



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

***Optimización de la hidrólisis enzimática
de *Scenedesmus almeriensis* para la
aplicación como biofertilizante***

Master en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Marlon Gonzalo Carvajal Proaño

Tutor: José María Fernández Sevilla

Cotutor: Cintia Gómez Serrano

Julio, 2017

Contenido

Índice de Figuras	3
Índice de Tablas	4
Resumen	5
Introducción.....	6
Materiales y métodos	8
Biomasa estudiada.....	8
Rotura celular	9
Determinación de proteínas	10
Determinación de lípidos.....	11
Hidrólisis Enzimática	11
Montaje de los reactores.....	11
Determinación del grado de hidrólisis alcanzado.....	12
Optimización de la hidrólisis.....	13
Análisis estadístico.....	14
Resultados y Discusión.....	14
Conclusiones	20
Bibliografía	21

Índice de Figuras

Figura 1: Influencia de los pesticidas y el calentamiento global en la fisiología y ecología de las especies salvajes, en tomate la influencia de los pesticidas y en verde la influencia del cambio global (Köhler & Triebkorn, 2013)	6
Figura 2: <i>Scenedesmus</i> sp. observada en el microscopio a 40X. (Lopez, 2016)	7
Figura 3: Preparación de la biomasa de <i>Scenedesmus almeriensis</i> de la Estación Experimental Cajamar	9
Figura 4: Proceso de rotura celular de <i>Scenedesmus almeriensis</i> por el ultrasonido.	9
Figura 5: Muestras sometidas a rotura celular por calentamiento y NaOH 1N para el análisis de proteínas	10
Figura 6: Recta patrón para el análisis proteico de <i>Scenedesmus almeriensis</i> , nótese el color azul que ha tomado el BSA después de reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu	10
Figura 7: Montaje de reactores para hidrólisis enzimática, con control de pH y temperatura.....	12
Figura 8: A) Centrifuga utilizada en la separación de la biomasa hidrolizada B) biomasa centrifugada de la cual se tomaba el sobrenadante para la determinación de aminoácidos por la técnica con o-phthaldialdehyde (OPA) tomaba diferentes coloraciones dependiendo del tratamiento efectuado.....	12
Figura 9: Representación del grado de hidrólisis alcanzado en con cada concentración de enzimas ensayado vs el tiempo de reacción enzimática A) Concentración al 0,1% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B B) Concentración al 1% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B C) Concentración al 3% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B D) Concentración al 5% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B	15
Figura 10: Grado de hidrólisis enzimática después de la combinación al 5% de proteasas: Bio B (Control), Bio B + Flavourzyme, Bio B + Alcalasa, Bio B + Bio A, comparada frente al tiempo de reacción.	16
Figura 12: Influencia de la temperatura y pH en el grado de hidrólisis A) ensayo a pH 7 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C B) Ensayo a pH 8 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C y C) ensayo a pH 9 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C.....	17
Figura 14: Combinación de enzima Bio B y Carezyme para determinar la dosis idónea de cada una A) Ensayo en la que se mantuvo fija la concentración de Bio B a un 5% como concentración máxima y se varió la dosis de Carezyme B) Ensayo manteniéndose fija la celulasa Carezyme y se varia la dosis de Bio B	18
Figura 15: Evolución del grado de hidrólisis enzimática en el tiempo con Bio B a 50°C y pH 7 con biomasa de <i>Scenedesmus almeriensis</i> fresca con diferentes métodos de rotura celular: Control sin ningún tipo de rotura celular, rotura enzimática con Carezyme al 5%. rotura mediante ultrasonido y mediante homogeneización de alta presión.....	19
Figura 16: Resultados de la hidrólisis enzimática realizada con <i>Nannochloropsis gatidana</i> al 10% p/v con biomasa liofilizada y biomasa fresca con celulasa Carezyme, biomasa fresca sin rotura previa y biomasa fresca rota por el ultrasonido. Las hidrólisis fueron llevadas a cabo por la enzima Bio B.....	19

Índice de Tablas

Tabla 1: Tiempos y nomenclatura de toma de las muestras necesarias para realizar la cinética enzimática	11
Tabla 2: Cantidades de las soluciones y reactivos necesarios para la determinación de aminoácidos.....	13
Tabla 3: Combinación de enzimas y dosis para los ensayos de hidrólisis de <i>S. almeriensis</i>	13
Tabla 4: Combinación de enzimas para determinar el incremento en el grado de hidrólisis.....	14

Resumen

La fuente de recursos en el planeta es un tema de mucha importancia en la actualidad, estamos experimentando un crecimiento acelerado a nivel de población. Como consecuencia de esto, durante las últimas décadas, se ha venido utilizando fertilizantes químicos de manera desmesurada, generado el empobrecimiento del suelo y el agotamiento de los cultivos, por lo que se debe invertir tiempo e investigación en tecnologías alternativas; de este modo surgen los biofertilizantes, que pueden ser derivados de organismos vivos o en algunos casos los organismos en sí. Los biofertilizantes están considerados como una alternativa más ecológica, rentable y sostenible a los fertilizantes sintéticos pues además de mejorar los cultivos disminuyen la contaminación ambiental pues son productos que mejoran las propiedades químicas y biológicas del suelo y estimulan el crecimiento de las plantas. A nivel industrial, los biofertilizantes suelen ser hidrolizados de una fuente rica en proteínas, es por esto que este trabajo, realizado en la Estación Experimental Cajamar localizada en Almería, se enfoca en encontrar las condiciones idóneas para hidrolizar las proteínas de la microalga *Scenedesmus almeriensis* que se caracteriza principalmente por tener la capacidad de almacenar grandes cantidades de proteínas. Se trabajó con cuatro proteasas, dos proporcionadas por Novozyme (Flavourzyme 1000L y Alcalasa 2,5L) y dos proporcionados por Biorizons Biotech, que por razones comerciales se las ha llamado Bio A y Bio B. De éstas, la más eficiente para el estudio de manera individual fue Bio B, alcanzando hasta un 30.88% de grado de hidrólisis de biomasa liofilizada y previamente rota por ultrasonido. Con el afán de reducir costos en el proceso, se trabajó a la par con ensayos de rotura enzimática que estaban siendo realizados por otro investigador de la Estación Experimental Cajamar, así se determinó que las condiciones adecuadas para la hidrólisis de *S. almeriensis* con la combinación de celulasa (Carezyme) y la proteasa (Bio B) fueron: temperatura 50°C, pH 7, concentración de proteasa 3% y concentración de celulasa 0,1%. Al trabajarse con biomasa fresca se alcanzó hasta un 56% de hidrólisis enzimática de *Scenedesmus almeriensis*; luego estas condiciones fueron validadas con la microalga *Nannochloropsis gaditana* obteniéndose entre el 35% con rotura enzimática y el 53% con rotura con ultrasonido.

Introducción

El crecimiento acelerado de la población, así como la demanda de recursos para mantener este desarrollo se ha convertido en una prioridad a nivel mundial, de éste surge la necesidad de encontrar formas alternativas de producción de alimentos desarrollando tecnologías innovadoras que permitan aumentar el rendimiento agrícola por hectárea de sembrío y al mismo tiempo que permitan la minimización de los insumos necesarios para este fin. (García & Sommerfeld, 2016)

Como consecuencia de este afán de producir cada vez cantidades más grandes de alimento, se ha introducido el uso de químicos para la fertilización del suelo, es así que en las últimas tres décadas se ha incrementado de manera considerable el uso de fertilizantes y pesticidas con nitrógeno y fósforo, lo que ha generado problemas ambientales como deterioramiento de la calidad del suelo, eutrofización del agua tanto superficial como subterránea, reducción de biodiversidad y en casos extremos se ha llegado a la supresión de ecosistemas completos (Kawalekar, 2013). Esto no solo afecta de manera directa a los cultivos sino que indirectamente afecta a toda la ecología circundante, se ha llegado a considerar que el uso indiscriminado de los mismos aporta al cambio climático que se está produciendo actualmente, pues llegan a formar parte de las interacciones de la naturaleza (**Figura 1**) **Figura 1** (Köhler & Triebkorn, 2013).

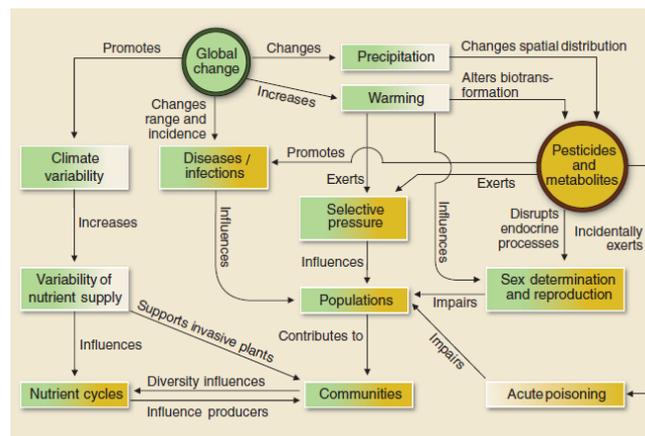


Figura 1: Influencia de los pesticidas y el calentamiento global en la fisiología y ecología de las especies salvajes, en tomate la influencia de los pesticidas y en verde la influencia del cambio global (Köhler & Triebkorn, 2013)

La alternativa que ha surgido al uso de fertilizantes sintéticos a base de productos químicos son los biofertilizantes, cuya principal función es aumentar la disponibilidad de nutrientes que sean de fácil asimilación para la planta, ya sean fijadores de nitrógeno, solubilizantes de fósforo oxidantes de azufre o descomponedores de materia orgánica. (Kawalekar, 2013)

Las microalgas son organismos microscópicos con capacidad fotosintética que, a diferencia de las plantas, carecen de raíz, tallos, hojas; sin embargo, poseen la maquinaria fotosintética que le permite captar la luz del ambiente y fijar el CO₂ atmosférico. (García Cubero, 2014). El ambiente ideal para el crecimiento de las microalgas es, rico en nutrientes, fuentes de carbono, temperatura adecuada y una cantidad suficiente de luz. Hasta la fecha se han descrito más de 40.000 especies (García Cubero, 2014). La gran cantidad de especies puede atribuirse a la capacidad de las microalgas para sobrevivir a ambientes extremos de turbulencia, temperaturas extremas, alta salinidad, pH, etc. (Elliott, y otros, 2012)

Las microalgas tienen un alto contenido de macronutrientes y una considerable cantidad de micronutrientes y aminoácidos (Shaaban, 2001), esta característica y la afinidad de las microalgas para ser reproducidas en aguas servidas y salobres les han convertido en grandes candidatos para la producción a gran escala de biofertilizantes.

Debido a la alta adaptabilidad y productividad en reactores externos en el lugar donde se realizó este estudio, se utilizó la microalga *Scenedesmus almeriensis* (**Figura 2**). La misma pertenece al reino Plantae, a la clase Chlorophyceae y a la familia Scenedesmaceae. Su temperatura ideal de reproducción es de 23°C; sin embargo, se ha encontrado que es capaz de soportar hasta 32°C, el tiempo de fotoperiodo ideal para su crecimiento es de 14 horas de luz (Lopez, 2016). Las paredes de las microalgas poseen en su mayor porcentaje celulosa, pero esta pared puede llegar a tener varias modificaciones dependiendo de su evolución y adaptación a ambientes más o menos hostiles, este es el caso del género *Scenedesmus*, que dispone de tres capas de esporopolenina, un carotenoide polimérico muy resistente químicamente, sobre la capa interna de celulosa. (Fanés, 2008). El género *Scenedesmus* posee células alargadas y ovals (Figura 2), pared celular lisa y cloroplastos parietales (Fanés, 2008). Se ha podido determinar que tiene niveles altos de aminoácidos esenciales, niveles de entre 25 y 65% de proteína, resistencia a pH entre 4 y 9,5 (Quevedo, Morales, & Acosta, 2008) la capacidad proteica ha ocasionado que *Scenedesmus* sea muy atractiva para la aplicación de tecnologías innovadoras como la hidrólisis enzimática para la obtención de aminoácidos libres y su posible aplicación como biofertilizantes en la agricultura (Romero, Ación, & Fernández, 2012)

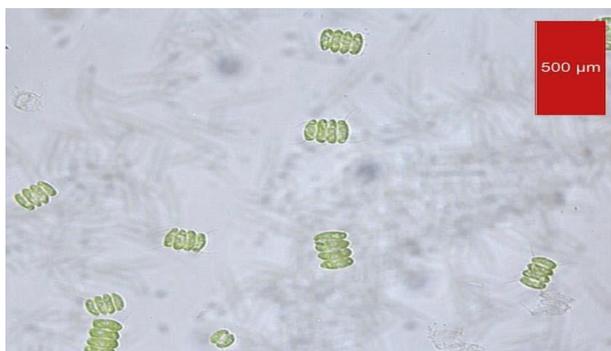


Figura 2: *Scenedesmus* sp. observada en el microscopio a 40X. (Lopez, 2016)

El proceso de hidrólisis enzimática viene constituido por tres procesos fundamentales de los cuales dependerá la eficiencia. El primero tiene la característica de la formación del complejo enzima sustrato, en el segundo se da la rotura del enlace amídico que ocasiona la liberación del péptido de la proteína y el último paso es la rotura del complejo enzima sustrato por medio de un ataque nucleofílico. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

La efectividad de la hidrólisis viene dado por el grado de hidrólisis, que relaciona entre el porcentaje de enlaces peptídicos rotos y las proteínas originales de la muestra de experimentación, determinando las características que va a tener el producto final. Este grado de hidrólisis depende mucho de los factores que se consideren al momento de realizar la hidrólisis, pues el resultado final se encuentra influenciado en por el pH, temperatura, relación enzima–sustrato, tiempo de incubación, y naturaleza de la enzima. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

La hidrólisis enzimática depende de la cantidad de proteínas disponibles en el medio para la actuación de las enzimas, es por esto que, un paso clave dentro del proceso es encontrar un método óptimo para la rotura de las células. Para esto existen varios métodos en la industria que pueden ser, de origen físico o químico-biológico. Dentro de los procesos físicos se puede mencionar los molinos de bolas, rotura por ultrasonido, u homogeneización de alta presión. Mientras que en los químicos biológicos se pueden mencionar a procesos térmicos, choques osmóticos, solventes, detergentes y enzimas. (Kakko, Ivanova, & Rantasalo, 2016).

Las enzimas proteolíticas constituyen uno de los grupos más importantes de enzimas comerciales, que tienen amplia utilización en procesos industriales (Ovissipour , Safari , Motamedzadegan, & Shabanpour, 2009) ya que actúan rompiendo los enlaces peptídicos liberando así los aminoácidos. La hidrólisis proteolítica se lleva a cabo en reactores con constante agitación con un control de pH, temperatura y tiempo del proceso. Durante la rotura del sustrato se realiza una disminución del pH, el mismo debe ser ajustado mediante la adición de Sosa (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008).

En la actualidad existen varios métodos de detección para determinar la cantidad de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis, entre ellos se puede mencionar la técnica que involucra al o-ftalaldehido (OPA), que reacciona con los grupos amino de los aminoácidos (Peñañiel, Monserrat, Solano, & Lozano , 2009); sin embargo este método posee un inconveniente y es que, OPA no reacciona con prolina y reacciona parcialmente con cisteína, lo que podría ocultar valores al momento de la medición. Por otro lado es mucho más seguro y rápido que otros método como el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) cuyas desventajas son más notorias pues el reactivo es inestable, hay un riesgo de explosión al momento de la reacción, puede presentarse interferencia de azúcares reductores y de amonio entre otros. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008).

El proceso de hidrólisis, como se mencionó anteriormente, tiene un gran potencial y efectividad siempre y cuando se determinen las condiciones adecuadas de funcionamiento como el pH, temperatura y tiempo de exposición de la enzima con el sustrato. Es por eso que el objetivo de este trabajo es encontrar y ajustar las condiciones óptimas para la hidrólisis de *Scenedesmus almeriensis* probando diferentes enzimas provistas por Biorizon y Novozyme, con la finalidad de utilizar esta biomasa en la producción de un biofertilizante.

Materiales y métodos

Biomasa estudiada

La materia prima a utilizarse en el proceso de optimización fue biomasa liofilizada de *Scenedesmus almeriensis* y, con la finalidad de tener una mezcla uniforme para los análisis de hidrólisis, se utilizó el mismo lote de biomasa molturada suavemente para todos los ensayos, aportada por la Estación Experimental Cajamar localizada en Almería, España (**Figura 3**). Para validar la metodología una vez optimizada se utilizó otra cepa de diferente composición y estructura, *Nannochloropsis gaditana*, suministrada nuevamente por la Estación Experimental Cajamar.

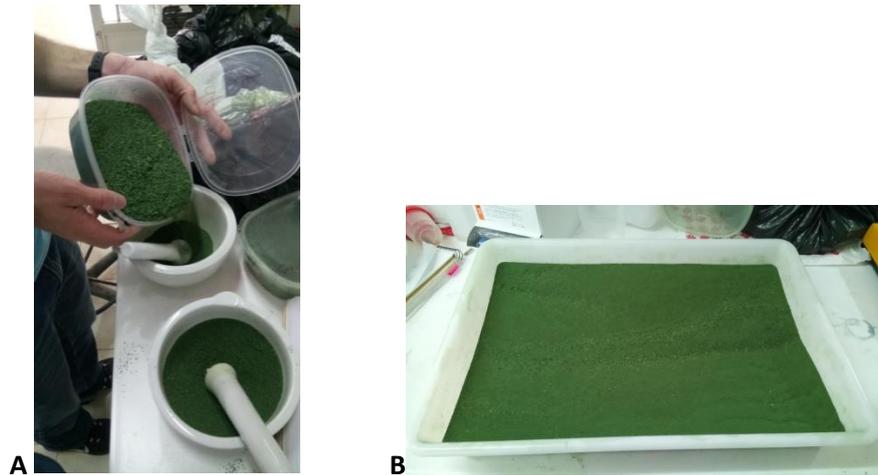


Figura 3: Preparación de la biomasa de *Scenedesmus almeriensis* de la Estación Experimental Cajamar

Rotura celular

Para la hidrólisis enzimática se utilizó una solución de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* en agua al 10% p/v. Como paso previo a la hidrólisis enzimática, fue necesario liberar las proteínas mediante la rotura celular. La biomasa se ultrasonó de forma continua a la máxima potencia y el máximo de ciclos durante el tiempo necesario para asegurar que la totalidad de la biomasa pasara 5 veces por el ultrasonido (**Figura 4**). Este número de pasos se había determinado en un experimento anteriormente realizado en el laboratorio de la Estación Experimental Cajamar. El ultrasonido poseía un encamisado frío para evitar el sobrecalentamiento de la biomasa por acción de la sonicación, esta biomasa rota sería utilizada posteriormente para el análisis proteico y la hidrólisis enzimática.

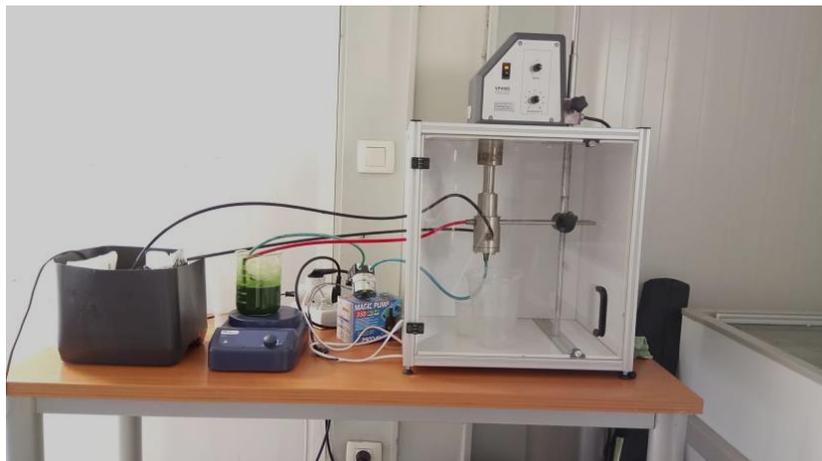


Figura 4: Proceso de rotura celular de *Scenedesmus almeriensis* por el ultrasonido.

Determinación de proteínas

Se realizó un análisis de la biomasa por triplicado con el fin de determinar la cantidad de proteínas iniciales que poseía, para esto se utilizó el método Lowry. Primero se tomó una muestra de aproximadamente 8 ml de una solución que contenía el 10% de biomasa para lo cual se pesaron 3 muestras de 50 mg en tubos Pyrex, posteriormente se añadió 2 ml de una solución de NaOH 1N, se mezcló y se dejó reaccionar en el termoblock a una temperatura de 100°C durante una hora (**Figura 5**).



Figura 5: Muestras sometidas a rotura celular por calentamiento y NaOH 1N para el análisis de proteínas

Una vez transcurridos el tiempo de reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 15 min, posteriormente se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, con el fin de separar las estructuras celulares de las proteínas liberadas. Se transfirió una alícuota de 100 µl a otro tubo, al cual se le añadió 0,3 ml de NaOH 1N y 0,4 ml de H₂O (Milli-Q).

A cada una de las muestras se le añadieron 2 ml de una mezcla de Na₂CO₃ y una solución de CuSO₄ disuelto en tartrato sodio potasio al 1%. Se mezcló con la muestra y se dejó reaccionar durante 10 min, posteriormente se colocó 0,4 ml del reactivo Folin-Ciocalteu para que reaccione alrededor de 30 min y se midió la absorbancia a 750 nm. La curva patrón fue realizada en cada ensayo de análisis de proteínas la misma contenía combinaciones de BSA con una concentración de 1 mg/ml y agua ultrapura (**Figura 6**).



Figura 6: Recta patrón para el análisis proteico de *Scenedesmus almeriensis*, nótese el color azul que ha tomado el BSA después de reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu

Determinación de lípidos

Los lípidos totales se determinaron a partir de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* liofilizada, la cual se mezcló en una proporción 1:1 de biomasa y óxido de aluminio. Esta mezcla se molturó durante 5 min para asegurar la liberación de los lípidos. Se tomó 200 mg de la muestra molturada y se añadió 2 ml de una solución 2:1 v/v de Cloroformo-Metanol, se agitó para mezclar y luego se centrifugó a 4000 rpm a 5 min. Se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo, al precipitado se volvió a colocar 1 ml de la solución de cloroformo – metanol hasta que se obtuvo un sobrenadante clarificado, en cada centrifugado se transfirió el sobrenadante al primer tubo que contenía el primer sobrenadante.

Una vez obtenido el sobrenadante se añadió 3 ml de HCl 0.1 N y 0,3 ml de MgCl₂ al 0,5% p/v se agitó y se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. Se tomó la fase oscura que es la que contiene los lípidos. Se lo llevo al termoblock y se colocó a 40°C en conjunto con secado por nitrógeno gaseoso. Se determinó la cantidad de lípidos por medio de diferencia de peso.

Hidrólisis Enzimática

Montaje de los reactores

Para la hidrólisis enzimática se utilizaron reactores encamisados de 250 ml, en los que se colocó 150 ml de la solución al 10% de *S. almeriensis*, con sus correspondientes sondas de pH, al igual que un mecanismo de bombeo de NaOH para regular y mantener el pH fijado (**Figura 7**). Como tiempo máximo de hidrólisis se estableció 4 horas, una vez alcanzada la temperatura y pH deseado para cada ensayo se tomó una muestra al tiempo 0, y posteriormente cada 60 min se tomó una muestra de 1,5 ml por reactor. El total de muestra tomadas por cada tratamiento fue de 5 como se detalla en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Tiempos y nomenclatura de toma de las muestras necesarias para realizar la cinética enzimática

Tiempo de hidrólisis (min)	Volumen de la muestra (ml)	Nº de muestra
0	1,5	T0
60	1,5	T1
120	1,5	T2
180	1,5	T3
240	1,5	T4



Figura 7: Montaje de reactores para hidrólisis enzimática, con control de pH y temperatura

Determinación del grado de hidrólisis alcanzado

Para conocer el grado de hidrólisis alcanzado se midió el contenido en proteínas de la de la biomasa diluida al 10% por el método Lowry, considerando este valor el 100% de los aminoácidos. A su vez, se determinaron los aminoácidos libres encontrados a los distintos tiempos de la hidrólisis, calculando con ambos valores el porcentaje de aminoácidos que se habían liberado.

$$\text{Grado de hidrólisis (\%)} = \text{Aa libres (mg/L)} / \text{Proteínas totales (mg/L)} * 100$$

$$\Delta \text{ Grado hidrólisis (\%)} = [\text{Aa libres (mg/L)} - \text{Aa libres iniciales(mg/L)}] / \text{Proteínas totales (mg/L)} * 100$$

Los aminoácidos libres fueron determinados por el método OPA (o-phthaldialdehyde). Las muestras tomadas de la hidrólisis se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 min para obtener 2 fases (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se tomó 100 µl del sobrenadante para ser transferido a un nuevo tubo que contenía 3,9 ml de agua ultrapura.

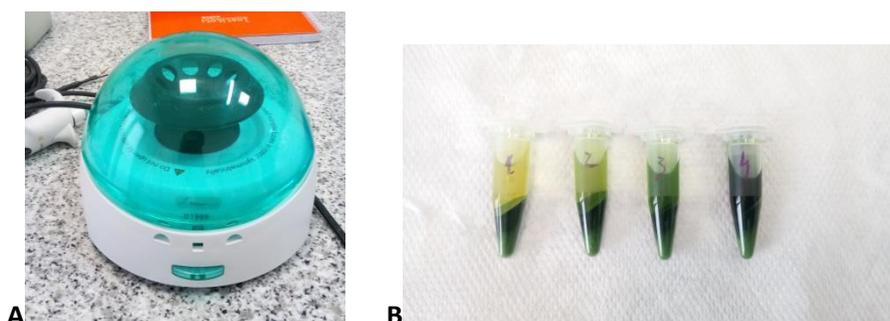


Figura 8: A) Centrifuga utilizada en la separación de la biomasa hidrolizada B) biomasa centrifugada de la cual se tomaba el sobrenadante para la determinación de aminoácidos por la técnica con o-phthaldialdehyde (OPA) tomaba diferentes coloraciones dependiendo del tratamiento efectuado.

Con la dilución de las muestras de la hidrólisis se procedió al análisis del contenido de aminoácidos, para esto se prepararon las disoluciones necesarias que se detallan en la **Tabla 2**. Se tomaron dos alícuotas de 100 µl de la disolución del centrifugado y se trasvasó a otro tubo que contenía 3 ml de la disolución 3 y 0,3 ml de agua ultrapura. Se dejó reaccionar durante dos minutos a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se midió en el espectrofotómetro a 340

nm. Debido a la sensibilidad de la reacción se verificó, previo a la medición de las muestras, la correcta elaboración de la disolución 3 con un patrón de serina de concentración 0,1 mg/ml.

Tabla 2: Cantidades de las soluciones y reactivos necesarios para la determinación de aminoácidos

Disolución	Reactivo	150 ml	225 ml
Disolución 1	di-Na-Tetraborato decahidratado (g)	5,715	7,62
	(SDS) Na-dodecil-sulfato (g)	0,15	0,2
	Agua Milli-Q (ml)	100	150
Disolución 2	(OPA) o-phthaldialdehido (g)	0,12	0,16
	Etanol (ml)	3	4
Disolución 3 (Disolución 1 + Disolución 2)	(DDT) Dthiothreitol (g)	0,132	0,176
	Agua ultrapura (ml)	Enrasado a 150 ml	Enrasado a 225 ml

Optimización de la hidrólisis

Con la metodología previamente especificada se procedió a montar distintos ensayos con el fin de determinar las condiciones adecuadas para la hidrólisis enzimática, para lo cual se contaba con cuatro proteasas, dos proporcionadas por Novozyme (Flavourzyme 1000L y Alcalasa 2,5L) y dos proporcionados por Biorizons Biotech, que por razones comerciales se las ha llamado Bio A y Bio B. Se realizaron los ensayos detallados en la **Tabla 3** con el fin de determinar la proteasa con mayor potencial y la dosis adecuada de la misma para la hidrólisis de *Scenedesmus almeriensis*, para esto se montó el ensayo a una temperatura y pH constantes de 40°C y 8 respectivamente. Esta temperatura y pH fueron establecidos en un ensayo anterior del

Tabla 3: Combinación de enzimas y dosis para los ensayos de hidrólisis de *S. almeriensis*

Enzima	Número de reactor	Dosis de enzima
Flavourzyme 1000L	Reactor 1	0,1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 2	1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 3	3 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 4	5 % p/p _{biomasa seca}
Alcalasa 2,5L	Reactor 1	0,1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 2	1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 3	3 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 4	5 % p/p _{biomasa seca}
Bio A	Reactor 1	0,1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 2	1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 3	3 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 4	5 % p/p _{biomasa seca}
Bio B	Reactor 1	0,1 % p/p _{biomasa seca}

	Reactor 2	1 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 3	3 % p/p _{biomasa seca}
	Reactor 4	5 % p/p _{biomasa seca}

El próximo paso fue encontrar la combinación de enzimas que diera lugar a un mayor grado de hidrólisis, para lo cual se realizó combinaciones entre ellas a una dosis del 5% con el fin de asegurar el mayor porcentaje. La combinación del ensayo se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Combinación de enzimas para determinar el incremento en el grado de hidrólisis.

Enzima	Número de reactor	Dosis de enzima
Control	Reactor 1	5%
Bio B + Alcalasa 2,5L	Reactor 2	
Bio B + Flavourzyme 1000L	Reactor 3	
Bio B + Bio A	Reactor 4	

Para la optimización de la hidrólisis se empezó a trabajar a la par con los ensayos de rotura que se encontraban efectuando en la Estación Experimental Cajamar. Se utilizaron biomásas sometidas a distintos tratamientos de rotura tanto mecánicas como químicas, optimizando para cada tratamiento la temperaturas y pH de la hidrólisis con el fin de encontrar la combinación adecuada para las enzimas seleccionadas y determinar el mayor grado de hidrolizado.

Estos ensayos se realizaron biomasa tanto con liofilizada como fresca de *Scenedesmus almeriensis*, y una vez optimizado se realizó un ensayo con *Nannochloropsis gaditana* con el fin de determinar si la optimización encontrada se podía aplicar a otra especie de microalga distinta de *S. almeriensis*.

Análisis estadístico

Para detectar las diferencias significativas en los resultados se realizó un ANOVA con el programa Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, Estados Unidos)

Resultados y Discusión

Además de la composición de proteínas, se determinó la composición de lípidos, carbohidratos y cenizas para la biomasa de *Scenedesmus almeriensis* con la que se trabajó en la hidrólisis enzimática, dando los resultados un 25% de lípidos totales, 40% de contenido de proteínas, 25% de carbohidratos y 10% de cenizas. Los valores de proteínas concuerdan con investigaciones como la de Romero J. *et al.*, 2012, donde se determinó por medio de una modificación del método de Lowry, mismo que se utilizó en este estudio, una composición proteica del 41% en *S. almeriensis*; sin embargo, en el estudio realizado por Apandi *et al.*, 2107 se encontraron cantidades de proteínas entre el 35 y 50%; esto se debe según los autores a las condiciones del medio utilizado para la producción de *Scenedesmus*; pues, el estrés que se puede

generar durante el crecimiento por la disminución o ausencia de algún elemento tiene consecuencia directa en la capacidad de acumulación de las proteínas en el cultivo.

Tras la rehidratación de la biomasa al 10% p/v se comprobó que efectivamente el contenido en biomasa era el calculado, dando un promedio de 9,3% para la biomasa liofilizada y para el caso de la biomasa fresca se tuvo un 4,06% de contenido de biomasa, puesto que más concentrada daba problemas de agitación por su alta viscosidad.

Los resultados de los experimentos realizados con cada una de las proteasas se pueden ver en la **Figura 9**, donde se aprecia que los valores más altos del grado de hidrólisis siempre se obtienen con la proteína al 5%, obteniéndose un 13.63% de grado de hidrólisis con Flavourzyme 1000L, 14.60% de grado de hidrólisis con Alcalasa 2,5L, 3.10% con Bio A y 30.88% con Bio B. De estos porcentajes se calculó la cantidad de aminoácidos en g/L y como resultados se obtuvieron 7.64, 7.81, 2.91 y 14.03 respectivamente.

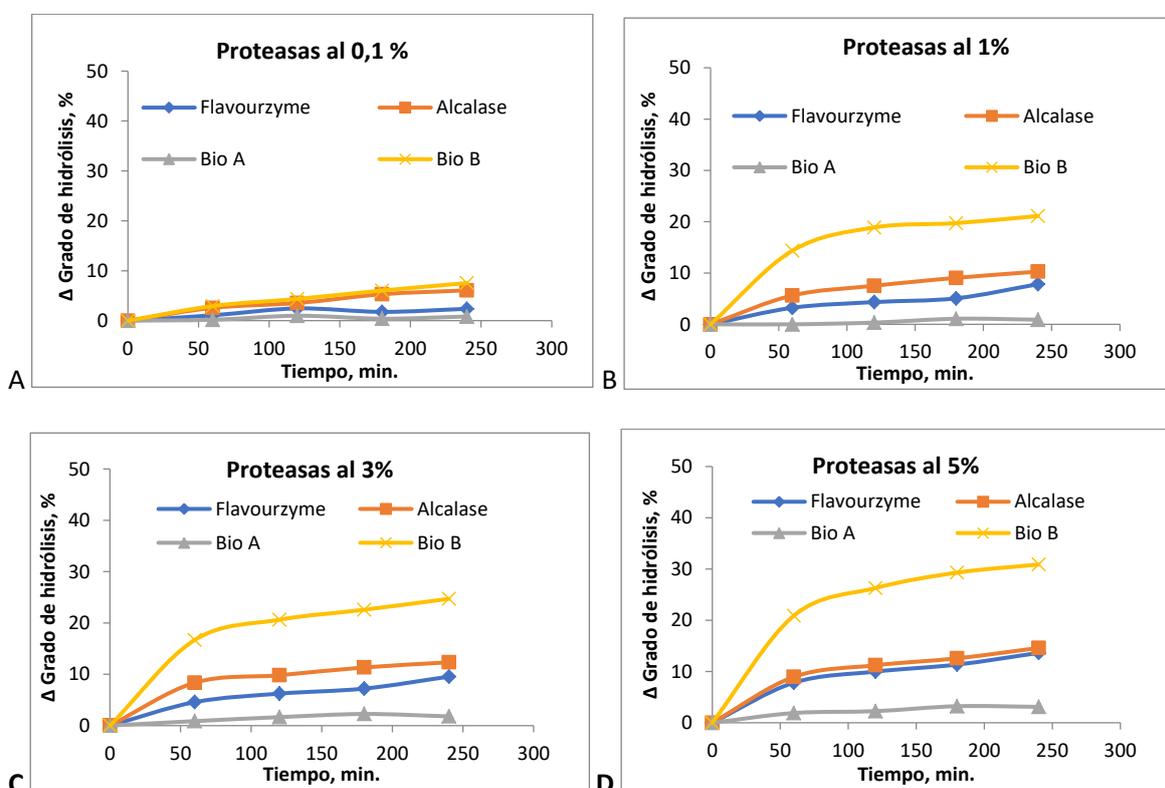


Figura 9: Representación del grado de hidrólisis alcanzado en con cada concentración de enzimas ensayado vs el tiempo de reacción enzimática **A)** Concentración al 0,1% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B **B)** Concentración al 1% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B **C)** Concentración al 3% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B **D)** Concentración al 5% de Flavourzyme, Alcalasa, Bio A y Bio B

Como se puede apreciar en la **Figura 9**, los porcentajes más altos de hidrólisis después de la ruptura con el ultrasonido se alcanzan al 5% de proteasa. Se sabe que la relación enzima-sustrato (E-S) es fundamental en procesos de hidrólisis. Como menciona Acosta et al., 2015, el primer factor en los procesos hidrolíticos es el tiempo y el segundo es la relación E-S, pues a mayor cantidad de enzimas se puede lograr mayor conversión de sustrato a producto, y estos dos factores son primordiales al momento de optimizar un proceso de hidrolizado; pues, el uso excesivo de enzimas representa un coste mayor de producción.

En la **Figura 10** se observan los resultados de las combinaciones de proteasas que se realizó teniendo como control la enzima Bio B, que individualmente había dado mejores resultados en los ensayos anteriores. El grado de hidrólisis final alcanzado varía del 30.5% usando sólo la enzima Bio B a 33.1% combinando Bio B con Alcalasa, 40% al ser combinada con Flavourzyme y 28.6% al ser combinada con Bio A. Por tanto, el mejor resultado para la combinación de enzimas se obtuvo con la combinación de Bio B y Flavourzyme, que dio un grado de hidrólisis del 40% y 15.65 g/L de aminoácidos frente a un 30.5% y 12.32 g/L del control Bio B.

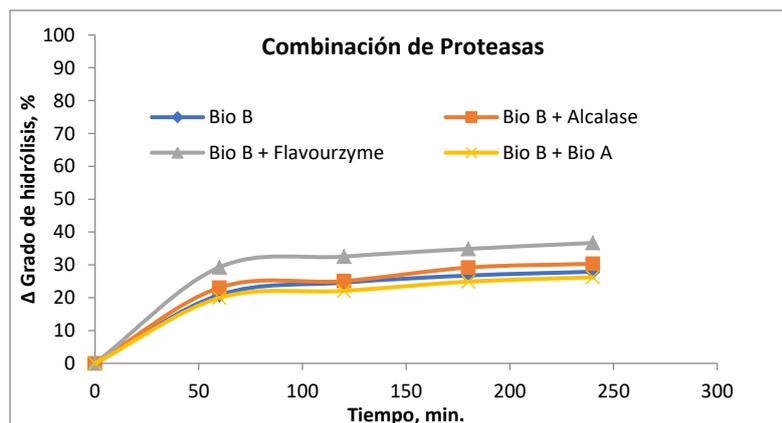


Figura 10: Grado de hidrólisis enzimática después de la combinación al 5% de proteasas: Bio B (Control), Bio B + Flavourzyme, Bio B + Alcalasa, Bio B + Bio A, comparada frente al tiempo de reacción.

El ANOVA realizado a los resultados confirma que la combinación entre Bio B + Flavourzyme 1000L alcanzó un grado de hidrólisis significativamente superior a las demás combinaciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Este incremento puede deberse a la acción de las enzimas de forma individual, por un lado Flavourzyme 1000L se ha determinado en el estudio de Mertz et al., 2015 que es un mix de 8 enzimas entre ellas tres endopeptidasas, dos aminopeptidasas, dos dipeptidilpeptidasas y una amilasa, esta combinación permite asegurar que Flavourzyme 1000L actúe sobre muchas conformaciones de proteínas para hidrolizar, y a falta de información por aspectos comerciales de Bio B podemos asumir que las enzimas que lo conforman se complementan con las de Flavourzyme 1000L .

La creación de biofertilizantes a nivel industrial debe ser económicamente sustentable, por lo que, habiendo ajustado el tipo de enzimas necesarias y la dosis, se comenzó a utilizar procesos de rotura celular enzimáticos, puesto que son más económicos que los físicos. Se determinó que la enzima celulasa Carezyme era más efectiva al momento de romper la célula por métodos enzimáticos, de esta manera se eliminó de nuestros ensayos la rotura con el sonicador y se decidió trabajar con la proteasa más eficiente que fue Bio B, con estos parámetros se procedió a encontrar el pH y temperatura adecuada para la hidrólisis a partir de rotura enzimática.

Con el fin de optimizar la hidrólisis enzimática se probaron diferentes rangos de temperatura (40, 50 y 60°C) y pH (7, 8 y 9). Los ensayos dieron los resultados indicados en la **Figura 11**, donde se aprecia que la temperatura óptima es 50°C y pH 7. se realizó un análisis

ANOVA multifactorial en donde se sometió a análisis la influencia de la temperatura, pH y el tiempo (Tabla 9 y 11 , Figura13) . De esta manera se determinó que la temperatura idonea para los ensayos de hidrólisis era la de 50°C y el pH se podía trabajar en pH 7 u 8 de lo cual se escogió el pH 7 por motivos de optimización de costos en el proceso.

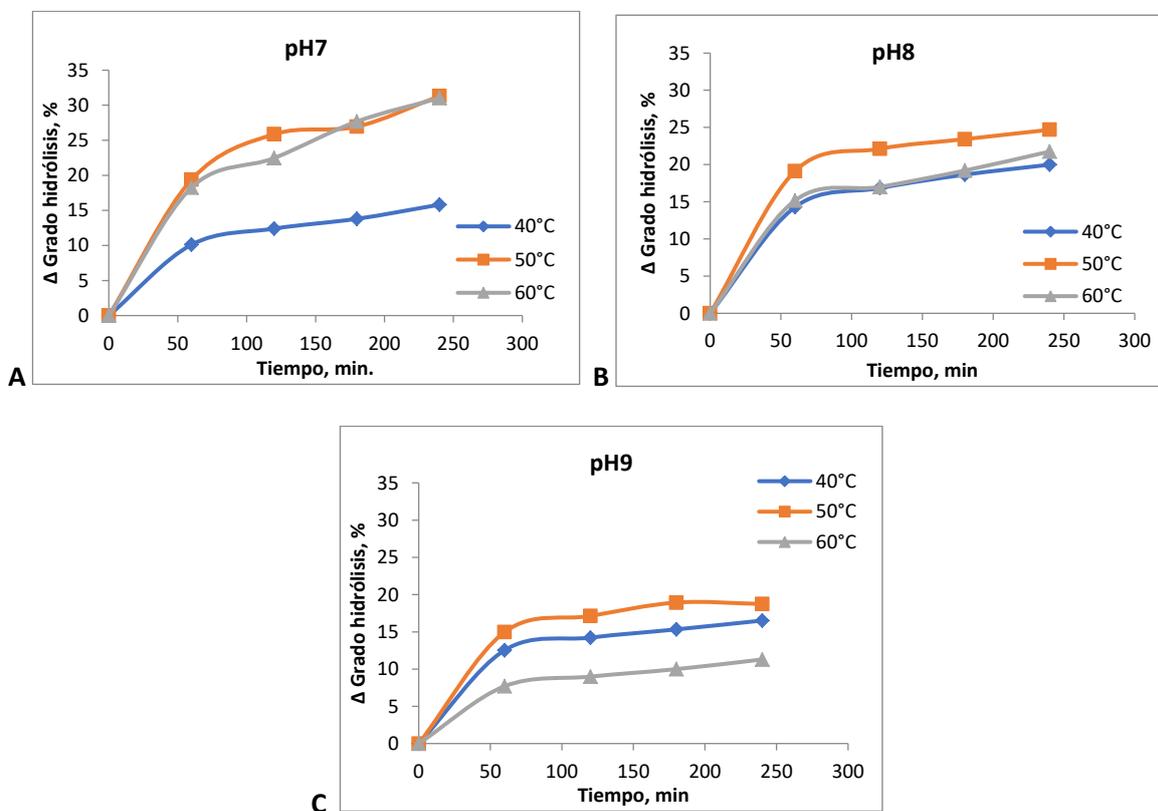


Figura 11: Influencia de la temperatura y pH en el grado de hidrólisis **A)** ensayo a pH 7 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C **B)** Ensayo a pH 8 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C y **C)** ensayo a pH 9 con tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C.

El pH y la temperatura óptimos coinciden con los reportados por otros autores en el proceso de hidrólisis, por ejemplo, Romero, Ación, & Fernández, 2012, reportan que para la hidrólisis de *S. almeriensis* con Flavourzyme 1000L se obtuvieron mejores resultados a la misma temperatura y pH reportados en este trabajo para Bio B. Otro estudio que verifica el pH es el de Lee et al., 2009, en el que estudian varias enzimas para obtener hidrolizado de las microalgas *Pediastrum duplex* y *Dactylococcopsis fascicularis*; sin embargo, las temperaturas en las que se trabajó fueron entre 25 y 30°C. Hoa et al, 2014 utilizó la misma temperatura y pH reportados para la hidrólisis de proteínas de soja.

Una vez optimizada la temperatura y pH es importante optimizar la cantidad de cada enzima, tanto de la celulasa como de la proteasa. Se realizaron dos ensayos en el cual se combinaban Bio B y Carezyme con el fin de determinar cual era la concentración adecuada. En el primer ensayo que se observó que el porcentaje de Carezyme no influía en el grado de hidrólisis (**Figura 12**) pues se llegaban a valores entre el 28 y el 31%, esto puede deberse al proceso de liofilización al que fue sometido la biomasa; pues, si no se coloca un criopreservante en el proceso de congelación se forman cristales dentro de la célula (García & Uruburu, 2001) lo que puede ocasionar que la pared de celulosa se rompa dejando así la capa de proteínas.

Se realizó el mismo ensayo, pero esta vez manteniendo fija la proteasa Bio B, esto confirmó lo mencionado anteriormente, que la dosis de la celulasa Carezyme no influía en el proceso de hidrólisis de la biomasa liofilizada de *S. almeriensis*. Sin embargo, se pudo determinar que al 3 y al 5% de proteasa se obtenía 25% de grado de hidrólisis, por lo cual se decidió continuar con el resto de ensayos al 3% de enzima por optimización de costos. Esto puede deberse a la optimización previa del pH y temperatura ya que, estos dos factores influyen en la conformación espacial de las proteínas, haciéndolas más biodisponibles para la hidrólisis, ya que a un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

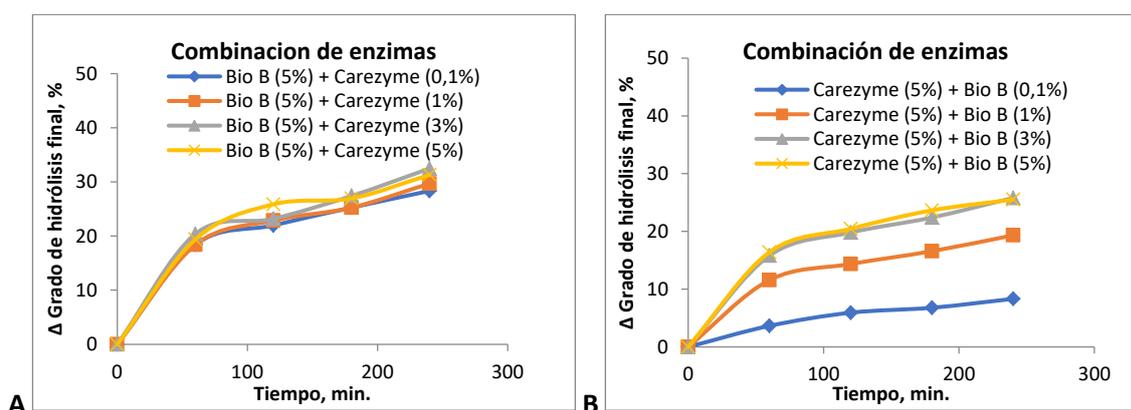


Figura 12: Combinación de enzima Bio B y Carezyme para determinar la dosis idónea de cada una **A)** Ensayo en la que se mantuvo fija la concentración de Bio B a un 5% como concentración máxima y se varió la dosis de Carezyme **B)** Ensayo manteniéndose fija la celulasa Carezyme y se varió la dosis de Bio B

Una vez obtenida la temperatura, pH y dosis de enzima, se procedió a realizar el ensayo en biomasa fresca. Puesto que el método de rotura celular previo a la hidrólisis fue demostrado sólo con la biomasa liofilizada, se comprobó la eficacia de los diferentes métodos en la biomasa fresca. Así, se probó la rotura enzimática mediante Carezyme, por ultrasonido, y homogeneización, tomando como referencia un control sin ningún tratamiento de rotura. Cabe señalar que la biomasa que se trató tenía un contenido del 4% en peso seco, en vez del 10% como se hizo con la biomasa liofilizada. Se obtuvieron los siguientes resultados de grado de hidrólisis (**Figura 13**): 77% de grado de hidrólisis y 16.60 g/L de aminoácidos cuando la biomasa fue rota por ultrasonido, 80% de grado de hidrólisis y 17.08 g/L de aminoácidos cuando se rompió con el homogeneizador, sin ningún tipo de rotura celular previa se alcanzó un 53% de grado de hidrólisis y 10.80 g/L de aminoácidos y por último usando Carezyme para una rotura enzimática se llegó al 56% de grado de hidrólisis y 11.31 g/L de aminoácidos. Por tanto, las hidrólisis más altas con biomasa fresca se obtienen rompiendo previamente la biomasa con ultrasonido y homogeneización, sin embargo, el consumo eléctrico de estas tecnologías es elevado, especialmente el del sonicador, siendo la rotura enzimática la más económica. Sería necesario análisis económico para la elección de un método de rotura para la fabricación de biofertilizantes. Comparando estos resultados con los obtenidos con biomasa liofilizada, se observan grados de hidrólisis mayores para la biomasa fresca, suponiendo una ventaja económica, puesto que al hidrolizar la biomasa fresca se evitan los costes del secado de la biomasa.

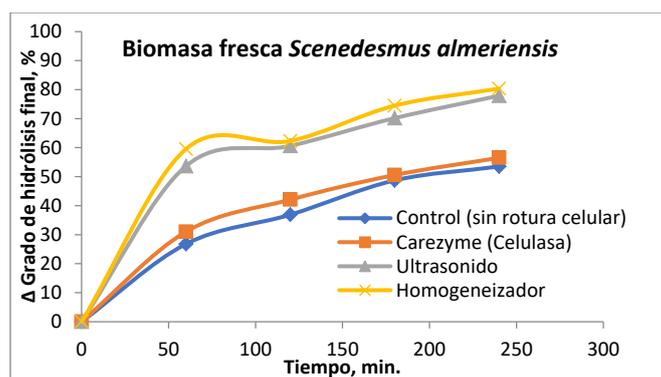


Figura 13: Evolución del grado de hidrólisis enzimática en el tiempo con Bio B a 50°C y pH 7 con biomasa de *Scenedesmus almeriensis* fresca con diferentes métodos de rotura celular: Control sin ningún tipo de rotura celular, rotura enzimática con Carezyme al 5%, rotura mediante ultrasonido y mediante homogeneización de alta presión.

Por último, para comprobar que la metodología optimizada es extrapolable a otras microalgas, se realizó un ensayo con *Nannochloropsis gatidana* con un contenido en proteínas del 23%. Se escogió esta microalga al tratarse de una especie de agua salada y con diferente estructura y composición a *Scenedesmus almeriensis*. Se hicieron nuevamente ensayos de hidrólisis con diferentes métodos de rotura celular para la biomasa fresca, y con biomasa liofilizada con rotura enzimática, puesto que se trata del método más económico, para la hidrólisis enzimática se utilizó nuevamente la enzima Bio B. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 14**, alcanzando para la biomasa liofilizada un 33% de grado de hidrólisis y 9.78 g/L de aminoácidos, para la biomasa fresca con Carezyme se llegó a un 34% de grado de hidrólisis y 9.75 g/L de aminoácidos, para biomasa fresca sin aplicación de rotura celular se alcanzó un 40% de grado de hidrólisis y 10.96 g/L de aminoácidos y, por último, para biomasa fresca rota por el ultrasonido como control, se alcanzó un 53,2% de grado de hidrólisis y 13.84 g/L de aminoácidos. En esta ocasión, se alcanzó el mismo grado de hidrólisis con biomasa liofilizada y fresca con rotura enzimática, siendo similar al control. Fue con la rotura por ultrasonido como se obtuvo la mayor hidrólisis, al igual que en el caso de *S. almeriensis*. Sin embargo, no se alcanzaron grados de hidrólisis tan altas como con *S. almeriensis*.

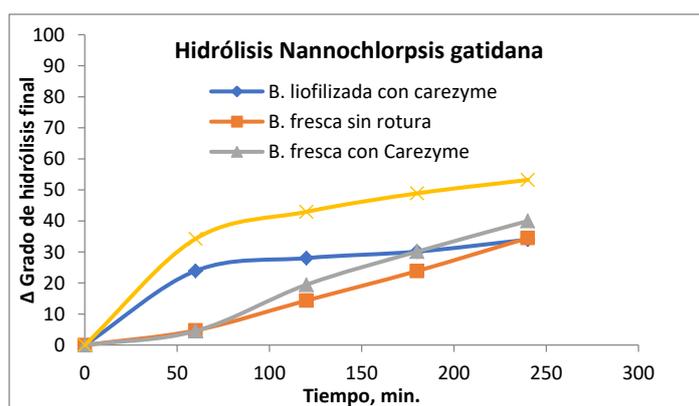


Figura 14: Resultados de la hidrólisis enzimática realizada con *Nannochloropsis gatidana* al 10% p/v con biomasa liofilizada y biomasa fresca con celulasa Carezyme, biomasa fresca sin rotura previa y biomasa fresca rota por el ultrasonido. Las hidrólisis fueron llevadas a cabo por la enzima Bio B.

Conclusiones

- El proceso de hidrólisis depende de la afinidad que tenga la enzima por el sustrato, pues, como se ha corroborado no todas las enzimas utilizadas han tenido resultados idóneos mostrando así, diferencias muy marcadas entre las mismas. En el caso de esta investigación Bio B individualmente tuvo un grado de hidrólisis un 20% superior que el resto de enzimas utilizadas, y se corrobora lo anteriormente mencionado, al realizar la combinación con la segunda mejor enzima, Flavourzyme, pues se alcanza un 5% más de hidrolizado, demostrando así que, las interacciones enzima-sustrato depende de la estructura y conformación de las proteínas y de las enzimas.
- La optimización de los factores como temperatura, pH, dosis enzimáticas, relación enzima-sustrato, contenido proteico son fundamentales al momento de tratar de obtener altos grados de hidrólisis, sin embargo, se debe también tener en cuenta el presupuesto que esta optimización puede llevar a escala industrial para determinar cuáles condiciones son las más adecuadas, tomando en cuenta este criterio se puede concluir que las condiciones adecuadas para la hidrólisis de la biomasa fresca de *S. almeriensis* fueron 50°C, pH 7 y concentración de proteasa del 3% p/p_{biomasa seca}. Estas condiciones permitieron alcanzar valores entre el 77 y 80% para el caso de romper la biomasa con ultrasonido o el homogeneizador, y entre el 53 y 56% en el caso de trabajar con rotura enzimática. El mayor grado de hidrólisis alcanzado en la biomasa fresca genera una ventaja económica en la creación de biofertilizantes, puesto los procesos de secado de la biomasa son costosos.
- La eficacia del proceso con el que la célula se rompe es uno de los pasos primordiales dentro de la hidrólisis enzimática, ya que de esto dependerá la cantidad de proteínas disponibles para ser hidrolizados por las enzimas. Fue la rotura por ultrasonido donde siempre se obtuvo mayores grados de hidrólisis comparado con la rotura enzimática, donde se obtenía alrededor de un 30% menos de hidrolizado.
- Se pudo validar la metodología con otra especie, *Nannochloropsis gatidana*, la cual posee distinta morfología, condiciones de cultivo diferentes y contenido proteico menor. Se pudo comprobar que a pesar de estas distinciones se llegaron a grados de hidrólisis similares a los de *Scenedesmus almeriensis* pudiendo concluir que el proceso de acondicionamiento de los parámetros para las enzimas fueron los idóneos.

Bibliografía

Apandi, N., Mohamed, R., Latiff, N., Mohd , N., & Al-Gheethi, A. (2017). Protein and Lipid Content of Microalgae *Scenedesmus* sp. Biomass Grown in Wet Market Wastewater. *MATEC Web of Conferences*, 103.

Acosta , E., Benítez , R., Lenis, L., & Hoyos , J. (2015). OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PROTEINS PRESENT IN SEEDS OF GUANDUL (*Cajanus cajan*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 114-122.

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Research Gate*, 227 - 236.

Elliott, L., Feehan, C., Laurens, L., Pienkos, P., Darzins, A., & Posewitz, M. (2012). Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection. *Algal Research*, 102 - 113.

Fanés, I. (2008). *Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España* . Granada, Andalucía , España: Universidad de Granada.

García , J., & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of applied phycology*, 1051 - 1061.

Garcia Cubero, R. (2014). PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CO₂. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

García, M., & Uruburu, F. (2001). La conservación de las cepas Microbianas. *Temas de Actualidad*, págs. 30:12 - 30:16.

Hoa, N., Xuan, T., Minh, N., & Dao, D. (2014). Investigation of Enzymatic Optimization by Flavourzyme and Celluclast for Soy Protein Hydrolysate Powder. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN PHARMACY, BIOLOGY AND CHEMISTRY*, 3(3), 550-562.

Kakko, N., Ivanova, N., & Rantasalo, A. (2016). *Universidad Aalto*. Recuperado el 11 de Junio de 2017, de https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwj36u6117XUAhXLcBoKHToSDhUQFggoMAA&url=https%3A%2F%2Fmycourses.aalto.fi%2Fpluginfile.php%2F398454%2Fmod_folder%2Fcontent%2F0%2FCell%2520disruption%2520methods.pdf

Kawalekar, J. (2013). ROLE OF BIOFERTILIZERS AND BIOPESTICIDES FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE. *Journal of Bio Innovation*, 73 - 78.

Köhler, H., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science*, 749-765.

Lee, S., Kim, A., Kang, M., Lee, J., & Jeon, Y. (2009). Potential Antioxidant Activities of Enzymatic Digests from Fresh Water Microalgae, *Pediastrum duplex* and *Dactylococcopsis fascicularis*. *Algae*, 24(3), 169 - 177.

Lopez, I. (Noviembre de 2016). Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación de aguas residuales. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., . . . Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Chemistry, A -L*.

Ovissipour , M., Safari , R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. (2009). Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Visceral Protein. *Food Bioprocess Technology*, 460 - 465.

Peñafiel, R., Monserrat, F., Solano, F., & Lozano , J. (2009). Análisis de aminoácidos en muestras biológicas impregnadas en papel de filtro por técnicas fluorimétricas. *repositorio Universidad de Murcia* , 5 - 25.

Quevedo, C., Morales, S., & Acosta , A. (2008). *Scenedesmus* sp. growth in different culture mediums for microalgal protein production. *Revista de la facultad de Química Farmacéutica*, 25 - 31.

Romero, J., Ación, F., & Fernández, J. (2012). Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 164 - 172.

Shaaban, M. (2001). Nutritional status and growth of Maize plants as affected by green microalgae as soil additives. *Online journal of biological sciences*, 479-479.