación de la biomasa y de los componentes extraídos. Harun et al., (2011) trabajando con la microalga *Chlorococcum humicola*, mostraron que 15-30 minutos de tratamiento ácido con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido 1-3% v/v a 130°C fueron suficientes para causar una ruptura efectiva en la pared celular de esta microalga y liberar los carbohidratos para la producción de 7.20 y 6 g bioetanol/L, sin embargo, al aumentar la temperatura por encima de 140-200°C, y el tiempo de reacción entre 30-60 minutos condujo a reducción de casi el 70% en el rendimiento de producción de bioetanol principalmente debido a la degradación de los carbohidratos. Por otro lado, Mahdy et al. (2014) informaron de rendimientos de solubilización de carbohidratos inferiores operando en condiciones más suaves, del 43.5% (5% NaOH (p/v), 50 °C, 48 h) y del 36% (2% KOH (p/v), 120 °C, 2 h) para las microalgas *Scenedesmus sp* y *Tetraselmis suecica* puras crecidas en medio sintético con rendimientos de recuperación inferiores al 25% para ambas microalgas.

El test de Duncan mostró diferencias significativas, con un 95% de confianza, para el tipo de hidrólisis empleado (HCl o NaOH) y la temperatura en el porcentaje de solubilización y recuperación con una contribución del 86.7% y 89.3% para ambos parámetros ( $p < 0.05$ ), respectivamente. Sin embargo, no mostró diferencias significativas para las temperaturas inferiores a 120°C lo que parece indicar que la solubilización de carbohidratos no se ve afectada a temperaturas inferiores a 120°C, lo que se atribuye a la alta estabilidad de los enlaces glucosídicos a bajas temperaturas (Fu et al. 2021). Esto se tradujo en pérdidas de casi el 45% y 48% en la recuperación de los carbohidratos al disminuir la temperatura por debajo de 120°C para las hidrólisis ácidas y alcalinas con rendimientos de recuperación del 20.1% y 18.2% para el tratamiento ácido y del 25.6% y 21.6% para el tratamiento alcalino a 60°C y 40°C debido posiblemente a que temperaturas inferiores a 120°C no hay energía suficiente para descomponer la biomasa y facilitar la hidrólisis de los carbohidratos a monosacáridos fermentables. En este sentido, Harun & Danquah, (2011) llevaron a una cabo una optimización mediante un diseño central compuesto para estudiar la conversión de carbohidratos complejos a azúcares fermentables para la producción de bioetanol a partir de biomasa de *Spirulina sp*. Los resultados revelaron que la temperatura fue el factor crítico durante el pretratamiento con ácido sulfúrico

(1% v/v) consiguiendo la mayor concentración de azúcares fermentables (7.20 g/L) a 120°C y 30 minutos con un rendimiento de producción de bioetanol del 52% (g/g), mientras que este rendimiento disminuyó hasta 2.67% (g/g) cuando el tratamiento se llevó a cabo a 100°C.

En cuanto a los tratamientos enzimáticos individuales y combinados secuenciales (molino de bolas y ultrasonidos), el análisis ANOVA mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la solubilización y recuperación de carbohidratos. El empleo únicamente de hidrólisis enzimática con Protamex (1:100 g/g, 3h, 50°C) condujo a una solubilización del 39.9%, aunque el alto factor de degradación (24%) condujo a un porcentaje de recuperación del 14.9% que se atribuye a la liberación concomitante de carbohidratos fácilmente hidrolizables que se solubilizan junto con las proteínas (glucoproteínas) según lo descrito por Mahdy et al., (2014b) Estos rendimientos de solubilización fueron mayores que los reportados por Rojo et al., (2021) quienes obtuvieron rendimientos de solubilización de carbohidratos inferiores al 30% empleando las enzimas comerciales Alcalasa 2.5 L y Protamex, en concentraciones de 5:100 v/g y 1:100 g/g, respectivamente, tras 3h de hidrólisis a 50°C y 300 rpm a partir de una suspensión al 5% en masa de un consorcio de microalgas-bacterias similar al de este estudio. Sin embargo, sus rendimientos de recuperación de azúcares fueron superiores, del 25% y 19%.

Si bien cabía esperar un aumento de la ruptura celular con la adición de celulasa, los rendimientos de solubilización de carbohidratos fueron prácticamente idénticos al obtenido con la proteasa, 38.4%, empleando la combinación de enzimas (Protamex + Celluclast 1.5L). La combinación de una proteasa con una celulasa sería una estrategia típica de tratamiento enzimático, ya que puede dirigirse a los principales componentes de la pared celular, las proteínas/péptidos y la celulosa y/u otros carbohidratos (Nitsos et al., 2020; Sathya et al., 2021). Sin embargo, en este caso, la combinación enzimática no mejoró la solubilización de carbohidratos posiblemente debido a la incapacidad de la celulasa para atacar y degradar el algaenan, un biopolímero alifático muy recalcitrante, u otros biopolímeros de carbohidratos presentes en la pared celular de *Scenedesmus almeriensis* (Chng et al., 2017; D'Hondt et al., 2017) aunque el rendimiento de recuperación mejoró hasta un máximo de 21.6% probablemente debido a la menor degradación (16.8%) de los carbohidratos liberados. Hay que tener en cuenta, además, que el pH óptimo de Celluclast 2.5L es de 4.8 mientras que la experimentación se llevó a cabo a pH 6.5 (el óptimo de Protamex) por lo que la actividad de la celulasa pudo verse reducida. También es posible que se haya producido un efecto de inhibición, ya que los productos de degradación generados por la acción de una de las enzimas pueden haber reducido la actividad de la otra. Para el consorcio de biomasa liofilizada constituida por *Alphanothece* sp (61%) y *Scenedesmus obliquus* (39%) cultivadas en fotobiorreactores alimentado con aguas residuales de purines se hallaron cantidades importantes de subproductos como ácido acético, ácido fórmico, metanol, ácido succínico y ácido butírico (1.04%) en los hidrolizados con Celluclast 1.5L y



Novozyme 188 (Martín Juárez et al., 2016). Estos productos se forman, probablemente, debido a la acción oxidativa y fermentativa sobre los monosacáridos como la glucosa y la xilosa, a través de las diferentes rutas metabólicas de las bacterias presentes en este tipo de biomasa (Cheng et al., 2019; Fuentes et al., 2016). En cualquier caso, los resultados parecen indicar que la hidrólisis enzimática por sí sola no es suficiente para conseguir una ruptura efectiva de la pared celular en este tipo de biomasa.

La solubilización de los carbohidratos con las combinaciones secuenciales, pretratamiento físico/mecánicos acoplados a hidrólisis enzimática con Protamex, dieron lugar a resultados muy similares, siendo el mayor rendimiento un 41.5% para la combinación de molino de bolas (1h, 2.5mm) seguido de 3h con Protamex (50°C, 1:100 g/g). El empleo de molino de bolas como método de pretratamiento aumentó ligeramente la solubilización de los carbohidratos con el consiguiente leve aumento en la recuperación de los mismos en un 3% respecto al tratamiento con Protamex en una única etapa. Por otro lado, el pretratamiento con ultrasonidos (10 min) no afectó de forma considerable a los resultados con un rendimiento de recuperación del 14.4%. Los resultados parecen indicar un escaso o nulo efecto de estos pretratamientos físico/mecánicos con un impacto insignificante en la estructura celular de esta microalga según indican Martín Juárez et al., (2021) quienes describen a través de microscopía SEM y FTIR que la estructura celular de *Scenedesmus almeriensis* crecida en medio de purines no muestran daño tras aplicar un pretratamiento con molino de bolas y ultrasonidos en las mismas condiciones empleadas en este trabajo. Miranda et al., (2012) y Günerken et al., (2015) también informaron de bajos rendimiento de solubilización y recuperación de carbohidratos en *Scenedesmus obliquus* y *Nannochloropsis* sp tras un pretratamiento de molienda a la biomasa. Probablemente estos procesos sólo permitan la solubilización y recuperación de carbohidratos que forman parte de la pared celular, sin conseguir que se produzca la dextrinización de los carbohidratos de almacenamiento, como el almidón, ni la liberación de los hidratos de carbonos presentes en el interior de la célula microalgal (Alavijeh et al., 2020; Postma et al., 2016) debido a la alta resistencia que presenta *Scenedesmus* a la disrupción celular. Se ha descrito que esta microalga posee una de las pared celular más rígidas entre todas las microalgas compuestas por multicapas: una interior compuesta por celulosa recubierta de una matriz de hemicelulosa y una exterior compuesta por esporopolenina, un politerpeno, presente también en los granos de polen y que le confiere gran rigidez y resistencia a la pared celular (Baudelet et al., 2017; D'Hondt et al., 2017). Los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron inferiores a los obtenidos por Alavijeh et al., (2020) quienes desarrollaron un método combinado secuencial empleando un molino de bolas horizontal de 75 mL con esferas de ZrO<sub>2</sub> estabilizadas con Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 0.4 mm y velocidad de agitación de 2039 rpm seguido de hidrólisis enzimática con proteasas al 2% v/g (*Bacillus licheniformis* con una actividad de 2.4 U/g) y mezcla proteasa-celulosa a 37°C y 24h

consiguiendo un solubilización del 69% y 81% de carbohidratos a partir de una suspensión de 25 g/L de *Chlorella vulgaris*, con un alto contenido en galactosa, cultivada en un fotobiorreactor de 1300 L en medio sintético M8a con recuperaciones del 58% y 74%. En este caso, los buenos resultados obtenidos por estos autores se deben en gran medida al elevado contenido de carbohidratos en la biomasa inicial (casi un 35% del peso seco) y a que *Chlorella vulgaris* posee una pared celular menos resistente que *Scenedesmus almeriensis* lo que facilita, en gran medida, la liberación de estos componentes (D'Hondt et al., 2017; Günerken et al., 2015). Por otro lado, Martín-Juárez et al. (2021) informaron de que el tratamiento con ultrasonidos (21 min, 115 W) seguido de 12 h de hidrólisis enzimática con Celluclast 1.5L y Novozyme 188 proporcionó rendimientos de solubilización y recuperación de carbohidratos del 69.5% y 27.7% mientras que la solubilización y recuperación disminuyeron hasta un 67.9% y 21% cuando el ultrasonido se aplicó únicamente durante 5 minutos pero a 479 W mientras que González-Balderas et al., (2020) lograron una solubilización selectiva del 40% de carbohidratos aplicando 50 kWh/kg<sub>biomasa</sub> de ultrasonidos durante 56 minutos a *Desmodesmus* sp cultivada en aguas residuales con un alto contenido en manosa y ramnosa. Por el contrario, Passos et al., (2015) obtuvieron una liberación insignificante de carbohidratos al aplicar un tratamiento con ultrasonidos (70 W, 30 minutos 26.700 J/g<sub>biomasa</sub>) a microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas. Los resultados parecen indicar que los métodos secuenciales aplicados en este trabajo resultaron ser muy suaves en el que el tiempo y los parámetros de aplicación de los pretratamientos previos así como el de las hidrólisis enzimáticas posteriores juegan un papel fundamental en la liberación y, por tanto, recuperación de estos macrocomponentes.

Por último, fue interesante observar como en los tratamientos “suaves” que implican una hidrólisis enzimática (individual o combinadas) el porcentaje de carbohidratos degradados fueron mayores que los recuperados, aproximadamente en un 25%, lo que se puede atribuir en gran parte a la actividad metabólica de las bacterias presentes en la biomasa. Para la biomasa de *Scenedesmaceae* cultivada en aguas residuales de purines Martín Juárez et al., (2021) confirmaron la acción del metabolismo bacteriano analizando la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa en los tratamientos aplicados (hidrólisis químicas y métodos secuenciales de molino de bolas y ultrasonidos acoplados a hidrólisis enzimática). Por un lado, no se encontró ADN bacteriano en las muestras después de los tratamientos ácido (HCl 2M, 1h, 121°C) y alcalino (NaOH 2M, 1h, 121°C) lo que indica una esterilización completa debido a una desintegración completa de las bacterias lo que sugiere que la generación de subproductos podría atribuirse a las reacciones químicas que se producen durante estos tratamientos. Por otro lado, los pretratamientos con ultrasonidos y molienda mostraron una degradación muy limitada del ADN bacteriano y el análisis de qPCR mostró un 66.8% de bacterias vivas en esta biomasa tras los pretratamientos aplicados. Por tanto, podemos plantear la hipótesis de que los tratamientos “suaves” consiguieron

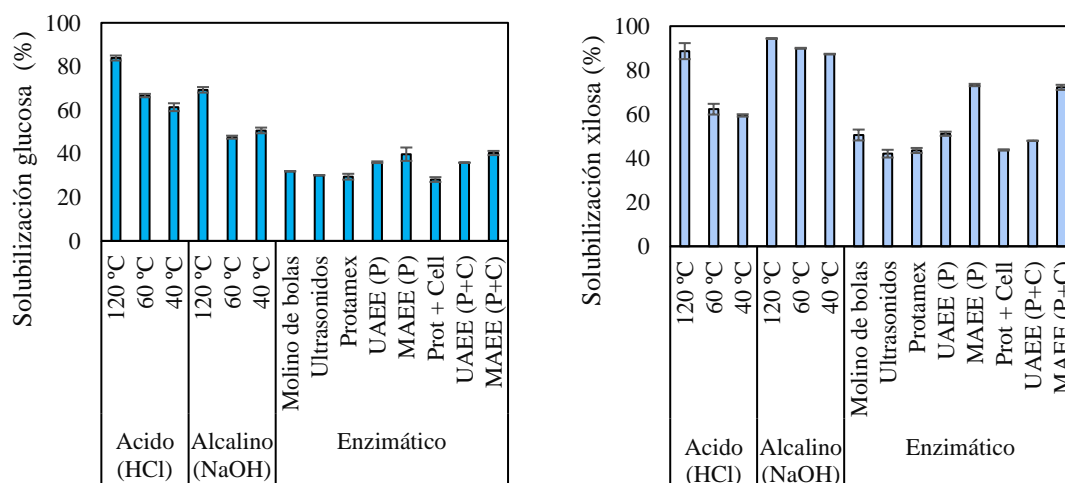
una leve ruptura celular pero sin alterar de forma significativa el ADN bacteriano los cuales utilizan los productos de solubilización para mantener su integridad dentro de la biomasa, de esta manera las bacterias viables en la biomasa degradarían los componentes solubilizados y los productos de valorización posteriores y competirían con los microorganismos de fermentación en las posteriores etapas de valorización (Fuentes et al., 2016; Kang et al., 2021; Martín Juárez et al., 2021),

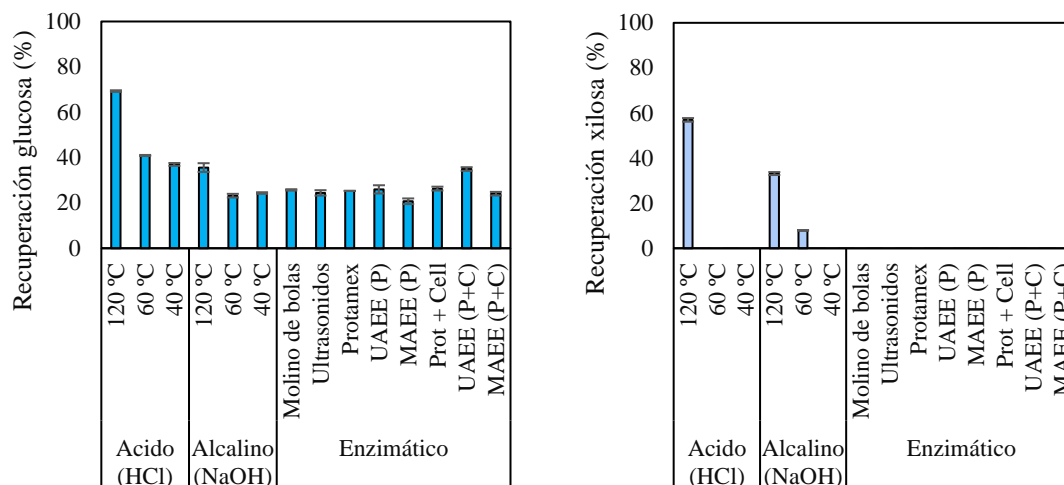
Finalmente, en relación con los métodos combinados asistidos, la máxima solubilización del 57.9% y 56.2% se obtuvieron con MAEE (P) y MAEE (P+C), es decir, casi un 33% superior que la hidrólisis únicamente con Protamex (3h) y con la combinación Protamex + Celluclast (3h) en un tiempo de tratamiento más corto (1h) a la misma concentración de enzima (1:100 g/g para Protamex y 10 FPU/mL para Celluclast 1.5L) mientras que UAEE (P) y UAEE (P+C) tras 1h dieron lugar a solubilización muy similares, un 45.8%, rendimientos muy superiores a los obtenidos sólo con Protamex pero aplicando un tiempo de hidrólisis más largo (3h). El test de Duncan confirmó con un 95% de confianza que existían diferencias significativas entre los tratamientos combinados asistidos (MAEE y UAEE) y las hidrólisis enzimáticas individuales (Protamex y Protamex + Celluclast 1.5L). Las mejoras conseguidas por la aplicación simultánea de ultrasonidos o microondas con hidrólisis enzimática podría estar relacionada con la rotura de agregados en la biomasa que podrían limitar la difusión durante la hidrólisis enzimática en una única etapa (Gerde et al., 2012; Wang & Yuan, 2015) o bien al rápido calentamiento inducido por la radiación microondas que conduce a una alta temperatura interna en la biomasa tratada y una diferencia de presión que afecta a la integridad de la pared celular mejorando la tasa de transferencia de masa (Rokicka et al., 2020). En este sentido Rojo et al. (2021) informaron de la necesidad de casi 5h de hidrólisis enzimática, de una suspensión al 5% de *Scenedesmus almeriensis* crecidas en purines de cerdo, con Protamex (1:100 g/g, 50°C) para conseguir un rendimiento de solubilización próximo al 30%. La aplicación de ultrasonidos y microondas, además, produce una reducción del volumen celular aparentemente no significativa, y una homogeneización que promueven fisuras y grietas en la superficie de las células de las algas y, en consecuencia, mejora la accesibilidad de las enzimas y con ello su actividad (Ardiles et al., 2020; Ciko et al., 2018). Los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron empleando la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos con valores de 31.9% y 18.9% correspondientes a UAEE (P+C) y UAEE (P) que, curiosamente, corresponden a los métodos asistidos que menor solubilización presentan pero con menores porcentajes de degradación (13.8% y 26%) mientras que en el caso de MAEE (P+C) y MAEE (P) las recuperaciones fueron del 22.7% y 12.7%. Los resultados parecen indicar que, aunque con microondas se consigue una mayor disrupción celular y, por tanto, una mayor solubilización de estos componentes, los carbohidratos liberados se degradan debido a la conversión de la energía electromagnética en calor provocando un

calentamiento local excesivo sobre las moléculas dieléctricas, como los mono- y di-sacáridos, como resultado de las fuerzas de fricción de los movimientos inter e intramoleculares (Rokicka et al., 2020) lo que condujo a porcentajes de degradación del 45% y 33% para la hidrólisis con Protamex y la combinación enzimática. Por otro lado se ha informado que el tratamiento con radiación microondas de biomasa vegetal con altos contenidos en polisacáridos (celulosa y quitina) y carbohidratos (glucosa, xilosa, sacarosa y celobiosa) conducen a la formación de productos de degradación como el ácido levulínico su derivado reducido y deshidratado, la  $\gamma$ -valerolactona (GVL), que pueden utilizarse para la producción de hidrocarburos funcionalizados, que podrían ser potenciales moléculas plataforma para la industria química (Kłosowski et al., 2020; Szabolcs et al., 2013).

### 5.4 SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE MONOSACÁRIDOS

Se analizaron las concentraciones de monosacáridos más abundantes (glucosa y xilosa) recuperados en las fracciones líquidas tras el pretratamiento y la hidrólisis enzimática para evaluar las alternativas de valorización de los carbohidratos. Las diferencias entre los carbohidratos solubilizados y los monosacáridos recuperados proporcionaron información sobre las pérdidas de carbohidratos como resultados de las condiciones de pretratamiento o del metabolismo de la biomasa (Chen et al., 2013). Los resultados de los rendimientos de solubilización y recuperación de monosacáridos son en referencia a la cantidad inicial de carbohidratos en la biomasa (21.6% de carbohidratos compuesto por un 11.1% de glucosa, 10.5% de xilosa con una relación glucosa/xilosa inicial de 1.05, < 1% de arabinosa y celobiosa) y se muestran en las Figura 22.





**Figura 22:** Porcentaje de solubilización y recuperación de glucosa y xilosa tras los tratamientos aplicados a la biomasa (5% g/g en 250 mL de agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimáticos secuenciales:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y Ultrasonidos (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** UAAE (P): Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); MAEE(P): Protamex (1:100 g/g) asistido por microondas ( 2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; UAAE (P+C): Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos ( 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; MAEE(P+C): Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s,38596 J/g), 1h. Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

Los mayores rendimientos de solubilización de glucosa se obtuvieron en los tratamientos ácidos con relaciones de glucosa a xilosa menores a la biomasa inicial (0.95), mientras que los rendimientos de solubilización de xilosa fueron considerablemente mayores en la hidrólisis alcalina con una relación glucosa/xilosa de 0.73. En ambas hidrólisis químicas, la solubilización disminuyó con la temperatura en el que se produjo un cambio grande en la relación glucosa/xilosa al disminuir la temperatura por debajo de 120°C. Para el tratamiento ácido a 40°C y 60°C esta relación varió en 1.07 y 1.03 muy cercana a la de la biomasa inicial (1.05) debido a que bajas temperaturas requieren de tiempos más largo de hidrólisis para la conversión de los carbohidratos a monosacáridos simples, es decir, la capacidad general de la hidrólisis es una función de la acción combinada de la temperatura y el tiempo de reacción (Markou et al., 2013) mientras en el tratamiento alcalino el cambio en glucosa/xilosa fue mucho más marcado con relaciones de 0.7 y 0.5 a 60°C y 40°C frente al de la biomasa inicial. Sin embargo, el tratamiento ácido a 120°C soportó el mayor rendimiento de recuperación de ambos monosacáridos, 69.3% y 59.9%, con proporciones de glucosa a xilosa de 1.2 y bajos factores de pérdidas de carbohidratos (26%). A 120°C, los rendimientos de recuperación de glucosa y xilosa de la hidrólisis alcalina fueron algo más moderados, 35.6% y 33.1%, con una relación de glucosa a xilosa cercana al de la biomasa

inicial pero los altos factores de pérdidas de carbohidratos (38%) pusieron en peligro los altos rendimientos de solubilización de carbohidratos que permitía este tratamiento. Por otro lado, los altos factores de degradación de xilosa, superiores al 31% y 61% para el tratamiento ácido y alcalino a las tres temperaturas ensayadas (120°C, 60°C y 40°C), condujeron a una menor recuperación de los carbohidratos para ambos tratamientos (Figura 21B). El tratamiento ácido dio lugar a una mayor proporción de glucosa que de xilosa en los monosacáridos recuperados debido a la combinación de una mayor solubilidad y a una menor degradación de la glucosa (entre un 15% y 25%) que de xilosa (entre un 31.7% y 62.7%) para las tres temperaturas ensayadas. Los resultados parecen indicar que el tratamiento ácido con HCl solubilizó principalmente glucosa mientras que el tratamiento alcalino con NaOH solubilizó principalmente xilosa que podría atribuirse a la presencia de xilosa unida a proteínas (glucoproteínas) en la composición de la pared celular de esta microalga (Rojo et al., 2021) debido a que la hidrólisis alcalina libera proteínas y, por tanto, la xilosa asociada a las mismas. Martín Juárez et al., (2021) para biomasa de *Scenedesmus* cultivada en medio de purines obtienen rendimientos de recuperación de monosacáridos superiores a los obtenidos en este trabajo, 81%, tras un tratamiento ácido con HCl (2M, 121°C) con relaciones de glucosa a xilosa cercana a la de la biomasa inicial (compuesta por un 84.4% de glucosa y 15.2% de xilosa) y con factores de pérdidas de carbohidratos del 20%, sin embargo, empleando el tratamiento alcalino con NaOH (2M, 121°C, 1h) los rendimientos de recuperación fueron muy inferiores, del 17.8%, con elevadas pérdidas de carbohidratos (70%) aunque con mayores proporciones de glucosa y xilosa en los monosacáridos recuperados ( $\approx 10$ ). El análisis ANOVA mostró diferencias significativas (valor  $p < 0.05$ ) para el rendimiento de solubilización y recuperación de estos monosacáridos, sin embargo, la contribución de los parámetros fue distinta según el monosacárido considerado. En la solubilización de glucosa el factor que más influye (con una contribución del 60.5%) fue la temperatura. El test de Duncan mostró diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%, para las tres temperaturas evaluadas en el tratamiento ácido (120°C, 60°C y 40°C) mientras que en el caso de la xilosa el factor que más influye (con una contribución de 53%) en la solubilización fue el tipo de hidrólisis y el test de Duncan, a un nivel de confianza del 95%, no mostró diferencias significativas entre las temperaturas inferiores a 120°C. Markou et al. (2013), evaluaron la capacidad de producción de bioetanol a partir de hidrolizados de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* usando HCl bajo cuatro concentraciones y temperaturas diferentes (0.5 a 2.5 M) a 40°C, 60°C, 80°C y 120°C. Los resultados evidenciaron que incluso en concentraciones de HCl 2.5 M tras 48h de hidrólisis a 40°C los rendimientos de glucosa no superaron el 4% mientras que a 60°C y 80°C tras 48h de hidrólisis con HCl 2.5 M los rendimientos de glucosa solo aumentaron en un 5% y 10%. Resultados similares fueron descritos por N. Zhou et al. (2011) para la recuperación de glucosa a partir de biomasa de *Chlorella vulgaris* empleando un 2% de HCl mientras que para *C. reinhardtii* empleando ácido sulfúrico diluido (3% en peso) durante 30 min a 100°C se obtuvieron un

rendimiento máximo de 95% de glucosa (Nguyen et al., 2009). Las diferencias entre el rendimiento de la hidrólisis química (ácida y alcalina) podrían deberse al hecho de que la hidrólisis alcalina escinde los enlaces intermoleculares entre polisacáridos complejos y libera fibras de carbohidratos y otros componentes poliméricos al medio, pero no descompone los carbohidratos complejos en azúcares simples. Sin embargo, en la hidrólisis ácida, las largas cadenas de celulosa se descomponen en oligómeros y monómeros más cortos que liberan glucosa y otros monosacáridos (Li et al., 2020; Pereira et al., 2018; Vlaskin et al., 2017) aumentando de esta manera la solubilización de glucosa en los tratamientos ácidos mientras que en el tratamiento alcalino la xilosa es el monosacárido que presenta mayor solubilización en gran parte debido a la mayor accesibilidad del NaOH a la pared celular de la microalga provocando cambios estructurales que facilitan la liberación de los monosacáridos, además, el tratamiento alcalino produce una mayor liberación de proteínas y, por consiguiente, solubiliza la xilosa asociada a las mismas (Harun et al., 2011; D. Hernández et al., 2015). Así mismo, los rendimientos de recuperación de monosacáridos sólo fueron un 15% inferiores a los reportados por Martín Juárez et al. (2021) para una biomasa con un contenido de carbohidratos 2 veces superior a la biomasa evaluada en este trabajo.

El tratamiento enzimático con la enzima Protamex y la combinación Protamex + Celluclast 1.5L mantuvieron similares proporciones de solubilización para ambos monosacáridos con una relación glucosa a xilosa de 0.7 y 0.6, respectivamente, con altas solubilizaciones de xilosa en ambas hidrólisis. Sin embargo, las altas pérdidas de xilosa en los tratamientos enzimáticos (100%) condujeron a que este monosacárido finalmente no fuese recuperado mientras que en el caso de la glucosa las recuperaciones estuvieron en concordancia con las solubilizaciones con rendimiento finales del 25.3% y 26.3% para la hidrólisis con Protamex y Protamex + Celluclast 1.5L respectivamente. El análisis ANOVA y el test de Duncan no mostraron diferencias significativas, a un 95% de confianza en la solubilización y recuperación de estos monosacáridos empleando Protamex o la combinación enzimática. El máximo rendimiento de solubilización de xilosa obtenido con la proteasa (43.5%) se debe principalmente a la mayor solubilización de la xilosa asociada a las proteínas en la composición de la pared celular de *Scenedesmus almeriensis* (Baudelet et al., 2017; Domozych, 2016) ya que las imágenes SEM reportadas por Rojo et al., (2021) para esta misma biomasa tras 5h de hidrólisis enzimática con la proteasa Protamex (1:100 g/g<sub>biomasa</sub>, 50°C) no evidenciaron ruptura en la pared celular de esta microalga aunque fue interesante observar como la combinación enzimática con Celluclast 1.5L no consiguió mejorar estos rendimientos (43.8%) a pesar de que el cóctel de Celluclast 1.5L es producido por *Trichoderma reesei*, un conocido productor de xilanasa (Travaini et al., 2016). Resultados similares fueron descritos por Rojo et al., (2021) quienes informaron de una mayor solubilización de xilosa, del 38% frente al 35% de glucosa, a partir de un consorcio basada en

*Scenedesmus almeriensis* cultivada en medio purines tras 5h de hidrólisis enzimática con Protamex (1:100 g/g, 50°C, 300 rpm). Finalmente, las altas pérdidas de xilosa condujeron a una recuperación de la misma inferior al 5% con una recuperación máxima de glucosa del 20.5%. Estos mismos autores describen que obtuvieron mayores solubilizaciones de xilosa al utilizar la enzima Protamex (del 20.6% al 38% tras 1 y 5 horas de hidrólisis) que en los experimentos con Celluclast 1.5L en las mismas condiciones. Por otro lado, a partir de biomasa formada principalmente por *Scenedesmus obliquus* cultivada en aguas residuales domésticas Martín Juárez et al., (2016) llevaron a cabo una hidrólisis enzimática con dos enzimas comerciales, Celluclast 1.5L y Novozyme 188, durante 48h y analizaron las concentraciones de monosacáridos y subproductos de degradación en la fracción líquida. Los resultados revelaron altas recuperaciones de glucosa (93.6%) y xilosa (23.5%) que los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, aplicando el mismo proceso a una biomasa cultivada en aguas residuales de purines y formada principalmente por *Scenedesmus obliquus* (39%) y cianobacterias *Aphanothece* sp (61%), encontraron una alta solubilización de carbohidratos (81%) con recuperaciones de monosacáridos tan bajas (< 1%), muy inferiores a las encontrados en este trabajo, con una alta concentración de subproductos, principalmente ácido acético (5.33 g/L). Por otro lado, los rendimientos de recuperación de monosacáridos obtenidos por Martín Juárez et al., (2021) fueron inferiores al 14.1% con biomasa de microalgas basada en *Scenedesmaceae* cultivada en aguas residuales de purines y un tiempo de hidrólisis enzimática de 12h con Celluclast 1.5L y Novozyme 188. Estos resultados muestran la gran variación que la especie de microalga, el medio de crecimiento, el tiempo de hidrólisis y el cóctel enzimático tienen sobre la solubilización y recuperación de monosacáridos.

La combinación del pretratamiento de la biomasa con molienda y la hidrólisis enzimática proporcionaron relaciones de glucosa a xilosa de 0.5 con altas solubilizaciones de xilosa frente a glucosa (50.5% vs 28.1%) aunque, nuevamente, la xilosa se degradó en su totalidad lo que condujo finalmente a que este monosacárido no fuese recuperado mientras que en el caso de la glucosa sólo se observó un 2.4% de pérdidas lo que llevó finalmente a un rendimiento de recuperación de este monosacárido en un 25.7%. El pretratamiento con ultrasonidos no introdujo una mejora en los resultados de la hidrólisis enzimática de ninguno de los monosacáridos con relaciones de solubilización glucosa/xilosa de 0.6, en comparación con la molienda la solubilización de xilosa fue algo inferior (46.9%) aunque, de nuevo, se produjo la pérdida de la totalidad de este monosacárido dando lugar únicamente a un 24.4% de recuperación de glucosa. La notable solubilización de carbohidratos lograda durante la hidrólisis enzimática de las suspensiones pretratadas con molienda y ultrasonidos (Figura 21A) fue contrarrestada por los altos factores de pérdidas de carbohidratos que se produjeron en estos experimentos (Figura 21B) atribuidas directamente al metabolismo activo de las bacterias (Fuentes et al., 2016). Martín Juárez et al., (2021) llegaron a estas mismas conclusiones tras 12h de hidrólisis enzimática de



biomasas basada en *Scenedesmaceae* pretratadas con molienda y ultrasonidos en las mismas condiciones empleadas en este trabajo donde las altas pérdidas de carbohidratos (> 65%) estuvieron en concordancia con la alta cantidad de subproducto generados tras la hidrólisis enzimática lo que supuso un rendimiento de monosacáridos del 31.3% y 23.5% para el tratamiento con molienda y ultrasonidos, respectivamente. Alavijeh et al., (2020) recuperaron el 37% de los monosacáridos de *Chlorella vulgaris* pura pretratada con molienda aplicando hidrólisis enzimática con celulasas. Los rendimientos de recuperación de monosacáridos de la hidrólisis enzimática para las muestras pretratadas con explosión de vapor y ultrasonidos oscilaron entre el 16% y el 40% debido a los altos factores de pérdidas de carbohidratos en hidrólisis enzimática de estos experimentos (>50%).

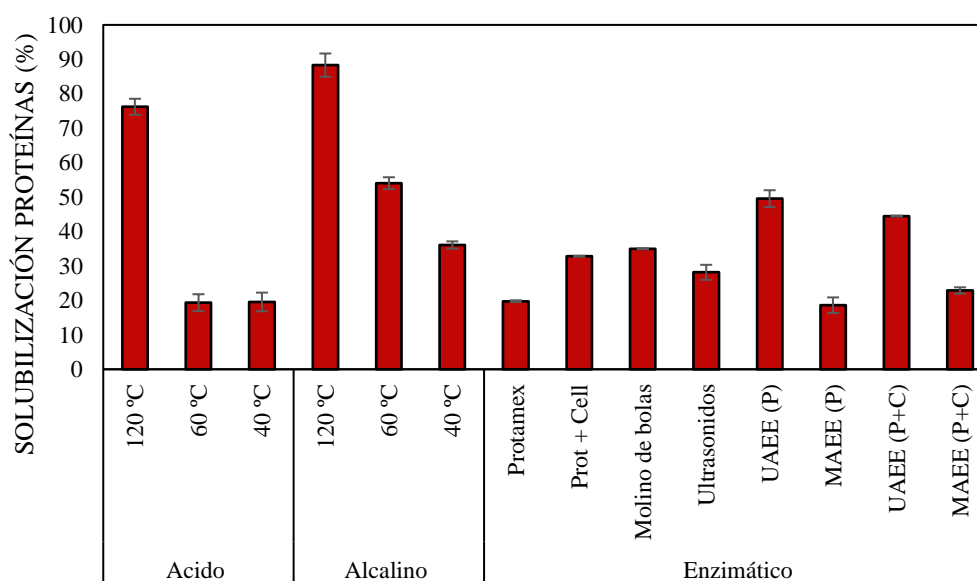
Los métodos de hidrólisis enzimática con Protamex asistidos por ultrasonidos y microondas, UAEE(P) y MAEE(P) proporcionaron relaciones glucosa a xilosa de 0.7 en ambos experimentos. Ambos métodos combinados dieron lugar nuevamente a solubilizaciones mayores de xilosa, aunque el alto factor de degradación de este monosacárido, 51.1% y 72.2%, condujo a que la xilosa no se recuperara mientras que la recuperación de glucosa obtenida fue del 26% y 20.7% con pérdidas del 10.1% y 19.1%. Por otro lado, empleando UAEE y MAEE asistidos junto con la combinación enzimática (Protamex + Celluclast 1.5L) se consiguió una mejora en los rendimientos con altas solubilizaciones de glucosa (35.9% y 37.3%) y xilosa (51.4% y 72.20), respectivamente, superiores al obtenido con la hidrólisis asistida con Protamex. En ambos casos la xilosa se degradó completamente por lo que no fue recuperada mientras que en el caso de la glucosa se obtuvo un rendimiento máximo del 35% empleando UAEE(P+C) gracias al bajo factor de degradación (inferior al 1%) obtenido. Esta recuperación fue prácticamente idéntica al 35.6% obtenido con la hidrólisis alcalina a 120°C pero empleando un método mucho más suave y sostenible. En contraposición, la hidrólisis con la combinación enzimática asistida por microondas (MAEE(P+C)) condujo a una mayor degradación de la glucosa (13.2%) lo que dio lugar a una recuperación mucho inferior que el tratamiento con UAEE(P+C) de 24.1%.

El análisis ANOVA y el test de Duncan no evidenció la existencia de diferencias significativas entre la solubilización y recuperación de monosacáridos a un 95% de confianza entre los métodos combinados con Protamex y la combinación enzimática Protamex + Celluclast 1.5L. Las altas pérdidas obtenidos se pueden deber nuevamente al metabolismo activo de las bacterias presentes en la biomasa aún tras el tratamiento aplicado. Otros autores también describen que se puede producir altas degradaciones de xilosa a moléculas furánicas empleando radiación microondas. En este sentido, Padilla-Rascón et al., (2020) explica que la deshidratación de las pentosas, como la xilosa, mediante radiación microonda implican la protonación de tres átomos de carbono del anillo del azúcar, eliminando tres moléculas de agua obteniendo las moléculas furánicas. En la reacción de deshidratación también se producen reacciones

secundarias no deseadas, por condensación entre el furfural y los productos intermedios de la deshidratación y por la degradación de las pentosas a productos de bajo peso molecular, generando productos secundarios solubles e insolubles denominadas huminas. Por otro lado, se informó también de la degradación de la glucosa a 6-anhidro-β-d-glucopiranosido (levoglucosan) promovida por la acción de un horno microondas a biomasa vegetal durante 10 minutos a 170W (Richel et al., 2011).

### 5.5 SOLUBILIZACIÓN Y RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS

El balance de materia al nitrógeno antes y después de cada proceso reveló pérdidas muy bajas, con recuperaciones cuantitativas de nitrógeno tras el proceso de hidrólisis en todos los experimentos, completando satisfactoriamente el balance de materia con pérdidas inferiores al 1%. Como se muestra en la Figura 23 se lograron altas solubilizaciones de proteínas empleando ambas hidrólisis químicas a 120°C (76.2% para la hidrólisis ácida y 88.3% para la hidrólisis alcalina).



**Figura 23:** Porcentaje de solubilización de proteínas tras los tratamientos aplicados a la biomasa (5% g/g en 250 mL de agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimáticos secuenciales:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y Ultrasonidos (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** UAEE (P): Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); MAEE(P): Protamex (1:100 g/g) asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; UAEE (P+C): Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos (50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; MAEE(P+C): Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g), 1h. Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

A diferencia de los resultados obtenidos para los carbohidratos con la hidrólisis ácida, en este contexto, parece que la hidrólisis alcalina solubilizó y recuperó principalmente proteínas promoviendo la ruptura de los enlaces de hidrógeno y la disociación del hidrógeno de las proteínas lo que puede mejorar la solubilidad de las mismas bajo condiciones alcalinas (Lu et al., 2019). Estas mismas conclusiones fueron descritas por Martín Juárez et al., (2021) quienes obtuvieron mayores rendimientos de solubilización de proteínas con hidrólisis alcalina (85.5%) que con hidrólisis ácida (75.5%) en las mismas condiciones operativas (120°C y un tiempo de hidrólisis de 1 hora) a partir de biomasa algal fresca alimentada con aguas residuales de purines principalmente formada por *Scenedesmaceae*. El análisis ANOVA mostró que los dos parámetros operativos individuales estudiados tuvieron un efecto significativo en la solubilización de las proteínas (valor  $p < 0.05$ ), siendo la temperatura de hidrólisis el parámetro más importante (representando el 80.5% de la contribución), seguido del tipo de hidrólisis y su interacción (contribución del 15.8% y 3.4%, respectivamente). La prueba de Duncan confirmó, con un nivel de confianza del 95%, que existían diferencias significativas entre la hidrólisis ácida y la alcalina y entre las tres temperaturas (120, 60 y 40°C). En estos métodos, la temperatura tiene una gran influencia en el proceso de solubilización, ya que el rendimiento aumenta con la temperatura además, la extracción de algunas proteínas asociadas a la membrana celular, como las glucoproteínas, requiere un gran consumo de energía y puede mejorarse a altas temperaturas (Lu et al., 2019). Su influencia se observó claramente en los ensayos de hidrólisis alcalina, donde la tasa de solubilización aumentó del 36.1% a 40°C y del 54.1% a 60°C al máximo rendimiento del 88.3% a 120°C. Por el contrario, no se observó diferencias de solubilización de proteínas entre las hidrólisis ácidas a 60°C y 40°C, con valores muy bajos en ambas (19%). Estas diferencias observadas entre los tratamientos alcalino y ácido a bajas temperaturas (inferiores a 120°C) puede deberse principalmente a que en el tratamiento alcalino las bajas temperaturas inducen un efecto de mercerización acompañado de un hinchamiento de la pared celular y en consecuencia, la permeabilidad de la pared celular puede ser alterada, haciendo que las células microalgales sean altamente susceptibles a la extracción de proteínas (Soto-Sierra et al., 2021; Ulug et al., 2021). Por otro lado, la mayoría de los aminoácidos tienen solubilidades más bajas en su punto isoeléctrico que ocurre principalmente alrededor del pH 4.5 (Akaberi et al., 2019; Soto-Sierra et al., 2021). Martín-Juárez et al., (2019) informa de un 96% de solubilización de proteínas empleando hidrólisis alcalina (NaOH, 2M) a 120°C utilizando un consorcio de microalgas y bacterias crecidas en medio de cultivo sintético, mientras que Dai et al., (2020) alcanzó un rendimiento del 58% utilizando *Chlorella prothothecoides* con HCl 0.5M y 4 horas a 85°C mientras que este rendimiento disminuyó casi en un 40% cuando la hidrólisis ácida se realizó a 40°C.

En cuanto a los tratamientos enzimáticos, la hidrólisis enzimática tras 3 horas con Protamex proporcionó rendimientos de solubilización de proteínas muy bajos (19.8%), mejorando los resultados cuando se combinaron secuencialmente molino de bolas e hidrólisis enzimática (28.2%) y ultrasonidos e hidrólisis enzimática (35%). En este sentido, Martín Juárez et al., (2021) reportaron un rendimiento de solubilización de proteínas del 37.8% tras 21 minutos de ultrasonidos (115 W, 7168 J/g, 20°C) seguido de 12 h de hidrólisis enzimática con Celluclast 1.5 L y Novozyme 188 a partir de una suspensión al 5% de un consorcio de *Scenedesmaceae* crecida en purines de cerdo. También, Hildebrand et al., (2020) reportaron una recuperación máxima de proteínas del 82.1% a partir de una suspensión de 200 g/L de *Chlorella vulgaris* cuando se combinó 6 h de hidrólisis enzimática con Proteasa AP-30L (*Aspergillus niger*) con un pretratamiento de ultrasonidos durante 10 minutos (100% potencia, 35 kHz) aunque el rendimiento disminuyó casi un 12% cuando la frecuencia del ultrasonido aumentó a 135 kHz.

La adición de celulasas al coctel enzimático mejoró considerablemente la solubilización de proteínas, que alcanzó un 32.8% debido posiblemente al efecto sinérgico anteriormente descrito por Nitsos et al. (2020) y Sathya et al. (2021). Estos resultados evidencian la alta resistencia que presenta la pared celular de *Scenedesmus almeriensis* crecida en el medio de purines donde el tratamiento enzimático con Protamex parece no ser suficiente para una solubilización efectiva de estos metabolitos lo que podría indicar que las proteínas solubilizadas formaban parte de la pared celular, ligadas a carbohidratos, y no son proteínas localizadas en el interior de la membrana plasmática, citoplasma o como parte de orgánulos como el cloroplasto, las mitocondrias, el retículo endoplásmico o dentro del núcleo de la célula (Safi et al., 2014). Rojo et al. (2021) analizaron mediante microscopía SEM el efecto sobre la membrana celular de microalgas *Scenedesmus* de la hidrólisis enzimática con Protamex, observando rugosidades en la pared celular pero no grietas ni roturas en la misma. Las microalgas *Scenedesmus* tiene una pared celular rígida y resistente, compuesta por multicapas fibrosas de celulosa, hemicelulosa y  $\beta$ -glucano además de otros polímeros orgánicos como la esporopolenina y el algaenan, que les hace capaces de soportar condiciones adversas como las de un reactor de tratamiento de aguas residuales (D'Hondt et al. 2017), En este sentido, Rojo et al. (2021) compararon la solubilización de proteínas a partir de un consorcio de *S. almeriensis* -bacterias crecidas en medio de purines (A1) y de *Scenedesmus almeriensis* pura crecida en medio sintético (A2) con Protamex (1:100 g/g, 50°C, 300 rpm). Obtuvieron solubilizaciones del 27.1% para A1 y de 39.2% para A2 tras 5 h de hidrólisis enzimática. Los autores atribuyeron los mayores rendimientos de solubilización de proteínas en A2 a la estructura de la pared celular y al tipo de proteínas, que podrían diferir de las de A1 debido a las diferentes condiciones de crecimiento y cultivo. En este estudio también describen que el tiempo de hidrólisis con Protamex (1, 3 y 5 h) parece no tener una influencia significativa en la solubilización de proteínas aunque encontraron diferencias significativas

cuando evaluaron el empleo de Alcalasa 2.5L frente a Protamex logrando solubilizaciones de proteínas de casi el 69% de estas biomásas, aunque recuperaron péptidos de muy pequeño tamaño.

En cuanto a los tratamientos combinados simultáneos, el ultrasonido potenció la solubilización de las proteínas por las enzimas, obteniendo un rendimiento final del 49.6% con Protamex y del 44.5% con Protamex y Celluclast 1.5L tras una hora de hidrólisis, superior a los controles sólo enzimáticos después de 3 horas (19.8% y 32.8% respectivamente). Estos resultados demostraron que la aplicación simultánea del tratamiento enzimático y de ultrasonidos como método de disrupción complementario dio lugar a una mayor eficiencia en la extracción de proteínas posiblemente porque la fuerza impulsora del ultrasonido creó cavidades que facilitaron la transferencia de materia y, así, el contacto entre los compuestos intracelulares y las enzimas (Le Guillard et al., 2016; Singla & Sit, 2021) de manera que el ultrasonido influye en la actividad de la enzima. En este sentido, Bashari et al., (2013) evaluaron el efecto de la radiación de ultrasonidos en la estructura secundaria y terciaria de las dextranas (enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,6)-d-glucosídicos en sitios aleatorios del dextrano) midiendo los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular en presencia y ausencia de ultrasonidos. Demostraron que la baja intensidad de los ultrasonidos (25 kHz) inducía el desdoblamiento molecular de la enzima, lo que distribuía las interacciones hidrofóbicas de las moléculas proteicas y hacía que más grupos y regiones del interior de las moléculas quedaran expuestas al exterior, lo que disminuía la fluorescencia de la dextranasa. Sin embargo, el análisis de los espectros de dicroísmo circular mostró que la fracción de  $\alpha$ -hélice aumentaba con la irradiación de ultrasonido. Finalmente, los autores atribuyeron este aumento a las transformaciones estructurales inducidas por el tratamiento con ultrasonidos que aumentaba en un 13.45% la actividad de la enzima.

Hasta donde se tiene conocimiento no existen publicaciones que empleen la combinación de ultrasonidos asistido por enzimas para la extracción de macrocomponentes a partir de biomasa microalgal. La mayor parte de las publicaciones referidas a biomasa algal emplean el ultrasonido como pretratamiento combinado secuencialmente a la hidrólisis enzimática (Hildebrand et al., 2020; Martín Juárez et al., 2021) o bien ultrasonidos asistido por disolventes (Lupatini et al., 2017; Vernès et al., 2019) aunque si se ha reportado el uso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos para otros tipos de biomasa como el arroz (Yang et al., 2018) o macroalgas (Le Guillard et al., 2016). Yang et al. (2018) consiguieron un rendimiento de extracción de proteínas cercano al 80% a partir de residuos de arroz tras 3 horas de UAEE a 50°C con un 1% [E/S] de  $\alpha$ -amilasa como enzima y 35 kHz de frecuencia, un rendimiento superior al del control sin ultrasonidos. Por otro lado, Le Guillard et al., (2016) aplicaron una hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos a la macroalga roja *Grateloupia turuturu* a 40°C durante 6 horas con un cóctel enzimático de cuatro carbohidrolasas industriales (Sumizyme TG, Sumizyme MC, Multifect CX y Ultraflo XL) obteniendo una solubilización de proteínas del 91%, superior a la extracción con

sólo el cóctel enzimático (71%) mientras que Ardiles et al. (2020) concluyeron que el método asistido por ultrasonidos es el más eficaz en la extracción de la ficoeritrina, una proteína-pigmento presente en la microalga roja *Porphyridium*, por encima de las microondas que no mejoraron su extracción.

Por otro lado, los ensayos con MAEE sorprendentemente no mejoraron la eficiencia del proceso, obteniendo un rendimiento de solubilización de proteínas incluso ligeramente inferior al del ensayo de control para MAEE(P) (18.6% vs 19.8%). Esta menor tasa de solubilización con MAEE (P) en comparación con la hidrólisis convencional con Protamex puede ser debido a que durante el proceso con microondas, solo una fracción del agua se mantiene dentro de las células por lo que la mayor parte de la energía de la radiación es absorbida por el medio circundante y se pierde en forma de calor causando la agregación y desnaturalización de las proteínas (Günerken et al., 2015) o simplemente a los menores tiempos de hidrólisis empleados en estos experimentos. Cabe destacar la menor tasa de solubilización en MAEE también trabajando con la combinación de enzimas, MAEE(P+C) que solubilizó únicamente el 22.9% de las proteínas iniciales mientras que en el ensayo de control solubilizó el 32.8%.

Al igual que en el caso de UAEE, hasta donde se tiene conocimiento aún no existen publicaciones relacionadas con la extracción de proteínas a partir de la aplicación simultánea de microondas y enzimas aunque si han aplicado esta metodología a otras biomásas según describe Görgüç et al. (2020) quienes realizaron un MAEE utilizando salvado de sésamo y estudiaron los efectos de las variables independientes, es decir, la temperatura del proceso (25-55 °C), el tiempo (10-120 min) y las concentraciones de alcalasa (0.12-2.40 AU/100 g). Obtuvieron el mayor rendimiento proteico del 90.6% en las condiciones óptimas (49°C, 98 min y 1.94 AU/100 g). Este mejor resultado podría deberse a la enzima utilizada (Alcalasa) que ha demostrado solubilizar una mayor cantidad de proteínas que otras proteasas como Protamex (Rojo et al., 2021) o al diferente sustrato en estudio. El análisis ANOVA mostró que los dos parámetros operativos individuales estudiados tuvieron un efecto significativo en la solubilización de las proteínas (valor  $p < 0.05$ ), siendo el tipo de método el parámetro más importante (representando el 87.2% de la contribución), seguido del tipo de enzima utilizada y su interacción (contribución del 2.8% y 9.3%, respectivamente). El test de Duncan confirmó con un nivel de confianza del 95% que existían diferencias significativas entre ambas enzimas y entre los tres tipos de métodos de extracción (sólo hidrólisis enzimática, UAEE y MAEE). A pesar de los rendimientos moderados obtenidos, estos rendimientos de solubilización seguían siendo inferiores a los obtenidos con los tratamientos químicos, por lo que todavía es necesario investigar y optimizar los procesos UAEE y MAEE para mejorar la extracción.

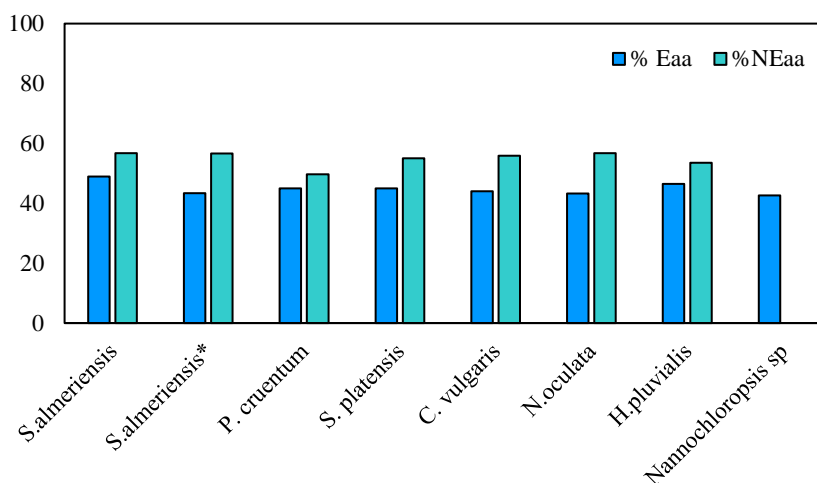
## 5.6 RECUPERACIÓN DE PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS

Se utilizó el análisis de ninhidrina para determinar la presencia de aminoácidos libres en la fracción líquida, dando un resultado positivo de su presencia en el caso de los tratamientos enzimáticos y los tratamientos asistidos (UAEE y MAEE). La prueba resultó negativa para los hidrolizados ácidos y combinaciones secuenciales mientras que los hidrolizados de hidrolisis alcalina, aunque el test de ninhidrina resultó negativo, si se obtuvieron bandas de péptidos por electroforesis para las tres temperaturas ensayadas (120°C, 60°C y 40°C). El método de la ninhidrina tiene algunas interferencias, incluyendo cationes como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Moore et al., 2010) que están presentes en el medio de cultivo, y monosacáridos como la glucosa, que podrían inhibir el desarrollo del color (Haven y Jørgensen, 2014). Por lo tanto, este método no era eficiente para la medición de aminoácidos en este tipo de hidrolizados.

Finalmente, se analizó el perfil de aminoácidos por HPLC de la biomasa original empleada en este trabajo y de las fracciones sólida y líquida de aquellos hidrolizados que mostraron bandas de péptidos en los ensayos de electroforesis. Para estos experimentos seleccionados, se calcularon las proteínas recuperadas como suma de aminoácidos en la fase líquida del hidrolizado.

El perfil de aminoácidos de las biombras inicial y de varias fases sólidas y líquidas se muestran en la Tabla 8. En cuanto al perfil de la biomasa microalgal inicial, el aminoácido principal fue el ácido glutámico (13.9%), seguido del ácido aspártico (10.6%) y la alanina (9.7%) con un porcentaje de aminoácidos esenciales (Eaa) del 48.8% y una distribución Eaa/NEaa de 0.86 con valores elevados de aminoácidos esenciales como la Leu y Lys aunque valores ligeramente inferiores de Val y Phe en comparación con las recomendaciones de la WHO/FAO (Becker, 2007). Según Safi et al. (2014) los principales aminoácidos para especies como *P.cruentun*, *A. platensis*, *C.vulgaris*, *N.oculata*, y *H.pluvalis* son el ácido aspártico (entre un 9.8% -13.1%), ácido glutámico (entre 9.0% - 11.6%) y alanina (7.4% - 12.4%) lo que coincide con los resultados obtenidos para nuestra biomasa aunque los %Eaa son inferiores en estas microalgas ( $\approx 43\%$ ) respecto a la biomasa evaluada en este trabajo (Figura 24) con una distribución promedio de Eaa/NEaa de 0.83. Vizcaíno et al. (2019) analizaron el perfil de aminoácidos de *Scenedesmus almeriensis* obteniendo porcentajes como los de este estudio con algunas variaciones. Sus principales aminoácidos fueron también el ácido glutámico, el ácido aspártico y la alanina, pero con valores más bajos (10.2%, 8.5% y 7.6% respectivamente) mientras que los porcentajes del resto de aminoácidos fueron mayores en nuestra biomasa, excepto la isoleucina (3.1%) y la valina (4.1%) aunque la distribución Eaa/NEaa fue similares (0.87). Por otro lado, Rojo et al. (2021) compararon el perfil de aminoácidos de *Scenedesmus almeriensis* cultivada en medio sintético y en medio de purines concluyendo que ambas biombras iniciales tenían perfiles de aminoácidos

similares, lo que demuestra que el medio de crecimiento y la presencia de bacterias no tuvieron ningún efecto sobre la composición de aminoácidos de la fracción proteica. Se encontró una elevada presencia de ácido glutámico (13.9% y 13.5%) y ácido aspártico (10.6% y 10.9 %) en ambas biomasa con valores de aminoácidos y ratios Eaa/NEaa prácticamente idénticos a las obtenidos en este trabajo.



**Figura 24:** Distribución del porcentaje de aminoácidos esenciales (Eaa) y no esenciales (NEaa) para la biomasa evaluada en este trabajo frente a otras microalgas. **Microalgas:** *S. almeriensis* cultivada en purines (este trabajo) ; *S.almeriensis\** pura en medio sintético (Rojo et al., 2021); *P.cruentum*, *A. platensis*, *C.vulgaris*, *N.oculata*, y *H.pluvalis* (Safi et al., 2014); *Nannochloropsis sp* (Soto-Sierra et al., 2021).

Rangos similares de Eaa/NEaa fueron encontrados para *Scenedesmus almeriensis* cultivada en medio de purines tras un tratamiento enzimático y alcalino reportados por Rojo et al. (2021) y Lorenzo-Hernando et al. (2019) con enriquecimiento en los aminoácidos esenciales como Leu e Ile. Safi et al., (2014) analizaron el perfil de aminoácidos de varias especies de microalgas, incluyendo *C.vulgaris* y *S. platensis*, así como el de los extractos obtenidos tras un tratamiento alcalino y homogenización a alta presión (HPO). En términos generales los ratios Eaa/NEaa fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo, en el intervalo de 0.48 – 0.64 para el tratamiento alcalino y 0.33 – 0.45 para el tratamiento con HPO. Los extractos obtenidos a partir de la biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales de purines en este trabajo tenían una mayor proporción y una mejor distribución de aminoácidos, con mayores contenidos de aminoácidos esenciales como His, Thr, Leu y Lys, y menores cantidades de Ala, Glu y Asp que los obtenidos a partir de la biomasa de *C.vulgaris* y *S. platensis*.



**Tabla 8:** Composición de aminoácidos (%) de la biomasa inicial y de las fracciones sólidas y líquidas seleccionadas tras la hidrólisis enzimática, en referencia a la masa total de aminoácidos.

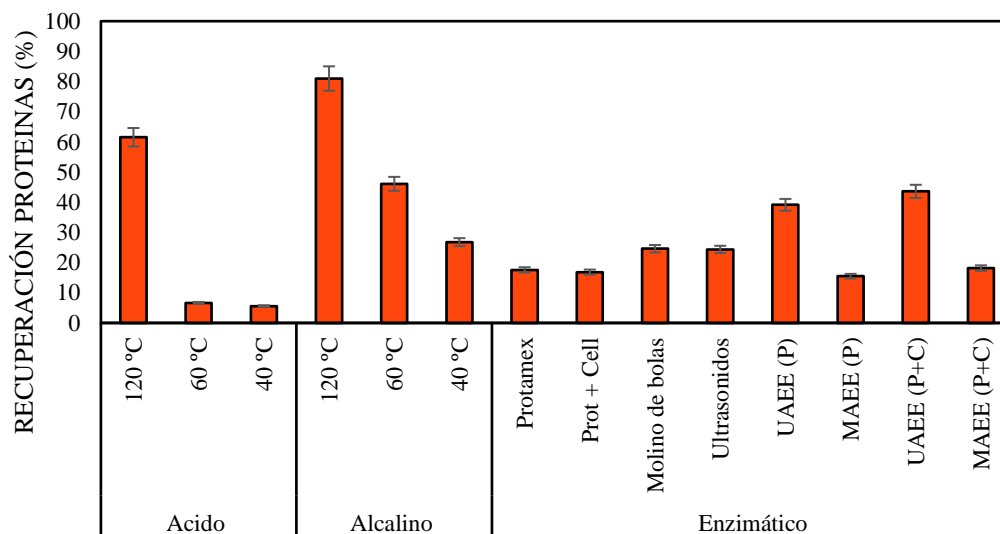
AA	FRACCIÓN SÓLIDA							FRACCIÓN LÍQUIDA							
	Inicial	Protamex	UAEE (P)	MAEE (P)	P+C	UAEE (P+C)	MAEE (P+C)	Inicial	Protamex	UAEE (P)	MAEE (P)	P+C	UAEE (P+C)	MAEE (P+C)	NaOH
<b>Asp</b>	10.57	10.73	10.77	10.93	10.61	10.74	10.74	11.94	13.29	11.45	12.43	12.78	12.34	11.94	13.56
<b>Glu</b>	13.95	11.92	11.28	12.33	11.88	11.47	11.88	13.26	14.53	17.17	12.71	13.11	18.37	13.26	16.22
<b>Ser</b>	5.67	5.50	5.34	5.57	5.50	5.40	5.33	4.77	5.59	5.12	5.08	5.56	5.77	4.77	1.76
<b>His*</b>	2.15	2.27	2.34	2.27	2.26	2.50	2.34	1.86	1.74	1.20	5.93	2.00	1.05	1.86	0.54
<b>Gly</b>	6.60	7.14	7.26	7.20	7.16	7.17	6.94	8.22	7.33	6.63	7.91	7.33	6.56	8.22	10.23
<b>Thr*</b>	4.70	5.34	5.17	5.27	5.27	5.42	5.33	6.37	5.84	5.12	5.93	3.67	5.25	6.37	0.24
<b>Arg*</b>	6.45	6.41	6.54	6.66	6.61	6.63	6.41	3.71	4.84	6.33	3.67	5.56	6.56	3.71	0.24
<b>Ala</b>	9.70	9.14	8.81	9.11	9.18	8.79	8.98	7.43	10.93	12.95	8.19	9.56	13.12	7.43	12.83
<b>Tyr</b>	3.71	4.11	4.23	4.00	4.14	4.38	4.09	4.24	4.10	3.01	3.95	4.11	3.15	4.24	4.96
<b>Cys</b>	0.88	0.82	0.88	0.78	0.91	0.64	1.1	0.80	0.50	0.60	0.85	0.67	0.52	0.80	5.15
<b>Val*</b>	4.10	4.50	4.46	4.56	4.46	4.76	4.69	5.31	3.85	3.31	4.52	4.11	3.41	5.31	5.27
<b>Met*</b>	2.22	2.36	2.44	2.48	2.55	2.39	2.40	2.39	2.11	1.51	1.98	2.44	1.31	2.39	2.42
<b>Phe*</b>	5.22	5.80	6.21	5.49	5.77	6.31	5.89	4.77	4.22	3.31	4.24	4.89	3.41	4.77	5.75
<b>Ile*</b>	3.10	3.57	3.62	3.51	3.48	3.78	3.74	2.65	2.36	5.12	1.41	2.78	1.84	2.65	1.27
<b>Leu*</b>	8.92	9.96	10.23	9.71	9.95	10.31	9.87	8.22	5.71	6.33	7.91	8.89	6.56	8.22	9.93
<b>Lys*</b>	6.39	6.86	6.55	7.10	6.78	6.54	6.82	7.96	7.45	6.02	6.50	6.56	6.04	7.96	5.33
<b>Pro</b>	5.66	3.57	3.85	3.04	3.49	2.77	3.45	6.10	5.59	4.82	6.78	6.00	4.72	6.10	4.30
<b>%EAA</b>	48.83	65.92	68.74	68.14	68.52	69.62	68.60	43.24	38.12	38.25	42.09	40.90	35.43	43.24	30.02
<b>Eaa/NEaa</b>	0.86	1.25	1.31	1.29	1.30	1.36	1.31	0.76	0.76	0.62	0.73	0.70	0.55	0.76	0.43

**AA-aminoácidos:** Asp – ácido aspártico, Glu-ácido glutámico; Ser- serina; His-histidina; Gly-glicina; Thr-treonina; Arg-arginina; Ala-alanina; Tyr-tirosina; Cys-cisteína; Val-valina; Met-metionina; Phe-felinalanina; Ile-isoleucina; Leu-leucina; Lys-lisina; Pro-prolina. **Tratamientos:** UAEE (P): Ultrasonidos (1h 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/gbiomasa) con Protamex 1:100 g/g; MAEE(P): Microondas (1h, 2.5 GHz ) con Protamex 1:100 g/g; P+C: 1 h hidrólisis enzimática con Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL ; UAEE (P+C): Ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/gbiomasa) con Protamex 1:100 g/g y Celluclast 10 FPU/mL ; MAEE(P+C): Microondas (1h, 2.5 GHz, 134 J/s,38596 J/g) junto con Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL. \* Aminoácido esenciales (**Eaa**); **NEaa**-aminoácidos no esenciales.

Tras la hidrólisis enzimática, todos los aminoácidos estuvieron presentes en la fracción líquida y no se observaron diferencias muy notables en la distribución de las cantidades de cada aminoácido, obteniéndose valores similares en todas las muestras (Tabla 8). Cabe destacar el alto porcentaje de ácido glutámico en la fracción líquida obtenidas con UAEE (17.2% para la proteasa y 18.4% para la combinación enzimática) que podría estar relacionado con la presencia de residuos de Ribonucleasa T<sub>1</sub> (principal endonucleasa producida por *Bacillus*). Rojo et al. (2021) describieron este mismo efecto en la biomasa de *Scenedesmus almeriensis* cultivada en purines de cerdo tras una hidrólisis enzimática con Protamex (5h, 50°C, 300 rpm) destacando el alto contenido de ácido glutámico (17.37%) así como altos contenidos de alanina. En general se encontró una buena relación Eaa para todos los extractos con valores en el intervalo de 38.3% y 61.9% superiores a los encontrados, por ejemplo, en la soja (35.9%) o suero de leche (45%) (Kalman, 2014) aunque los ratios Eaa/NEaa fueron ligeramente inferior a la biomasa inicial presentando valores de 0.55 a 0.76 que están dentro del rango de la media Eaa/NEaa reportado para la soja, suero de leche y huevo (Becker, 2007; Kalman, 2014)

Las recuperaciones (Figura 25) calculadas a partir de los perfiles de aminoácidos fueron inferiores a la solubilidad de las proteínas de los mismos experimentos (Apartado 4.5), debido a la degradación de parte de las proteínas liberadas. Como se muestra en la Figura 25, se obtuvieron mayores recuperaciones de péptidos (80.9%) para la hidrólisis con mayor solubilización de proteínas (NaOH 2M a 120°C) mientras que la hidrólisis ácida a 120°C también proporcionó buenas recuperaciones, aunque con pérdidas dos veces superior al del tratamiento alcalino (16.3%), lo condujo a una recuperación de proteínas del 61.5% para este tratamiento. Las pérdidas por degradación obtenidas se pueden deber, posiblemente, a la desnaturalización de las proteínas liberadas por la combinación de altas temperaturas y bajo pH, además, la presencia de altas concentraciones de glucosa (un azúcar reductor) con la combinación de altas temperaturas y pH alcalinos pueden originar degradación de proteínas a través de la reacción de Millard (Lund & Ray, 2017). Por otro lado, en ambas hidrólisis se observó un efecto muy marcado de la temperatura sobre la recuperación de los péptidos. Los tratamientos alcalinos a 60°C y 40°C proporcionaron rendimientos de recuperación del 46.1% y 26.8, respectivamente, con pérdidas por degradación inferiores al 9% mientras que el tratamiento ácido las pérdidas obtenidas fueron superiores al 12% lo que condujo finalmente a una recuperación inferior al 6% a estas temperaturas. Estos resultados coinciden a su vez con las menores solubilizaciones que presentaron las proteínas a estas temperaturas en ambos tratamientos lo que parecen indicar que menores temperaturas requieren mayores tiempos de hidrólisis (García et al., 2018; Safi et al., 2014). Los resultados parecen indicar que las altas temperaturas y los pH alcalino permiten una mayor recuperación, con bajas pérdidas por degradación, de los péptidos liberados debido, en gran parte, a la facilidad del tratamiento alcalino para provocar alteraciones en las propiedades

superficiales de la pared celular ya que el hidróxido sódico es capaz de realizar un proceso similar a la mercerización, al penetrar en la estructura microcristalina de la pared celular de la microalga permitiendo un mayor acceso a las proteínas citoplasmática promoviendo una mayor solubilización, además, los pH alcalino (>10) permiten mantener la integridad de los péptidos liberados evitando los procesos de racemización lo que ha conducido a una mayor recuperación de los mismos con el tratamiento alcalino (Sari et al., 2015). Safi et al., (2014) evaluaron el efecto de diferentes técnicas de disrupción celular (alcalino, molienda, ultrasonidos y homogenización a alta presión) sobre la recuperación de proteínas en cinco microalgas (*Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Porphyridium cruentum* y *Nannochloropsis oculata*) con diferentes macroestructuras en su pared celular. Los resultados revelaron que el tratamiento químico con NaOH (2M, 40°C y 2h) fue el tratamiento clave para conseguir una recuperación del 15.8% de proteínas en *Haematococcus pluvialis*, una especie con una pared celular muy rígida y resistente formada por una capa trilaminar de celulosa, algaenan y esporopolenina similar a *Scenedesmus*. Para el resto de microalgas, con una pared celular relativamente más frágil, las recuperaciones oscilaron entre un 31.1% y 73.5%. Aunque la hidrólisis alcalina proporcionó buenos rendimiento de recuperación, la calidad de los péptidos obtenidos, en término de tamaño, fueron menores que las de las hidrólisis enzimática y métodos asistidos.



**Figura 25:** Porcentaje de recuperación (%) de aminoácidos tras los pretratamientos aplicados a la biomasa (5% en 250 mL de agua). **Métodos químicos:** 1h con HCl y NaOH 2M a 120°C, 60°C, y 40°C. **Métodos enzimáticos:** Protamex (1:100 g/g), 3h, 50°C, 300 rpm; Protamex (1:100 g/g) + Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), 3h, 50°C, 300 rpm. **Métodos enzimáticos secuenciales:** Pretratamiento con molino de bolas (1 h con esferas de 2.5 mm) y *Ultrasonidos* (10 minutos, 50 % amplitud, 150 J/s, 7186 J/g<sub>biomasa</sub>) seguido de 3h de hidrólisis con Protamex 1:100 g/g. **Métodos enzimáticos asistidos:** *UAEE (P)*: Protamex (1:100 g/g, 50°C, 1h) asistido por ultrasonidos (1h, 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>); *MAEE(P)*: Protamex (1:100 g/g) asistido por microondas ( 2.5 GHz, 134 J/s, 38596 J/g) 1h, 50°C ; *UAEE (P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por ultrasonidos ( 50% amplitud, 120 J/s, 34560 J/g<sub>biomasa</sub>) 1h, 50°C; *MAEE(P+C)*: Protamex 1:100 g/g + Celluclast 10 FPU/mL asistido por microondas (2.5 GHz, 134

J/s,38596 J/g), 1h. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de 4 determinaciones analíticas (etapa duplicada analizada en réplica). Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias.

En relación a los métodos enzimáticos la hidrólisis con Protamex proporcionó una recuperación de péptidos del 17.8% mientras que la adición de la celulasa al cóctel enzimático no mejoró el rendimiento (16.9%) aun cuando la solubilización obtenida con la combinación enzimática fue casi un 40% superior que empleando únicamente la proteasa lo que nos sugiere que la adición de la celulasa parece inducir una mayor degradación de las proteínas liberadas (15.9%) frente a la proteasa (2.2%). Sin embargo, en ambos casos, el tamaño de los péptidos recuperados estuvo entre 11 y 135 kDa, muy superiores a los obtenidos con la hidrólisis alcalina ( $< 11$  kDa). Rojo et al. (2021), trabajando con biomasa basada en *Scenedesmus almeriensis* cultivada en purines de cerdo alcanzaron rendimientos de recuperación de péptidos del 32.4%, 19.6% y 6.6% tras 5 h de hidrólisis enzimática a 50°C con las enzimas comerciales Alcalasa 2.5L (5:100 v/g), Protamex (1:100 g/g) y Celluclast 1.5L (10 FPU/mL), respectivamente, con pérdidas superiores al 10% en gran parte de los hidrolizados mientras que para biomasa de *Scenedesmus sp\_pura* no se encontraron diferencias en la recuperación de proteínas (28%) tras un tratamiento enzimático con Lysozyme y celulasas (*Trichoerma longibrachiatrum*) (Al-Zuhair et al., 2017).

El uso de los pretratamientos físico/mecánicos mejoraron los rendimientos con un ligero aumento, pero significativo (Test de Duncan) respecto a las hidrólisis enzimáticas en una única etapa en la recuperación de péptidos aunque la alta degradación (10.8%) registrada con molienda condujo a que ambos pretratamientos dieran finalmente rendimientos de recuperación muy similares en ambos pretratamientos, 24.6% y 24.3% para la molienda (60 min) y ultrasonidos (10 min), respectivamente. Para biomasa basada en *Scenedesmacea* cultivada en purines se consiguió un 42.9% y un 32.8% de recuperación de proteínas tras un pretratamiento con molienda (60 min) y ultrasonidos (21 min) seguido de 12h de hidrólisis enzimática (Martin Juárez et al., 2021). Por otro lado, para *Chlorella vulgaris* se ha informado de una recuperación del 42% de proteínas tras 10 minutos de molienda seguido de 24h de hidrólisis enzimática con proteasas (2% v/g) a 37°C. Finalmente, mediante SDS-page se obtuvieron péptidos con tamaños inferiores a 20 kDa (Alavijeh et al., 2020).

En cuanto a los métodos combinados asistidos, con UAEE(P) a pesar del 10% de degradación se alcanzaron rendimientos de recuperación del 39.2% utilizando la proteasa y del 43.6% empleando la combinación proteasa + celulasa, rendimientos muy superiores a los alcanzado únicamente con la proteasa (17.6%) y la combinación enzimática (16.9%) en un tiempo de tratamiento mucho más corto (1h) lo que coincide a su vez con las altas solubilizaciones de proteínas que presentaron estos tratamientos combinados. Sin embargo, el uso de microondas asistido a pesar de las bajas degradaciones, 3.1% y 4.7% para Protamex y la combinación

Protamex + Celluclast 1.5L, las recuperaciones fueron muy inferiores (1.5.5% y 18.1%) a los controles y las recuperaciones obtenidas con ultrasonidos asistido. A pesar de los moderados rendimientos de recuperación obtenidos, los métodos combinados asistidos resultaron ser métodos novedosos y prometedores para extraer y recuperar proteínas a partir de biomasa microalgal, además, el impacto medioambiental es mínimo al evitar el uso de disolventes químicos. Sin embargo, requieren un estudio mucho más profundo sobre su mecanismo de actuación, y una optimización de los principales parámetros (tiempo, potencia, frecuencia, relación biomasa/disolvente, dosis de enzima, temperatura) para obtener resultados comparables a los obtenidos con el método convencional de hidrólisis alcalina.

Se obtuvieron, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-page), los tamaños de los péptidos de todas las fracciones líquidas tras la hidrólisis. Los resultados mostraron notables diferencias en el tamaño molecular de los péptidos presentes en la fracción líquida entre experimentos y la gran influencia que tuvo el tipo de tratamiento aplicado. Se obtuvieron bandas de péptidos en los tratamiento alcalinos aunque no se observó una influencia de la temperatura en el tamaño de los péptidos revelados en la electroforesis ya que todos los hidrolizados presentaban bandas en torno a 11 kDa las cuales eran más difusas en el caso de los hidrolizados a 60°C y 40°C. Por otro lado no se observaron bandas de péptidos para los tratamientos ácidos en ninguna de las temperaturas ensayadas. Esto indica que las proteínas recuperadas con la hidrólisis ácida se hallarían en forma de muy pequeños péptidos o de aminoácidos. Para el caso de los metodos combinados secuenciales, los hidrolizados obtenidos con molienda y ultrasonidos seguidos de 3h de hidrólisis enzimática con la proteasa y la combinación proteasa + celulasa revelaron bandas de proteínas muy difusas en el fondo del gel las cuales no se pudieron identificar, probablemente indicaban la presencia de péptidos de baja masa en el hidrolizado (inferiores a 5 kDa). A partir de una suspensión de 25 g/L de *Chlorella vulgaris* tras un tratamiento de molienda durante 10 minutos Alavijeh et al., (2020) reporta bandas de péptidos intensas y definidas en el gel de electroforesis con tamaños de péptidos entre 10 y 150 kDa. Sin embargo, cuando aplicaron una hidrólisi enzimática con proteasas y mezclas proteasas + celulasa durante 24h a la biomasa pretratada con molienda el gel reveló únicamente dos bandas, muy difusas y poco definidas, de 10 y 20 kDa.

Por otro lado, los experimentos realizados sólo con Protamex y con la combinación de Protamex y Celluclast 1.5L dieron como resultado péptidos con pesos moleculares de 135 kDa, 75 kDa, 63 kDa y unos 11 kDa, por lo que las proteínas no fueron completamente hidrolizadas y permanecieron en la fase líquida como cadenas largas. La UAEE proporcionó proteínas de varios tamaños ( $\approx$ 135 kDa y 63 kDa para los ensayos con Protamex, y  $\approx$ 135 kDa, 100 kDa, 63 kDa y 48 kDa para los ensayos con Protamex y Celluclast 1.5L). Además, se obtuvieron dos bandas en torno a 11 kDa en ambos UAEE que indicaban la presencia de péptidos pequeños. Para biomasa de

*Scenedesmus almeriensis* pura y crecida en medio de purines Rojo et al., (2021) informa de tamaño de péptidos similares en los hidrolizados de ambas biomásas, lo que indicaría que el medio de cultivo parece no influir en el tamaño de los péptidos recuperados. Además, por otro lado, para la biomasa crecida en medio de purines tras 5 horas de hidrólisis enzimática con Protamex (1:100 g/g, 50°C) obtuvieron bandas con pesos moleculares de 135 kDa, 75 kDa, 63 kDa y unos 11 kDa mientras que empleando el cóctel de Celluclast 1.5L (10 FPU/mL, 50°C) sólo obtuvieron dos bandas de mayor intensidad correspondientes a péptidos de 135 kDa y 75 kDa y no observaron fracciones más pequeñas, por lo que las proteínas no se hidrolizaron completamente y permanecieron en la fase líquida como cadenas largas. Finalmente la hidrólisis con el cóctel Alcalasa 2.5L (5:100 v/g, 50°C) proporcionaron péptidos con pesos moleculares inferiores a 11 kDa lo que indicaba la presencia de péptidos cortos e incluso aminoácidos simples.

## 5.7 MODELADO CINÉTICO

Dado que los mejores resultados se han obtenido aplicando hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos por enzimas, se ha determinado la cinética de extracción para este tipo de ensayo. La eficacia de la extracción y la pureza de los compuestos finales recuperados están estrechamente relacionadas con los parámetros de funcionamiento del proceso, teniendo estos factores también una gran influencia en su cinética. Para la investigación cinética de un proceso de extracción y con el fin de describir los mecanismos que los impulsan, los datos experimentales son generalmente procesados y analizados utilizando modelos cinéticos físicos y empíricos, de forma similar a los procesos sólido-líquido (Jokic et al., 2010). Utilizando estos modelos cinéticos, se puede predecir el rendimiento de solubilización y seleccionar los tiempos óptimos de extracción, datos extremadamente útiles cuando se desea aumentar la escala (Lazar et al., 2016).

Al estudiar la extracción de proteínas por UAEE del consorcio de microalgas-bacterias, se confirmó una cinética de extracción común en la extracción sólido-líquido dividida en dos periodos diferentes: un primer periodo de “lavado” (*washing*), caracterizado por un rápido aumento de la concentración de proteínas al principio del proceso, y un segundo periodo de extracción lenta (aproximadamente después de los primeros 20 minutos) controlado por difusión (Kitanović et al., 2008; Mitić et al., 2020). En general, las curvas que representan el cambio del rendimiento de extracción con el tiempo (Figuras 26) eran parabólicas con una elevada pendiente inicial seguida de una forma exponencial, lo que es típico de la mayoría de las curvas de extracción sólido-líquido. Según el conocimiento que se tiene, ningún artículo ha presentado estudios sobre la extracción de proteínas de microalgas y su modelización con UAEE, aunque sí se ha estudiado la cinética de extracción de otros compuestos y procesos comparables, como los compuestos fenólicos de residuos de macroalgas y bagazo por hidrólisis enzimática (Alonso-Riaño et al.,

2020; Trigueros et al., 2021) o las ficobiliproteínas de *Oscillatoria* sp. mediante extracción asistida por ultrasonidos (Sharma et al., 2020) obteniendo cinéticas similares a las de este estudio con un elevado incremento en los primeros minutos del proceso seguido de una etapa más estable donde el aumento de la concentración de los compuestos extraídos es menor hasta alcanzar el equilibrio.

Como blanco se ha utilizado una suspensión de biomasa en agua, sin adición de enzimas que se ha sometido a ultrasonidos en idénticas condiciones de operación a las empleadas en los ensayos de hidrólisis enzimática. Como era de esperar, el uso de proteasas aumenta la extracción de proteínas, logrando aproximadamente el doble de recuperación de péptidos para un tiempo determinado. Sin embargo, la aplicación de ambas enzimas incrementó ligeramente los valores de proteína recuperada pero no mejoró la cinética del proceso.

Las curvas de extracción obtenidas con UAEE se han ajustado a los modelos empíricos recogidos en la Tabla 7 y los parámetros obtenidos se recogen la Tabla 9. En general, todos los modelos, a pesar de ser modelos empíricos, proporcionaron buenos ajustes para las cinéticas de extracción. El criterio utilizado para evaluar la calidad de la representación de los datos experimentales por parte de los modelos fueron el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y el valor del RMS (%). En este sentido cuanto mayor sea el valor del coeficiente de correlación y menor sea el valor del RMS, mejora será la bondad del ajuste (Kitanović et al., 2008; Mitić et al., 2020).

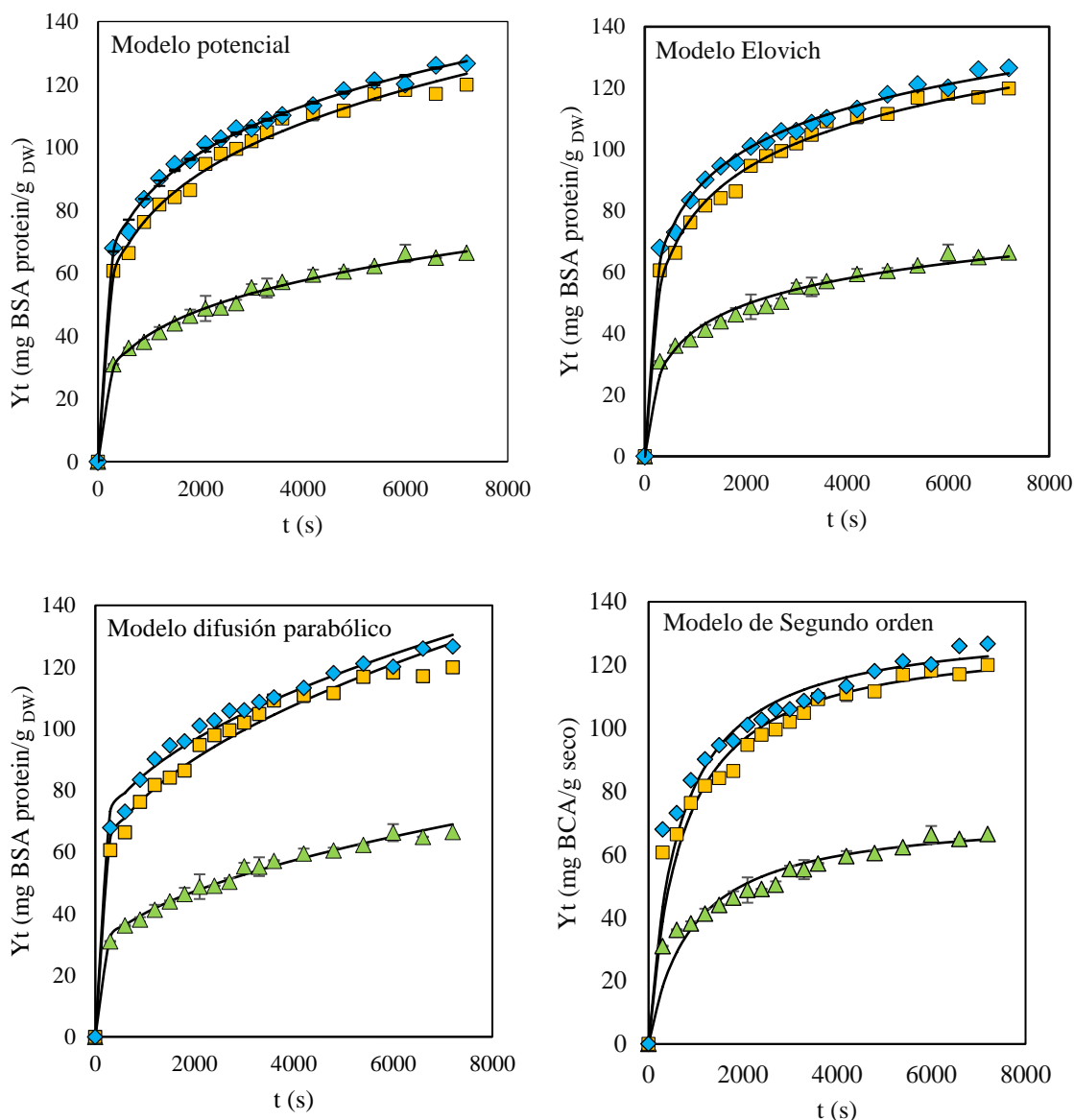
En general se observa que, independientemente del modelo, los valores de RMS fueron inferiores al 5%, a excepción del modelo de segundo orden, con valores de  $R^2 > 0.96$  en la mayoría de los casos. Fue interesante observar como en el modelo de difusión parabólica el % RMS aumenta al emplear las enzimas, respecto al control, con la consiguiente disminución del valor  $R^2$  mientras que en el caso del modelo de Segundo orden el valor de  $R^2$  se mantuvo constante (0.99) mientras que el %RMS varió de 1.15% a 1.48% para los ensayos evaluados debido posiblemente a la diferente metodología empleada para el cálculo de los parámetros. Para los restantes modelo (Potencial y Elovich) la tendencia observada fue la opuesta. Estas tendencias también fueron reportadas por Kitanović et al., (2008) para la extracción de alcaloides empleando un sistema de ultrasonidos asistido por disolventes con etanol al 95% a partir de *Hypericum perforatum* L.

Las líneas continuas indicadas en las Figuras 26 se corresponden a los datos obtenidos con los modelos propuestos y, como se puede observar gráficamente estos modelos son capaces de describir las cinéticas de extracción de proteínas de forma adecuada. Para el modelo potencial, que se ha aplicado ampliamente para describir el proceso de extracción sólido-líquido (Zahari et al., 2020; Zghaibi et al., 2020) y el comportamiento asintótico de las curvas de extracción (Kriia & Hadrich, 2019), el exponente difusional ( $n$ ), fue inferior a la unidad, como se informó para otros materiales vegetales como residuos de macroalgas y bagazo (Alonso-Riaño et al., 2020;

Trigueros et al., 2021). Se obtuvo un exponente difusional más bajo para los ensayos UAEE (0.23 y 0.20 para los ensayos con Protamex y Protamex + Celluclast 1.5L) lo que indica que la extracción de proteínas por ultrasonidos y enzimas estaba probablemente controlada por los fenómenos de difusión interna descrita por (Wu et al., 2018) para la extracción de proteínas a partir de residuos de quinoa indicando un gran efecto sobre la tasa inicial y el rendimiento final de la extracción de proteínas debido posiblemente al doble efecto ya descrito del fenómeno de cavitación que facilitó las reacciones asistidas por enzimas (Singla & Sit, 2021). Además, el valor de la constante B se hace mayor cuanto mayor es la velocidad inicial de extracción de las proteínas como se puede observar en los valores obtenidos en los ensayos con enzimas respecto al ensayo control. Trigueros et al. (2021) reportaron valores de exponente difusional ( $n$ ) de 0.154 (sin enzima), 0.206 (6% de proteasa) y 0.246 (3% proteasa + 3% de celulasa) para la extracción de TP (polifenoles totales) mediante hidrólisis enzimática (24h, 50°C) a partir del residuo de la macroalga *Gellidium* generado tras la obtención del agar-agar, por otro lado, Zahari et al. (2020) informa de valores de exponente difusional inferiores a los obtenidos en este trabajo, de 0.03, en la cinética de extracción de timol empleando ultrasonido asistido por disolvente (130W, 30kHz, 2h, 25°C) a partir de *Plectranthus Amboinicus*.

En cuanto al modelo de difusión parabólica,  $A_0$  (coeficiente de lavado) representa el rendimiento de extracción recuperado instantáneamente a medida que la biomasa se sumerge en el disolvente (por ejemplo, para  $t = 0$ ) (Kitanović et al., 2008) que ha dado lugar a valores más altos para los procesos UAEE (48.10 con Protamex y 58.42 con Protamex y Celluclast) en comparación con el ensayo sin enzima (22.97), lo que significa que la presencia de las enzimas mejoró la recuperación instantánea de proteínas debido posiblemente a una mayor solubilidad y una menor resistencia a la transferencia de masa. Por otro lado  $A_1$ , representa la constante de velocidad de difusión (Kriaa & Hadrich, 2019), también proporcionó valores más altos para los procesos UAEE (7.28  $\text{min}^{-0.5}$  y 6.57  $\text{min}^{-0.5}$  respectivamente) respecto al control, correlacionado con una mayor tasa de liberación.





**Figura 26:** Cinética de extracción de proteínas a 50°C y al 50% de la amplitud de ultrasonidos para una suspensión al 5% de biomasa utilizando agua como disolvente y con diferentes combinaciones de enzimas (▲ Control ultrasonidos sin enzima; ■ UAEE con 1% de Protamex; ◆ UAEE con 1% Protamex + 10 FPU/mL Celluclast 1.5L). Concentración de proteínas expresadas como mg BSA/g<sub>dw</sub> con g<sub>dw</sub>-gramos de biomasa seca. Las líneas continuas representan los resultados obtenidos con los modelos. Los resultados s expresan como medias ± desviaciones estándar de 2 determinaciones analíticas. Las líneas de intervalo vertical representan la desviación estándar de las medias

**Tabla 9:** Parámetros cinéticos obtenidos en la extracción de proteínas con ultrasonidos y ultrasonidos asistido por enzimas.

Modelo	Parámetros cinéticos	Control (solo US)	UAEE-Protamex 1:100 g/g	UAEE Protamex 1:100 g/g y Celluclast 10 FPU/mL
<b>Potencial</b>	B (min <sup>-n</sup> )	19.73	40.76	48.24
	n	0.26	0.23	0.20
	R <sup>2</sup>	0.988	0.986	0.990
	RMS (%)	0.462	0.375	0.285
<b>Difusión parabólica</b>	A <sub>0</sub>	22.97	48.11	58.42
	A <sub>1</sub> (min <sup>-0.5</sup> )	4.20	7.28	6.57
	R <sup>2</sup>	0.984	0.9657	0.955
	RMS (%)	0.474	0.720	0.590
<b>Elovich</b>	E <sub>0</sub> (g <sub>dw</sub> /mg BSA)	6.76	21.14	31.66
	E <sub>1</sub> (mg BSA/g <sub>dw</sub> ·min)	12.19	20.68	19.46
	R <sup>2</sup>	0.964	0.979	0.986
	RMS (%)	0.850	0.504	0.372
<b>Segundo* orden</b>	Y <sub>S</sub> (mgBSA/g <sub>DW</sub> )	73	130	133
	h (mg/g <sub>DW</sub> min)	4.82	12	12.83
	k <sub>2</sub> (g <sub>DW</sub> /mgBSA min)	9·10 <sup>-4</sup>	6.5·10 <sup>-4</sup>	7.2·10 <sup>-4</sup>
	R <sup>2</sup>	0.990	0.996	0.995
	RMS (%)	1.48	1.38	1.15

\*Parámetros obtenidos mediante regresión lineal con Excel (Plot: t/Y<sub>t</sub> vs t)

La modelización de Elovich dio lugar a variaciones significativas para el parámetro E<sub>0</sub> (tasa de extracción inicial) y E<sub>1</sub> (constante de velocidad de extracción). El rendimiento de extracción inicial aumentó para los procesos asistidos con valores de 21.14 y 31.66 (g<sub>dw</sub>/mg BSA) mientras que para el proceso sin enzima se obtuvo un valor muy inferior (6.76 g<sub>dw</sub>/mg BSA) indicando nuevamente, al igual que en caso del modelo parabólico, que el empleo de enzimas mejora la liberación instantánea de proteínas debido, posiblemente, a un incremento de los fenómenos de difusión promovidos por la acción del ultrasonidos correlacionado a su vez con un

aumento en la constante de velocidad para los procesos con enzimas. Kitanović et al., (2008) también informa este mismo efecto en la extracción de alcaloides a partir de residuos de *Hypericum perforatum* L empleando un sistema de ultrasonidos asistido por disolventes con etanol al 95% donde la constante de velocidad  $E_0$  aumentó cuando la temperatura de extracción se incrementó de 25°C a 80°C promovido por un incremento en los procesos de difusión y a una menor resistencia a la transferencia de masas. Este modelo es una relación logarítmica ajustada a las curvas de lixiviación y deriva al suponer que la tasa de extracción disminuye exponencialmente con el aumento del rendimiento de extracción (Haqqyana et al., 2020; Kitanović et al., 2008). Harouna-Oumarou et al. (2007) y Menkiti et al. (2017) describen que en el modelo Elovich el rendimiento de extracción aumenta exponencialmente con la constante de velocidad de extracción  $E_1$ . El menor valor de RMS para el modelo Elovich indicaron un mejor ajuste de los datos experimentales por lo que se podría asumir que el proceso de UAEE tenía el mismo comportamiento.

Por último, varios autores (Lazar et al., 2016; Qu et al., 2010; Tao et al., 2014) estudiando el mecanismo de extracción asistida por ultrasonidos de biocompuestos a partir de biomasa vegetal mostraron que la mayoría de las veces el proceso ocurre siguiendo el mecanismo cinético de segundo orden descrito por (Harouna-Oumarou et al., 2007; Lovasoa Rakotondramasy-Rabesiaka et al., 2007) el cual también fue evaluado en este trabajo. Este modelo se basa en que la velocidad de extracción de sólidos solubles está controlada por los fenómenos de difusión provenientes de la biomasa a condición de equilibrio y a cualquier tiempo  $t$ . Aunque este modelo también describe la cinética de extracción en dos periodos (un rápido incremento de la concentración inicialmente seguido de un periodo lento controlado por difusión) en nuestro estudio se pudo observar (Figura 26) que el modelo de segundo orden no es capaz de describir la extracción de proteínas durante los primeros minutos de extracción (esta tendencia se observa claramente durante los primeros 20 minutos) obteniendo curvas inicialmente más planas y con menor pendiente que la de los modelos potencial, Elovich y difusión parabólica. El rendimiento de saturación ( $Y_S$ ), la tasa de extracción inicial ( $h$ ) y la constante de extracción de segundo orden ( $k_2$ ) para los ensayos realizados se muestran en la Tabla 9. Como se puede observar la tasa de extracción y el rendimiento de saturación aumentaron para los ensayos con enzimas respecto al ensayo control, a excepción del valor de  $k_2$ , donde se observa la tendencia opuesta. El pronunciado efecto de las enzimas sobre  $h$  y  $Y_S$  es razonable ya que el efecto combinado de las enzimas y el ultrasonido promueve una mayor liberación de las proteínas al potenciar la actividad catalítica de la enzima (Bashari et al., 2013). Sin embargo, la constante de velocidad  $k_2$  disminuyó en los ensayos asistidos con enzimas. También se encontró una tendencia similar sobre  $k_2$  durante la extracción asistida por ultrasonidos a partir de semilla de granada (Lazar et al., 2016). Las altas desviaciones obtenidas con el modelo de segundo orden (%RMS > 1.15%) derivan del hecho de

que este modelo considera, por una parte, que el fenómeno de difusión es siempre constante durante la sonicación (a través del modelo potencial observamos que esta consideración no es correcta) y por otro lado, considera despreciable la resistencia a la transferencia de materia de la fase sólida a la fase líquida, descritas también por Tao et al., (2014) para la extracción de fenoles y flavonoides a partir de virutas de roble.

Las variaciones observadas en los parámetros obtenidos de los modelos cinéticos podrían explicarse por los fenómenos físicos relacionados con el proceso de extracción. Los menores valores de los parámetros cinéticos obtenidos empleando únicamente ultrasonido podrían indicar una mayor resistencia a la transferencia de masas (Sant'Anna et al., 2012) o una menor solubilización de las proteínas (Kitanović et al., 2008) mientras que el empleo de enzimas cataliza la ruptura de macromoléculas, generando cadenas de mayor tamaño que difunden con mayor facilidad. También se pudo comprobar que el mecanismo de extracción de proteínas consistía en un lavado rápido y una difusión lenta. La suspensión de biomasa contenía tanto proteínas depositadas en su superficie como proteínas extraíbles distribuidas uniformemente. Analizando el comportamiento de las cinéticas de extracción, el mejor tiempo de hidrólisis con UAEE sería 1 hora (la cual fue usada anteriormente), ya que a mayores tiempos no se produce una mayor extracción de proteínas que mejorase el proceso. Así mismo, el uso de tiempos largos de ultrasonidos llevaría consigo mayores costes de energía para evitar el sobrecalentamiento y podría una mayor degradación de las proteínas extraídas.

## 6. CONCLUSIONES

---

Se llevaron a cabo múltiples ensayos para evaluar la capacidad de extracción de macrocomponentes, proteínas y carbohidratos, con el objetivo de conseguir una valorización integral de la biomasa *Scenedesmus almeriensis*-bacteria genera durante el tratamiento de aguas residuales de purines de cerdo. Los resultados revelaron que la hidrólisis ácida con HCl 2M a 120°C condujo a una recuperación de carbohidratos del 60.7% aunque la degradación de la xilosa en su totalidad puso el peligro la gran solubilidad que presentaban estos componentes con rendimientos del 86.7%. El empleo de bajas temperaturas en el tratamiento ácido (60°C y 40°C) no condujo a una mejora en los rendimientos debido a la alta resistencia de la pared celular que presenta esta microalga y a los altos factores de degradación (43%) con recuperaciones inferiores al 21% para ambas temperaturas. La hidrólisis alcalina también promovió buenas solubilizaciones y recuperaciones de carbohidratos, en gran parte, debido a la mayor solubilización (98.4%, 89.9%, y 87.3% a 120°C, 60°C y 40°C) de xilosa asociadas a las proteínas. Por otro lado, la hidrólisis alcalina (NaOH 2M) a altas temperaturas, 120°C, potenció los rendimientos solubilización (88.3%) y recuperación (81%) de proteínas aunque las duras condiciones de hidrólisis condujeron a la obtención de péptidos con tamaños inferiores a 11 kDa. Las pérdidas, entre un 7% y 9% del tratamiento alcalino a 60°C y 40°C no mejoraron el proceso con rendimiento de recuperación del 46.1% y 26.8%, respectivamente. No se observó un efecto de la temperatura en el tamaño de los péptidos recuperados. La hidrólisis ácida condujo a buenas recuperaciones de péptidos, inferiores al tratamiento alcalino, a 120°C (61.5%) aunque resultó ser un tratamiento muy agresivo con degradaciones del 16% lo que se tradujo en péptidos muy pequeños o incluso aminoácidos que no fueron revelados en la electroforesis.

La selectividad de la hidrólisis enzimática con la proteasa quedó reflejada en su capacidad de extraer proteínas con tamaños superiores a 40 kDa, aunque la alta resistencia que presenta la pared celular de la microalga condujo a recuperaciones moderadas (17.6%). No se encontraron diferencias, entre los pretratamientos, cuando la biomasa fue pretratada con molienda y ultrasonidos aunque estos pretratamientos consiguieron mejorar ligeramente los rendimientos de recuperación en un 24.6% y 24.3%, respectivamente. El efecto de estos métodos secuenciales tuvo un efecto moderado en la solubilización de los carbohidratos (35.1% y 28.2 para molienda y ultrasonidos) en comparación con la hidrólisis enzimática (19.8%) aunque finalmente las recuperaciones (15.2% y 14.4%) fueron prácticamente idénticas al obtenido únicamente con la proteasa en una única etapa (14.9%). La combinación de una proteasa con una celulasa parecía ser una estrategia viable para extraer tanto carbohidratos como proteínas en una única etapa pero los resultados mostraron que, aunque la combinación enzimática mejoraba la solubilización de

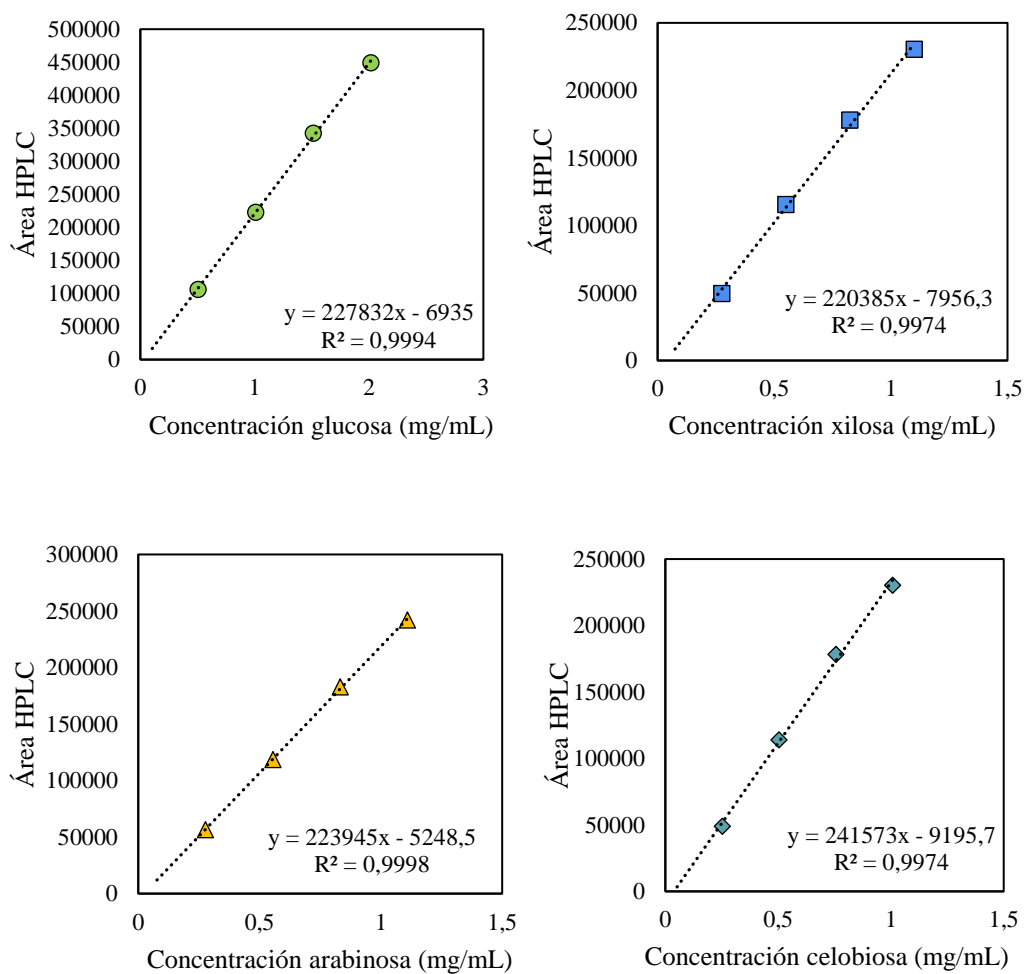
proteínas respecto a la proteasa sola (32.8% vs 19.8%) este efecto no se observó en los carbohidratos con rendimientos de solubilización prácticamente idénticos que empleando únicamente proteasa (38%). Finalmente las altas pérdidas de estos macrocomponentes con la combinación enzimática, aproximadamente en un 17% para ambos, condujo a recuperaciones del 21.6% para los carbohidratos y del 16% para las proteínas. No se observó un efecto de la adición de celulasa en el tamaño de los péptidos recuperados obteniendo en ambos casos (proteasa y proteasa + celulasa) péptidos con tamaños de 135 kDa, 75 kDa, 63 kDa y unos 11 kDa, por lo que las proteínas no fueron completamente hidrolizadas y permanecieron en la fase líquida como cadenas largas

Los métodos combinados de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos y microondas (UAEE y MAEE), aunque necesitan un mayor estudio y optimización, resultaron ser métodos novedosos y prometedores para la valorización de la biomasa presentada en este trabajo. Por un lado, MAEE potenció la solubilización de carbohidratos con rendimientos máximos de 57.9% y 56.2% para la hidrólisis enzimática con Protamex y Protamex + Celluclast 1.5L asistido por microondas. Por otro lado, UAEE favoreció en gran medida la solubilización de proteínas con rendimientos del 49.6% y 44.5% para los ensayos con Protamex y Protamex + Celluclast asistido por ultrasonidos. En ambos casos, los rendimientos obtenidos fueron muy superiores a las hidrólisis enzimáticas individuales y a los métodos combinados secuenciales pero empleando una única etapa y un tiempo de proceso mucho más corto (1h). Además, aunque las recuperaciones de péptidos fueron moderadas (39.2% y 43.61% para la proteasa y proteasa + celulasa) en comparación con la hidrólisis alcalina convencional, la UAEE nos proporcionó péptidos de diversos tamaños ( $\approx$ 135 kDa y 63 kDa para los ensayos con Protamex, y  $\approx$ 135 kDa, 100 kDa, 63 kDa y 48 kDa para los ensayos con Protamex y Celluclast 1.5L) a diferencia del método convencional de hidrólisis alcalina que proporcionó buenas recuperaciones pero péptidos muy pequeños que obstaculizarían en gran parte los procesos posteriores de purificación.

Finalmente el modelado a través de modelos empíricos de extracción sólido-líquido de las curvas cinéticas de hidrólisis enzimática asistida con US nos ayudó a comprender la existencia de un mecanismo común involucrado en la liberación de proteínas dividida en dos periodos diferentes: un primer periodo de “lavado” (*washing*), caracterizado por un rápido aumento de la concentración de proteínas al principio del proceso, y un segundo periodo de extracción lenta controlado por fenómenos de difusión.

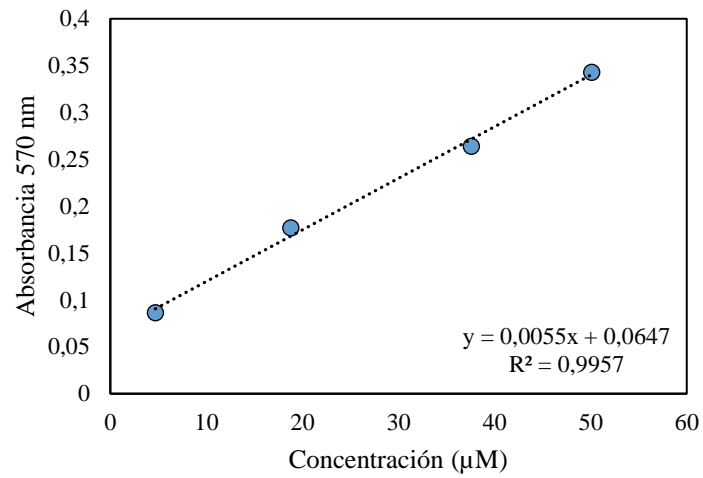
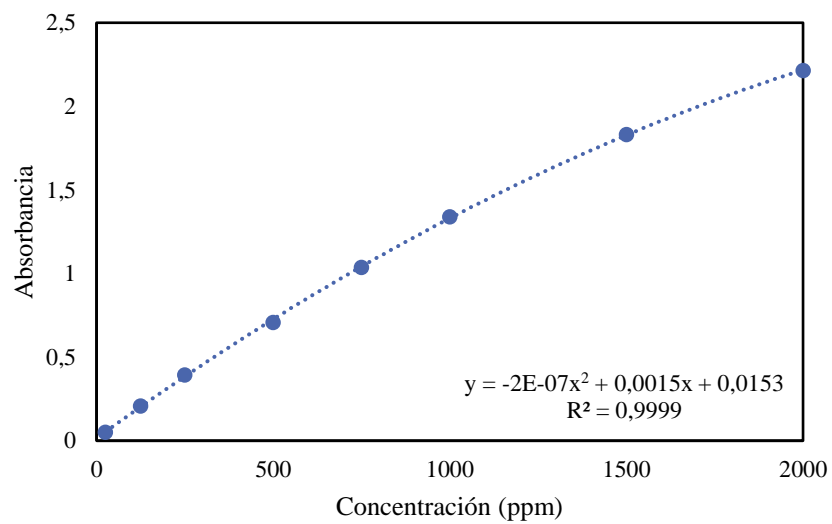
## 7. ANEXO

**Anexo -Figura 1:** Rectas de calibrado para la determinación de azúcares (● glucosa, ■ xilosa, ▲ arabinosa y ◆ celobiosa) mediante HPLC.



**Anexo-Tabla 1:** Factores de corrección HPLC para los monosacáridos

Monosacárido	Factor de corrección
Glucosa	0.951
Xilosa	1.043
Arabinosa	1.026
Celobiosa	0.469

**Anexo- Figura 2:** Recta de calibrado ácido aspártico-glutámico**Anexo- Figura 3:** Calibrado BSA



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- 't Lam, G. P., Vermuë, M. H., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & van den Berg, C. (2018). Multi-Product Microalgae Biorefineries: From Concept Towards Reality. *Trends in Biotechnology*, *36*(2), 216–227. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.10.011>
- Abdel Ghaly, M. A. hattab. (2015). Microalgae Oil Extraction Pre-treatment Methods: Critical Review and Comparative Analysis. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, *05*(04). <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000172>
- Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., & Iluz, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, *329*(February), 124895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124895>
- Acien, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(21), 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Acien Fernández, F. G., Gómez-Serrano, C., & Fernández-Sevilla, J. M. (2018). Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *2*(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>
- Adamczyk, M., & Sajdak, M. (2018). Pyrolysis Behaviours of Microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Waste and Biomass Valorization*, *9*(11), 2221–2235. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9996-8>
- Akaberi, S., Gusbeth, C., Silve, A., Senthilnathan, D. S., Navarro-López, E., Molina-Grima, E., Müller, G., & Frey, W. (2019). Effect of pulsed electric field treatment on enzymatic hydrolysis of proteins of *Scenedesmus almeriensis*. In *Algal Research*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101656>
- Al-Jabri, H., Das, P., Khan, S., Thaher, M., & Abdulquadir, M. (2021). Treatment of wastewaters by microalgae and the potential applications of the produced biomass—a review. *Water (Switzerland)*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/w13010027>
- Al-Zuhair, S., Ashraf, S., Hisaindee, S., Darmaki, N. Al, Battah, S., Svistunenko, D., Reeder, B., Stanway, G., & Chaudhary, A. (2017). Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Engineering in Life Sciences*, *17*(2), 175–185.

<https://doi.org/10.1002/ELSC.201600127>

- Alavijeh, R. S., Karimi, K., Wijffels, R. H., van den Berg, C., & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*, 309(April), 123321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123321>
- Alonso-Riaño, P., Diez, M. T. S., Blanco, B., Beltrán, S., Trigueros, E., & Benito-Román, O. (2020). Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration. *Antioxidants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antiox9030265>
- Amenorfenyo, D. K., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Q., Zhang, N., Ren, J., & Huang, Q. (2019). Microalgae brewery wastewater treatment: Potentials, benefits and the challenges. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph16111910>
- Ardiles, P., Cerezal-Mezquita, P., Salinas-Fuentes, F., Órdenes, D., Renato, G., & Ruiz-Domínguez, M. C. (2020). Biochemical composition and phycoerythrin extraction from red microalgae: A comparative study using green extraction technologies. *Processes*, 8(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr8121628>
- Arias, D. M., García, J., & Uggetti, E. (2020). Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives. *New Biotechnology*, 55(September 2019), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.001>
- Assemany, P., de Paula Marques, I., Calijuri, M. L., & Reis, A. (2020). Complementarity of Substrates in Anaerobic Digestion of Wastewater Grown Algal Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 11(11), 5759–5770. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00875-8>
- Bashari, M., Eibaid, A., Wang, J., Tian, Y., Xu, X., & Jin, Z. (2013). Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 155–161. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.06.010>
- Baudelet, P. H., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25, 333–371. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.04.008>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

- Berliner, M. . (1986). Proteins in *Chlorella Vulgaris*. *Microbios*, 46, 199–203.
- Bhatia, S. K., Mehariya, S., Bhatia, R. K., Kumar, M., Pugazhendhi, A., Awasthi, M. K., Atabani, A. E., Kumar, G., Kim, W., Seo, S. O., & Yang, Y. H. (2021). Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges. *Science of The Total Environment*, 751, 141599. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141599>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 1–34. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)
- Boursier, H., Béline, F., & Paul, E. (2005). Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technology*, 96(3), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.03.007>
- Callejo-López, J. A., Ramírez, M., Cantero, D., & Bolívar, J. (2020). Versatile method to obtain protein- and/or amino acid-enriched extracts from fresh biomass of recalcitrant microalgae without mechanical pretreatment. *Algal Research*, 50(July). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102010>
- Cao, L., Zhou, T., Li, Z., Wang, J., Tang, J., Ruan, R., & Liu, Y. (2018). Effect of combining adsorption-stripping treatment with acidification on the growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 263(April), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.094>
- Castro, J. de S., Calijuri, M. L., Ferreira, J., Assemany, P. P., & Ribeiro, V. J. (2020). Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. *Science of the Total Environment*, 724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138138>
- Chai, W. S., Tan, W. G., Halimatul Munawaroh, H. S., Gupta, V. K., Ho, S. H., & Show, P. L. (2021). Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. *Environmental Pollution*, 269, 116236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F. W., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., & Kumar, S. M. (2019). Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource Technology*, 275(October 2018), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.019>
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., & Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101(9), 3097–3105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.026>
- Chng, L. M., Lee, K. T., & Chan, D. J. C. (2017). Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Conversion and Management*, 141, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.026>
- Chong, A. M. Y., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2000). Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*, 41(1–2), 251–257. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00418-X)
- Choudhary, P., Assemany, P. P., Naaz, F., Bhattacharya, A., Castro, J. de S., Couto, E. de A. do C., Calijuri, M. L., Pant, K. K., & Malik, A. (2020). A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. *Science of the Total Environment*, 726(271), 137961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137961>
- Ciko, A. M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/md16100348>
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2021). Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods. In *Processes*. <https://doi.org/10.3390/pr9010010>
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 133–154.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>

- Dai, L., Reichert, C. L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2020). An erosion-type hydrolysis behavior of insoluble protein fraction from *Chlorella protothecoides*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(3), 1072–1079. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10112>
- Das, P., Quadir, M. A., Thaher, M. I., Alghasal, G. S. H. S., & Aljabri, H. M. S. J. (2019). Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(7), 3355–3364. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1867-8>
- De Morais, M. G., Vaz, B. D. S., De Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Dineshkumar, R., Subramanian, J., Gopalsamy, J., Jayasingam, P., Arumugam, A., Kannadasan, S., & Sampathkumar, P. (2019). The Impact of Using Microalgae as Biofertilizer in Maize (*Zea mays* L.). *Waste and Biomass Valorization*, *10*(5), 1101–1110. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0123-7>
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katsеров, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*, *10*(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Domozych, D. S. (2016). Biosynthesis of the Cell Walls of the Algae. *The Physiology of Microalgae*, *6*, 47–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_2)
- Dvoretzky, D. S., Akulinin, E., Temnov, M., Dvoretzky, A. D., EAkulinin, A., Dvoretzky, S., Temnov, student M., & student Androsova, M. A. (2016). *DEFINING OPTIMAL CONDITIONS FOR CHLORELLA VULGARIS MICROALGAE BIOMASS CELL WALLS DISRUPTION IN THE PROCESS OF BIOFUEL PRODUCTION Purification Treatment of Municipal Wastewater Using Microalgae Chlorella Vulgaris View project Renewable Energy Sources and C. August*. <https://doi.org/10.5593/sgem2016B41>
- Fito, J., & Alemu, K. (2019). Microalgae–bacteria consortium treatment technology for municipal wastewater management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, *4*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s41204-018-0050-2>
- Fradinho, J. C., Domingos, J. M. B., Carvalho, G., Oehmen, A., & Reis, M. A. M. (2013). Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. *Bioresource Technology*, *132*, 146–153.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.01.050>

- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Fu, Q., Xiao, C., Liao, Q., Huang, Y., Xia, A., & Zhu, X. (2021). Kinetics of hydrolysis of microalgae biomass during hydrothermal pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 149(March), 106074. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106074>
- Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., & Vílchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- Gao, F., Cui, W., Xu, J. P., Li, C., Jin, W. H., & Yang, H. L. (2019). Lipid accumulation properties of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in membrane photobioreactor (MPBR) fed with secondary effluent from municipal wastewater treatment plant. *Renewable Energy*, 136, 671–676. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.038>
- García, D., de Godos, I., Domínguez, C., Turiel, S., Bolado, S., & Muñoz, R. (2019). A systematic comparison of the potential of microalgae-bacteria and purple phototrophic bacteria consortia for the treatment of piggery wastewater. *Bioresource Technology*, 276(October 2018), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.095>
- García, D., Posadas, E., Blanco, S., Acién, G., García-Encina, P., Bolado, S., & Muñoz, R. (2018). Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresource Technology*, 248, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>
- García, E. S., Van Leeuwen, J. J. A., Safi, C., Sijtsma, L., Van Den Broek, L. A. M., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & Van Den Berg, C. (2018). Techno-Functional Properties of Crude Extracts from the Green Microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7831–7838. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01884>
- García, G., Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacariás, C., Iqbal, H., & Parra-Saldívar, R. (2020). Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus sp.* under Nutrient-Deficient Conditions. <https://doi.org/10.3390/polym13010131>
- Gerde, J. A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D., & Wang, T. (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110>

- Gerde, J. A., Wang, T., Yao, L., Jung, S., Johnson, L. A., & Lamsal, B. (2013). Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. *Algal Research*, 2(2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.02.001>
- Gonçalves, A. L. (2021). *applied sciences The Use of Microalgae and Cyanobacteria in the Improvement of Agricultural Practices : A Review on Their Biofertilising , Biostimulating and Biopesticide Roles.*
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- González-Balderas, R. M., Velásquez-Orta, S. B., Valdez-Vazquez, I., & Orta Ledesma, M. T. (2020). Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus* sp. by using ultrasound or ozone. *Ultrasonics Sonochemistry*, 62(May 2019), 104852. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2013). Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 129, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.123>
- Gouveia, L. (2011). SpringerBriefs in Microbiology. In *Microralgae as Feedstock for Biofuels.*
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Haqqyana, H., Tania, V. F. W., Suyadi, A. M., Kusuma, H. S., Altway, A., & Mahfud, M. (2020). Kinetic study in the extraction of essential oil from clove (*Syzygium aromaticum*) stem using microwave hydrodistillation. *Moroccan Journal of Chemistry*, 8(S1), 64–71. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v8i1.19126>
- Harouna-Oumarou, H. A., Fauduet, H., Porte, C., & Ho, Y. S. (2007). Comparison of kinetic models for the aqueous solid-liquid extraction of *Tilia* sapwood a continuous stirred tank reactor. *Chemical Engineering Communications*, 194(4), 537–552. <https://doi.org/10.1080/00986440600992511>
- Harun, R., & Danquah, M. K. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46(1), 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.027>

- Harun, R., Jason, W. S. Y., Cherrington, T., & Danquah, M. K. (2011). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, 88(10), 3464–3467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.10.048>
- He, P. J., Mao, B., L., F., Shao, L. M., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, 146, 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.111>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 262, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.049>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A., & García-González, M. C. (2016). Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. *Chemical Engineering Journal*, 285, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.072>
- Hernández, David, Molinuevo-Salces, B., Riaño, B., Larrán-García, A. M., Tomás-Almenar, C., & García-González, M. C. (2018). Recovery of Protein Concentrates From Microalgal Biomass Grown in Manure for Fish Feed and Valorization of the By-Products Through Anaerobic Digestion. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00028>
- Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>
- Ho, S. H., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>
- Hongyang, S., Yalei, Z., Chunmin, Z., Xuefei, Z., & Jinpeng, L. (2011). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresource Technology*, 102(21), 9884–9890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.016>
- Hussain, F., Shah, S. Z., Ahmad, H., Abubshait, S. A., Abubshait, H. A., Laref, A., Manikandan, A., Kusuma, H. S., & Iqbal, M. (2021). Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137(November 2020), 110603.



<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>

- Jayaseelan, M., Usman, M., Somanathan, A., Palani, S., Muniappan, G., & Jeyakumar, R. B. (2021). Microalgal Production of Biofuels Integrated with Wastewater Treatment. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 8797, 13(16), 8797. <https://doi.org/10.3390/SU13168797>
- Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Ana Bucic-Kojic, Planinic, M., & Tomasa, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(3), 206–212. <https://doi.org/10.17221/200/2009-cjfs>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>
- Kalman, D. S. (2014). Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. *Foods*, 3(3), 394–402. <https://doi.org/10.3390/foods3030394>
- Kang, Y., Kim, M., Shim, C., Bae, S., & Jang, S. (2021). Potential of Algae-Bacteria Synergistic Effects on Vegetable Production. *Front. Plant Sci*, 12, 656662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656662>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kitanović, S., Milenović, D., & Veljković, V. B. (2008). Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.010>
- Kłosowski, G., Mikulski, D., & Lewandowska, N. (2020). Microwave-assisted degradation of biomass with the use of acid catalysis. *Catalysts*, 10(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/catal10060641>
- Kose, A., & Oncel, S. S. (2015). Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. *Biotechnology Reports*, 6, 137–143. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2015.02.005>
- Kriaa, K., & Hadrich, B. (2019). A New Modeling Approach of Ultrasonic Extraction of

- Polyphenols from Carob. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 14(2), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s12247-018-9342-0>
- Kröger, M., Klemm, M., & Nelles, M. (2018). Hydrothermal disintegration and extraction of different microalgae species. *Energies*, 11(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/en11020450>
- Lane, D. J., Zevenhoven, M., Ashman, P. J., Van Eyk, P. J., Hupa, M., De Nys, R., & Lewis, D. M. (2014). Algal biomass: Occurrence of the main inorganic elements and simulation of ash interactions with bed material. *Energy and Fuels*, 28(7), 4622–4632. <https://doi.org/10.1021/ef500989n>
- Lazar, L., Talmaciu, A. I., Volf, I., & Popa, V. I. (2016). Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.009>
- Le Guillard, C., Bergé, J. P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J. Y., Baron, R., Fleurence, J., & Dumay, J. (2016). Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2575–2585. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0788-x>
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41(April), 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Li, S., Ji, L., Chen, C., Zhao, S., Sun, M., Gao, Z., Wu, H., & Fan, J. (2020). Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioresour. Technol.*, 309(April), 123362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123362>
- Liu, B. L., Chai, W. S., Show, P. L., Chen, J. Y., & Chang, Y. K. (2020). Evaluation of dynamic binding performance of C-phycoerythrin and allophycocyanin in *Spirulina platensis* algae by aminated polyacrylonitrile nanofiber membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 161(May), 107686. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107686>
- López Rocha, C. J., Álvarez-Castillo, E., Estrada Yáñez, M. R., Bengoechea, C., Guerrero, A., & Orta Ledesma, M. T. (2020). Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater. *Journal of Environmental Management*, 263(November 2019).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110353>

- Lorenzo-Hernando, A., Ruiz-Vegas, J., Vega-Alegre, M., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.068>
- Lu, K., Zhao, X., Ho, S. H., Ma, R., Xie, Y., & Chen, J. (2019). Biorefining and the Functional Properties of Proteins from Lipid and Pigment Extract Residue of *Chlorella pyrenoidosa*. *Marine Drugs*, *17*(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md17080454>
- Lu, Y., Levine, R. B., & Savage, P. E. (2015). Fatty acids for nutraceuticals and biofuels from hydrothermal carbonization of microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *54*(16), 4066–4071. <https://doi.org/10.1021/ie503448u>
- Lund, M. N., & Ray, C. A. (2017). Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(23), 4537–4552. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00882>
- Lupatini, A. L., de Oliveira Bispo, L., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Canan, C., & Colla, E. (2017). Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. *Food Research International*, *99*, 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.036>
- Ma, R., Wang, B., Chua, E. T., Zhao, X., Lu, K., Ho, S. H., Shi, X., Liu, L., Xie, Y., Lu, Y., & Chen, J. (2020). Comprehensive utilization of marine microalgae for enhanced co-production of multiple compounds. *Marine Drugs*, *18*(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/md18090467>
- Ma, Y. A., Cheng, Y. M., Huang, J. W., Jen, J. F., Huang, Y. S., & Yu, C. C. (2014). Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(8), 1543–1549. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1126-4>
- Mahali, M., & G., S. (2019). Extraction Methods and Functional Properties of Protein from *Arthrospira platensis* for Bioavailability of Algal Proteins. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, *5*(2), 20. <https://doi.org/10.11648/j.ijpc.20190502.12>
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014a). Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy*, *78*, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.05.052>

- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014b). Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Conversion and Management*, 85, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*, 6(8), 3937–3950. <https://doi.org/10.3390/en6083937>
- Martín-Juárez, J., Vega-Alegre, M., Riol-Pastor, E., Muñoz-Torre, R., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. *Bioresource Technology*, 281(December 2018), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>
- Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., & Bolado Rodríguez, S. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
- Martin Juárez, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García Encina, P. A., Muñoz Torre, R., & Bolado Rodríguez, S. (2021). Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129330>
- Martín Juárez, J., Riol Pastor, E., Fernández Sevilla, J. M., Muñoz Torre, R., García-Encina, P. A., & Bolado Rodríguez, S. (2018). Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. *Bioresource Technology*, 257(February), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.063>
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., & Yamazawa, A. (1999). Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80095-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80095-2)
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Medina, C., Rubilar, M., Shene, C., Torres, S., & Verdugo, M. (2015). Protein fractions with techno-functional and antioxidant properties from *Nannochloropsis gaditana* microalgal biomass. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 9(4), 417–425.

<https://doi.org/10.1166/JBMB.2015.1534>

- Mehariya, S., Goswami, R. K., Verma, P., Lavecchia, R., & Zuurro, A. (2021). Integrated Approach for Wastewater Treatment and Biofuel Production in Microalgae Biorefineries. *Energies*, *14*(8), 2282. <https://doi.org/10.3390/en14082282>
- Mehrabadi, A., Craggs, R., & Farid, M. M. (2016). Biodiesel production potential of wastewater treatment high rate algal pond biomass. *Bioresource Technology*, *221*, 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.028>
- Menkiti, M. C., Agu, C. M., & Udeigwe, T. K. (2017). Kinetic and parametric studies for the extractive synthesis of oil from *Terminalia catappa* L. kernel. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*. <https://doi.org/10.1007/s11144-016-1101-y>
- Milledge, J. J., & Heaven, S. (2017). Energy balance of biogas production from microalgae: Effect of harvesting method, multiple raceways, scale of plant and combined heat and power generation. *Journal of Marine Science and Engineering*, *5*(1), 14–16. <https://doi.org/10.3390/jmse5010009>
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., & Gouveia, L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *104*, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.059>
- Mishra, S., & Mohanty, K. (2020). Co-HTL of domestic sewage sludge and wastewater treatment derived microalgal biomass – An integrated biorefinery approach for sustainable biocrude production. *Energy Conversion and Management*, *204*(November 2019), 112312. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112312>
- Mitić, M., Janković, S., Mašković, P., Arsić, B., Mitić, J., & Ickovski, J. (2020). Kinetic models of the extraction of vanillic acid from pumpkin seeds. *Open Chemistry*, *18*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0001>
- Mohd Udaiyappan, A. F., Abu Hasan, H., Takriff, M. S., & Sheikh Abdullah, S. R. (2017). A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, *20*(September), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.006>
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., & Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>

- Mulbry, W., Westhead, E. K., Pizarro, C., & Sikora, L. (2005). Recycling of manure nutrients: Use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology*, 96(4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.026>
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40(15), 2799–2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. H., Lill, R. E., Li, S., Battershill, C. N., & Duckworth, A. R. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80093-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80093-9)
- Nguyen, M. T., Choi, S. P., Lee, J., Lee, J. H., & Sim, S. J. (2009). Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 161–166). <https://doi.org/10.4014/jmb.0810.578>
- Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12761. <https://doi.org/10.1111/JFBC.12761>
- Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., & Abu, G. O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98(11), 2207–2211. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028>
- Onay, M. (2018). Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. *Energy Procedia*, 153, 253–257. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2018.10.032>
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. (2018). Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93(April), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.015>
- Padilla-Rascón, C., Romero-García, J. M., Ruiz, E., & Castro, E. (2020). Optimization with response surface methodology of microwave-assisted conversion of xylose to furfural. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163574>

- Parimi, N. S., Singh, M., Kastner, J. R., Das, K. C., Forsberg, L. S., & Azadi, P. (2015). Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content. *Frontiers in Energy Research*, 3(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00030>
- Passos, F., Carretero, J., & Ferrer, I. (2015). Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.065>
- Passos, F., Hernández-Mariné, M., García, J., & Ferrer, I. (2014). Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Research*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.013>
- Pereira, A. M., Lisboa, C. R., & Costa, J. A. V. (2018). High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47(February), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.015>
- Phang, S. M., Miah, M. S., Yeoh, B. G., & Hashim, M. A. (2000). *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 395–400. <https://doi.org/10.1023/a:1008157731731>
- Phong, W. N., Show, P. L., Le, C. F., Tao, Y., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2018). Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>
- Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, 184, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Postma, P. R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., Olivieri, G., & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresource Technology*, 203, 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.12.012>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28(November), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16–23.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>

- Raheem, A., Prinsen, P., Vuppaladadiyam, A. K., Zhao, M., & Luque, R. (2018). A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *Journal of Cleaner Production*, *181*, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.125>
- Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J. L., Porte, C., & Fauduet, H. (2009). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.-Kinetic modelling of influential parameters. *Industrial Crops and Products*, *29*(2–3), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.10.001>
- Rakotondramasy-Rabesiaka, Lovasoa, Havet, J. L., Porte, C., & Fauduet, H. (2007). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.-Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology*, *54*(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.09.015>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, *34*(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Rambabu, K., Thanigaivelan, A., Bharath, G., Sivarajasekar, N., Banat, F., & Show, P. L. (2021). Biosorption potential of *Phoenix dactylifera* coir wastes for toxic hexavalent chromium sequestration. *Chemosphere*, *268*, 128809. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128809>
- Razon, L. F. (2012). Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresource Technology*, *107*, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.075>
- Reddy, N., & Santosh, M. S. (2016). Recovery and Applications of Feather Proteins. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*, 255–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00014-8>
- Richel, A., Laurent, P., Wathelet, B., Wathelet, J. P., & Paquot, M. (2011). Microwave-assisted conversion of carbohydrates. State of the art and outlook. *Comptes Rendus Chimie*, *14*(2–3), 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.04.004>
- Rajo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, *335*(May). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>



- Rokicka, M., Zieliński, M., Dudek, M., & Dębowski, M. (2020). Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. *Bioenergy Research*, 752–760. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10202-y>
- Ronga, D., Biazzzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*, 9(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Safi, C., Cabas Rodriguez, L., Mulder, W. J., Engelen-Smit, N., Spekking, W., van den Broek, L. A. M., Olivieri, G., & Sijtsma, L. (2017). Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.012>
- Safi, Carl, Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P. Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>
- Safi, Carl, Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>
- Salakkam, A., Sittijunda, S., Mamimin, C., Phanduang, O., & Reungsang, A. (2021). Valorization of microalgal biomass for biohydrogen generation: A review. In *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124533>
- Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., & Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(May), 1189–1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>
- Sanchez Rizza, L., Coronel, C. D., Sanz Smachetti, M. E., Do Nascimento, M., & Curatti, L. (2019). A semi-closed loop microalgal biomass production-platform for ethanol from renewable sources of nitrogen and phosphorous. *Journal of Cleaner Production*, 219, 217–224. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.01.311>
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2012). Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.09.004>

- Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products*, *70*, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.020>
- Sathya, R., Mubarakali, D., Mohamedsaalis, J., & Kim, J. W. (2021). A systemic review on microalgal peptides: Bioprocess and sustainable applications. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/su13063262>
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, *73*, 129–140. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.06.001>
- Schwenzfeier, A., Lech, F., Wierenga, P. A., Eppink, M. H. M., & Gruppen, H. (2013). Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, *33*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.002>
- Sen Tan, J., Lee, Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, W., Ho, S.-H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, *11*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M. Z., Nawaz, S., Asraful Alam, M., & Mehmood, M. A. (2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment*, *704*, 135303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>
- Shetty, P., Boboescu, I. Z., Pap, B., Wirth, R., Kovács, K. L., Bíró, T., Futó, Z., White, R. A., & Maróti, G. (2019). Exploitation of algal-bacterial consortia in combined biohydrogen generation and wastewater treatment. *Frontiers in Energy Research*, *7*(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00052>
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, *200*(July), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.090>
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. Diversity and Significance. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, 11–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- Singla, M., & Sit, N. (2021). Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *73*, 105506. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105506>

- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. In *Algal Research*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Soto-Sierra, L., Wilken, L. R., Mallawarachchi, S., & Nikolov, Z. L. (2021). Process development of enzymatically-generated algal protein hydrolysates for specialty food applications. *Algal Research*, 55, 102248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102248>
- Su, J. J., Ding, S. T., & Chung, H. C. (2020). Establishing a smart farm-scale piggery wastewater treatment system with the internet of things (IoT) applications. *Water (Switzerland)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/w12061654>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29(6), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
- Sun, S. W., Lin, Y. C., Weng, Y. M., & Chen, M. J. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.006>
- Sutherland, D. L., Howard-Williams, C., Turnbull, M. H., Broady, P. A., & Craggs, R. J. (2015). Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.074>
- Szabolcs, Á., Molnár, M., Dibó, G., & Mika, L. T. (2013). Microwave-assisted conversion of carbohydrates to levulinic acid: an essential step in biomass conversion. *Green Chemistry*, 15(2), 439–445. <https://doi.org/10.1039/C2GC36682G>
- Tacias-pascacio, V. G., Morellon-sterling, R., Siar, E., Tavano, O., Berenguer-murcia, Á., & Fernandez-lafuente, R. (2020). International Journal of Biological Macromolecules Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D. W. (2014). Experimental and modeling studies of ultrasound-assisted release of phenolics from oak chips into model wine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(5), 1839–1848. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.016>
- Ter Veld, F. (2012). Beyond the fossil fuel era: On the feasibility of sustainable electricity generation using biogas from microalgae. *Energy and Fuels*, 26(6), 3882–3890.

<https://doi.org/10.1021/ef3004569>

- Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W., & Gruppen, H. (2017). Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 7989–8002. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01788>
- Topuz, O. K., Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Ucak, I., & Gumus, B. (2016). Optimization of Antioxidant Activity and Phenolic Compound Extraction Conditions from Red Seaweed (*Laurencia obtuse*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(3), 414–422. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.868844>
- Travaini, R., Barrado, E., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 214, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.102>
- Trigueros, E., Sanz, M. T., Filipigh, A., Beltrán, S., & Riaño, P. (2021). Enzymatic hydrolysis of the industrial solid residue of red seaweed after agar extraction: Extracts characterization and modelling. *Food and Bioprocess Processing*, 126, 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.01.014>
- Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E., & Steyer, J. P. (2014). Integrating microalgae production with anaerobic digestion: A biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(4), 516–529. <https://doi.org/10.1002/BBB.1469>
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108(March 2020), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Vernès, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., & Chemat, F. (2019). Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.016>
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Acien, F. G., & Alarcón, F. J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research*, 37(February 2018), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.018>
- Vlaskin, M. S., Chernova, N. I., Kiseleva, S. V., Popel', O. S., & Zhuk, A. Z. (2017). Hydrothermal liquefaction of microalgae to produce biofuels: state of the art and future

prospects. *Thermal Engineering*, 64(9), 627–636.  
<https://doi.org/10.1134/S0040601517090105>

Wadhwa, M., & Bakshi, M. P. S. (2016). Application of Waste-Derived Proteins in the Animal Feed Industry. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*, 161–192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00010-0>

Wang, M., & Yuan, W. (2015). Microalgal cell disruption in a high-power ultrasonic flow system. *Bioresource Technology*, 193, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.040>

Wilkie, A. C., & Mulbry, W. W. (2002). Wilkie 2002. *Elsevier*, 84, 1–11.  
<https://pdf.sciencedirectassets.com/271433/1-s2.0-S0960852400X00934/1-s2.0-S0960852402000032/main.pdf?x-amz-security-token=FQoGZXIvYXdzEN7%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaDCkyD7xHqoNnXieQPyK3A%2BksKbZ40zTIqVTPH5u8eoPH6%2BTa0XWrRrD5AohrBjN1hIH8E7Irc4Y8UFCg>

Wu, X., Sun, Y., Shi, Y., Tang, Y., Tian, J., & Zhao, G. (2018). *Study on Kinetics of Protein Forward Extraction from Quinoa by AOT/ Isooctane Reverse Micelles System*. 160(Msam), 334–339. <https://doi.org/10.2991/msam-18.2018.70>

Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>

Xu, Z., Wang, H., Cheng, P., Chang, T., Chen, P., Zhou, C., & Ruan, R. (2020). Development of integrated culture systems and harvesting methods for improved algal biomass productivity and wastewater resource recovery – A review. *Science of the Total Environment*, 746, 141039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141039>

Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., & Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>

Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., Zhou, C., Ye, X., Ma, H., & Duan, Y. (2018). Effects of ultrasound-assisted  $\alpha$ -amylase degradation treatment with multiple modes on the extraction of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40(April 2017), 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.08.028>

Zahari, N. A. A. R., Chong, G. H., Abdullah, L. C., & Chua, B. L. (2020). Ultrasonic-assisted

- extraction (UAE) process on thymol concentration from *Plectranthus amboinicus* leaves: Kinetic modeling and optimization. *Processes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/pr8030322>
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>
- Zghaibi, N., Omar, R., Kamal, S. M. M., Biak, D. R. A., & Harun, R. (2020). Kinetics study of microwave-assisted brine extraction of lipid from the microalgae *Nannochloropsis* sp. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040784>
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118(October 2019), 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>
- Zhou, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X., & Wang, Q. (2011). Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl<sub>2</sub>. *Bioresource Technology*, 102(21), 10158–10161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.051>
- Zhou, Weizheng, Wang, Z., Xu, J., & Ma, L. (2018). Cultivation of microalgae *Chlorella zofingiensis* on municipal wastewater and biogas slurry towards bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(5), 644–648. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.006>
- Zhou, Wenguang, Hu, B., Li, Y., Min, M., Mohr, M., Du, Z., Chen, P., & Ruan, R. (2012). Mass cultivation of microalgae on animal wastewater: A sequential two-stage cultivation process for energy crop and omega-3-rich animal feed production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(2), 348–363. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9779-4>
- Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., & Yuan, Z. (2013). Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Research*, 47(13), 4294–4302. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>