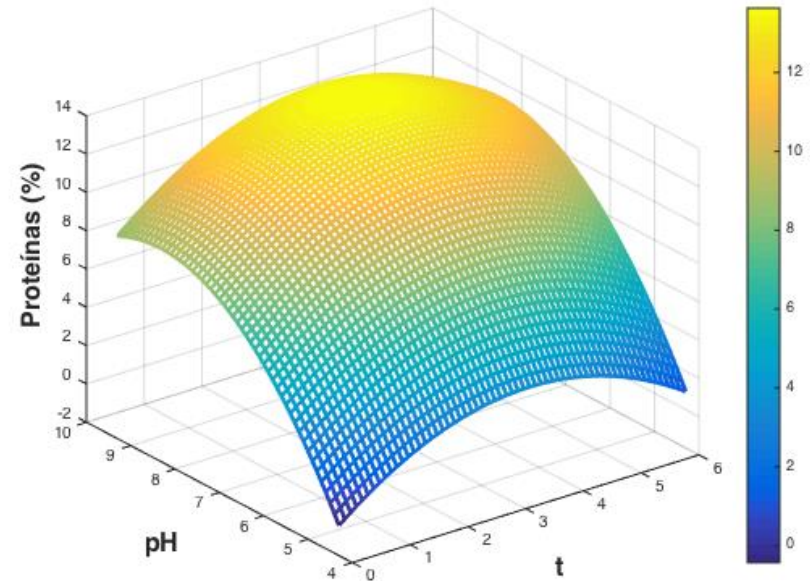


- REACTORES BIOLÓGICOS Y ENZIMÁTICOS
- BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS LIBRES A PARTIR DE MICROALGAS APLICABLES A LA DEPURACIÓN DE GASES



J.A. Callejo¹, M. Ramírez¹, J. Bolívar², A. Valle² y D. Cantero¹

Proyecto “Revalorización del biogás de vertedero mediante un sistema biológico integrado (Biointegra3)”

¹Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos.

²Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública.

Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.

Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentario (IVAGRO).

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS AGROALIMENTARIOS DE LA ESCUELA
INTERNACIONAL DE DOCTORADO EN AGROALIMENTACIÓN (eidA3)

INTRODUCCIÓN

Interés creciente por las microalgas para procesos integrados

Depuración/aprovechamiento de efluentes

✓ Gaseosos

CO₂

✓ Líquidos

PO₄

NO₃

Urbanos, industriales...

BIOPRODUCTOS

✓ Alimento animal

✓ Nutracéuticos

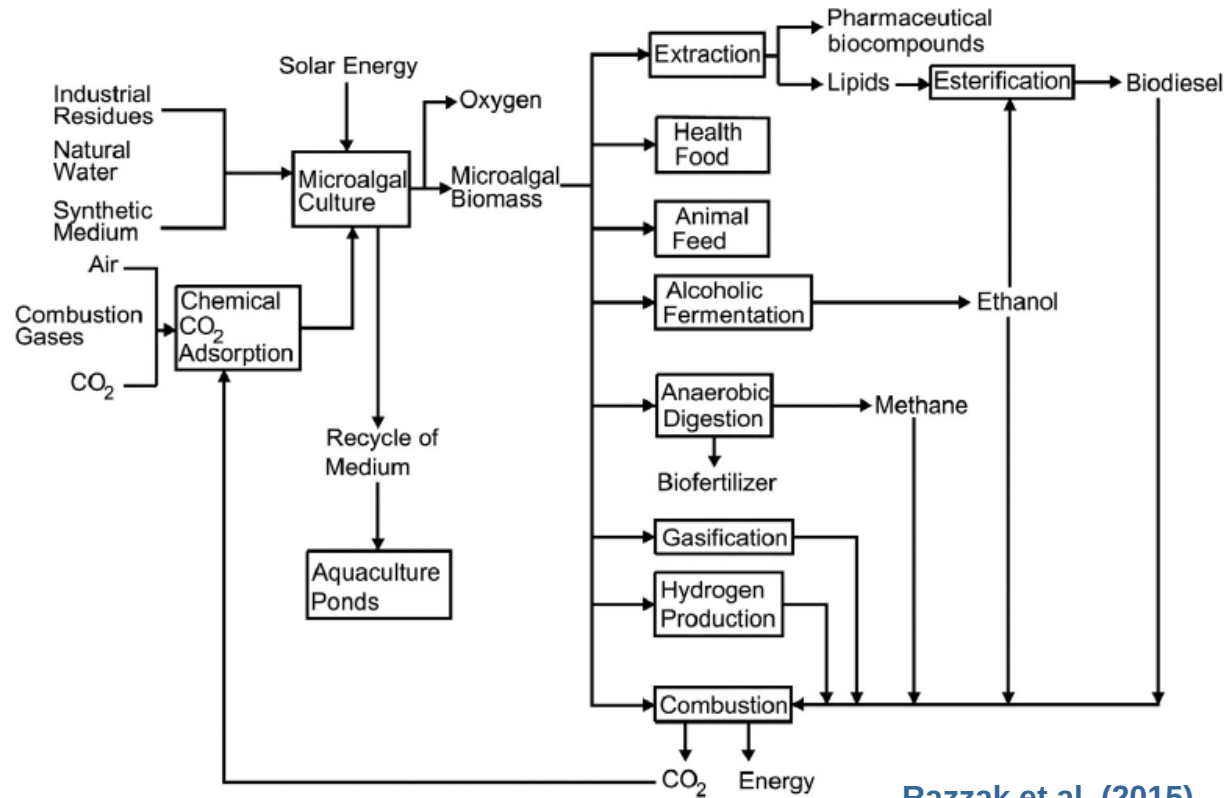
✓ Moléculas bioactivas

BIOENERGÍA

✓ Biocarburantes

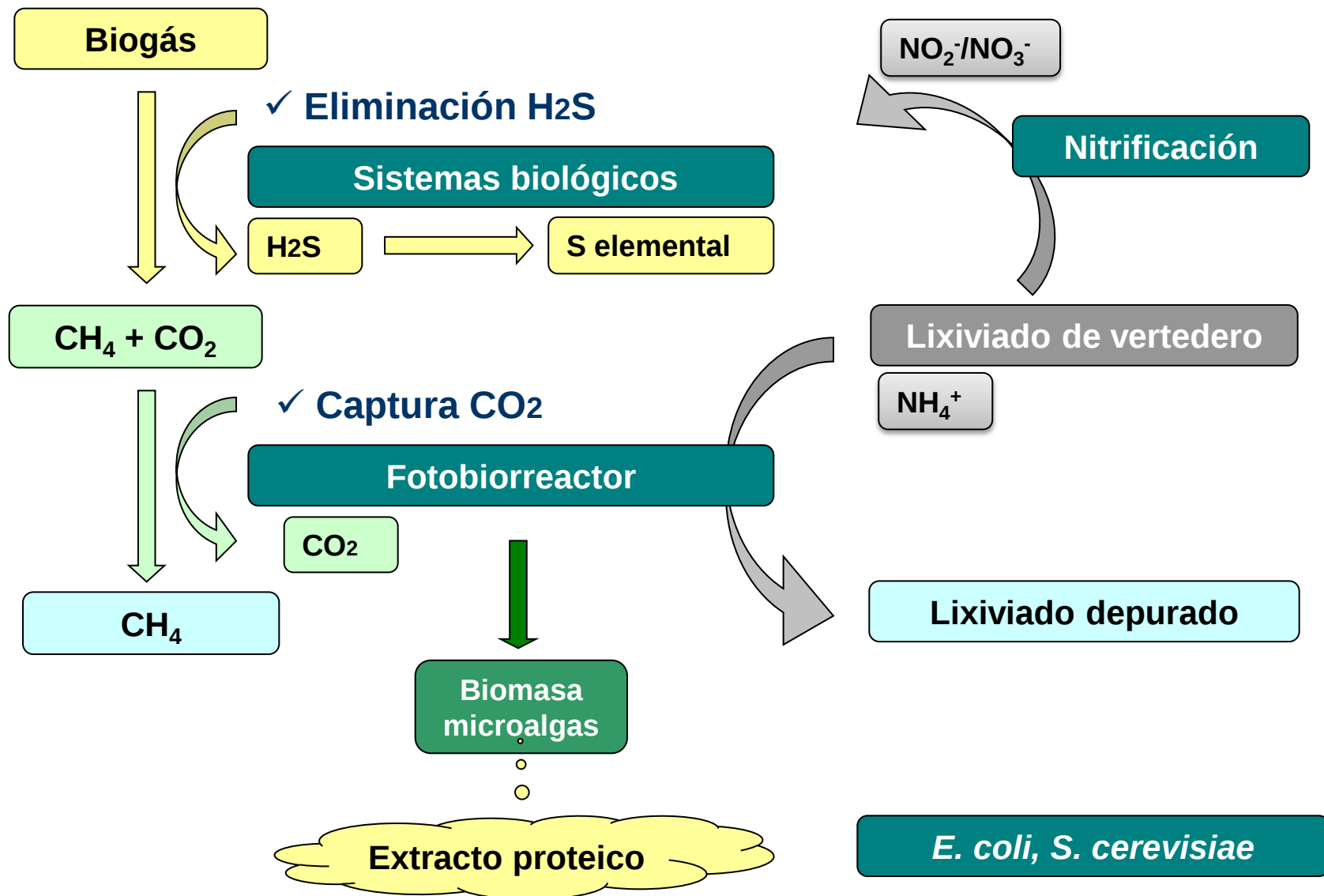
✓ Biohidrógeno

✓ Biogás



INTRODUCCIÓN

Proceso integrado enriquecimiento de biogás



INTRODUCCIÓN

Chlorella vulgaris para depuración de gases

✓ Elevada tolerancia a altas concentraciones de CO₂ (hasta del 15%) (Anjos et al., 2013; Chiu et al., 2008; Yun et al., 1997)

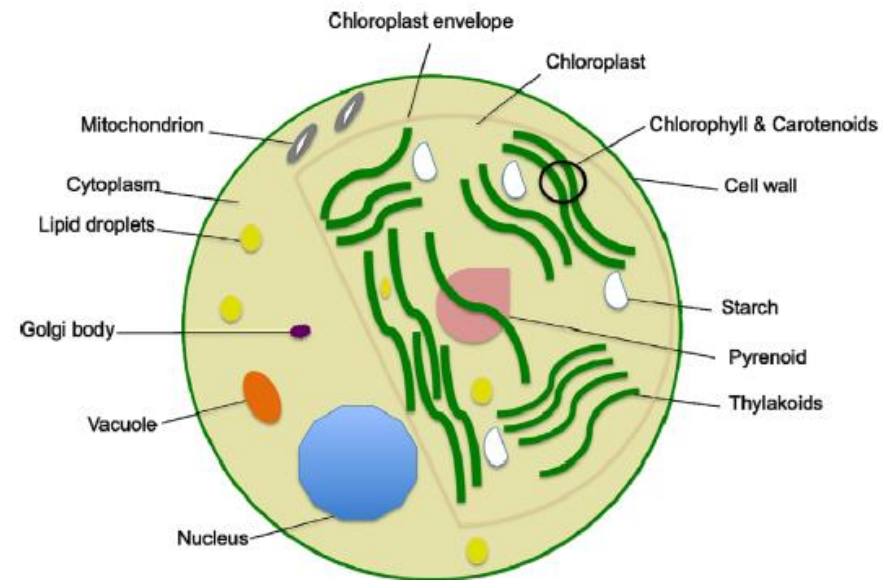
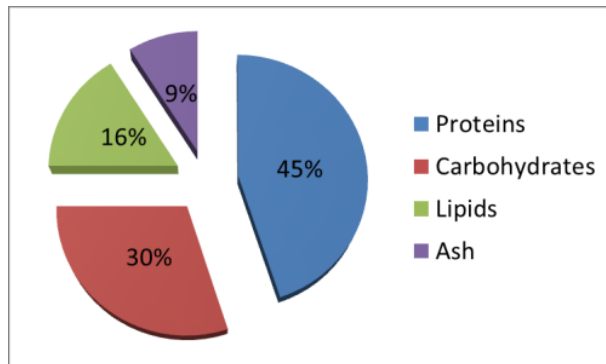
✓ Especie de pared celular resistente (Gerken et al., 2013)

Normal *C. vulgaris* cell walls:



Gerken et al. (2013)

✓ Alto contenido en proteínas



Estructura de *Chlorella vulgaris* (Safi et al., 2014)

- ✓ extracción de lípidos (Cho et al., 2013; Lee et al., 2010; Zheng et al., 2012, 2011)
- ✓ extractos ricos en azúcares para bioetanol (Harun et al., 2011; Kim et al., 2014; Lee et al., 2011)
- ✓ pretratamiento para biogás (Mahdy et al., 2014a, 2014b; Mendez et al., 2013; Passos et al., 2016)

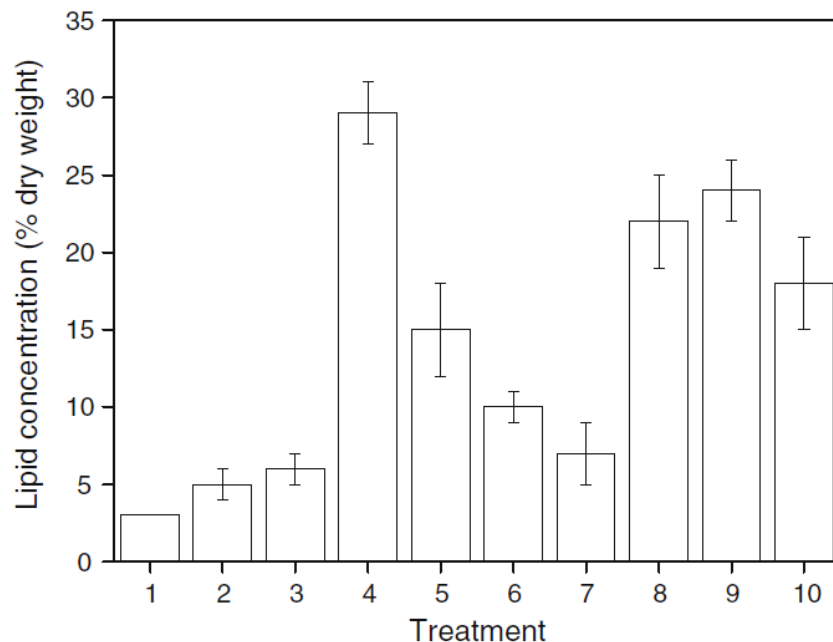


Fig. 2 Effect of different methods on cell disruption of *Chlorella vulgaris*. 1 Control (intact), 2 grinding with quartz sand under wet condition, 3 grinding with quartz sand under dehydrated condition, 4 grinding in liquid nitrogen, 5 ultrasonication, 6 bead milling, 7 snailase, 8 lysozyme, 9 cellulase, 10 microwaves

Zheng et al. (2011)

INTRODUCCIÓN

Estudios de la fracción proteica

✓ métodos de análisis

(Barbarino and Lourenço, 2005; González López et al., 2010; Rausch, 1981; Slocombe et al., 2013)

✓ factores de conversión de nitrógeno a proteína

(González López et al., 2010; Lourenço et al., 2004, 2002, 1998; Safi et al., 2014)

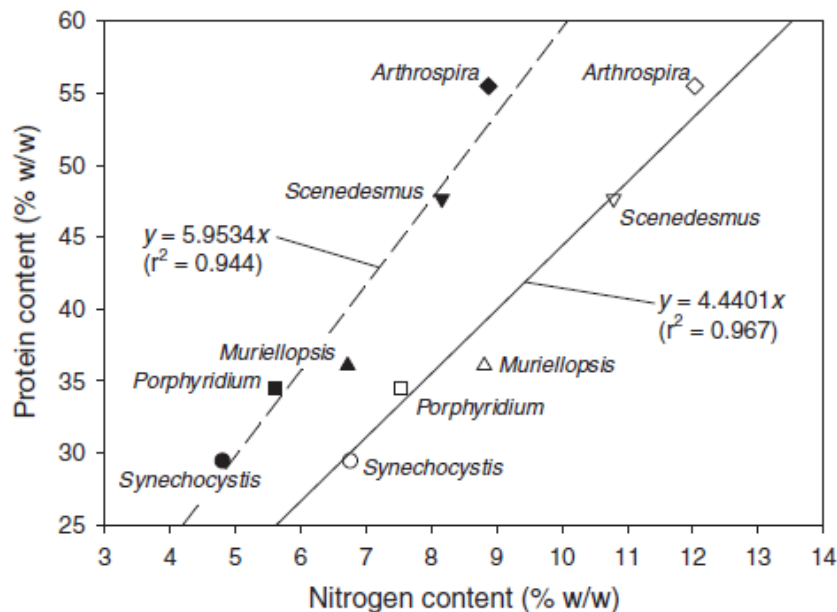


Fig. 4. Correlations between the protein content (Lowry method) of the biomass and: (a) the total measured nitrogen content (hollow symbols); (b) Kjeldahl nitrogen content (filled symbols). The dashed and solid lines are the regression lines through the protein nitrogen and total nitrogen data, respectively.

González López et al. (2010)

Micro-algae extraction

Vortex 5 mg DW in
0.2 mL 24% (w/v) TCA.
Incubate at 95°C for 15
min

TCA precipitation

Cool to RT, add 0.6 mL
water.
Spin at 15,000 rpm for
20 min at 4°C

TCA precipitate
Resuspend in 0.5 mL
Lowry Reagent D

Supernatant
Discard

Alkaline suspension
Incubate at 55°C for 3 h
Spin at 15,000 g for 20
min at room temp

Pellet
Discard

**Retain
supernatant**
Proceed with the
Lowry assay
(30 min)

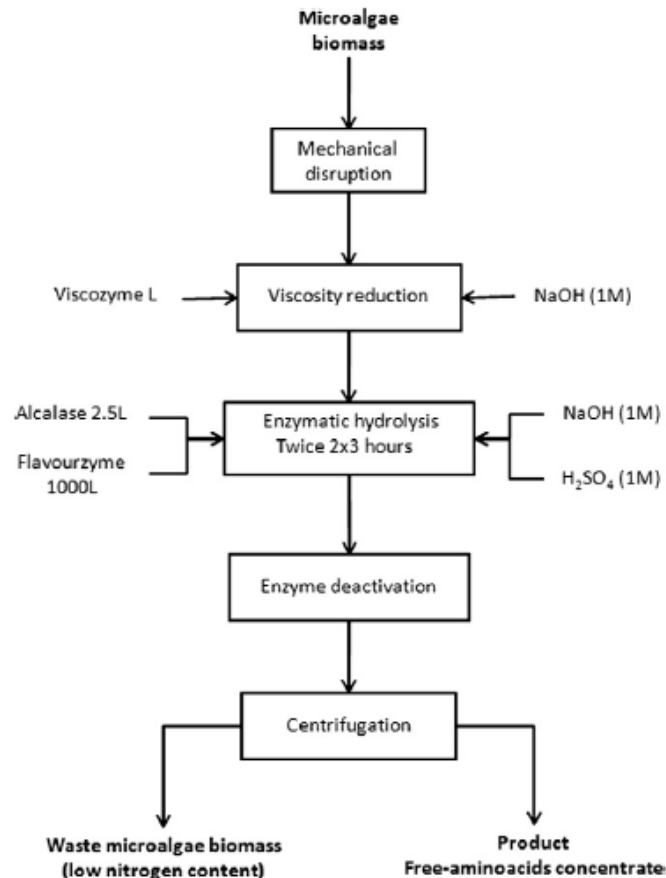
Slocombe et al. (2013)

INTRODUCCIÓN

Estudios sobre extracción de proteínas e hidrólisis a aminoácidos

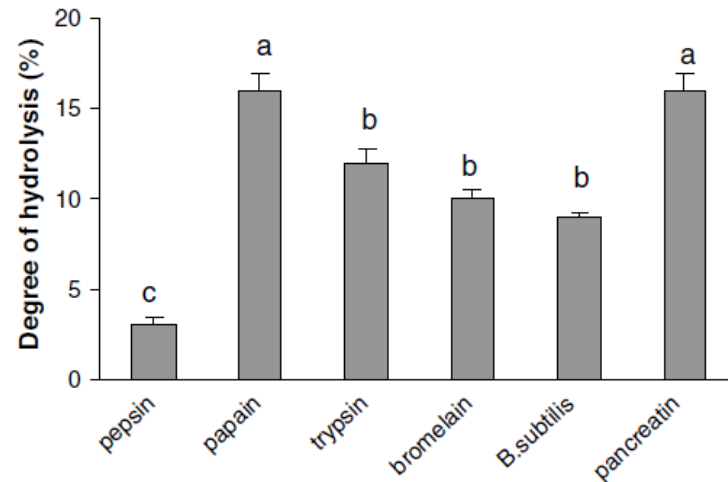
Romero et al. (2012)

✓ *Scenedesmus almeriensis*



Morris et al. (2008)

✓ *Chlorella vulgaris*



Kightlinger et al. (2014)

✓ *Chlamydomonas reinhardtii*

✓ Autolysis 50 °C 24 h *E. coli* y *S. cerevisiae*

Chemical properties of yeast extract and algae extract

Property	Yeast extract ^a	Algae extract
α-Amino nitrogen (%)	4.12 ± 0.16	3.86 ± 0.05
Total protein (%) ^b	ND ^c	2.99 ± 0.06
Total carbohydrate (mg/g)	90.2 ± 0.2	92.2 ± 0.1

OBJETIVOS

General:

Evaluar y desarrollar un **método** de obtención de un **extracto** rico en **proteínas** y **aminoácidos** a partir de microalgas basado en la **autólisis**, precedido de un proceso enzimático de **rotura** de la membrana celular con **celulasa**

Específicos:

Evaluar:

- ✓ especie de pared celular **resistente**, *Chlorella vulgaris*
- ✓ efecto sobre biomasa **fresca**, pared mantiene su estructura intacta
- ✓ **diseño** experimental de análisis estadístico de superficie de respuesta

MATERIAL Y MÉTODOS: Condiciones de cultivo de las microalgas y producción de biomasa

Cultivo



- ✓ *Chorella vulgaris* (SAG 211-12) (U. Göttingen, Alemania)
- ✓ Fotobiorreactores 5 L
- ✓ T^a ambiente
- ✓ Luz artificial 4 tubos led ($170 \text{ micromol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 12/12 h
- ✓ Aire y CO_2 mediante burbujeo, filtrado (0,2 micras) pH 7,5-8,2
- ✓ Medio de cultivo Combo (Kilham et al., 1998), 3x N y P
- ✓ Modo semicontinuo $tr = 15,8$ días, biomasa máx. = $0,9 \text{ g l}^{-1}$

Cosechado y acondicionamiento de la biomasa



Ensayos con biomasa húmeda para autólisis:

- ✓ Centrifugación: 5.000 g, 15 min, 4°C
- ✓ Pretratamiento manual con mortero durante 5 min

MATERIAL Y MÉTODOS: Ensayos enzimáticos

Biomasa Fresca pretratada

- ✓ Centrifugación
- ✓ Molido manual mortero 5 min

Disrupción pared celular

Método Enzimático

- ✓ Celulasa Celluclast 1.5 L (Novozymes): 0,1 ml g⁻¹
- ✓ T = 50 °C
- ✓ pH = 5
- ✓ Distintos t

Hidrólisis proteínas

Autólisis

- ✓ 50 °C
- ✓ 24 h
- ✓ Distintos pH

- ✓ Fin reacción: 85°C 10 min
- ✓ Muestras 10.000 g, sobrenadante
- ✓ -20°C hasta análisis

Condiciones:

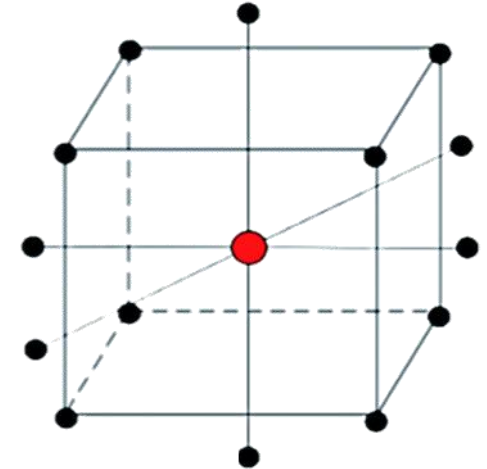
- ✓ Tubos, vol. trabajo 5 ml
- ✓ Incubadora orbital (150 rpm)
- ✓ Concentración biomasa = 10 mg/ml



MATERIAL Y MÉTODOS: **Diseño experimental**

Diseño de análisis estadístico de superficie de respuesta de diseño central compuesto rotatable:

- ✓ Distancia axial: 1.41421
- ✓ Tres puntos centrales
- ✓ N total de ensayos: 11 (4 del diseño factorial, 4 puntos axiales y 3 centrales)



Factores experimentales:

- ✓ tiempo reacción enzimática
- ✓ pH autólisis

Variables de respuesta:

- ✓ Rendimiento de proteínas (%)
- ✓ Rendimiento de FAN (%)

Tabla 1. Niveles de los factores empleados en el diseño experimental

Factor	Nivel del factor					Unidad
	-1,41421	-1	0	1	1,41421	
Tiempo	0,5	1,2	2,8	4,4	5,1	horas
pH	4,3	5,0	6,7	8,3	9,0	pH

- ✓ Statgraphics Centurion XVII (versión 17.1.08)

MATERIAL Y MÉTODOS: Métodos analíticos

Crecimiento de la biomasa

- ✓ Densidad óptica (DO) 680 nm
- ✓ Peso seco 104 °C (24 h)

Determinación de nitrógeno en medio

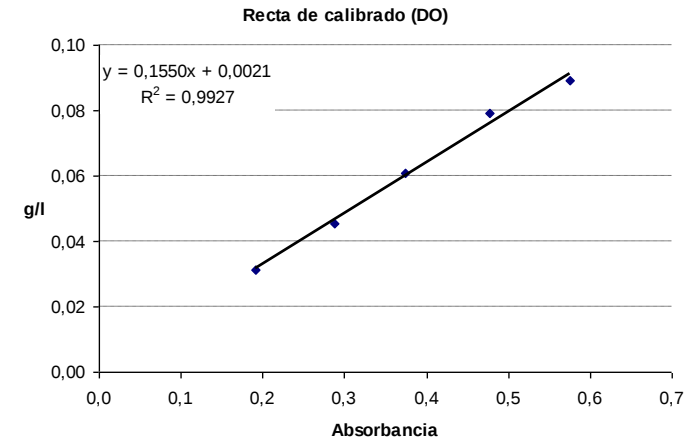
- ✓ Ultravioleta Espectrofotómetro

Contenido en proteínas

- ✓ Método Slocombe et al. (2013)
- ✓ Kedjhal

Rendimiento y cinética de la reacción:

- ✓ Proteínas: Lowry, BSA, 750 nm
- ✓ Free Amino Nitrogen (FAN): ninhidrina, glicina, 570 nm



RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

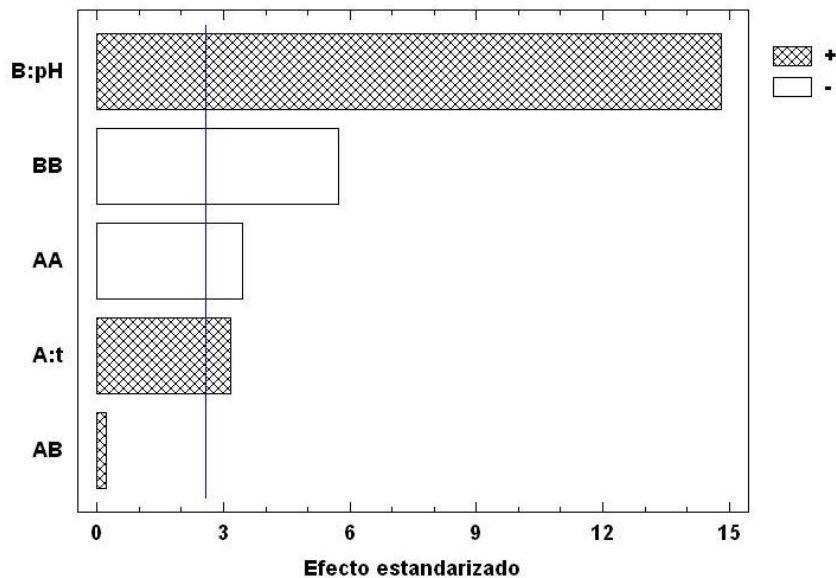
Ajuste de los modelos

✓ $\text{Proteínas (\%)} = -31,7 + 2,4*t + 9,8*pH - 0,38*t^2 + 0,0258*t*pH - 0,588*pH^2$

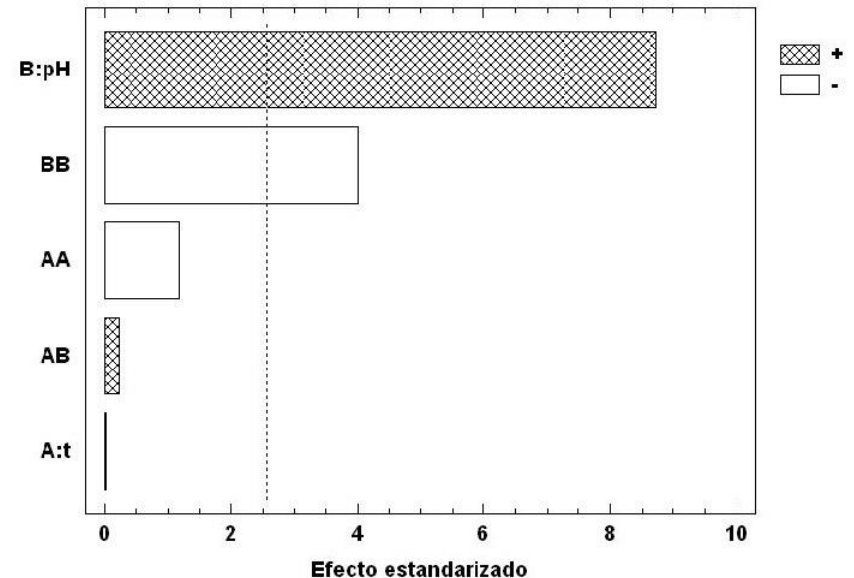
✓ $\text{FAN (\%)} = -0,7 + 0,019*t + 0,24*pH - 0,0047*t^2 + 0,001*t*pH - 0,015*pH^2$

Tabla 2. Coeficientes y estadísticos

Variable	R ²	R ² aj	Durbin-Watson
Proteínas (%)	0,982	0,963	2,4988 (p=0,7133)
FAN (%)	0,949	0,897	2,1029 (p=0,4022)



Proteínas

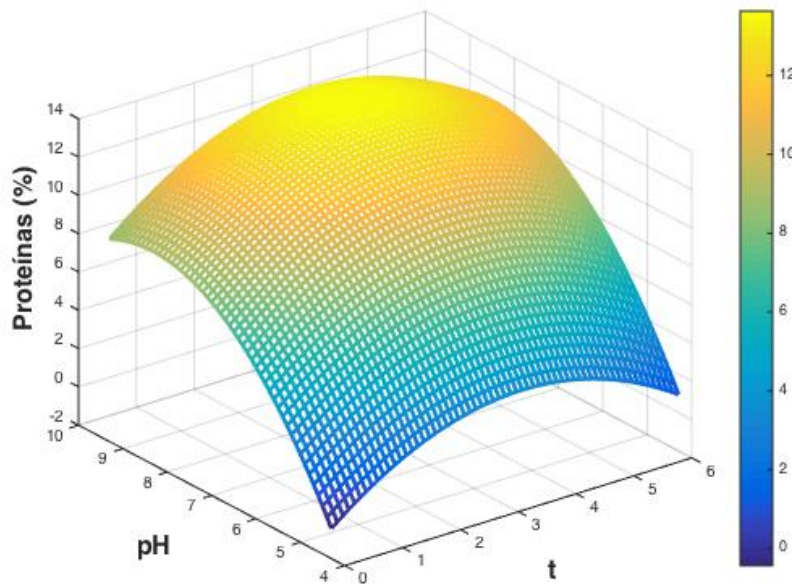


FAN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

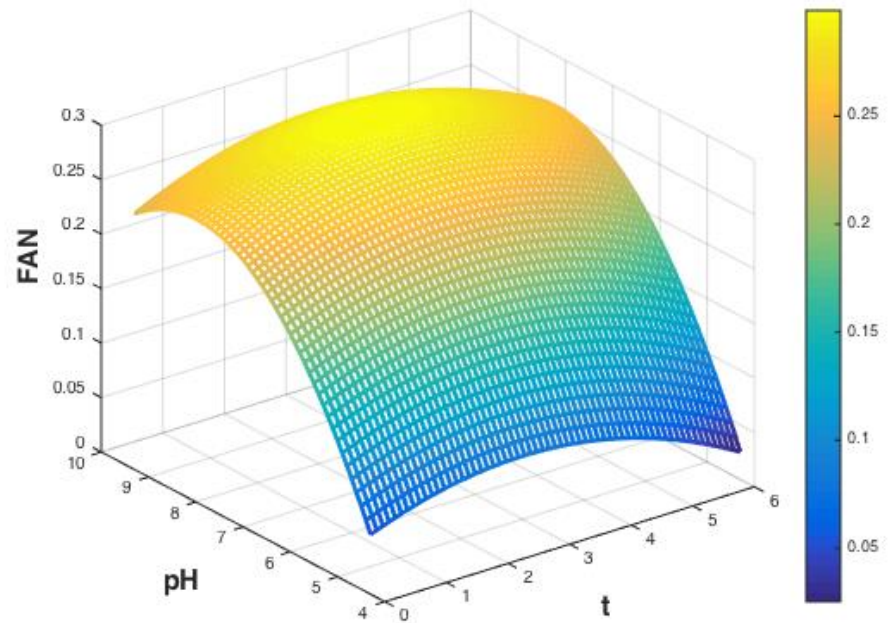
Análisis de las superficies de respuesta

Gráficas de superficie de respuesta mostrando el efecto del tiempo de la reacción enzimática con celulasa (t) y el pH de la fase de autólisis para la obtención de proteínas y FAN (% sobre materia seca)



Proteínas

- ✓ efecto notable para tiempo y pH
- ✓ máximo a $t=3,5$ h y $pH=8,5$



FAN

- ✓ efecto notable para pH
- ✓ máximo a $t=2,9$ h y $pH=8,2$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Validación del modelo

Tabla 3. Respuestas optimizadas del modelo (% sobre biomasa seca)

	Proteínas (%)	FAN (%)*	Múltiples	
			Proteínas (%)*	FAN (%)*
Valor óptimo	14,2	0,32	14,2	0,31
t (h)	3,5	2,9	3,3	
pH	8,5	8,2	8,3	

Ensayo por triplicado en las condiciones de maximización de ambas variables de respuesta

Rendimientos:

- ✓ Proteínas = 14,4 % ($\pm 0,89$) (44,2% sobre el total de proteínas)
- ✓ FAN = 0,33% ($\pm 0,011$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Comparación con otros estudios

Tabla 3. Respuestas optimizadas del modelo (% sobre biomasa seca)

	Este estudio	Safi et al. (2014)		Morris et al (2008)***
Proteínas	14,4	16,5*	26,6**	26,8
FAN	0,33			2,4

* Alcalino pH12 ** homogenización a alta presión, ambos con biomasa liofilizada

*** Enzimático con pancreatina *C. vulgaris* previa extracción etanólica

Bajo rendimiento autólisis

Evaluar:



- ✓ Proteasas comerciales (Alcalase, Flavourzyme) (Romero García et al., 2012), Morris et al (2008)
- ✓ Otros métodos de disrupción celular sobre biomasa fresca

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Celulasa como método válido para la disrupción celular de *Chlorella vulgaris*, aunque con bajo rendimiento

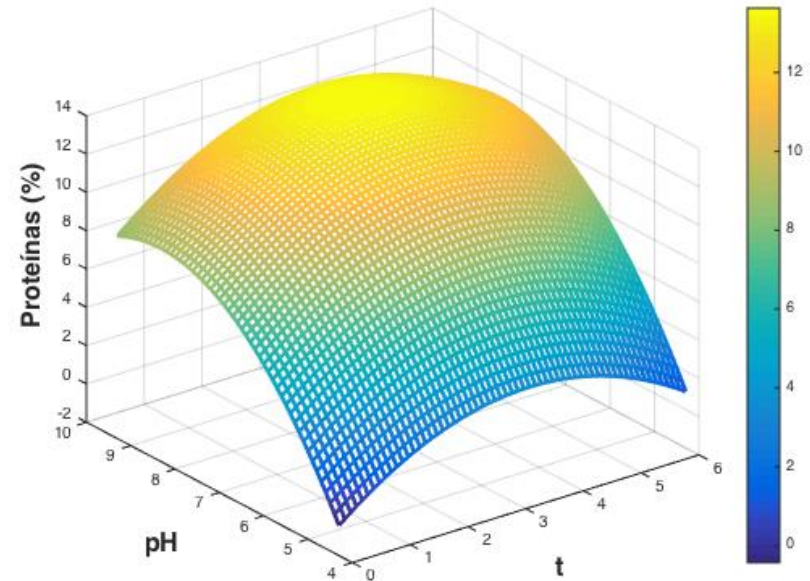
- ✓ Empleada con éxito en otros estudios con esta especie (Cho et al., 2013; Zheng et al., 2012, 2011)
- ✓ En otro estudio el efecto fue negativo, señalando incluso la carencia de celulosa en la pared celular. Sin embargo, en este mismo estudio se obtuvo un cierto efecto (pequeñas cantidades de celulosa o polímeros hidrolizables) (Gerken et al. 2013)

Conclusiones:

- ✓ **Método optimizado para la obtención de proteínas y aminoácidos libres**
 - ✓ basado en la autólisis
 - ✓ previa ruptura celular con celulasa
 - ✓ especie de pared celular resistente (*Chlorella vulgaris*)
 - ✓ biomasa fresca
- ✓ **Análisis estadístico de superficie de respuesta de diseño central compuesto adecuado para alcanzar el objetivo propuesto**
- ✓ **Rendimientos en proteínas y FAN superiores al 14% y 0,3%, respectivamente, sobre biomasa seca.**
- ✓ **Rendimientos en FAN bajos sugieren el uso enzimas proteolíticas**

- REACTORES BIOLÓGICOS Y ENZIMÁTICOS
- BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS LIBRES A PARTIR DE MICROALGAS APLICABLES A LA DEPURACIÓN DE GASES



J.A. Callejo¹, M. Ramírez¹, J. Bolívar², A. Valle² y D. Cantero¹

Proyecto “Revalorización del biogás de vertedero mediante un sistema biológico integrado (Biointegra3)”

¹Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos.

²Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública.

Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.

Instituto Universitario de Investigación Vitivinícola y Agroalimentario (IVAGRO).

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS AGROALIMENTARIOS DE LA ESCUELA
INTERNACIONAL DE DOCTORADO EN AGROALIMENTACIÓN (eidA3)