

Biorrefinería de Microalgas: Hidrólisis Enzimática de Polisacáridos y Proteínas

Teresa García Bárcena

Tesis Doctoral 2020

Grupo de Tecnología Enzimática y Celular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila

Biorrefinería de Microalgas: Hidrólisis Enzimática de Polisacáridos y Proteínas

Memoria presentada por Teresa García Bárcena para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biomedicina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los profesores Juan Luis Serra y María Jesús Llama por haberme guiado y cuidado durante estos años. Gracias por todos los consejos que me habéis dado durante estos años, por todas las cosas que me habéis enseñado y por el ambiente de trabajo tan bueno del que he disfrutado.

También agradecer a mis compañeros de laboratorio Noelia, Ainhoa, Álvaro y Carmen por la ayuda y enseñanzas al comienzo de mi carrera investigadora. A Quique por acompañarme durante estos años con risas y charlas interesantes, y sobre todo por hacer de los congresos una aventura. A todos los alumnos internos que habéis pasado por el laboratorio quiero daros las gracias por haber estado ahí conmigo, ayudándome y alegrándome los días: Gracias por todo Josu, Sara, Jone, Ane, Julen, Maitane, Gloria y los chicos (Jon, Iñigo y Julen). Pero en especial a Imanol por su gran inteligencia y con el que he compartido alegrías y desgracias.

También quiero dar las gracias a Iraide, compañera desde la carrera hasta cuando sea... Gracias por ser tan buena amiga y una gran persona.

Un agradecimiento especial para Clemente, por su gran sabiduría y amabilidad.

A todas las Golfis, gracias por estar ahí: Ane, María, San, Cris, Txet, Bego, Arce, Lady Sara, Lau, Cus, Coti, Pispu, Paty, Ana, Amaia, Oli, Tami, Anita, Joa y Aitzi. Ya sabéis que no soy persona de muchas palabras.

Por último, las personas más importantes, mi familia. Gracias a mi ama y mi tía que siempre están ahí. A mi aita y mi hermana por sus bromas tontas que me hacen reír. A Erick y a mi tío por apuntarse a esta familia de locas. A Iker. A todos los García y lo vamos a celebrar. A Pili, Vicky y Enrique que también son mi familia. A mi bisa y mi abuela. Y sobre todo a mi abuelo por ser el mejor abuelo del mundo.

RESUMEN

El interés por las microalgas ha aumentado considerablemente en la última década, principalmente como fuente para la obtención de biocombustibles, como alternativa a los productos fósiles empleados hoy en día. Actualmente, se ha visto que a partir de biomasa microalgal no solo se pueden obtener materias primas para obtener biocombustibles, sino que también, esta biomasa es de utilidad para obtener bioproductos de interés en los sectores farmacéutico, alimentario, cosmético y de química fina, entre otros. Por lo tanto, la biomasa microalgal sería de utilidad para proporcionar de forma sostenible y renovable muchos bioproductos de interés, permitiendo conseguir energías limpias, sostenibles y renovables, además, de otros bioproductos de valor añadido limpios y biodegradables. Esto sería la base, de lo que denominamos, biorrefinería a partir de microalgas.

La mayoría de los estudios realizados proponen la utilización de microalgas para la obtención de biodiesel a partir de sus triglicéridos esterificables con alcoholes (metanol o etanol). Pero la biomasa microalgal contiene muchos más compuestos útiles, además de los lípidos, como azúcares y almidones fermentables, que pueden emplearse en la obtención de bioetanol. Otros productos intracelulares también pueden emplearse en los sectores farmacéutico, cosmético, alimentario y de química fina. Está claro que, si la biomasa microalgal sólo se emplea para extraer lípidos de utilidad para obtener biodiesel, el coste económico del cultivo algal y la extracción de los lípidos, así como las infraestructuras necesarias para realizar estos procesos, no son económicamente viables, ya que son procesos costosos y que requieren energía. Por lo tanto, la solución a este inconveniente es el

aprovechamiento integral de la biomasa microalgal, que puede emplearse en la obtención de muchos y diversos bioproductos de interés.

En este trabajo, se han estudiado distintos métodos de cosecha de microalgas que permitan recolectar esta biomasa de la forma más eficiente y económicamente viable. Para ello, se han adsorbido a nanopartículas magnéticas, como un método de cosecha rápido, fácil y no contaminante. Además, estas nanopartículas pueden ser recuperadas y reutilizadas, disminuyendo el coste de la cosecha. Por otro lado, se ha empleado la cosecha por centrifugación, como un método poco agresivo para los bioproductos intracelulares presentes en las microalgas. Sin embargo, la extracción del contenido microalgal de forma completa es un punto crucial del proceso y, debido a las complejas envolturas celulares de las microalgas, el prensado de las células ha sido el único método eficiente.

La hidrólisis de los polisacáridos y proteínas de estas microalgas, se ha realizado de forma no contaminante, empleando glucosidasas (α -amilasa y glucoamilasa) y proteasas (Alcalase[®] y Neutrase[®]) comerciales. Inicialmente, se ha realizado la caracterización de estos enzimas empleando sustratos modelo, con el fin de determinar las condiciones de hidrólisis óptimas, para más tarde, ajustarlas a la hidrólisis del extracto microalgal como sustrato. Para reutilizar estos enzimas en posteriores reacciones de hidrólisis, se han sintetizado mCLEAs de los distintos enzimas, que se han caracterizado empleando sustratos modelo. Finalmente, se han aplicado estas condiciones a la hidrólisis de extractos microalgales. De esta forma, se concluye que el empleo de estos enzimas comerciales en la hidrólisis de extractos microalgales es más eficiente empleando el enzima soluble, y que, además, es necesaria una cantidad muy pequeña de enzima para obtener

una hidrólisis adecuada de los extractos microalgales, tanto en polisacáridos como en proteínas.

Finalmente, se ha estudiado el efecto de la deslipidación de las microalgas, observándose que este proceso afecta de forma considerable a la posterior hidrólisis de los polisacáridos y proteínas.

Todo ello permite concluir, que el proceso de biorrefinería microalgal es prometedor, aunque se encuentre en sus inicios. Hace falta más estudios para que se pueda implementar de distintas formas, con el fin de optimizar todos los pasos del proceso para obtener un mayor rendimiento tanto económico como de obtención de productos.

ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

αA	α -amilasa
A	Alcalase [®]
APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
BSA	Seroalbúmina bovina
Chl <i>a</i>	Clorofila a
Chl <i>b</i>	Clorofila b
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
D	Diámetro promedio
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DNS	3,5-dinitrosalicílico
DRX	Difracción de rayos X
DW	Agua destilada
E	Enzima
emu	Unidades electromagnéticas
GA	Glucoamilasa
H	Fuerza de campo magnético aplicado
H_c	Coercitividad
IM	Índice de Margalef
kDa	kilo Dalton
M	Magnetización de un compuesto
mCLEAs	Magnetic cross-linked enzyme aggregates
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MNPs-NH₂	Nanopartículas magnéticas con funcionalizadas con grupos -NH ₂
MNPs-OH	Nanopartículas magnéticas desnudas
M_R	Remanencia magnética
M_s	Saturación magnética

N	Neutrase®
Oe	Oersted (A/m)
p/s	Peso seco
PBS	Tampón fosfato salino 150 mM, pH 7.4
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SE	Error estándar
TAGs	Triacilglicéridos
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletildiamina
TLC	Cromatografía en capa delgada
Tyr	Tirosina
v/v	Volumen/volumen
VSM	Magnetometría de muestra vibrante

ÍNDICE

Capítulo I Introducción General	29
1.1. Introducción general	31
1.1.1. Biorrefinería de microalgas	32
1.1.1.1. Lípidos.....	32
1.1.1.2. Proteínas	33
1.1.1.3. Carbohidratos	33
1.1.2. Las microalgas.....	34
1.1.2.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	35
Capítulo II Materiales y Métodos.....	41
2.1 Reactivos y Productos.....	43
2.2 Cultivo y cosecha de microalgas	46
2.2.1 Seguimiento del cultivo	46
2.2.1.1 Seguimiento por turbidez.....	47
2.2.1.2 Seguimiento por pigmentos fotosintéticos.....	47
2.2.1.3 Estado fisiológico del cultivo: Índice de Margalef.....	48
2.2.2 Cosecha de las microalgas	48
2.2.2.1 Cosecha por adsorción a nanopartículas magnéticas (MNPs) 48	
2.2.2.1.1 Selección del tipo de MNPs	49
2.2.2.1.2 Efecto del volumen de incubación	49
2.2.2.1.3 Efecto de la cantidad de microalgas	50
2.2.2.1.4 Efecto del pH.....	50
2.2.2.1.5 Desorción	51
2.2.2.2 Cosecha por centrifugación	52
2.3 Obtención de biomasa microalgal.....	53
2.3.1 Liofilizado	53

2.3.2	Molino de bolas	53
2.3.3	Prensa de French.....	54
2.4	Métodos analíticos	54
2.4.1	Métodos analíticos para la determinación de productos de hidrólisis de glucosidasas	54
2.4.1.1	Determinación de azúcares totales.....	54
2.4.1.2	Determinación de azúcares reductores.....	55
2.4.1.3	Cromatografía en capa delgada (TLC)	55
2.4.2	Métodos analíticos para la determinación de productos de hidrólisis de proteasas	56
2.4.2.1	Determinación de la concentración de proteína.....	56
2.4.2.2	Determinación de compuestos fenólicos	57
2.4.2.3	Análisis electroforéticos (SDS-PAGE).....	57
2.4.3	Detección de las proteínas mayoritarias mediante LC-MS/MS	58
2.5	Síntesis y caracterización de las nanopartículas magnéticas .	61
2.5.1	Caracterización morfológica de las MNPs	62
2.5.2	Caracterización magnética de las MNPs	63
2.5.2.1	Tamaño del núcleo magnético de las MNPs.....	64
2.5.3	Estabilidad	64
2.6	Síntesis de mCLEAs de proteasas y glucosidasas	65
2.7	Obtención de hidrolizados de polisacáridos con glucosidasas	66
2.7.1	Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo.....	66
2.7.1.1	Determinación del pH óptimo de actividad	67
2.7.1.2	Determinación de la temperatura óptima de actividad	67
2.7.1.3	Determinación de la cantidad de enzima	68
2.7.1.4	Determinación de la actividad enzimática	68
2.7.1.4.1	Distinta concentración de sustrato.....	68
2.7.1.4.2	Determinación de los parámetros cinéticos.....	69

2.7.1.5	Combinación de enzimas para la hidrólisis de sustratos modelo	69
2.7.1.5.1	Estequiometria enzimática en la hidrólisis de almidón	69
2.7.2	Caracterización de las mCLEAs empleando sustratos modelo	70
2.7.2.1	Determinación de la temperatura óptima de actividad	71
2.7.2.2	Determinación del pH óptimo de actividad	71
2.7.2.3	Selección de la cantidad de mCLEAs y del sustrato...	71
2.7.2.4	Combinación de las mCLEAs para la hidrólisis de sustratos modelo	72
2.7.3	Hidrólisis de polisacáridos de biomasa microalgal empleando α -amilasa y glucoamilasa solubles.	72
2.7.3.1	Determinación del pH óptimo de actividad	73
2.7.3.2	Determinación de la temperatura óptima de actividad	73
2.7.3.3	Optimización del proceso de hidrólisis.....	74
2.7.3.3.1	Efecto del pretratamiento térmico del sustrato.....	74
2.7.3.3.2	Efecto de los iones de calcio en la actividad de la α -amilasa	74
2.7.3.4	Combinación de glucosidasas para la hidrólisis de polisacáridos de la biomasa microalgal	75
2.7.4	Hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado de microalgas empleando mCLEAs.....	75
2.7.4.1	Efecto del pretratamiento térmico del sustrato	76
2.7.4.2	Determinación de la temperatura óptima.....	76
2.7.4.3	Determinación de la cantidad óptima de mCLEAs de glucoamilasa	76
2.8	Obtención de hidrolizados de proteínas con proteasas	77
2.8.1	Caracterización de los enzimas libres empleando sustratos modelo	77
2.8.1.1	Determinación del pH óptimo de actividad	77
2.8.1.2	Determinación de la temperatura óptima de actividad	78

2.8.1.3	Determinación de la cantidad de enzima	79
2.8.1.4	Determinación de la actividad enzimática	79
2.8.1.4.1	Distinta concentración de sustrato.....	79
2.8.1.4.2	Determinación de los parámetros cinéticos.....	79
2.8.2	Caracterización de las mCLEAs empleando sustratos modelo	80
2.8.2.1	Determinación del pH óptimo de actividad	80
2.8.2.2	Determinación de la temperatura óptima.....	81
2.8.2.3	Selección de la cantidad de mCLEAs.....	81
2.8.2.4	Selección del tipo de agitación	82
2.8.3	Hidrólisis de proteína del extracto soluble de microalgas empleando Alcalase [®] y Neutrase [®] solubles	82
2.8.3.1	Determinación del pH óptimo de actividad	83
2.8.3.2	Determinación de la temperatura óptima de actividad	83
2.8.3.3	Determinación de la cantidad óptima de enzima	83
2.8.4	Hidrólisis de proteínas solubles del extracto de microalgas empleando mCLEAs.....	84
2.8.4.1	Determinación de la temperatura óptima de actividad	84
2.8.4.2	Determinación del pH óptimo de actividad	84
2.9	Deslipidación de las microalgas.....	85
2.9.1	Proceso de deslipidación	85
2.9.1.1	Extracción en matraz agitado.....	85
2.9.1.2	Extracción por saponificación	85
2.9.2	Análisis de los compuestos de interés	86
2.9.2.1	Lípidos	86
2.9.2.2	Polisacáridos y proteínas	87
2.9.3	Hidrólisis de polisacáridos	87
2.9.3.1	Glucosidasas solubles	88
2.9.3.2	mCLEAs de glucoamilasa.....	88

Capítulo II Obtención de las mCLEAs 89

3.1	Introducción	91
3.1.1	Las nanopartículas	92
3.1.2	Síntesis de MNPs.....	95
3.1.2.1	Coprecipitación química	96
3.1.2.2	Funcionalización de las MNPs	96
3.1.3	Inmovilización de enzimas	97
3.1.3.1	Adsorción.....	98
3.1.3.2	Unión covalente	98
3.1.3.3	Atrapamiento e inclusión en membranas.....	99
3.1.3.4	Entrecruzamiento (Cross-Linking)	99
3.2	Resultados y Discusión	100
3.2.1	Caracterización morfológica de las MNPs	100
3.2.2	Caracterización magnética de las MNPs	102
3.2.3	Estabilidad de las MNPs.....	105
3.2.4	Síntesis de las mCLEAs	105

Capítulo IV Cultivo y Cosecha de las Microalgas..... 107

4.1	Introducción	109
4.1.1	Cosecha de las microalgas.....	109
4.1.1.1	Métodos físicos	110
4.1.1.1.1	Centrifugación.....	110
4.1.1.1.2	Sedimentación por gravedad.....	110
4.1.1.1.3	Filtración	110
4.1.1.1.4	Flotación.....	111
4.1.1.2	Métodos químicos (floculación)	111
4.1.1.3	Métodos biológicos (floculación)	112
4.1.1.4	Métodos magnéticos: separación magnética.....	112
4.1.2	Obtención de biomasa microalgal	114

4.2	Resultados y Discusión	116
4.2.1	Seguimiento del cultivo para su cosecha	116
4.2.1.1	Turbidez	116
4.2.1.2	Pigmentos fotosintéticos	116
4.2.1.3	Índice de Margalef (IM)	118
4.2.2	Cosecha del cultivo.....	119
4.2.2.1	Cosecha por adsorción a MNPs	119
4.2.2.1.1	Selección del tipo de MNP	119
4.2.2.1.2	Efecto del volumen en la incubación	120
4.2.2.1.3	Efecto de la cantidad de microalgas	121
4.2.2.1.4	Efecto del pH.....	122
4.2.2.1.5	Desorción	123
4.2.3	Extracción de biomasa microalgal.....	125

Capítulo V Obtención de Hidrolizados de Polisacáridos empleando Glucosidasas 129

5.1	Introducción	131
5.1.1	Hidrólisis de polisacáridos en microalgas	131
5.1.1.1	Hidrólisis ácida	132
5.1.1.2	Hidrólisis enzimática	132
5.1.2	Glucosidasas	132
5.1.2.1	α -amilasa.....	133
5.1.2.2	Glucoamilasa	133
5.1.2.3	Empleo de las glucosidasas en la hidrólisis de polisacáridos microalgales.....	134
5.2	Resultados y discusión.....	136
5.2.1	Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo.....	136
5.2.1.1	Determinación del pH óptimo de actividad	137

5.2.1.2	Determinación de la temperatura óptima de actividad	138
5.2.1.3	Determinación de la cantidad de enzima	139
5.2.1.4	Determinación de la afinidad enzimática.....	141
5.2.1.5	Combinación de enzimas para la hidrólisis de sustratos modelo	142
5.2.1.5.1	Estequiometria enzimática en la hidrólisis de almidón	144
5.2.2	Caracterización de mCLEAs empleando sustratos modelo	145
5.2.2.1	Determinación de la temperatura óptima de actividad	145
5.2.2.2	Determinación del pH óptimo de actividad	147
5.2.2.3	Selección de la cantidad de mCLEAs y del sustrato.	147
5.2.2.4	Combinación de las mCLEAs para la hidrólisis de sustratos modelo	150
5.2.3	Hidrólisis de polisacáridos de biomasa microalgal empleando α -amilasa y glucoamilasa solubles	152
5.2.3.1	Determinación del pH óptimo de actividad	153
5.2.3.2	Determinación de la temperatura óptima.....	154
5.2.3.3	Optimización del proceso de hidrólisis.....	154
5.2.3.3.1	Efecto del pretratamiento térmico del sustrato....	155
5.2.3.3.2	Efecto de los iones de calcio en la actividad de la α -amilasa	158
5.2.3.4	Combinación de glucosidasas para hidrolizar polisacáridos de la biomasa microalgal	160
5.2.4	Hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado microalgal empleando mCLEAs	162
5.2.4.1	Efecto del pretratamiento térmico del sustrato	162
5.2.4.2	Determinación de la temperatura óptima.....	164
5.2.4.3	Determinación de la cantidad de mCLEAs de glucoamilasa	165

Capítulo VI Obtención de Hidrolizados de Proteínas empleando Proteasas..... 167

6.1. Introducción.....	169
6.1.1. Obtención de proteínas de microalgas	169
6.1.2. Proteasas.....	170
6.1.2.1. Alcalase®	171
6.1.2.2. Neutrase®	172
6.1.2.3. Empleo de proteasas con las microalgas	173
6.2. Resultados y discusión.....	174
6.2.1. Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo.....	174
6.2.1.1. Determinación del pH óptimo de actividad.....	175
6.2.1.2. Determinación de la temperatura óptima de actividad	176
6.2.1.3. Determinación de la cantidad de enzima.....	177
6.2.1.4. Determinación de la actividad enzimática	179
6.2.2. Caracterización de mCLEAs empleando sustratos modelo	
.....	180
6.2.2.1. Determinación del pH óptimo de actividad.....	180
6.2.2.2. Determinación de la temperatura óptima	181
6.2.2.3. Selección de la cantidad de mCLEAs	182
6.2.2.4. Selección del tipo de agitación.....	184
6.2.3. Hidrólisis de proteína del extracto soluble de microalgas empleando Alcalase® y Neutrase® solubles	185
6.2.3.1. Detección de las proteínas mayoritarias mediante LC-MS/MS	185
6.2.3.2. Determinación del pH óptimo de actividad.....	186
6.2.3.3. Determinación de la temperatura óptima de actividad	186
6.2.3.4. Determinación de la cantidad óptima de enzima ..	188

6.2.4. Hidrólisis de proteínas del extracto soluble de microalgas empleando mCLEAs	191
6.2.4.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad 191	
6.2.4.2. Determinación del pH óptimo de actividad.....	193

Capítulo VII Deslipidación de las microalgas 197

7.1 Introducción	199
7.1.1 Extracción de los lípidos microalgales	199
7.2 Resultados y discusión.....	201
7.2.1 Análisis de los lípidos extraídos	201
7.2.2 Análisis de proteínas.....	202
7.2.3 Análisis de polisacáridos	203
7.2.4 Hidrólisis de polisacáridos	204
7.2.4.1 Glucosidasas solubles	204
7.2.4.2 mCLEAs de glucoamilasa.....	205

Capítulo VIII Discusión General 207

Capítulo IX Conclusiones 213

Capítulo X Bibliografía..... 219

Capítulo I

Introducción General

1.1. Introducción general

Se estima que el 90% de nuestro consumo actual de energía proviene del carbón, del gas natural y del petróleo, y menos del 10% se obtiene a partir de energías renovables (Yen *et al.*, 2013). Además, basándonos en los consumos actuales, es muy probable que para el año 2050 las reservas de petróleo desaparezcan (Campbell y Laherrère, 1998) (Figura 1.1). Por otro lado, aunque las reservas de petróleo sigan siendo suficientes, la contaminación ambiental asociada (como la liberación de CO₂ y NO_x) representa una gran amenaza a nivel mundial (Ho *et al.*, 2011).

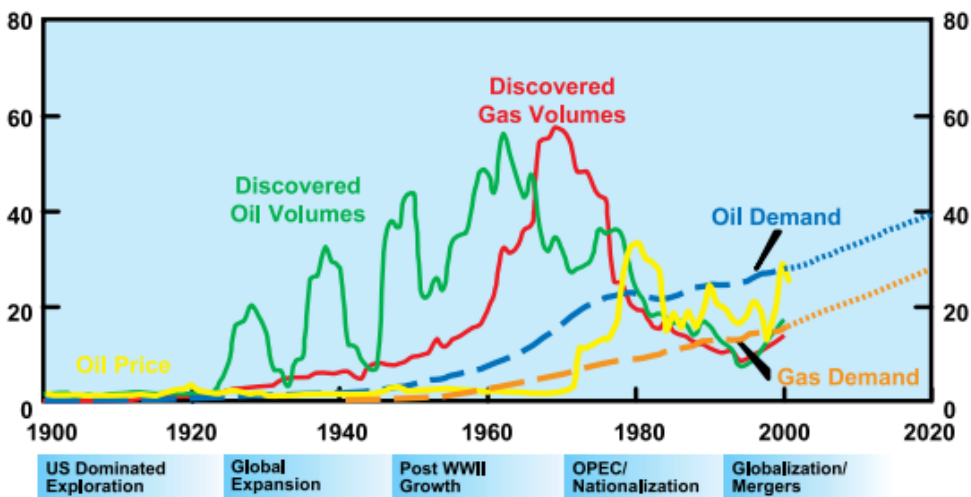


Figura 1.1: Demanda y descubrimientos de petróleo y gas durante 100 años. Estimación hasta 2020. La demanda de ambos compuestos aumenta a medida que disminuyen los descubrimientos de fuentes de gas y petróleo (Longwell, 2002).

Este aumento en la demanda de energía durante décadas ha propiciado la búsqueda de combustibles renovables. Entre estas fuentes alternativas hay una que ha ido cogiendo cada vez más importancia, la biomasa de microalgas (Chew *et al.*, 2017). Pero la producción únicamente de biocombustibles a partir de microalgas es un proceso muy costoso, tanto energéticamente, como

económicamente (Wijffels y Barbosa, 2010; Norsker *et al.*, 2011). Las microalgas contienen una gran cantidad de lípidos, proteínas y carbohidratos, por lo que, además de en el sector energético, pueden emplearse en otros sectores como en el alimenticio, el químico o el farmacéutico. Por lo tanto, para obtener el mayor rendimiento y disminuir los costes, se debe enfocar el proceso en la explotación máxima de la biomasa microalgal. O lo que es lo mismo, realizar un proceso de biorrefinería que abarque todos los compuestos de interés que contienen las microalgas.

1.1.1. Biorrefinería de microalgas

Se define la biorrefinería como un proceso de obtención de biocombustibles, energía y productos de alto valor, a través de la transformación y el procesado de la biomasa (Chew *et al.*, 2017). Puede ser, además, un proceso prometedor para mitigar las emisiones de los gases de efecto invernadero. Sin embargo, una de las mayores dificultades de la biorrefinería es la separación de los distintos compuestos de interés sin causar daño a las otras fracciones.

La biorrefinería de microalgas permite obtener distintos productos de interés, siendo los más importantes: biodiesel, bioetanol, biometano, químicos orgánicos y suplementos alimenticios (Harun *et al.*, 2010). Estos compuestos se obtienen a partir de distintos componentes de la biomasa microalgal.

1.1.1.1. Lípidos

Las microalgas acumulan gran cantidad de lípidos, que rondan entre el 30 y el 50% de su peso seco total, dependiendo del tipo de microalga y de las

condiciones del cultivo. Los principales usos potenciales de estos lípidos son la producción de biodiésel o moléculas de alto valor alimenticio (como ácido linolénico, ácido eicosapentanoíco...) (Chew *et al.*, 2017).

1.1.1.2. Proteínas

Las proteínas son el componente mayoritario de las microalgas (50-70% de su peso total). La obtención de proteínas a partir de microalgas tiene un gran valor en la nutrición tanto humana como animal (Chew *et al.*, 2017).

1.1.1.3. Carbohidratos

Las microalgas presentan un gran contenido en carbohidratos que aproximadamente un 50% más alto que su peso en seco. Estos carbohidratos pueden presentarse como glucosa, almidones, celulosa y otros polisacáridos. La hidrólisis de estos carbohidratos permite obtener azúcares fermentables, empleados generalmente para la producción de bioetanol o biometano (Harun *et al.*, 2010).

Otra de las ventajas que presenta la biorrefinería, es la capacidad de las microalgas para fijar el CO₂ atmosférico más rápidamente que las plantas terrestres (Ho *et al.*, 2011). De esta forma, la biorrefinería al permitir obtener productos de interés de distintos sectores, por su capacidad de fijar el CO₂, cerraría el ciclo del carbono disminuyendo la contaminación atmosférica (Figura 1.2). Además, también tienen capacidad para eliminar otros compuestos tóxicos como el NH₄⁺, NO₃⁻ y PO₃⁻ en aguas contaminadas.

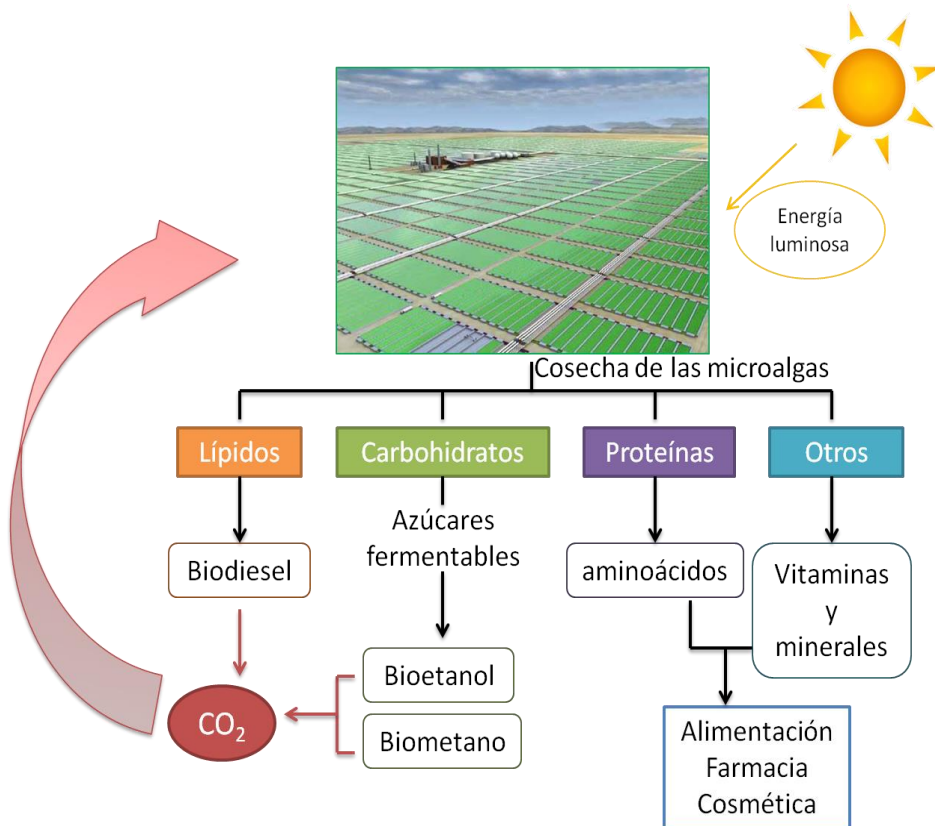


Figura 1.2: Resumen del proceso de biorrefinería de microalgas. Compuestos de interés de las microalgas y productos obtenidos. El CO₂ liberado por los biocombustibles es reabsorbido por las microalgas.

1.1.2. Las microalgas

El término microalga no representa ningún grupo biológico determinado, si no que representa a varias cepas de distintos filos. Por tanto, este término comprende a aquellas plantas microscópicas que viven en hábitats acuáticos. En este sentido, el término microalga comprende también a las cianobacterias procariotas (Posten y Chen, 2015). Las microalgas eucarióticas son organismos de 2-200 μm eucariotas fotosintéticos capaces de crecer rápidamente y vivir en condiciones adversas, gracias a su estructura unicelular o multicelular simple (Mata *et al.*, 2010). Presentan orgánulos similares a los de las plantas terrestres, como cloroplastos y núcleo, pero presentan una mayor

eficiencia en la producción de biomasa, debido a su mayor rendimiento en la captación y utilización de luz, CO₂, agua, etc. (Panahi *et al.*, 2019). Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas terrestres, no solo acuáticos, si no también, terrestres. Existen cerca de 50.000 especies diferentes, pero únicamente se han analizado y estudiado cerca de 30.000 (Richmons, 2004).

En este trabajo se empleó la microalga *Chlorella vulgaris*.

1.1.2.1. *Chlorella vulgaris*

Chlorella es un género de microalgas verdes unicelulares del filo Chlorophyta y de la clase Chlorophyceae. Son estructuras celulares eucariotas, de forma esférica, cuyo tamaño puede variar entre los 2 y 15 µm. son organismos fotosintéticos que presentan como pigmentos clorofila *a* y *b*. Se encuentra ampliamente distribuida en diversos hábitats como: agua dulce, agua marina, en el suelo o en simbiosis con líquenes y protozoos. Este tipo de microalgas presentan un gran interés en el ámbito nutricional ya que contienen una gran cantidad de proteínas, vitaminas y minerales. Además, se consideran grandes candidatas como sustitutas del petróleo, debido a la gran cantidad de lípidos que son capaces de sintetizar (Posten y Chen, 2016).

Las diferentes especies de *Chlorella* son: *C. autotrophica*, *C. coloniales*, *C. lewinii*, *C. minutissima*, *C. pituita*, *C. pulchelloides*, *C. pyrenoidosa*, *C. rotunda*, *C. singularis*, *C. sorokiniana*, *C. variabilis*, *C. volutis*, *C. vulgaris*.

Chlorella vulgaris (Figura 1.3) fue descrita por primera vez en 1890 por M. W. Beijerinck. Presenta forma esférica y un diámetro entre 2 y 10 μm , y puede encontrarse en hábitats diversos. Se reproduce de forma asexual mediante autoesporas. Presenta una pared celular rígida de celulosa, en su interior



Figura 1.3: *Chlorella vulgaris*. NIES culture collection.

encontramos cloroplastos, mitocondrias, el núcleo, la vacuola, almidón y cuerpos lipídicos (Posten y Chen, 2016). La composición bioquímica de *C. vulgaris* se presenta en la Figura 1.4. Esta composición bioquímica presenta gran variación según las condiciones de cultivo empleadas, que pueden fomentar el aumento de unos compuestos otros, y el método de detección empleados. Generalmente, el porcentaje de proteínas es el que menos suele verse afectado por estas variaciones, mientras que lípidos y carbohidratos pueden variar ampliamente (Abalde *et al.*, 1995; Safi *et al.*, 2014).

Chlorella es una fábrica unicelular, impulsada por luz solar, para obtener proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales. Durante mucho tiempo se ha empleado como alimento humano como suplemento nutricional y como alimento animal en acuicultura. Se ha demostrado también su capacidad en la biorremediación de gases de combustión industrial y de aguas residuales. Recientemente, esta alga ha atraído el interés en la producción de biocombustibles.

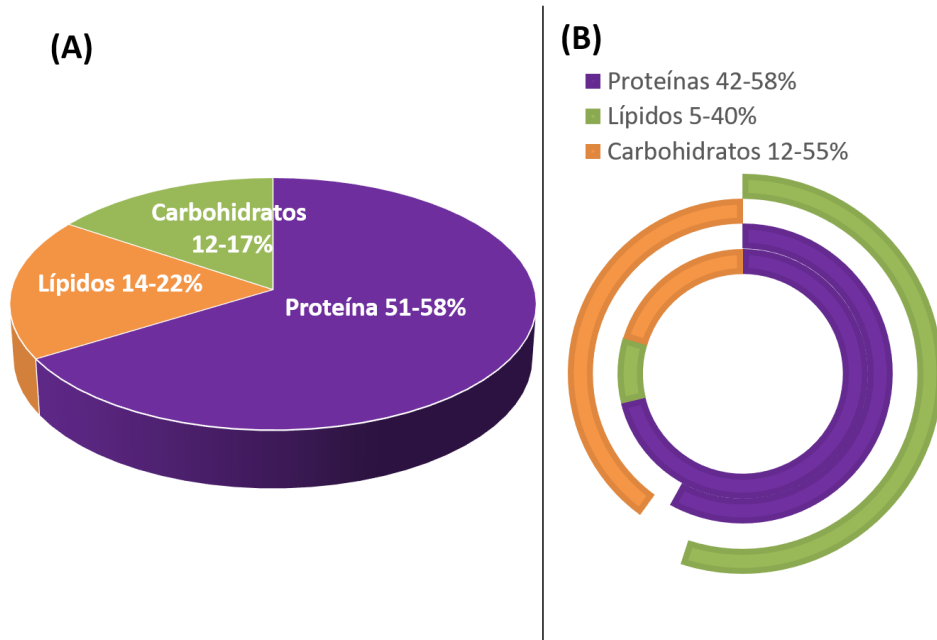


Figura 1.4: Composición bioquímica de *C. vulgaris*. (A) Composición bioquímica en condiciones normales (Abalde *et al.*, 1995). (B) Alteraciones en la composición bioquímica en función del medio de cultivo y las técnicas de detección empleadas (Safi *et al.*, 2014). Los datos se representan en % de materia seca.

1.1.1. Los biocatalizadores enzimáticos

Los enzimas se emplean como biocatalizadores en una amplia gama de aplicaciones industriales. Estos biocatalizadores son altamente específicos y estereoselectivos para catalizar una gran variedad de reacciones químicas (Rehm *et al.*, 2016). Los biocatalizadores presentan diversas ventajas frente a los métodos clásicos como la catálisis química. La catálisis enzimática permite reacciones mucho más específicas, en condiciones de reacción más suaves y un menor gasto, tanto energético como de agua. Además, su empleo se combina con materias primas obtenidas de forma sostenible a partir de fuentes renovables. Pero presentan inconvenientes tales como la pérdida de su estabilidad a altas temperaturas y/o pHs extremos o su alto coste que pueden ser solventados mediante la inmovilización de los enzimas. La inmovilización de los enzimas permite disminuir el número de pasos necesarios en una

reacción gracias a su fácil separación de la mezcla de reacción manteniendo su actividad enzimática y permitiendo su reutilización (Chapman *et al.*, 2018) (Tabla 1.1).

Tabla1.1: Ventajas y limitaciones de la inmovilización enzimática

Ventajas	Desventajas
✓ Aumento de la estabilidad	✗ Disminución de la actividad
✓ Posibilidad de reutilización	✗ Posibilidad de problemas de difusión
✓ Posibilidad de separación del producto del enzima	y transferencia de masa ✗ Posibilidad de modificación de
✓ Reacciones en continuo y multietapa	propiedades catalíticas
✓ Anulación de la inmunogenicidad	✗ Incremento del precio y complejidad

1.2. Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, actualmente el empleo de microalgas para la producción de biodiesel está limitado por su elevado coste. Para obtener un mayor rendimiento de este proceso, es necesaria la obtención y el posterior tratamiento de otros bioproductos de interés como polisacáridos y proteínas. Para ello se emplearán métodos enzimáticos, que reducen el posible daño ambiental que provocarían los métodos químicos, y se realizará tanto con enzimas solubles como enzimas inmovilizados. Para conseguir este objetivo principal, las tareas a desarrollar en este trabajo se desglosan en los siguientes subobjetivos:

- Cultivar y cosechar *C. vulgaris* de forma rápida e inocua para las células empleando MNPs. Seleccionar del tipo de MNP a emplear y optimización del proceso de adsorción y desorción.
- Extraer de los bioproductos de interés de *C. vulgaris* empleando métodos físicos para una extracción completa de la biomasa, sin que se produzca una pérdida de aquellos productos de interés.
- Caracterizar con sustratos modelo los enzimas libres e inmovilizados en mCLEAs. Se empleará almidones y dextrinas para glucosidasas, y caseína para proteasas, con el fin de seleccionar las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática.
- Caracterizar con extracto microalgal la actividad de los enzimas libres y en mCLEAs: glucosidasas (α -amilasa y glucoamilasa) y proteasas (Alcalase[®] y Neutrase[®]). Se empleará extracto microalgal soluble para determinar las condiciones óptimas de actividad para la hidrólisis mediante glucosidasas de polisacáridos microalgales, y mediante proteasas de proteína microalgal soluble.
- Deslipidizar las microalgas de forma química empleando disolventes orgánicos para comprobar el efecto que tienen en los compuestos no

lipídicos, proteínas y polisacáridos, restantes presentes en el extracto microalgal.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y Productos

En este capítulo se emplearon los reactivos y productos que aparecen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Reactivos y productos empleados Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen. Todos los reactivos químicos eran de calidad para análisis o en su caso de grado para biología molecular. Los compuestos empleados para preparar los medios de cultivo eran de calidad purísimo o equivalente.

Casa comercial, ciudad, país	Producto
Bio-Rad Hercules, PA, EEUU	30% Acrilamida/Bisacrilamida Bio-Rad Protein Assay® Mini-PROTEAN TGX; Stain-Free gels Precision Plus Protein™ Standards
GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Suecia	Azul de Coomassie Columnas de desalinización desechables PD-10
Merck Darmstadt, Alemania	2-Propanol 2-Mercaptoetanol Acetato sódico Ácido sulfúrico Ácido tricloroacético Bicarbonato sódico Carbonato sódico Citrato sódico Cloruro cálcico · 2H ₂ O Cloruro potásico Cloruro sódico Dicloruro de manganeso · 4H ₂ O Fosfato sódico monobásico Glutaraldehído N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) n-Hexano

	Nitrato potásico
	Persulfato amónico
Panreac	Cloruro potásico
Barcelona, España	Dicloruro de cobalto · 6H ₂ O
	Dihidrogenofosfato de potasio
	Etanol
	Fosfato monopotásico
	Fosfato sódico dibásico
	Glicerol
	Glucosa
	Hidróxido sódico
	Metanol
	Sulfato amónico
	Sulfato cúprico · 5H ₂ O
	Sulfato de magnesio · 7H ₂ O
	Tris(hidroximetil)aminometano
Quimivita	Ácido acético
Barcelona, España	Ácido cítrico
	Ácido clorhídrico
	Hidróxido amónico
Sigma-Aldrich	1-Butanol
St. Louis, MO, EEUU	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
	Ácido bórico
	Acetato de etilo
	Alcalase [®] Proteasa (EC 3.4.21.62) de <i>Bacillus licheniformis</i>
	Almidón soluble
	Aminopropiltriétoxilano (APTS)
	Azul de bromofenol
	Borohidruro de sodio
	Carbazol
	Caseína de leche de vaca
	Citrato férrico · H ₂ O

Cloruro férrico
Cloruro ferroso
Dextrina
Dodecilsulfato sódico (SDS)
Glicina
Glucoamilasa (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger*
Hidróxido amónico
L-Tirosina
Molibdato sódico · 2H₂O
Neutrase[®] Proteasa (EC 3.4.24.28) de *Bacillus amiloliquefaciens*
Reactivo de Folin & Ciocalteu
Seroalbúmina bovina (BSA)
Sulfato amónico
Sulfato cálcico · 7H₂O
Sulfito sódico
Tiosulfato sódico
Tritón X-100
 α -Amilasa (EC 3.2.1.1) de *Aspergillus oryzae*

TCL Europe, Zwijndrecht,
Bélgica

Ácido esteárico
Ácido mirístico
Ácido oleico
Ácido palmítico

2.2 Cultivo y cosecha de microalgas

Medio de cultivo

Se obtuvo una cepa de *Chlorella vulgaris* de Neiker (Teknalia, Arkaute, Álava). Para su cultivo, tanto sobre agar sólido como en medio líquido en matraces Erlenmeyer de 1 l, se empleó el medio Chu13 modificado (Chu, 1942). Como macronutrientes se emplearon: KNO_3 3.95 mM, K_2HPO_4 0.458 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.725 mM y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.81 mM. Como micronutrientes: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.202 μM , H_3BO_3 92.5 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 18.29 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.64 μM y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.408 μM . Además, se añadió ácido cítrico 0.52 mM y citrato férrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 64.44 μM (solución madre 19.96 mM y NaOH 1 M). Finalmente, el pH se ajustó a 7.5. Los cultivos se autoclavaron a 1 bar de presión y 121°C durante 30 minutos. Para el mantenimiento del cultivo se realizaron resiembras, a partir de cultivos en medio líquido, sobre agar sólido al 1.5% (p/v) con medio Chu 13 (Chu, 1942) empleando asas de siembra estériles.

Condiciones de cultivo

Los cultivos, tanto en medio líquido como en agar sólido, se incubaron a 25°C con agitación orbital de 150 rpm (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) y con iluminación continua de 760 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1}$ proporcionada con lámparas fluorescentes.

2.2.1 Seguimiento del cultivo

Para determinar la evolución del crecimiento de los cultivos se midió tanto la densidad celular como la concentración de pigmentos fotosintéticos, determinándose también el estado fisiológico del cultivo. Se emplearon cultivos celulares discontinuos por su relativo fácil manejo (Abalde *et al.*, 1995).

2.2.1.1 Seguimiento por turbidez

Se realizó el seguimiento de la turbidez de los cultivos espectrofotométricamente (Spectrophotomete DU 800, Beckman Coulter) midiendo la absorbancia a 680 nm.

2.2.1.2 Seguimiento por pigmentos fotosintéticos

Para calcular la concentración de pigmentos fotosintéticos, se colectaron muestras de 1 ml del cultivo en tubos Eppendorf y se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm (Microfuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter). El sedimento se lavó 2 veces con agua destilada por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm (Microfuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter). A continuación, se añadió al sedimento 1.5 ml de metanol, los tubos se agitaron en un agitador de tubos (Heidolph, REAX 2000) 15 segundos y se incubaron a 80°C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 13000 rpm (Microfuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter). La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 450, 650 y 665 nm (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter) para determinar la concentración de clorofila *a* (Ecuación 1), clorofila *b* (Ecuación 2) y carotenoides (Ecuación 3) (Horii *et al.*, 2007).

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (16.5 \cdot A_{665}) - (8.3 \cdot A_{650}) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (33.8 \cdot A_{650}) - (12.5 \cdot A_{665}) \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g/ml)} = \frac{A_{450}}{250} \quad (3)$$

2.2.1.3 Estado fisiológico del cultivo: Índice de Margalef

Con el fin de obtener la mayor cantidad de bioproductos de los extractos microalgales se tuvo en cuenta el valor del Índice de Margalef (IM) de los cultivos, que indica el estado fisiológico de las células (Ecuación 4). Cuando el cultivo es joven el valor de IM varía entre 1 y 1.5 mientras que si el valor asciende a 5 se trata ya de un cultivo viejo con baja tasa de renovación (Margalef, 1983).

$$IM = \frac{A_{460}}{A_{665}} \quad (4)$$

2.2.2 Cosecha de las microalgas

Las células se cosecharon empleando tanto nanopartículas magnéticas (MNPs) como centrifugación.

2.2.2.1 Cosecha por adsorción a nanopartículas magnéticas (MNPs)

Para la cosecha de las microalgas se emplearon MNPs de dos tipos: MNP-OH (nanopartículas desnudas) y MNP-NH₂ (funcionalizadas con grupos amino). Para la adsorción de las microalgas a las MNPs se empleó un volumen determinado de cultivo del que se calculó su contenido en Chl *a* para determinar la cantidad de biomasa microalgal. Las MNPs, que estaban almacenadas en PBS, se lavaron 3 veces con agua MilliQ y finalmente se les expuso a un volumen determinado de cultivo microalgal. Las microalgas se incubaron con las MNPs a temperatura ambiente, durante 5 minutos en un

brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMi) a 30 rpm en el programa F1. Con ayuda de un imán se retuvieron las MNPs con las microalgas adsorbidas para retirar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de células no adsorbidas mediante el cálculo de la concentración de Chl *a* (Apartado 2.2.1.2).

Se determinaron distintos parámetros que podrían afectar al proceso de adsorción, como el tipo de MNPs a emplear, el volumen de la incubación, la cantidad de biomasa a emplear o el pH del medio.

2.2.2.1.1 Selección del tipo de MNPs

Para seleccionar el tipo de MNPs idóneo se emplearon distintas cantidades de MNPs-OH y MNPs-NH₂: 0.5, 1, 1.5 y 2 mg. Las MNPs se lavaron previamente con agua MilliQ. Después, se les expuso a la cantidad de cultivo de microalgas correspondientes a 19 µg/ml de Chl *a* y se incubaron como se ha indicado anteriormente (Apartado 2.2.2.1). Finalmente, con ayuda de un imán se retuvieron las MNPs con microalgas adsorbidas y se midió la cantidad de Chl *a* presente en la fase líquida para calcular el porcentaje de adsorción (Apartado 2.2.1.2).

2.2.2.1.2 Efecto del volumen de incubación

Se añadieron 200 µl de cultivo microalgal, con una concentración de 3.5 µg/ml de Chl *a*, a distintas cantidades (0.5, 1 y 1.5 mg) de MNP-OH lavadas previamente 3 veces con agua MilliQ. El volumen final de incubación se llevó a 0.3, 0.5, 1 y 1.5 ml añadiendo medio de cultivo fresco (sin células). Las muestras se incubaron durante 5 minutos como se ha indicado previamente (Apartado 2.2.2.1) y, después, se recogió el sobrenadante con ayuda de un imán para separar las MNPs con microalgas adsorbidas. Se calculó la cantidad de

Chl *a* presente en la fase líquida para determinar el porcentaje de adsorción (Apartado 2.2.1.2).

2.2.2.1.3 Efecto de la cantidad de microalgas

Se expusieron 200 (3 $\mu\text{g/ml}$ de Chl *a*), 500 (10.5 $\mu\text{g/ml}$ de Chl *a*) y 800 μl (14.25 $\mu\text{g/ml}$ de Chl *a*) de cultivo microalgal a 1.5 mg de MNP-OH lavadas previamente 3 veces con agua MilliQ. Los volúmenes finales de incubación se llevaron a 0.3, 0.5, 1 y 1.5 ml añadiendo medio de cultivo fresco (sin células) en todos los casos. Las muestras se incubaron como se ha indicado anteriormente (Apartado 2.2.2.1). Finalmente, se determinó la cantidad de Chl *a* presente en la fase líquida (Apartado 2.2.1.2), tras retirar con un imán las MNPs con microalgas adsorbidas, calculando así el porcentaje de adsorción.

2.2.2.1.4 Efecto del pH

Se expusieron 1.5 mg de MNP-OH, lavadas previamente 3 veces con agua MilliQ, con 200 μl de volumen de cultivo microalgal (3.4 $\mu\text{g/ml}$ de Chl *a*) en un volumen final de 1 ml. Para ajustar el pH se centrifugó durante 10 minutos el volumen de cultivo celular (13000 rpm, Microfuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter) y se resuspendió el sedimento en 1 ml del tampón correspondiente al pH de interés (Tabla 2.2)

Tabla 2.2. Tampón o medio empleado para la adsorción de microalgas a MNP-OH y sus respectivos pH.

Tampón o medio	pH
Glicina-HCl 50 mM	3
Acético-Acetato sódico 50 mM	4.5
Medio de cultivo fresco	7.5
Carbonato-Bicarbonato sódico 0.1 M	10

Tras la incubación, se separó la fase líquida con ayuda de un imán para retener las MNPs con microalgas adsorbidas, y se midió la cantidad de Chl *a* presente en la fase líquida con el fin de determinar el porcentaje de adsorción (Apartado 2.2.1.2).

2.2.2.1.5 Desorción

Para desorber las microalgas adsorbidas a las MNPs-OH se emplearon dos estrategias.

En la primera se adsorbieron 200 μ l de cultivo (2 μ g/ml de Chl *a*) a 1 mg de MNP-OH, en un volumen final de 1 ml, y se midió el porcentaje de adsorción mediante el cálculo de Chl *a* contenida en la fase líquida (Apartado 2.2.1.2). Una vez realizada la adsorción (Apartado 2.2.2.1), se decantó la fase líquida y se añadió 1 ml de ácido sulfúrico al 10% (v/v). A continuación, las muestras se incubaron en uno de los tres siguientes procedimientos (Prochazkova *et al.*, 2013):

- 1 hora en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) en el programa F1 a 45 rpm a temperatura ambiente

- 1 hora en un baño (Unitronic 320 OR, P. Selecta) a 40°C agitando las muestras manualmente cada 15 minutos
- 1 hora en un sonorreactor (UTR 200, Hielscher Ultrasound Technology) a 32 kHz y 40°C.

Para la segunda estrategia de desorción se varió el pH del medio. Para ello, se adsorbieron 200 μ l de cultivo (2 μ g/ml de Chl *a*) con 1.5 mg de MNP-OH en un volumen final de 1 ml a pH 7 (añadiendo medio de cultivo fresco sin células) y se calculó el porcentaje de adsorción midiendo la cantidad de Chl *a* presente en la fase líquida (Apartado 2.2.1.2). Después, se retiró la fase líquida y se añadió 1 ml de tampón glicina/HCl (50 mM) pH 3.0, tampón fosfato (50 mM) pH 7.0 o tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7 y se incubó 1 hora en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) a 35 rpm en el programa F1 y a temperatura ambiente.

Una vez incubadas las muestras con los distintos tipos de desorción se retiraron las MNP-OH con la ayuda de un imán y se midió la cantidad de Chl *a* presente en la fase líquida (Apartado 2.2.1.2) para calcular el porcentaje de desorción (Ecuación 5).

$$\text{Desorción \%} = \frac{[\text{Chl } a \text{ desorbida}]}{[\text{Chl } a \text{ inicial}] - [\text{Chl } a \text{ no adsorbida}]} \times 100 \quad (5)$$

2.2.2.2 Cosecha por centrifugación

La cosecha microalgal por centrifugación se empleó para el posterior estudio de hidrólisis tanto de polisacáridos como de proteínas. Los cultivos recogidos tenían una $A_{680\text{nm}}$ entre 2.5 - 4 y un IM entre 1.5 - 2. Primero, se

calculó la cantidad de biomasa presente en el cultivo en peso seco. Para esto se emplearon filtros de microfibra de vidrio (Filter-Lab, 90 mm), por los que se filtraron distintos volúmenes conocidos de cultivo, y se dejaron secar a 60°C toda la noche. Una vez secos, se pesaron para relacionar la cantidad de biomasa con el volumen del cultivo filtrado. Conociendo ya la cantidad de biomasa y el estado fisiológico del cultivo, se centrifugó 1 l de cultivo 5 minutos a 9000 rpm y 5°C (Kubota 7820). Se realizaron 2 lavados (con el tampón de interés) durante 10 minutos a 5°C y 7000 rpm (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter). La biomasa se resuspendió en el tampón seleccionado a una concentración de 20 mg (p/s)/ml.

2.3 Obtención de biomasa microalgal

Se ensayaron distintos métodos para obtener biomasa microalgal y la posterior ruptura de las envueltas celulares.

2.3.1 Liofilizado

El cultivo fresco con una A_{680nm} entre 2.5 - 4 y un IM de 1 - 1.5 se concentró en frascos de cristal de 8 ml. Posteriormente, se liofilizó a 10^{-4} atm y -50°C (Laboratory Freeze Dryer, FD-Series). Las microalgas liofilizadas se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

2.3.2 Molino de bolas

La biomasa liofilizada se resuspendió a 20 mg (p/s)/ml en el tampón a emplear. A continuación, la biomasa se homogeneizó durante 5 minutos con esferas de vidrio (Glass Beads 4 mm de diámetro, Sigma-Aldrich.) a una frecuencia de 27 s^{-1} (Homogeneizador, RETSCH MM400).

2.3.3 Prensa de French

Se realizaron 5 ciclos de prensado a 1250 PSIG (French[®] Pressure cell press SIM AMINCO, SLM INSTRUMENT INC) del cultivo liofilizado y resuspendido a 20 mg (p/s) /ml en el tampón a emplear y del cultivo fresco cosechado mediante centrifugación y resuspendido a 20 mg (p/s)/ml en el tampón seleccionado. La biomasa obtenida, que se empleó para estudiar la hidrólisis de proteína soluble, se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm y 10°C (Allegra[™] X-22R Centrifuge, Beckman Coulter), recogiendo el sobrenadante y desechando el sedimento.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Métodos analíticos para la determinación de productos de hidrólisis de glucosidasas

Para la determinación de los productos de hidrólisis de glucosidasas se emplearon los métodos siguientes.

2.4.1.1 Determinación de azúcares totales

La determinación de los azúcares totales en la biomasa microalgal se llevó a cabo mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951). Se realizó una recta de calibrado con cantidades conocidas de glucosa. A 4 µl de muestra de biomasa microalgal (20 mg (p/s)/ml) se le añadió 396 µl de tampón acético/acetato sódico (50 mM) pH 4.6 y 400 µl de fenol al 5% (p/v). Las muestras se agitaron y se le añadió 2 ml de ácido sulfúrico al 99% (v/v) repitiéndose la agitación. Las preparaciones se enfriaron 30 minutos a

temperatura ambiente. Finalmente, se midieron las absorbancias a 490 nm (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter).

2.4.1.2 Determinación de azúcares reductores

La aparición de azúcares reductores se siguió empleando el método del DNS (3,5-dinitrosalicílico) o método de Miller (1959). Se obtuvo una recta de calibrado con cantidades conocidas de glucosa. Se retiraron de la mezcla de hidrólisis de polisacáridos alícuotas de 0.25 ml y se añadieron 0.75 ml del reactivo DNS (3,5-dinitrosalicílico 1% (p/v), NaOH 1% (p/v) y Na₂SO₃ 0.05% (p/v)) parándose la reacción. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 100°C. Por último, las muestras se diluyeron en 4 ml de agua destilada y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para que se estabilizara el color. Se midieron las absorbancias de las muestras a 540 nm (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter).

2.4.1.3 Cromatografía en capa delgada (TLC)

Se tomaron alícuotas de 100 µl de la mezcla de reacción empleada para la hidrólisis enzimática de polisacáridos del homogeneizado de microalgas. Las alícuotas se concentraron por evaporación al vacío (Savant Automatic Enviromental SpeedVac Apparatus) hasta 1/3 de su volumen inicial. Se depositaron 10 µl de la muestra concentrada en placas de TLC de 20 cm x 20 cm (TLC Silica gel 60, Merck). La placa se desarrolló en una cubeta cerrada con una fase móvil de n-Butanol, 2-Propanol y agua destilada 20:25:20 (v:v:v) (Chiba and Shimomura, 1965) durante 4 horas. Tras evaporar la fase móvil de las placas a temperatura ambiente, éstas se tiñeron mediante pulverización con una mezcla de carbazol (0.5 g), etanol al 96% (v/v) (95 ml) y ácido sulfúrico

99% (v/v) (5 ml) y se dejaron secar. Una vez secas, las placas se mantuvieron en una estufa a 120°C durante 10 minutos (Adachi, 1965).

2.4.2 Métodos analíticos para la determinación de productos de hidrólisis de proteasas

A continuación, se detallan los métodos empleados para la determinación de proteína y para el seguimiento de la hidrólisis de éstas.

2.4.2.1 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína presente en las preparaciones empleadas de los enzimas comerciales se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una recta de calibrado utilizando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). Para el análisis del enzima comercial se añadieron 100 µl de muestra a 700 µl de agua destilada y 200 µl de reactivo de Bradford. Se analizó también la proteína soluble presente en las preparaciones de biomasa de microalgas (20 mg (p/s)/ml) obtenidas por liofilización, molino de bolas tras liofilización, prensado (Prensa de French) tras liofilización y prensado (Prensa de French) de células frescas. Para ello se añadieron 10 µl de muestra, 790 µl de tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7 y 200 µl del reactivo de Bradford. Las muestras se agitaron y se dejaron reposar durante 30 minutos agitándolas cada 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter).

2.4.2.2 Determinación de compuestos fenólicos

Para medir la actividad hidrolítica de las proteasas se empleó el método modificado de Anson (Anson, 1938) y Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927). Se obtuvo una recta de calibrado de cantidades conocidas de tirosina. De cada reacción de hidrólisis enzimática de proteína se extrajeron alícuotas de 0.5 ml que se añadieron a 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.67 M. Después de agitar se paró la reacción, insolubilizando la proteína sustrato no hidrolizada y manteniéndose en disolución los péptidos y aminoácidos solubles. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 5°C y 13000 rpm (Sigma 1-15PK). Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 250 µl que se añadieron a 625 µl de Na₂CO₃ (0.5 M). Por último, se añadieron 125 µl del reactivo de Folin & Ciocalteu (0.2 N) que reaccionó con los compuestos fenólicos presentes. La absorbancia a 660 nm de las muestras agitadas se midió espectrofotométricamente (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter).

2.4.2.3 Análisis electroforéticos (SDS-PAGE)

Los análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes se realizaron según Laemmli (1970), tanto para detectar la presencia de proteínas contaminantes presentes en los preparados de enzimas comerciales, como para seguir la hidrólisis enzimática de proteínas solubles en el extracto de microalgas. Se emplearon dos tipos de geles:

- Geles de 1 mm de espesor con poliacrilamida al 10% (p/v) en el gel separador y 4% (p/v) en el concentrador, que se habían obtenido con persulfato amónico y TEMED como agentes polimerizantes

- Geles comerciales en gradiente de poliacrilamida 4-20 % (Mini-PROTEAN TGX stain-free gels, BioRad)

El tampón de electrodos empleado contenía Tris 3.03% (p/v), glicina 14.4% (p/v) y SDS 1% (p/v). También se empleó un tampón de electrodos compuesto por Tris/HCl 0.5 M 13.3% (v/v), glicerol 26.6% (v/v), SDS 2.1% (v/v) y azul de bromofenol 1.6% (v/v), que se suplementó con 2-mercaptoetanol en proporción 1:19 (v/v) antes de su uso, y se añadió a la muestra en una proporción 1:1 (v/v). Ésta mezcla se calentó a 100°C durante 10 minutos. En los geles al 10% de poliacrilamida se cargaron 5 µl de marcador de proteínas de baja masa molecular (Precision Plus Protein Standards- All blue, BioRad) y 20 µl de muestra. Por otro lado, en los geles en gradiente de poliacrilamida se cargaron 10 µl de marcador de proteínas de baja masa molecular (Precision Plus Protein Standards- All blue, BioRad) y 40 µl de muestra. La separación electroforética se realizó empleando una fuente de alimentación (Power Pac 300, Bio-Rad, Hércules, PA, EEUU) a 60 V durante 30 minutos y más tarde de 100 V hasta la migración del frente al final del gel. Para realizar la tinción con Azul de Coomassie, en un recipiente de 25 ml de volumen se añadieron 22,5 ml de solución de destinción (agua destilada 60% (v/v), metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v)) y 2,5 ml de Coomassie madre (pastilla de Blue R, metanol 60% (v/v)) para incorporar después el gel. Después de 2 h de tinción, se realizó la destinción y se escaneó el gel.

2.4.3 Detección de las proteínas mayoritarias mediante LC-MS/MS

Se realizó un análisis electroforético mediante SDS-PAGE (apartado 2.4.2.3) de 50 µl de extracto microalgal prensado (20 mg(p/s)/ml) y centrifugado en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0). Se recortaron las bandas

mayoritarias (50 kDa y 25 kDa) tañidas con Azul de Coomassie para analizarlas mediante LC-MS/MS (servicio de proteómica SGIker).

Las bandas seleccionadas se extrajeron manualmente del gel y se sometieron a digestión con endopeptidasas según Shevchenko *et al.* (1996) con modificaciones menores. Con el fin de reducir y alcalinizar las proteínas, las fracciones del gel se incubaron con DTT (10 mM en 50 mM de NH_4HCO_3 , a 56°C durante 45 minutos) e iodoacetamida (25 mM en 50 mM de NH_4HCO_3 , a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos). A continuación, los trozos del gel se hincharon en tampón de digestión (NH_4HCO_3 50 mM con 12.55 ng/ μl de tripsina de grado proteómico, Roche Diagnostics) a 37°C durante la noche. Se recuperó el sobrenadante y se extrajeron los péptidos del gel dos veces: primero, con NH_4HCO_3 (25 mM) y acetonitrilo y después con 0.1% de ácido trifluoroacético y acetonitrilo. Se agruparon los sobrenadantes recuperados y los péptidos extraídos, se secaton en un SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) y, posteriormente, se desalaron con puntas caseras C18 (3M Empore C18).

Los análisis espectrométricos de masas se realizaron en un sistema de cromatografía líquida EASY-nLC 1200 en interfaz con un espectrómetro de masas Q Exactive HF-X (Thermo Scientific) a través de una fuente de iones flexibles de nanoaspersión. Los péptidos desalados se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap100 (75 μm x 2 cm, Thermo Scientific) conectada a una columna analítica Acclaim PepMap RSLC (75 μm x 25 cm, Thermo Scientific). Los péptidos se eluyeron de la columna usando un gradiente lineal de acetonitrilo del 2,4 al 24% en ácido fórmico al 0,1% a una velocidad de flujo de 300 nl min^{-1} durante 18 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones positivos. Se obtuvieron escaneos completos de MS de m/z 375 a 1800 con una resolución de 120,000 a m/z 200. Los 10 iones más intensos fueron fragmentados por una disociación de C-trap

de mayor energía con energía de colisión normalizada de 28 y se registraron espectros de MS/MS con una resolución de 15,000 a m/z 200. El tiempo máximo de inyección de iones fue de 100 ms para levantamiento y 120 ms para escaneos MS/MS, mientras que los valores objetivo de AGC de 3×10^6 y 5×10^5 se usaron para levantamiento y MS/MS escaneos, respectivamente. Los iones cargados individualmente, o los iones con estado de carga no asignado, también se excluyeron de MS/MS. Los datos fueron adquiridos utilizando el software Xcalibur (Thermo Scientific).

Los archivos se procesaron con Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) y la lista de picos resultante se buscó en la base de datos NCBI nr 2020_06 restringida a *Chlorella vulgaris* usando el motor de búsqueda MASCOT v. 2.2.03 (Matrix Science). Las tolerancias de masa de precursores y fragmentos se ajustaron a 10 ppm y 0,05 Da, respectivamente, y se permitió hasta 1 escisión perdida. La carbamidometilación de Cys se estableció como modificación fija y la oxidación de Met como modificación variable.

2.5 Síntesis y caracterización de las nanopartículas magnéticas

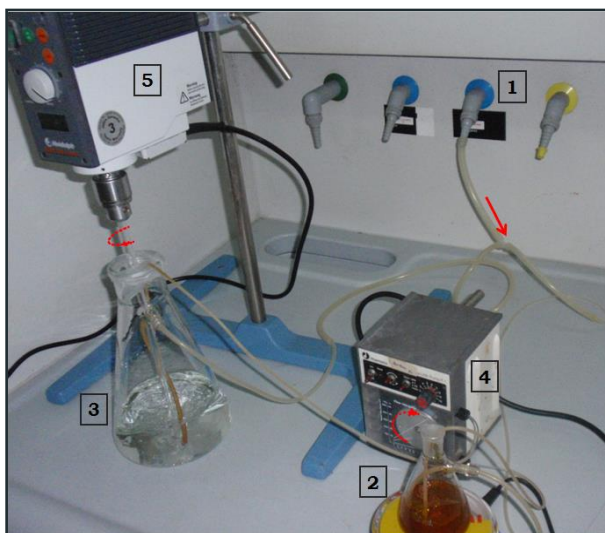
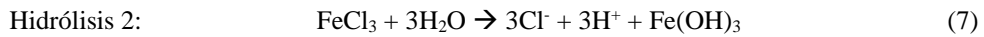
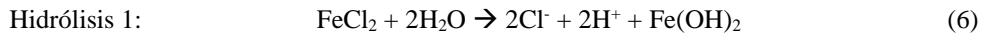


Figura 2.1: Montaje experimental para la síntesis de las MNPs. (1) N_2 para burbujear las disoluciones de cloruros de hierro (2) y NH_4OH (3). Los cloruros de hierro se añaden gota a gota, mediante una bomba peristáltica (4) a la preparación de NH_4OH agitada mecánicamente (5) (Cruz-Izquierdo, 2013).

Para la síntesis de MNPs se coprecipitaron sales de hierro en medio alcalino (Morales *et al.*, 1999). Para ello, una disolución de $FeCl_2$ (0.33 M) y $FeCl_3$ (0.66 M) se bombeó a 5 ml/min sobre 450 ml de NH_4OH (0.42 M) agitada mediante una varilla de vidrio a 400 rpm (Agitador RZR 2102, Heidolph) a temperatura ambiente (Figura 2.1). Posteriormente, se mantuvo la agitación durante 30 minutos más. Los cloruros de hierro al hidrolizarse y transformarse en hidróxidos coprecipitan gracias a la presencia de iones amonio formándose, así, la magnetita. Las reacciones del proceso se presentan a continuación (Răuciu, 2009) (Ecuaciones 6-9):



Mediante el proceso de coprecipitación se obtuvo un precipitado negro que se lavó 3 veces con agua desionizada y 2 veces con tampón PBS (Phosphate buffer saline) (150 mM, pH 7.4) con la ayuda de un imán. Todas las disoluciones fueron burbujeadas con N₂ para desplazar el aire disuelto.

Las MNPs obtenidas se denominan nanopartículas desnudas (MNP-OH) y presentan en su superficie grupos -OH (Liu *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004). La funcionalización de las MNP-OH se llevó a cabo incubando 300 mg de éstas con 3-aminopropiltriétoxilano (APTS al 2%, v/v) durante 24 horas a 70°C. Se obtuvieron, de esta forma, nanopartículas funcionalizadas con grupos -NH₂ en la superficie (MNP-NH₂) (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2012).

La concentración tanto de MNP-OH como de MNP-NH₂ se calculó mediante secado al vacío en un equipo Savant (Automatic Environmental Speedvac Apparatus), de un volumen conocido de MNPs. Finalmente, las MNPs se almacenaron en PBS a 4°C hasta su empleo.

2.5.1 Caracterización morfológica de las MNPs

La caracterización cristalográfica y la identificación de las fases se realizaron mediante un difractómetro (PANanalytical Xpert PRO). La anchura

a media altura de los máximos de difracción permitió calcular el tamaño del cristalito empleando la ecuación de Scherrer (Ecuación 10) que relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción (β) con el tamaño del cristalito (D).

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (10)$$

Al considerarse las nanopartículas esféricas, K toma el valor de 0.89; la longitud de onda de la radiación X utilizada (0.54 nm) sería λ ; el ensanchamiento neto del pico de difracción expresado en radianes 2θ sería β que puede determinarse de las siguientes formas:

$$\text{Según Warren} \quad \beta^2 = \beta_{\text{obs}}^2 - \beta_{\text{ins}}^2 \quad (11)$$

$$\text{Según Scherrer} \quad \beta = \beta_{\text{obs}} - \beta_{\text{ins}} \quad (12)$$

donde β_{obs} correspondía a la anchura observada (experimental) y β_{ins} a la anchura instrumental.

Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), en un microscopio JEOL 1010, se comprobó el tamaño y la forma de las MNPs.

2.5.2 Caracterización magnética de las MNPs

La caracterización magnética de las MNPs se realizó mediante ciclos de magnetización empleando magnometría de muestra vibrante (VSM) en un electroimán hasta campos moderados (1.8 T) a temperatura ambiente. Estos ciclos de magnetización permitieron obtener los valores de saturación magnética (M_s), coercitividad (H_c) y remanencia (M_R).

2.5.2.1 Tamaño del núcleo magnético de las MNPs

Las curvas de magnetización dan una aproximación del tamaño del núcleo magnético de las MNPs empleando la ecuación de Langevin (Ecuación 13) ajustada mediante el modelo superparamagnético no interaccionante.

$$M(H) = M_S \left(\frac{\text{emu}}{\text{g}} \right) \int_0^T L \left(\frac{\mu_0 M_S (\text{Am}^{-1}) V H (\text{Am}^{-1})}{k_B T} \right) f(D) dD \quad (13)$$

donde, la distribución de diámetros de la población de partículas $f(D)$ es una función del tipo log-normal; la imanación de saturación macroscópica M_S (emu/g); la imanación de la partícula M_S (Am^{-1}); la permeabilidad magnética en el vacío μ_0 ; y la constante de Boltzmann k_B .

El volumen crítico V_C se determinó para cada temperatura mediante (Ecuación 14):

$$V_C = \frac{25k_B T}{K} \quad (14)$$

siendo K la constante de anisotropía efectiva.

Se consideró que la forma de las MNPs es esférica y el componente mayoritario es magnetita (magnetización a 480 kA/m).

2.5.3 Estabilidad

El análisis del potencial Zeta (ξ) permitió determinar la estabilidad de las MNPs en un coloide. Este parámetro, que está relacionado con la carga superficial y con el entrono local de la MNP, permite determinar el potencial

electrostático del plano de corte de la nanopartícula. Para determinar el potencial Zeta (ξ) se empleó un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire), midiendo a 25°C con cubetas tipo “Folded Capillary cel” (DTS 10600) una suspensión de MNPs en agua destilada (50 $\mu\text{g/ml}$).

A partir de la movilidad electroforética, basada en la ecuación de Smoluchowski (Ecuación 15), se calculó el potencial Zeta (ξ).

$$v = \left(\frac{\epsilon E}{\eta} \right) \xi \quad (15)$$

donde la velocidad electroforética es v , la viscosidad η , la permitividad eléctrica de la solución electrolítica es ϵ y el campo eléctrico es E (Zhang *et al.*, 2008).

2.6 Síntesis de mCLEAs de proteasas y glucosidasas

La inmovilización de proteasas (Alcalase[®] y Neutrase[®]) y glucosidasas (α -amilasa y glucoamilasa) en MNP-NH₂ se realizó mediante enlaces covalentes, obteniéndose agregados magnéticos enzimáticos entrecruzados (Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates, mCLEAs).

La inmovilización se realizó según Cruz-Izquierdo *et al.* (2014) a temperatura ambiente para los cuatro tipos de enzimas. A 30 mg de MNP-NH₂ se añadieron 3 mg de enzima soluble y 42 ml de sulfato amónico (3.6 M) como insolubilizante. Se mantuvo en agitación durante 5 minutos a 30 rpm (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) y, tras ello, se añadió 3.72 ml de glutaraldehído (2.5 M) como agente entrecruzante. La preparación se incubó durante 24 horas con un brazo agitador a 30 rpm (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) y temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS.

Una vez realizada la inmovilización se incubó la preparación con NaBH_4 (1 mg/ml) en tampón carbonato-bicarbonato (100 mM, pH 10) durante 2 horas. De esta forma se redujeron las bases de Schiff y los grupos aldehído que pudieran quedar libres. Se lavaron nuevamente tres veces con PBS. Finalmente, para eliminar las interacciones inespecíficas, se realizaron dos lavados consecutivos de 10 minutos a temperatura ambiente con NaCl_2 (2 M en PBS) y Triton-X100 (1%, v/v en PBS) (Mateo *et al.*, 2000).

Tras cada etapa de inmovilización se realizaron tres lavados con PBS con el fin de eliminar el reactivo sobrante y el enzima que no se había inmovilizado. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación rotatoria a 30 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI).

Las mCLEAs se almacenaron en tampón PBS a 4°C a una concentración de 2 mg (p/s)/ml.

2.7 Obtención de hidrolizados de polisacáridos con glucosidasas

Para la obtención de hidrolizados de polisacáridos con sustratos modelo y con homogeneizados de microalgas sin centrifugar se emplearon dos tipos de glucosidasas: α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1) (Novozymes) y glucoamilasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3) (Novozymes).

2.7.1 Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo

Se determinó la concentración de proteína presente en las preparaciones de los enzimas comerciales mediante el método de Bradford (1976) (Apartado

2.4.2.4), realizándose un análisis de la pureza mediante SDS-PAGE (Apartado 2.4.2.3).

Para caracterizar los enzimas solubles se realizaron modificaciones en los protocolos de Bernfeld (1955) y Chang *et al.* (1995) para la α -amilasa, y Jebor *et al.* (2014) para la glucoamilasa. Se empleó almidón como sustrato modelo para ambos enzimas. Se realizó una gelificación previa del almidón hirviéndolo en tampón acético-acetato sódico (50 mM) al pH necesario en cada ocasión, durante 10 min a 100°C.

Las reacciones de hidrólisis se incubaron a la temperatura correspondiente (Climo-Shaker ISFIX, Khuner) con agitación rotatoria en un brazo giratorio a 35 rpm (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Se recogieron muestras a distintos tiempos y se analizaron mediante el método del DNS (Miller, 1959) (Apartado 2.4.1.2).

2.7.1.1 Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad de la α -amilasa (1 nl de E/ml) y glucoamilasa (10 nl de E/ml) se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado y las reacciones se incubaron a 40 y 45°C, respectivamente, durante 30 minutos. Se empleó tampón acético-acetato sódico (50 mM) ajustado a los valores de pH 3.6, 4.1, 4.6 y 5.25 y tampón ácido cítrico-citrato sódico (50 mM) a pH 6.0.

2.7.1.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para determinar la temperatura óptima de actividad se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5. Se añadieron 10 nl de E/ml de mezcla de incubación de α -amilasa o de

glucoamilasa. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 35, 40 y 45°C para la α -amilasa y 40, 45 y 50°C para la glucoamilasa.

2.7.1.3 Determinación de la cantidad de enzima

Se varió la concentración de α -amilasa o glucoamilasa empleada para hidrolizar almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM) pH 4.5. La cantidad de enzima comercial añadido fue 0.01 y 0.1, 1 y 10 nl de E/ml de mezcla de incubación. Las temperaturas de incubación empleadas fueron 40°C para α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) durante 30 minutos

2.7.1.4 Determinación de la actividad enzimática

Para determinar los parámetros cinéticos (V_M y K_m) se varió la concentración de sustrato en las reacciones de hidrólisis. Tanto para α -amilasa y glucoamilasa se empleó tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5. Las temperaturas de incubación empleadas fueron 40°C para α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) durante 20 minutos.

2.7.1.4.1 Distinta concentración de sustrato

Se varió la concentración de almidón gelificado de 1 a 10 mg/ml en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las cantidades de enzima empleadas fueron 10 nl de E/ml de mezcla de incubación para la α -amilasa y 100 nl de E/ml de mezcla de incubación para la glucoamilasa.

2.7.1.4.2 Determinación de los parámetros cinéticos

Se estudió la saturación del enzima representando las velocidades iniciales de reacción frente a la concentración de sustrato. Los parámetros cinéticos, K_M (mg/ml) y V_{max} (mg azúcar reductor/min), se determinaron por regresión lineal, a una representación doble recíproca, y por regresión no lineal, a una hipérbola al representar v vs $[S]$. Para los cálculos se empleó el SOLVER de Microsoft Excel.

Las actividades de los enzimas se expresaron en unidades de actividad (U), es decir, como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcar reductor por minuto en condiciones estándar.

2.7.1.5 Combinación de enzimas para la hidrólisis de sustratos modelo

Se estudió mediante TLC (Apartado 2.4.1.3) la hidrólisis de almidón catalizada por la α -amilasa y glucoamilasa individualmente y, posteriormente se hidrolizó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50mM, pH 4.5) empleando primero la α -amilasa y a continuación la glucoamilasa. En todos los casos se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado y 10 nl de E/ml de mezcla de incubación. Las reacciones se incubaron a 42.5°C durante 5 horas.

2.7.1.5.1 Estequiometría enzimática en la hidrólisis de almidón

Se emplearon distintas combinaciones de α -amilasa y glucoamilasa para hidrolizar almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las reacciones se incubaron a 42.5°C durante 30 minutos.

En la relación estequiométrica el valor 1 corresponde a 15 nl de E/ml de mezcla de incubación. Se realizaron las siguientes combinaciones enzimáticas (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Estequiometría enzimática empleada en la hidrólisis de almidón (10 mg/ml) siendo 1= 15 nl de E/ml de mezcla de incubación.

α-Amilasa:Glucoamilasa	
1:1	
1:2	2:1
1:3	3:1

2.7.2 Caracterización de las mCLEAs empleando sustratos modelo

Se sintetizaron mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa (Apartado 2.6). La caracterización se llevó a cabo empleando almidón y dextrina como sustratos. El almidón se gelificó en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a 100°C durante 10 minutos al pH indicado. La dextrina se hirvió en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a 90°C durante 10 minutos al pH indicado. Las reacciones se incubaron a la temperatura correspondiente (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Se recogieron muestras en tubos Eppendorf dispuestos en una gradilla imantada. Una vez retenidas las mCLEAs al imán se recogieron las fases líquidas, que se analizaron por el método del DNS (Miller, 1959) (Apartado 2.4.1.2).

2.7.2.1 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para determinar la temperatura óptima de las mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa se empleó dextrina como sustrato. Se añadieron 4 mg (p/s) de mCLEAs, previamente lavadas con el tampón a emplear, en un volumen final de 7 ml de dextrina (5 mg/ml) en tampón acético-acetato (50 mM, pH 4.6). Las reacciones se incubaron en un intervalo de 30-60°C durante 50 minutos.

2.7.2.2 Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de las mCLEAs se empleó dextrina como sustrato. Se añadieron 4 mg (p/s) de mCLEAs, previamente lavadas con el tampón a emplear, en un volumen final de 7 ml de dextrina (5 mg/ml) en tampón acético-acetato sódico (50 mM) variando el pH entre 3.5 a 5.5. Las reacciones se incubaron a 40°C para la α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa durante 1 hora.

2.7.2.3 Selección de la cantidad de mCLEAs y del sustrato

Para determinar la cantidad de mCLEAs y el sustrato a emplear para caracterizar la actividad de las mCLEAs, se realizaron reacciones de hidrólisis con almidón gelificado y con dextrina hervida en tampón acético-acetato sódico pH 4.5 (50 mM).

Se emplearon tres cantidades de mCLEAs con ambos sustratos: 0.3, 0.6 y 0.9 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación. Para ambas enzimas se añadieron 2.5 mg/ml de almidón gelificado o de dextrina hervida en tampón acético-acetato pH 4.5 (50 mM). Las reacciones se incubaron a 40°C para la α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa entre 1 y 40 horas.

Para seleccionar el sustrato se añadieron 0.6 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación a preparaciones de almidón (2.5 mg/ml) gelificado o dextrina hervida en tampón acético-acetato sódico pH 4.5 (50 mM). Las reacciones se incubaron entre 1 y 25 horas, aproximadamente, a 40°C para la α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa.

2.7.2.4 Combinación de las mCLEAs para la hidrólisis de sustratos modelo

Se combinaron en distintas proporciones las mCLEAs de α -amilasa y de glucoamilasa para la hidrólisis de dextrina hervida. Se añadieron mCLEAs a dextrina (10 mg/ml) hervida en tampón acético-acetato sódico (50 mM) pH 4.5. Las reacciones se incubaron a 45°C durante 1 hora.

En relación a la estequiometría entre mCLEAs el valor 1 corresponde a 0.3 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. Se realizaron las siguientes combinaciones (Tabla 2.4).

2.7.3 Hidrólisis de polisacáridos de biomasa microalgal empleando α -amilasa y glucoamilasa solubles.

El homogeneizado de microalgas empleado se obtuvo por prensado del cultivo de microalgas a una concentración de 20 mg (p/s)/ml con una prensa de French en tampón acético-acetato sódico (50 mM) al pH correspondiente. Las reacciones se incubaron a la temperatura indicada (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Las muestras se analizaron por el método del DNS (Miller, 1959) (Apartado 2.4.1.2) y por TLC (Apartado 2.4.1.3).

Tabla 2.4: Estequiometría enzimática empleada en la hidrólisis de dextrina (10 mg/ml) siendo 1= 0.3 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación.

α-Amilasa:Glucoamilasa	
1:0	0:1
2:0	0:2
3:0	0:3
1:1	
1:2	2:1
1:3	3:1

2.7.3.1 Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad enzimática se empleó tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5 y 6.0, y tampón Tris/HCl (50 mM) para pH 8.0. Se añadieron 450 nl E/mg (p/s) de microalga de α -amilasa y 200 nl E/mg (p/s) de microalga de glucoamilasa. Las reacciones se incubaron a 40°C para α -amilasa y 45°C para glucoamilasa durante 1 hora.

2.7.3.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para determinar la temperatura óptima de actividad enzimática se empleó homogeneizado crudo de microalgas, sin centrifugar, en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5. Se añadieron 45 nl de E/mg (p/s) de microalgas de α -amilasa y 20 nl de E/mg (p/s) de microalgas de glucoamilasa. Las reacciones se incubaron entre 35 y 50°C durante 20 minutos.

2.7.3.3 Optimización del proceso de hidrólisis

Se estudió el posible efecto activador del CaCl_2 en la actividad de la α -amilasa (Dojnov *et al.*, 2008). También se realizó un pretratamiento térmico del sustrato a 90°C durante 5 minutos para gelificar los almidones presentes en la biomasa microalgal (Souilah *et al.*, 2015).

2.7.3.3.1 Efecto del pretratamiento térmico del sustrato

Se utilizó como sustrato homogeneizado de microalgas sin centrifugar (20 mg (p/s)/ml) sin tratamiento térmico y biomasa microalgal pretratada a 90°C durante 5 minutos. En todos los casos el homogeneizado de microalgas se realizó en tampón acético-acetato sódico (50 mM) pH 4.5.

En el caso de la α -amilasa se emplearon 4.5, 45 y 450 nl de E/mg (p/s) de microalga y para la glucoamilasa se emplearon 20 y 200 nl de E/mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron a 40°C para la α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa durante 1 hora.

2.7.3.3.2 Efecto de los iones de calcio en la actividad de la α -amilasa

Se añadieron 4.5 nl de E/mg (p/s) de microalga al homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s) /ml) pretratada a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente se añadió CaCl_2 a 2, 5 y 8 mM en las mezclas de reacción, y se incluyó un control sin CaCl_2 . Las mezclas de reacción se incubaron a 40°C durante 1 hora. Se empleó como control una reacción con almidón (10 mg/ml) gelificado al que se le añadieron 10 nl de E/ml de mezcla de incubación y otra empleando α -amilasa dializada empleando una columna PD 10 (GE Healthcare). En ambos casos se añadió CaCl_2 2 mM y se incubaron a 40°C durante 1 hora.

2.7.3.4 Combinación de glucosidasas para la hidrólisis de polisacáridos de la biomasa microalgal

Se realizaron distintas combinaciones estequiométricas de α -amilasa y glucoamilasa con el fin de optimizar el grado de hidrólisis de los polisacáridos. Se utilizó homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s)/ml) en acético-acetato sódico (50 mM pH 4.5) pretratado térmicamente a 90°C durante 5 minutos. Se añadieron distintas proporciones de los enzimas (Tabla 2.5), el valor 1 en la estequiometría corresponde a 4.5 nl de E/mg (p/s) de microalga.

Tabla 2.5: Estequiometría enzimática empleada en la hidrólisis de biomasa microalgal (20 mg (p/s)/ml) pretrada a 90°C durante 5 minutos 1= 4.5 nl de E/mg (p/s) de microalga.

α-Amilasa	1	1	0.1	0.1	0.1	0.1
Glucoamilasa	1	4	0.6	0.2	0.1	0.05

Las reacciones se incubaron a 42.5°C durante 1 hora. Se incluyeron controles en la estequiometría 1:1 y 1:4 con homogeneizado de microalgas sin pretratamiento térmico.

2.7.4 Hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado de microalgas empleando mCLEAs

Se emplearon mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s)/ml) obtenido por prensado en prensa de French al pH de interés. Las reacciones se incubaron a la temperatura indicada (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-

Mixer, ELMI). Las muestras se analizaron mediante el método del DNS (Miller, 1959) (Apartado 2.4.1.2) y mediante TLC (Apartado 2.4.1.3).

2.7.4.1 Efecto del pretratamiento térmico del sustrato

Se emplearon homogeneizados de microalgas (20 mg (p/s)/ml) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) sin pretratar y pretratado térmicamente a 90°C durante 5 minutos. Se añadieron 50 µg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron a 55°C durante 24 horas.

2.7.4.2 Determinación de la temperatura óptima

Se añadieron 50 µg (p/s) de mCLEAs de glucoamilasa/mg (p/s) de microalga al homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s)/ml) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) pretratada térmicamente a 90°C durante 5 minutos. Las reacciones se incubaron entre 35 y 55°C durante 24 horas.

2.7.4.3 Determinación de la cantidad óptima de mCLEAs de glucoamilasa

Se añadieron 25, 50 y 75 µg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) de microalga al homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s)/ml) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) pretratada térmicamente a 90°C durante 5 minutos. Las reacciones se incubaron a 50°C durante 24 horas.

2.8 Obtención de hidrolizados de proteínas con proteasas

Para la obtención de hidrolizados de proteínas con sustratos modelo y con biomasa microalgal se emplearon dos preparaciones comerciales de proteasas distintas: la Alcalase[®] de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62) (Novozymes) y la Neutrase[®] de *Bacillus amyloliquefaciens* (EC 3.4.24.28) (Novozymes). Previamente se caracterizaron los parámetros cinéticos empleando sustratos modelo.

2.8.1 Caracterización de los enzimas libres empleando sustratos modelo

Se determinó la cantidad de proteína presente en los enzimas comerciales mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) (Apartado 2.4.2.4) y se analizó la pureza por SDS-PAGE (Apartado 2.4.2.3).

Para la caracterización de los enzimas libres se empleó caseína como sustrato previamente desnaturalizada a 80°C durante 10 minutos en el tampón de interés (Ferrero *et al.*, 1996).

Las reacciones se incubaron a la temperatura indicada (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Los aminoácidos presentes se cuantificaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu (1927) (Apartado 2.4.2.2).

2.8.1.1 Determinación del pH óptimo de actividad

Para la determinación del pH óptimo de actividad enzimática se preparó caseína (10 mg/ml) en distintos tampones (Tabla 2.6). La cantidad de enzima añadido en la reacción fue 4 µl de E/ml de mezcla de incubación para Alcalase[®]

y 9 μ l de E/ml de mezcla de incubación para Neutrased[®]. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

Tabla 2.6: Tampones e intervalos de pH empleados para la determinación del pH de las proteasas empleando caseína (10 mg/ml) como sustrato. La concentración del tampón era 50 mM en todos los casos.

Enzima	Tampón	pH
Neutrased [®]	Fosfato	5.7-8.0
	Tris/HCl	8.0-8.5
	Carbonato/Bicarbonato	9.0-11.0
Alcalased [®]	Fosfato	7.5
	Tris/HCl	8.0
	Carbonato/Bicarbonato	9.0-11.0
	KCl/NaOH	12.0-13.0

2.8.1.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para determinar la temperatura óptima de actividad enzimática se preparó caseína (10 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 8 para Neutrased[®] y en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7 para Alcalased[®]. En ambos casos se añadieron 280 nl de E/ml de mezcla de incubación del enzima correspondiente. Las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura de 30 a 50°C durante 30 minutos.

2.8.1.3 Determinación de la cantidad de enzima

Se añadió a una preparación de caseína (10 mg/ml) distintas cantidades de Alcalase[®] 50-500 nl E/ml de mezcla de incubación y de Neutrase[®] 0.1 - 1 μ l de E/ml de mezcla de incubación. Para la Alcalase[®] se empleó tampón KCl/NaOH (50 mM) a pH 12.7 a una temperatura de incubación de 35°C durante 20 minutos, y para la Neutrase[®] tampón Tris/HCl (50 mM) a pH 8.0 a una temperatura de incubación de 40°C durante 20 minutos.

2.8.1.4 Determinación de la actividad enzimática

Para determinar los parámetros cinéticos se varió la concentración de sustrato en la hidrólisis de caseína. Para la Alcalase[®] se empleó caseína en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH12.7 y para la Neutrase[®] en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 8.0. Las temperaturas de incubación fueron 35°C para la Alcalase[®] y 40°C para la Neutrase[®] durante 30 minutos.

2.8.1.4.1 Distinta concentración de sustrato

Se varió la concentración de caseína entre 0.5 y 3 mg/ml para una concentración fija de Alcalase[®] de 28 nl de E/ml de mezcla de incubación y de Neutrase[®] de 100 nl de E/ml de mezcla de incubación.

2.8.1.4.2 Determinación de los parámetros cinéticos

Se estudió la saturación del enzima representando las velocidades iniciales de reacción frente a la concentración de sustrato. Los parámetros cinéticos, K_M (mg/ml) y V_{max} (μ mol Tyr/min), se determinaron por regresión lineal, a una representación doble recíproca, y por regresión no lineal, a una

hipérbola al representar v vs $[S]$. Para los cálculos se empleó el SOLVER de Microsoft Excel.

Las actividades de los enzimas se expresaron en unidades de actividad (U), es decir, como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcar reductor por minuto en condiciones estándar.

2.8.2 Caracterización de las mCLEAs empleando sustratos modelo

Se sintetizaron mCLEAs de Alcalase[®] y Neutrase[®] (Apartado 2.6). La caracterización de la actividad se llevó a cabo empleando caseína desnaturalizada a 80°C durante 10 minutos en el tampón de interés. Las reacciones se incubaron a la temperatura correspondiente en cada caso (Climo-Shaker ISFIX, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMi). Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu (1927) (Apartado 2.4.2.2).

2.8.2.1 Determinación del pH óptimo de actividad

En el caso de la Alcalase[®] se preparó caseína (10 mg/ml) en tampón con un intervalo de pH entre 9.5 y 12.75 (Tabla 2.7) con 0.3 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. Para la Neutrase[®] se preparó caseína (5 mg/ml) en tampón con un intervalo de pH entre 7.0 y 10.0 (Tabla 2.7) con 0.4 mg (p/s) de mCLEAs /ml de mezcla de incubación. Las reacciones se incubaron a 55°C, durante 30 minutos para la Alcalase[®] y durante 3 horas para la Neutrase[®].

2.8.2.2 Determinación de la temperatura óptima

Para determinar la temperatura óptima de actividad se incubaron las mezclas de reacción entre 40 y 65°C durante 1 hora. Se añadieron 0.3 mg (p/s) de mCLEAs de Alcalase[®]/ml de mezcla de incubación a 10 mg/ml de caseína (KCl/NaOH 50 mM, pH 12.5), y 0.4 mg (p/s) de mCLEAs de Neutrase[®]/ml de mezcla de incubación a 5 mg/ml de caseína (Tris/HCl 50 mM, pH 7.5).

Tabla 2.7: Tampones y pH empleados para determinar el pH óptimo de actividad para mCLEAs de Neutrase[®] y Alcalase[®]. La concentración del tampón era 50 mM en todos los casos.

Alcalase [®]		Neutrase [®]	
	9.5		7.0
	9.65		7.5
Carbonato-Bicarbonato sódico	10.0	Tris/HCl	8.0
	10.5		8.5
	10.8		9.0
KCl/NaOH	12.0	Carbonato-Bicarbonato sódico	10.0
	12.4		
	12.75		

2.8.2.3 Selección de la cantidad de mCLEAs

Se determinó la cantidad de mCLEAs de Alcalase[®] y Neutrase[®] óptima para hidrolizar caseína a 10 mg/ml y 5 mg/ml, respectivamente. Con las mCLEAs de Alcalase[®] se empleó caseína en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH

12.5, empleándose entre 0.1 y 0.6 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. Las mCLEAs de Neutrase[®] se añadieron a caseína en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 7.5 en un intervalo de 0.2 a 0.5 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación. Ambas reacciones se incubaron a 55°C entre 10 y 60 minutos.

2.8.2.4 Selección del tipo de agitación

Se incubaron mCLEAs de Alcalase[®] (0.3 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación) con caseína (10 mg/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM) a pH 12.5 y de Neutrase[®] (0.4 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación) con caseína (5 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM) a pH 7.5 a 55°C durante 20 minutos o 1 hora, respectivamente. Se emplearon dos tipos de incubación: agitación en un brazo giratorio a 35 rpm (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) y mecánica con un imán (reactor Radleys).

2.8.3 Hidrólisis de proteína del extracto soluble de microalgas empleando Alcalase[®] y Neutrase[®] solubles

El extracto soluble de microalgas empleado se obtuvo por prensado del cultivo de microalgas frescas a una concentración de 20 mg (p/s)/ml, en el tampón seleccionado, mediante la prensa de French y posteriormente centrifugado a 7000 rpm a 10°C (AllegraTM X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) para emplear la proteína soluble presente en el sobrenadante. Las reacciones se incubaron a la temperatura indicada en cada caso (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu (1927) (Apartado 2.4.2.2) y mediante SDS-PAGE (Apartado 2.4.2.3).

2.8.3.1 Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad enzimática se empleó una fase soluble del extracto de microalgas prensadas en tampón KCl/NaOH (50 mM) para la Alcalase[®] y pH entre 12.4 y 12.8 y tampón Tris /HCl (50 mM) pH 7.0 - 8.5 para la Neutrased[®]. Se añadieron de Alcalase[®] 0.5 µl de E/mg (p/s) de microalga y de Neutrased[®] 1 µl de E/mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron a 37 y 55°C, respectivamente, durante 1 hora.

2.8.3.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se añadieron 50 nl de E/mg (p/s) de microalga de Alcalase[®] al extracto soluble de microalgas en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7, y por otro lado 1 µl de E/mg (p/s) de microalga de Neutrased[®] en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 8.0. Las reacciones transcurrieron de 30 - 40°C para la Alcalase[®] y de 35 - 50°C para la Neutrased[®] durante 1 hora.

2.8.3.3 Determinación de la cantidad óptima de enzima

Se añadieron 1, 2, 3 y 5 nl de E/mg (p/s) de microalga de Alcalase[®] a 20 mg (p/s)/ml del extracto soluble de microalgas prensado en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7 y se incubó la reacción a 35°C durante 1 hora. De Neutrased[®], se añadieron 1, 2 y 4 µl de E/mg (p/s) de microalga a 20 mg (p/s)/ml del extracto soluble de microalgas prensado en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 8.0 y se incubó a 40°C durante 5 horas.

2.8.4 Hidrólisis de proteínas solubles del extracto de microalgas empleando mCLEAs

Para la hidrólisis con mCLEAs se empleó extracto soluble de biomasa microalgal prensada (20 mg (p/s)/ml) en el tampón de interés y posteriormente centrifugado a 7000 rpm y 10°C (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) para emplear la proteína soluble presente en el sobrenadante. Las reacciones se incubaron a la temperatura indicada en cada caso (Climo-Shaker ISF1X, Khuner) con agitación rotatoria a 35 rpm en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI). Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu (1927) (Apartado 2.4.2.2) y mediante SDS-PAGE (Apartado 2.4.2.3).

2.8.4.1 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se añadieron 0.57 mg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) de microalga en ambos casos. Para la Alcalase® se empleó extracto soluble de microalgas prensado en tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.7 y para la Neutrase® en tampón Tris/HCl (50 mM) pH 8.0. Las reacciones se llevaron a cabo entre 37 y 55°C durante 24 horas.

2.8.4.2 Determinación del pH óptimo de actividad

Se emplearon 1.14 mg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) de microalga tanto para la Alcalase® como para la Neutrase®. En el caso de la Alcalase® se empleó tampón carbonato-bicarbonato sódico (50 mM) pH 10.0 y 10.8, tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.0 y 12.7. Para la Neutrase® se empleó tampón Tris/HCl (50 mM) pH 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5. Las reacciones se incubaron a 50°C para la Alcalase® y 45°C para la Neutrase® durante 24 horas.

2.9 Deslipidación de las microalgas

Se estudió el efecto de la deslipidación de las microalgas en la estabilidad de los demás productos de interés, proteínas y carbohidratos.

2.9.1 Proceso de deslipidación

Los procesos de deslipidación empleados se realizaron según Picó *et al.* (2018), con pequeñas modificaciones, ajustándolos a escala de laboratorio. En ambos procesos la biomasa de *C. vulgaris* se cosechó por centrifugación a 9000 rpm durante 5 minutos a 5°C (Kubota 7820) y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en la mezcla de deslipidización adecuada.

2.9.1.1 Extracción en matraz agitado

La biomasa de *C. vulgaris* resuspendida en cloroformo:metanol (2:1, v/v) se calentó durante 30 minutos a 72°C con agitación magnética (reactor Radleys). Se utilizó una proporción de 75 mg (p/s) de muestra por ml de disolvente binario. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 7000 rpm y 5°C (AllegraTM X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) y se decantó la mezcla de disolvente. Se dejaron evaporar los restos de disolvente, y el sedimento se sometió a un segundo proceso de extracción en las mismas condiciones.

2.9.1.2 Extracción por saponificación

Empleando el método de saponificación de Grima *et al.* (1994) y las modificaciones realizadas por Picó *et al.* (2018), se extrajeron los ácidos grasos libres (FFAs) de *C. vulgaris*. La biomasa de *C. vulgaris* se saponificó a 65°C con etanol (96%) en presencia de KOH (30 ml de etanol y 0.2 g de KOH por g de biomasa) con agitación magnética (Reactor Radleys) durante 3 horas. La

mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm y 5°C (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter), y se decantó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con hexano (50 ml cada vez) para extraer la fracción insaponificable. Una vez eliminado el hexano, se lavó el sedimento con agua destilada (50 ml) y se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm y 5°C (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter). Finalmente, las células deslipidizadas se resuspendieron en el tampón de interés a una concentración de 20 mg/ml.

2.9.2 Análisis de los compuestos de interés

2.9.2.1 Lípidos

Se concentraron 2 ml de muestra de la fracción saponificable (Thermo Savant SPD 110V SpeedVac, con trampa refrigeradora) hasta un volumen final de 0.5 ml, y más tarde 2 ml de cada extracción con hexano hasta 0.5 ml mediante evaporación por temperatura (60°C). Las muestras (10 µl) se analizaron por TLC (Cromatografía en capa delgada) en placas de 20 cm x 20 cm (TLC Silica gel 60, Merck), activadas previamente durante 30 minutos a 100°C, empleando como patrones aceite de oliva virgen extra (Carbonell®) (0.5 µl), ácido palmítico (10 µl), ácido mirístico (10 µl), ácido esteárico (10 µl) y ácido oleico (10 µl). La fase móvil fue hexano:acetato de etilo:ácido acético (90:10:1, v/v/v) (Samukawa *et al.*, 2000). Tras 40 minutos de separación, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Después, se tiñeron por inmersión durante 1 minuto en Coomassie Blue R-350 al 0.02% (p/v) en metanol:ácido acético:DW (3:1:6, v/v/v).

2.9.2.2 Polisacáridos y proteínas

Se emplearon células deslipidizadas por saponificación y células sin deslipidizar que se prensaron durante 5 ciclos a 1250 psi (French® Pressure cell press SIM AMINCO, SLM INSTRUMENT INC) a una concentración de 20 mg (p/s)/ml en el tampón adecuado, tampón ácido acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) para determinación de azúcares totales y tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0) para determinación de proteínas. En ambos casos se analizó el lavado con agua realizado antes de resuspender las células en tampón.

Los polisacáridos se analizaron como azúcares totales mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951) (Apartado 2.4.1.1).

Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 4-20% (Mini-PROTEAN TGX; Stain-Free gels) (Apartado 2.4.2.3).

2.9.3 Hidrólisis de polisacáridos

Una vez deslipidizadas y prensadas las células, se comprobó la actividad de las glucosidasas comerciales, α -amilasa y glucoamilasa, de forma soluble y en forma de mCLEAs de glucoamilasa. Como controles se emplearon células prensadas sin deslipidizar. En todos los casos, se empleó como sustrato homogeneizado de microalgas (20 mg/ml (p/s)) deslipidizadas o sin deslipidizar en tampón ácido acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las muestras se analizaron por el método del DNS (Miller, 1959) (Apartado 2.4.1.2).

2.9.3.1 Glucosidasas solubles

Se añadieron 4.5 nl de α -amilasa/mg de microalga (p/s) o 2 nl de glucoamilasa /mg microalga (p/s). Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria durante 1 hora a 40°C para la α -amilasa y 45°C para la glucoamilasa.

2.9.3.2 mCLEAs de glucoamilasa

Se añadieron 25 μ g (p/s) de mCLEAs/mg de microalga (p/s). Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria durante 30 horas a 50°C.

Capítulo II

Obtención de las mCLEAs

3.1 Introducción

El término “Nanotecnología” como “el procesamiento de la separación, la consolidación, y deformación de materiales por un átomo o por una molécula” fue introducido por Norio Taniguchi en 1974 (Taniguchi, 1974). Previamente fue Richard Feynman quien en 1959 introdujo la idea de poder “construir cosas pequeñas”. La nanotecnología es un campo de investigación multidisciplinar con aplicaciones emergentes en varias áreas, como materiales, física, química, ingeniería y medicina (Nunes *et al.*, 2019).

Las partículas generadas a nanoescala (1-100 nm) (Figura 3.1), presentan propiedades únicas (ópticas, magnéticas, eléctricas...) debido a su gran área de superficie específica, su alta energía superficial y su confinamiento cuántico (Hussain *et al.*, 2016). Estas exclusivas propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales encuentran infinitas aplicaciones en medicina, cosméticos, electrónica, industria alimentaria e industria química (Pal *et al.*, 2019).

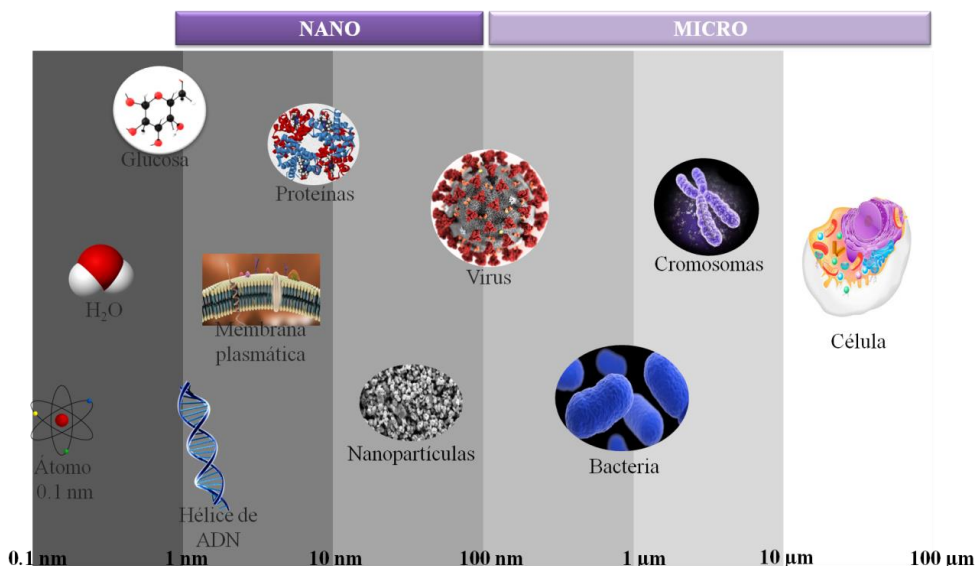


Figura 3.1: Diferentes objetos y su tamaño. Los objetos que se encuentran entre 0.1 y 100 nm son con los que trabaja habitualmente la nanotecnología.

3.1.1 Las nanopartículas

Las nanopartículas se pueden definir como partículas cuyo tamaño se encuentra entre 1 y 100 nm, y están formadas, generalmente, por carbono, metales, óxidos metálicos o materia orgánica (Hasan, 2015). Como se ha mencionado anteriormente, el tamaño nano de estas partículas les proporciona características únicas en comparación con sus partículas respectivas de mayor tamaño. Estos fenómenos se deben, principalmente, a que las partículas presentan un área superficial relativamente grande para su volumen, un aumento en la reactividad o estabilidad en los procesos químicos, y una resistencia mejorada, entre otros (Anu y Saravanakumar, 2017). No existe una única clasificación para las nanopartículas. De hecho, se pueden clasificar atendiendo a las dimensiones que presentan, su tamaño, su forma o el material del que están compuestas (Cho *et al.*, 2013).

Las nanopartículas magnéticas generalmente se clasifican según su respuesta magnética a un campo magnético externo. De acuerdo con esto, las nanopartículas pueden clasificarse como partículas ferrimagnéticas, ferromagnéticas o superparamagnéticas (Jeong *et al.*, 2007; Kolhatkar *et al.*, 2013).

Los materiales ferromagnéticos (como Fe, Ni y Co) presentan dominios con un gran número de átomos con momentos magnéticos paralelos. Es decir, cada dominio tiene un momento magnético neto que apunta en una dirección específica, por lo que el momento magnético neto del material es nulo (Issa *et al.*, 2013). Al aplicarse un campo magnético externo, los dominios del material ferromagnético se alinean a lo largo de la dirección del campo magnético aplicado, lo que resulta en un gran momento magnético neto. Después de eliminar el campo externo, queda un momento magnético residual (Buzea y Pacheco 2017) (Figura 3.2).

Los materiales ferrimagnéticos (magnetita- Fe_3O_4) contienen varios tipos de átomos que ocupan diferentes sitios reticulares con momentos magnéticos antiparalelos, pero con diferentes magnitudes. De esta forma los momentos magnéticos no se anulan, resultando en un momento magnético neto espontáneo. Cuando se aplica un campo magnético externo, estos materiales se comportan del mismo modo que los ferromagnéticos (Buzea y Pacheco 2017) (Figura 3.2).

El superparamagnetismo es una consecuencia única de los nanomateriales magnéticos. Se observa, solamente, cuando el tamaño y el número de dominios son suficientemente pequeños (partículas entre 10 y 150 nm de diámetro) (Clemons et al., 2018). Estas partículas, en ausencia de un campo magnético externo, muestran un momento magnético promedio nulo, y en presencia de un imán se aumentan los momentos magnéticos (Buzea y Pacheco 2017) (Figura 3.2).

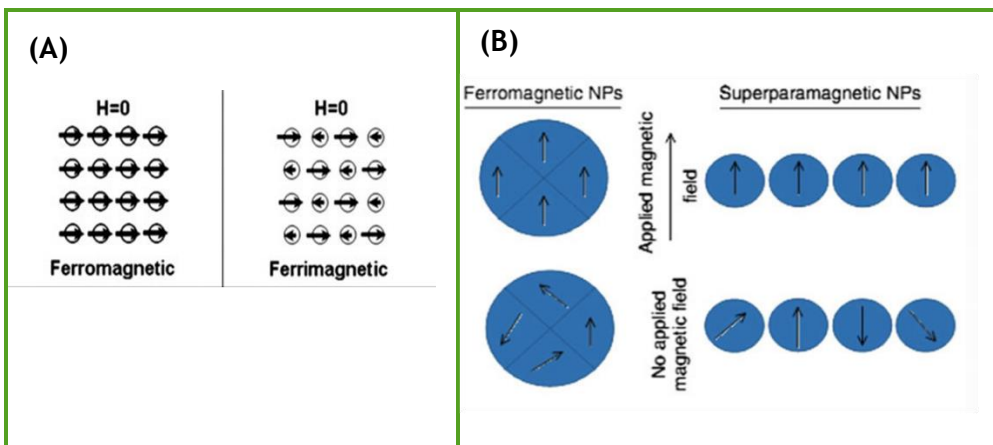


Figura 3.2: (A) Comportamiento de los dipolos magnéticos de partículas ferromagnéticas y ferrimagnéticas sometidas a un campo magnético externo (Jeong *et al.*, 2007), (B) magnetización de partículas ferromagnéticas y superparamagnéticas sometidas a un campo magnético externo (Akbarzadeh *et al.*, 2012).

La Figura 3.2 B, muestra un claro ejemplo de las diferencias entre los comportamientos ferromagnético y superparamagnetismo. En el primer, caso al aplicar un campo magnético externo se produce la alineación de los dominios con el campo y, en consecuencia, la magnetización irreversible de la partícula denominada histéresis. Por otro lado, en las partículas superparamagnéticas al retirar el campo magnético se produce una rápida inversión del momento magnético, lo que provoca que su magnetización residual sea cercana a cero (Kolhatkar *et al.*, 2013). De esta forma, la medición de los ciclos de histéresis permite medir las características magnéticas.

Para realizar estas mediciones se aplica un campo (H) hasta que todos los spines están orientados, o lo que es lo mismo, hasta alcanzar la saturación magnética (M_S). Se obtiene así, una pendiente inicial que representa la permeabilidad magnética del material. Al disminuir el campo eterno el material alcanza un campo nulo en el que se mantiene un magnetismo residual o remanencia (M_R). Cuanto más ferromagnético sea el material mayor será M_R . Posteriormente, se aplica un campo magnético opuesto, denominado campo coercitivo (coercitividad, H_C), que permite anular el magnetismo remanente. En esta ocasión los espines se orientan en sentido contrario hasta alcanzar, nuevamente, la saturación. El ciclo se reinicia al aumentar nuevamente el campo (Cruz-Izquierdo, 2013) (Figura 3.3).

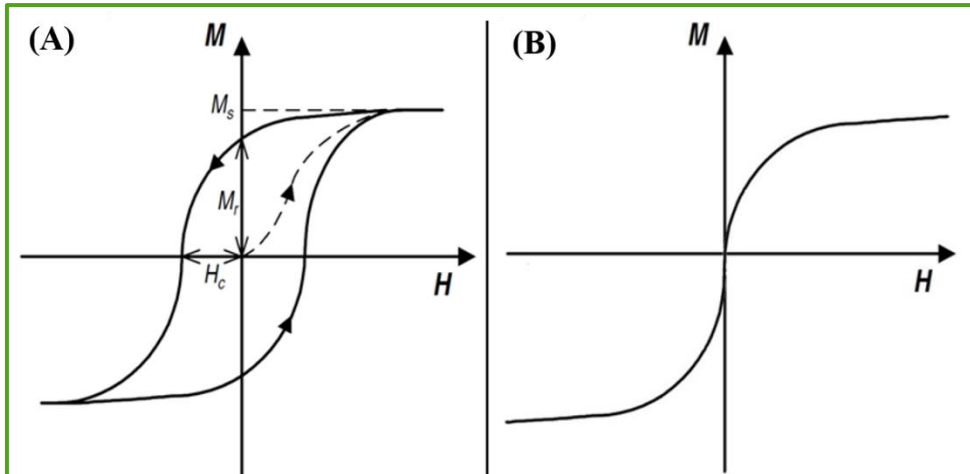


Figura 3.3: Curvas de histéresis. (A) Compuesto ferromagnético. La línea discontinua muestra la pendiente del primer ciclo. (B) Compuesto superparamagnético donde M_r y H_c son prácticamente nulas. (Picó, 2017).

En este trabajo se han obtenido nanopartículas de magnetita que presentan superparamagnetismo.

3.1.2 Síntesis de MNPs

Son varios los métodos empleados para la síntesis de nanopartículas. Pueden emplearse métodos físicos, químicos, biológicos o varios de ellos en conjunto. Además, según la forma en la que han sido sintetizadas, las nanopartículas muestran propiedades específicas (Villegas *et al.*, 2019).

En este trabajo, la síntesis de las nanopartículas se realizó mediante coprecipitación química de sales de hierro (Massart, 1981). Debido a su sencillez, es uno de los métodos más empleados para sintetizar nanopartículas de magnetita (Biehl *et al.*, 2018).

3.1.2.1 Coprecipitación química

La coprecipitación es un método que permite sintetizar nanopartículas mediante reacciones en condiciones suaves, los productos que se emplean son económicos y no requieren de un equipo especializado. Además, es un proceso escalable. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, presenta una desventaja importante, el deficiente control de la distribución de tamaños, produciéndose nanopartículas de entre 4 y 20 nm (Clemons *et al.*, 2018). Una agitación enérgica y el aumento de la velocidad de adición de los reactivos (Răcuciu, 2009), así como, el empleo de un ambiente no oxidante, mediante burbujeo del medio con N₂ para desplazar el oxígeno (Maity y Agrawal, 2007), permite una disminución del tamaño medio de las nanopartículas.

3.1.2.2 Funcionalización de las MNPs

La funcionalización de las nanopartículas ofrece distintas ventajas, como evitar la aglomeración de las mismas (Kickelbick y Schubert, 2003; Grancharov *et al.*, 2005), mejorar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas (Moon *et al.*, 2005) y conjugarlas con moléculas de interés mediante enlaces secundarios (Thiruppathi *et al.*, 2017).

Uno de los métodos más empleados para funcionalizar las MNPs es el uso de los oligosilanos (APTS), comúnmente utilizados como agentes enlazantes entre el soporte y la partícula de interés (Kuzminska *et al.*, 2015). Los oligosilanos son moléculas bifuncionales que reaccionan con los grupos –OH superficiales de las MNPs sustituyéndolos por grupos -NH₂ (Wang *et al.*, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, la funcionalización evita la agregación de las MNPs. Este tipo de interacción de una dispersión magnética con el medio se mide a través del potencial Zeta (ξ). Cuando el valor es

elevado, tanto negativa como positivamente, indica que la suspensión de MNPs es estable y su agregación menor (Goodarzi *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2003; Ravi Kumar *et al.*, 2004).

3.1.3 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de un enzima es su confinamiento a una fase (matriz / soporte) diferente de la de los sustratos y productos (Datta *et al.*, 2013). La selección del tipo de soporte y del método de inmovilización a emplear es determinante según el uso y la aplicación prevista (Hassan *et al.*, 2016).

Los principales métodos de inmovilización de enzimas son: adsorción, unión covalente, atrapamiento e inclusión en membranas, y entrecruzamiento.

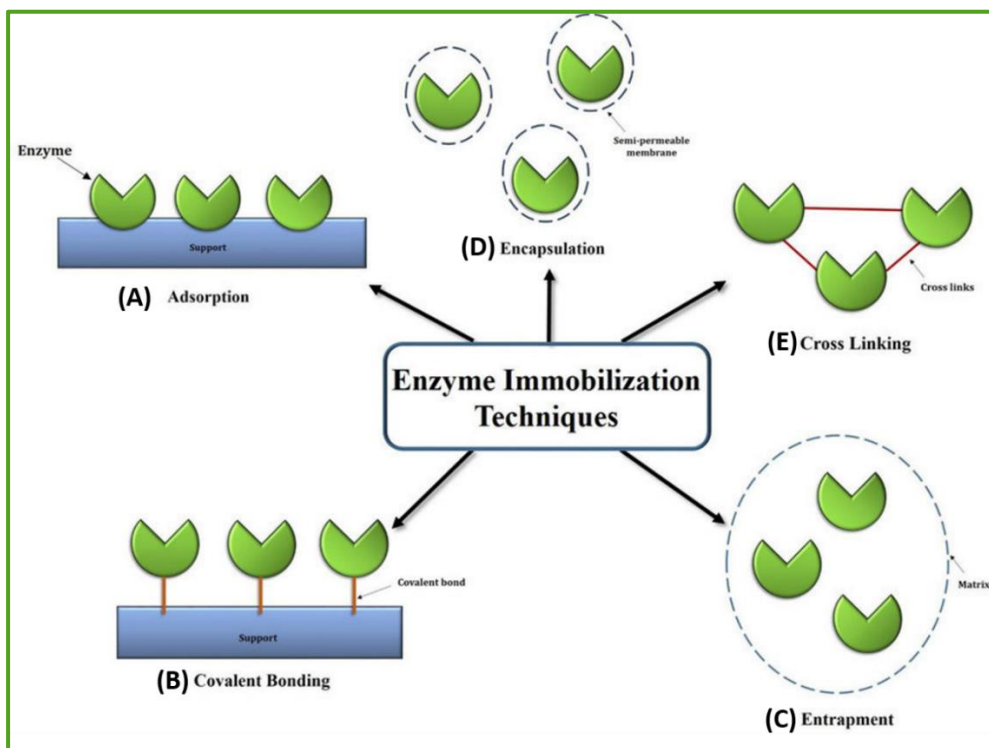


Figura 3.4: Inmovilización de enzimas. (A) Adsorción. (B) Unión covalente. (C) Atrapamiento. (D) Inclusión en membranas. (E) Entrecruzamiento. (Raman *et al.*, 2008).

3.1.3.1 Adsorción

La adsorción (Figura 3.4A) es uno de los métodos de inmovilización más sencillos y permite la interacción reversible entre el soporte y el enzima (Wahba y Hassan, 2015). Se forman interacciones débiles principalmente electrostáticas, por ejemplo, fuerzas de Van der Waals, interacciones de enlaces iónicos o puentes de hidrógeno, aunque los enlaces hidrófobos pueden ser significativos. Aunque estas fuerzas son muy débiles, son lo suficientemente grandes como para permitir una unión estable. Este método apenas causa daños en el enzima, pero éste puede liberarse fácilmente del soporte (Hassan *et al.*, 2016).

3.1.3.2 Unión covalente

La unión covalente (Figura 3.4A) consiste en la formación de enlaces covalentes (enlace fuerte), irreversibles, entre los grupos funcionales del soporte y los del enzima (Porath y Axen, 1976; Toher *et al.*, 1990). Estos grupos funcionales en la superficie del enzima, pueden ser grupos amino (-NH₂) de arginina o lisina, grupo carboxílico (-COOH) de ácido glutámico o ácido aspártico, grupo hidroxilo (-OH) de treonina o serina, o grupo sulfhidrilo (-SH) de cisteína. Los soportes más empleados son los hidrofílicos como la celulosa, el almidón, dextranos (Sephadex) y la agarosa (Sepharosa). Los residuos de los azúcares de estos polímeros contienen grupos hidroxilos encargados de formar enlaces covalentes con el enzima (Gemeiner, 1992).

La inmovilización del enzima al soporte se realiza en dos pasos. Primero, se activan los grupos funcionales del soporte, empleando un reactivo específico y, después, se agrega el enzima para formar los enlaces covalentes (Hassan *et al.*, 2016).

3.1.3.3 Atrapamiento e inclusión en membranas

En la inmovilización por atrapamiento (Figura 3.4B) el enzima queda encapsulado dentro de una matriz polimérica que permite el paso de los sustratos y productos, pero no del enzima. Por otro lado, en la encapsulación (Figura 3.4C) el enzima queda retenido dentro de un gel polimérico, a través del cual las moléculas pequeñas pueden difundir. Comparado con la adsorción, este método permite una inmovilización más estable del enzima, pero presenta problemas de difusión de la materia a través de la matriz (Sankaran *et al.*, 2016).

3.1.3.4 Entrecruzamiento (Cross-Linking)

En este método de inmovilización no se emplea soporte (Figura 3.4D). Se realiza uniendo el enzima entre sí creando una gran y compleja estructura tridimensional. Generalmente, se insolubiliza el enzima, empleando agentes como sales o disolventes orgánicos y, posteriormente, se entrecruza empleando reactivos bifuncionales, como el glutaraldehído. Estos agregados reciben el nombre de CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates). El entrecruzamiento puede provocar cambios conformacionales en el enzima o la destrucción parcial de su centro activo, disminuyendo su actividad. Por otro lado, debido a las fuertes fuerzas de unión, el enzima no se puede soltar (Hassan *et al.*, 2016; Sankaran *et al.*, 2016).

Actualmente, se está empleando la nanobiotecnología para la inmovilización de enzimas. De esta forma, empleando MNPs y entrecruzamiento se generan biocatalizadores muy estables y de fácil recuperación. Estos nanobiocatalizadores magnéticos se denominan mCLEAs.

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Caracterización morfológica de las MNPs

Mediante difractogramas de rayos X (DRX), se demostró que la magnetita Fe_3O_4 ($\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$) es la única fase presente en las MNPs que cristaliza en el sistema cúbico (Figura 3.5).

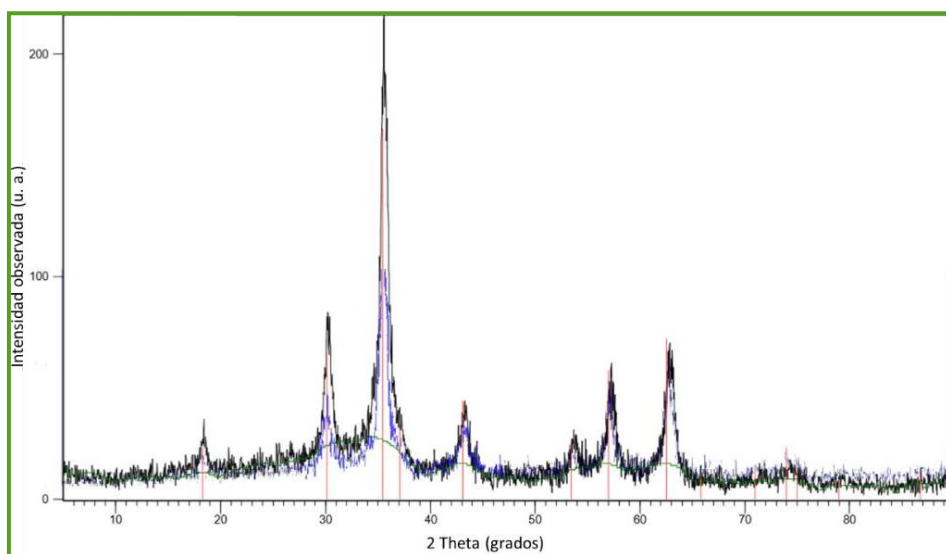


Figura 3.5: Difractograma con rendija automática (ADS) de las MNPs. Se estudiaron las MNP-OH (negro) y las MNP-NH₂ (azul) y se estudiaron los máximos de difracción de la magnetita (rojo).

La anchura a media altura de los máximos de difracción permitió calcular el tamaño del cristalito (Ángstrom, Å) (Tabla 3.1) empleando la ecuación de Scherrer que relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción con el tamaño del cristalito. El ensanchamiento neto del pico de difracción se calculó mediante la aproximación de Warren y la de Scherrer.

Tabla 3.1: Tamaño medio del cristalito de las MNPs. El tamaño en Ångstroms (Å) se calculó mediante el ensanchamiento de Warren y el de Scherrer.

	Tamaño MNPs (Å)	
	Ensanchamiento de Warren	Ensanchamiento de Scherrer
MNP-OH	93 Å	103 Å
MNP-NH₂	82 Å	89 Å

Se observó que las diferencias entre el tamaño de las muestras no eran significativas, por lo que se determinó en 100 Å (10 nm) el tamaño medio del cristalito.

Empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM) se comprobó que la forma de las MNPs es más o menos esférica y que su tamaño medio corresponde al obtenido mediante DRX, esto es 10 nm. Se pudo también observar, que las MNPs tienden a formar agregados de unos 80 nm, provocado por las diversas interacciones que actúan entre ellas (Figura 3.6).

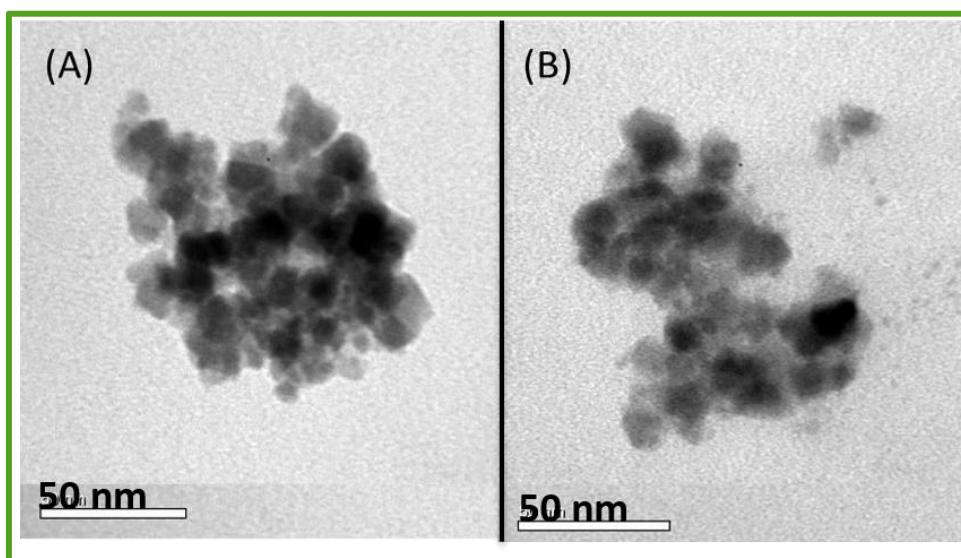


Figura 3.6: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las MNPs (x400000). (A) MNP-OH. (B) MNP-NH₂.

Se comprobaron estos resultados empleando DLS (Dynamic Light Scattering). Esta técnica analiza los agregados formados y su tamaño. Los resultados (Tabla 3.2) mostraron agregados de tamaños superiores a los 80 nm observados por TEM.

Tabla 3.2: Tamaño medio de las MNPs determinado por DLS. El tamaño se representa en nm y SD corresponde a la desviación estándar.

	Tamaño (nm)	SD
MNP-OH	81.23	± 19
MNP-NH ₂	112.03	± 20

3.2.2 Caracterización magnética de las MNPs

Se realizaron sucesivos ciclos de histéresis de las MNPs demostrándose el comportamiento superparamagnético de las mismas (Figura 3.7).

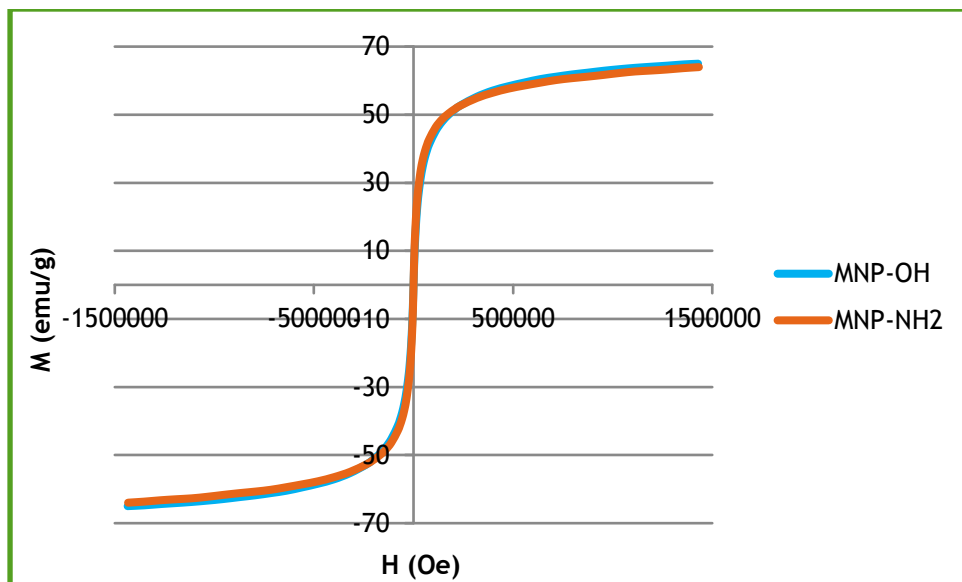


Figura 3.7: Curvas de histéresis de las MNP-OH y MNP-NH₂. Los ciclos de histéresis se realizaron a 20°C. (H) Fuerza del campo magnético medida en Oersted (Oe). (M) Magnetización media medida en unidades electromagnéticas por gramo (emu/g).

Mediante el análisis de los ciclos de histéresis se obtuvieron los parámetros cinéticos siguientes (Tabla 3.3): saturación magnética (M_S), coercitividad (H_C), remanencia (M_R) y el diámetro promedio (D) en nm.

Tabla 3.3: Parámetros magnéticos de las MNPs.

	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)	D (nm)
MNP-OH	83.3	0.7	8.6	6.7-8.5
MNP-NH₂	60.1	0.2	4.4	7.7-9.1

Se puede concluir, que el componente mayoritario de las MNPs es magnetita. Ya que cuando la magnetita es el componente mayoritario, la saturación magnética (M_S) a temperatura ambiente es 89 emu/g. En nuestro caso es 83.3 emu/g. Pero esta pequeña diferencia puede deberse a las diferencias existentes entre la magnetita macroscópica y la nanoscópica (Maity y Agrawal, 2007; Cruz-Izquierdo *et al.*, 2014). Por otro lado, en el caso de las MNP-NH₂ el valor de M_S es de 60.1 debido a la presencia de APTS en su superficie, que le proporciona mayor cantidad de materia orgánica alrededor de la magnetita.

Los valores próximos a cero de H_C y M_R demuestran el carácter superparamagnético de las MNPs analizadas.

Finalmente, empleando la ecuación de Langevin a partir de los datos obtenidos en los ciclos de histéresis, se obtuvieron los tamaños medios del diámetro de las MNPs. En ambos casos los resultados obtenidos son próximos a 10 nm, tal como se obtenía en la caracterización morfológica (Figura 3.8).

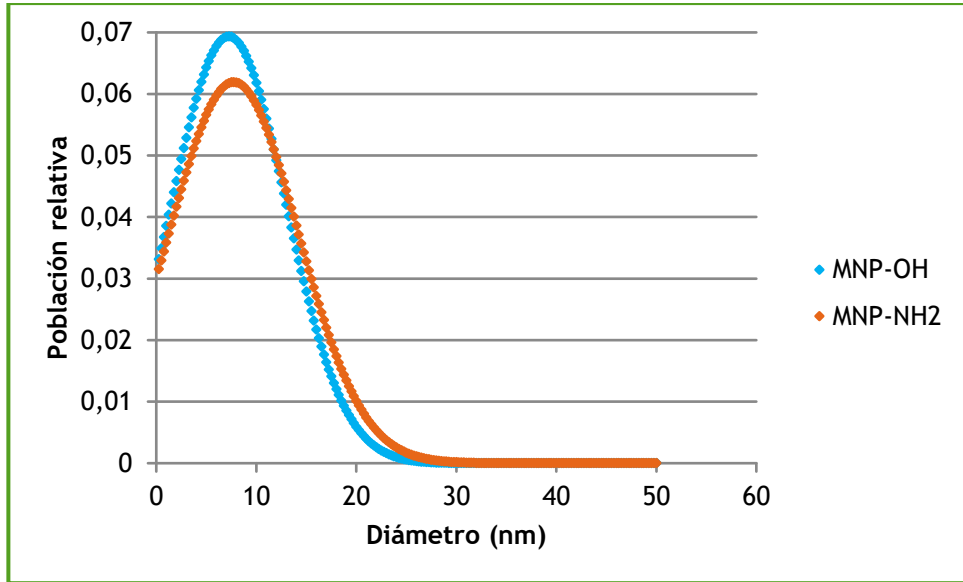


Figura 3.8: Dispersión de los tamaños de las MNPs.

Como se observa en la Figura 3.8, existe una elevada desviación en la distribución del tamaño de las MNPs, aunque la gran mayoría se encuentran en torno a los 10 nm de diámetro. Como se ha mencionado anteriormente, el método empleado para la síntesis de las MNPs es la coprecipitación química, cuya desventaja es el deficiente control en la distribución de tamaños. A pesar de esta dispersión en los tamaños, en todos los casos siguen estando dentro de los límites del superparamagnetismo.

3.2.3 Estabilidad de las MNPs

La estabilidad de las MNPs presente en un coloide se analizó mediante el potencial Zeta (ξ) (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Análisis del potencial Zeta (ξ) de las MNPs. Las unidades del potencial Zeta están dadas en mV y SE corresponde al error estándar.

	Potencial Zeta (mV)	SE
MNP-OH	+12.6	± 1.35
MNP-NH₂	+14.8	± 0.32

Como se observa en la Tabla 3.4, las MNPs presentan carga neta positiva a pH 7. Los valores del potencial Zeta cercanos a ± 15 sugieren que estas MNPs se encuentran en la región umbral entre la estabilidad y la agregación (Clogston y Patri, 2011), aunque las MNP-OH tienden más a la agregación que las MNP-NH₂. Demostrándose que la funcionalización de las MNPs presenta como ventaja el evitar la agregación entre ellas mismas (Kickelbick y Schubert, 2003; Grancharov *et al.*, 2005).

Finalmente, se puede deducir, como se demuestra en los análisis realizados tanto por TEM como por DLS, que las MNPs presentan cierta tendencia a agregarse obteniéndose, así, los agregados de 80 nm mencionados anteriormente. Esta agregación podría deberse tanto a interacciones no magnéticas (Goodarazi *et al.*, 2003) que presentan las MNPs, como al magnetismo residual (MR) que, aunque cercano a cero, es suficiente para favorecerla.

3.2.4 Síntesis de las mCLEAs

La inmovilización en mCLEAs de las glucosidasas (α -amilasa y glucoamilasa) y de las proteasas (Alcalase[®] y Neutrase[®]), se realizó según Cruz-Izquierdo *et al.* (2014).

La actividad de los enzimas, bien sean solubles o como mCLEAs, se midió empleando sustratos modelo (almidón o caseína) y mediante cuantificación del producto obtenido, azúcares reductores o compuestos fenólicos liberados.

Los resultados obtenidos se presentan en los Capítulos IV y V.

Capítulo IV

Cultivo y Cosecha de las Microalgas

4.1 Introducción

Actualmente, se considera a las microalgas como una alternativa viable a los combustibles fósiles, aunque aún existen numerosos obstáculos en el proceso de biorrefinería para que éste sea posible económicamente. Además de obtener productos de valor añadido, se están estudiando otros factores para abaratar el proceso, como pueden ser el método de cosecha o el de ruptura celular.

4.1.1 Cosecha de las microalgas

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta en el proceso de biorrefinería de microalgas, es el método de cosecha celular, ya que este supone el 30% de la inversión económica del proceso (Jankowska *et al.*, 2017) (Milledge y Heaven, 2013). La cosecha de microalgas presenta, principalmente, tres tipos de dificultades (Wang *et al.*, 2015): la baja concentración de biomasa en los cultivos (0.5 g/l) (Grima *et al.*, 2003), el pequeño tamaño de las microalgas (entre 2 y 20 μm) que dificulta el empleo de técnicas de cosecha como la filtración (Gultom y Hu, 2013) y la carga electronegativa de la superficie celular que evita la formación de agregados haciendo que permanezcan de forma estable en suspensión (Amaro *et al.*, 2011).

Actualmente se emplean varios métodos para la cosecha de las microalgas (Mathimani y Mallick, 2018):

- Físicos: centrifugación, sedimentación por gravedad, filtración y flotación
- Químicos: floculación inorgánica y floculación orgánica
- Biológicos: autofloculación y biofloculación

- Magnéticos: separación magnética

4.1.1.1 Métodos físicos

4.1.1.1.1 Centrifugación

La centrifugación permite separar dos partículas miscibles, según su densidad, mediante la fuerza centrífuga. Se han estudiado varios tipos de centrifugación con distintas eficiencias en la cosecha microalgal, pero, tradicionalmente, las centrífugas tubulares o las multi-cámara han sido las más empleadas. Pero, a pesar de la alta eficiencia de cosecha, la centrifugación requiere, aproximadamente, 1 MJ kg^{-1} de energía para la cosecha de las microalgas, valores energéticos mayores que los empleados en la cosecha de madera ($0.7 - 0.9 \text{ MJ kg}^{-1}$) (Sawayama *et al.*, 1999).

4.1.1.1.2 Sedimentación por gravedad

La sedimentación por gravedad es un método de separación sólido-liquido empleando la fuerza de la gravedad hasta que las células sedimenten. Según los estudios de Choi *et al.* (2006) y Nurdogan y Oswald (1996) sobre 30 tipos distintos de microalgas, la sedimentación por gravedad no es un método adecuado para la recolección de microalgas de pequeño tamaño.

4.1.1.1.3 Filtración

La filtración es un proceso de separación en el que se emplea una membrana o filtro poroso por el que se hace pasar una suspensión de microalgas. El agua pasaría a través del filtro y las microalgas quedarían retenidas en él. Existen numerosas técnicas de filtración en función del tamaño del poro empleado: macrofiltración ($10 \mu\text{m}$), microfiltración ($0.1 - 10 \mu\text{m}$),

ultrafiltración (0.02- 0.2 μm) y ósmosis inversa (0.001 μm), entre otras (Milledge y Heaven, 2013). Aunque todas estas técnicas son efectivas, ninguna es adecuada para la filtración de microalgas debido a la rápida obstrucción de los filtros y el bajo rendimiento de cosecha (Mohn, 1988).

4.1.1.1.4 Flotación

La flotación es el proceso inverso a la sedimentación. En este caso se emplea un burbujeo de aire o gas para mantener las microalgas en suspensión. Debido al poco espacio y tiempo que requiere el proceso, la flotación ha sido reconocida como un método prometedor para la separación de *Chlorella vulgaris* (Liu *et al.*, 1999). Pero a pesar de su eficacia, la energía necesaria para realizarlo a gran escala no es rentable económicamente (Milledge y Heaven, 2013).

4.1.1.2 Métodos químicos (floculación)

En la cosecha por floculación, la agregación de las células del cultivo se produce empleando un floculante o coagulante, que puede ser orgánico o inorgánico. Este método presenta varios inconvenientes que lo descartan como método adecuado de cosecha. Uno de los floculantes empleados son las sales metálicas, que son dependientes de pH y, además, pueden deteriorar la biomasa y contaminar los productos finales (Chen *et al.*, 2011). Por otro lado, un floculante puede ser adecuado para un tipo de microalga, pero no para otro. Y, finalmente, los floculantes inorgánicos no coagulan bien las algas crecidas en agua de mar, ya que tienden a contraerse cuando la fuerza iónica es alta (Vandamme *et al.*, 2013)

4.1.1.3 Métodos biológicos (floculación)

La floculación biológica puede realizarse por autofloculación o por biofloculación. La autofloculación ocurre espontáneamente modificando las condiciones del medio que provocan la agregación de las células (Pragya *et al.*, 2013). Sin embargo, en la biofloculación se provoca la secreción de polímeros por las microalgas, que actuaran como floculantes (Christenson y Sims, 2011). Pero a pesar de ser un método ecológico y de bajo coste energético, el tiempo necesario es muy grande (Schenk *et al.*, 2008) y no se ha podido realizar con éxito a gran escala (Lee *et al.*, 2009).

4.1.1.4 Métodos magnéticos: separación magnética

En los últimos años se ha prestado especial atención a la cosecha de microalgas empleando nanopartículas magnéticas (MNPs), ya que permiten ahorrar tiempo y son fáciles de sintetizar y reutilizar (Hu *et al.*, 2013; Prochazkova *et al.*, 2013). Los factores más interesantes de las MNPs son su biocompatibilidad, su capacidad de adherirse a la superficie de las microalgas y su fácil extracción del medio empleando un imán (Schwertmann y Cornell, 2007; Prochazkova *et al.*, 2012).

La adsorción de microalgas a las nanopartículas se produce por una atracción electrostática provocada por las cargas negativas presentes en la superficie de las microalgas y las positivas que presentan las nanopartículas. Por lo tanto, la eficiencia de la adsorción está influida por el pH al que se realiza (Xu *et al.*, 2011). En función del tipo de microalga empleada se han observado distintos efectos del pH. Según Xu *et al.* (2011) empleando *Bortryococcus braunii* el porcentaje de adsorción disminuye con el aumento del pH. Empleando *Chlorella ellipsoidea* la mayor eficiencia en la adsorción se obtiene a pH neutro, disminuyendo tanto a pH ácidos como básicos. Por otro

lado, Hu *et al.* (2013) empleando *Nannochloropsis maritima* obtuvieron una eficiencia de adsorción menor a pH neutro, seguida por pH ácido y una mayor eficiencia a pH básico. Para *Chlorella vulgaris* Zhu *et al.* (2019) determinaron que a pH bajo resultaba una mayor eficiencia de cosecha y esta disminuía a medida que aumentaba el pH.

El proceso de adsorción también depende de la dosis de nanopartículas empleadas y de la concentración de las células en el medio. En todos los casos, se observó que, al aumentar la cantidad de nanopartículas, la eficiencia en la cosecha aumentaba (Xu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2018). También, al aumentar la concentración de células se observa un aumento en la eficiencia de adsorción (Hu *et al.*, 2014).

A pesar de la rapidez y eficiencia en la adsorción celular existen, aún, varios inconvenientes entre los que se encuentran la posterior desorción de las microalgas a las nanopartículas para reutilizar éstas últimas. Se ha observado que empleando ácidos, como HCl y H₂SO₄, y aplicando distintos métodos de agitación se puede separar las nanopartículas de las microalgas adsorbidas. Este proceso es posible debido a que las nanopartículas se desintegran y las microalgas se lisan. Los compuestos que quedan en disolución y que formaban parte de las nanopartículas son reutilizados para regenerarlas (Xu *et al.*, 2011; Prochazkova *et al.*, 2013). Este método no permite la cosecha de las microalgas enteras y, además, provoca la pérdida de otros componentes de interés presentes en las microalgas. Sin embargo, este método de desorción no es el más adecuado para todos los compuestos de las microalgas. Por un lado, los compuestos de interés pueden ser destruidos en el proceso de desorción y, por lo tanto, dejaría de ser un tratamiento suave (Wang *et al.*, 2015).

La cosecha mediante MNPs no solo está influenciada por el tipo de nanopartícula que se emplea, sino también lo está, por el tipo de microalga y por los compuestos presentes en el medio de cultivo. Además, las técnicas de

desorción no permiten obtener microalgas vivas de forma rentable. Por tanto, son necesarios más estudios sobre el tipo de interacción que se establece entre las nanopartículas y las microalgas para poder emplearlo a nivel industrial (Wang *et al.*, 2015).

La mayoría de los métodos descritos anteriormente solo se han empleado a escala de laboratorio, por lo que son necesarios estudios a mayor escala para determinar cuál es el método más adecuado y rentable en el proceso de biorrefinería (Mathimani y Mallick, 2018).

4.1.2 Obtención de biomasa microalgal

Chlorella vulgaris contiene proteínas, azúcares y lípidos de interés, entre otros productos. Su pared celular, compuesta mayoritariamente por celulosa, actúa como barrera para la extracción de sus compuestos intracelulares, restringiendo la entrada de disolventes orgánicos en la célula y limitando la extracción de estos compuestos (Kim *et al.*, 2016; Bernaerts *et al.*, 2018). Por lo tanto, es necesario optimizar los métodos de ruptura celular para obtener de forma adecuada todos, o la mayoría, de sus productos bioactivos, ya que la mayoría de los métodos empleados únicamente se han centrado en la obtención de lípidos (Stirk *et al.*, 2020).

Los métodos de ruptura celular pueden clasificarse como métodos mecánicos o no mecánicos.

- Mecánicos: molienda con perlas, homogeneización a alta presión, ultrasonidos, pulsos eléctricos, termólisis.
- No mecánicos: hidrólisis química, hidrólisis enzimática y choque osmótico.

Se han realizado estudios sobre distintos métodos de ruptura celular analizando diferentes factores. Los métodos mecánicos ofrecen, generalmente, los mejores resultados tanto en proteína extraída (Safi *et al.*, 2015) como en porcentaje de células rotas (Stirk *et al.*, 2020).

Estos métodos necesitan un alto gasto energético, por lo que la hidrólisis enzimática está adquiriendo mayor interés, ya que evitaría emplear disolventes contaminantes y reduciría el gasto energético. Se ha observado que ciertas combinaciones de enzimas aumentan la permeabilidad de las paredes de las células empleando microalgas intactas, pero son procesos que aún necesitan mucha optimización (Gerken *et al.*, 2013).

Actualmente, no existe un método adecuado y rentable para la ruptura de las paredes celulares de las microalgas. Existen métodos que facilitan la extracción de ciertos compuestos, pero no de la totalidad de la biomasa microalgal.

4.2 Resultados y Discusión

4.2.1 Seguimiento del cultivo para su cosecha

Como la composición bioquímica de *C. vulgaris* varía en función del estado de crecimiento en el que se encuentren, se realizó un seguimiento del crecimiento celular, tanto por turbidez como por medida de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides). Así, los cultivos se cosecharon en el mismo estado fisiológico para que los experimentos fuesen más reproducibles.

4.2.1.1 Turbidez

La medida celular por turbidez permite observar el paso de la fase exponencial a estacionaria del cultivo. El crecimiento celular era lento debido a que no se aportó fuente de carbono externa (atmósfera enriquecida en CO₂) (Figura 4.1).

4.2.1.2 Pigmentos fotosintéticos

También se siguió durante el desarrollo del cultivo la evolución de los pigmentos fotosintéticos, en especial, de Chl *a* y de carotenoides (para el cálculo del Índice de Margalef) (Figura 4.2). El contenido de Chl *a* y carotenoides es un buen indicador del estado fisiológico del cultivo, ya que indican de forma previa a la turbidez, la entrada de cultivo a fase estacionaria o de muerte. Una disminución de la Chl *a* y un aumento de los carotenoides son indicadores del inicio de la fase estacionaria.

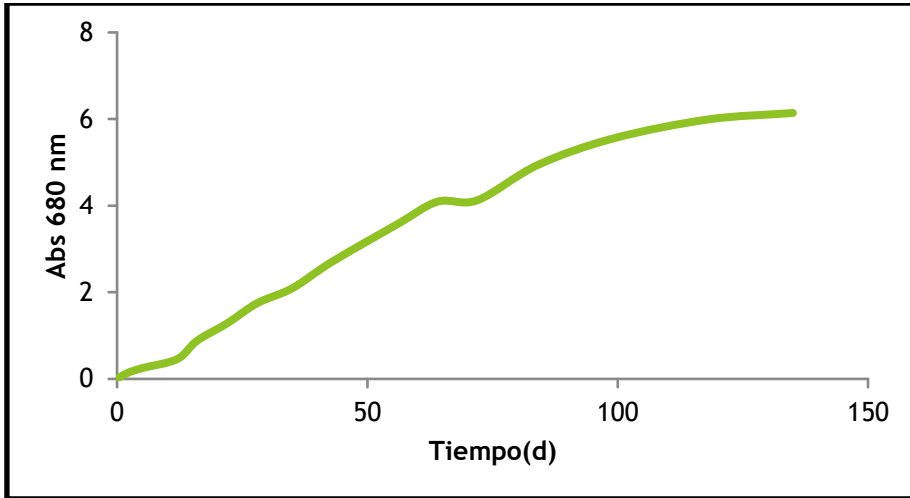


Figura 4.1: Curva de crecimiento de *C. vulgaris*. El crecimiento celular se midió durante 135 días midiendo la turbidez del cultivo a 680 nm.

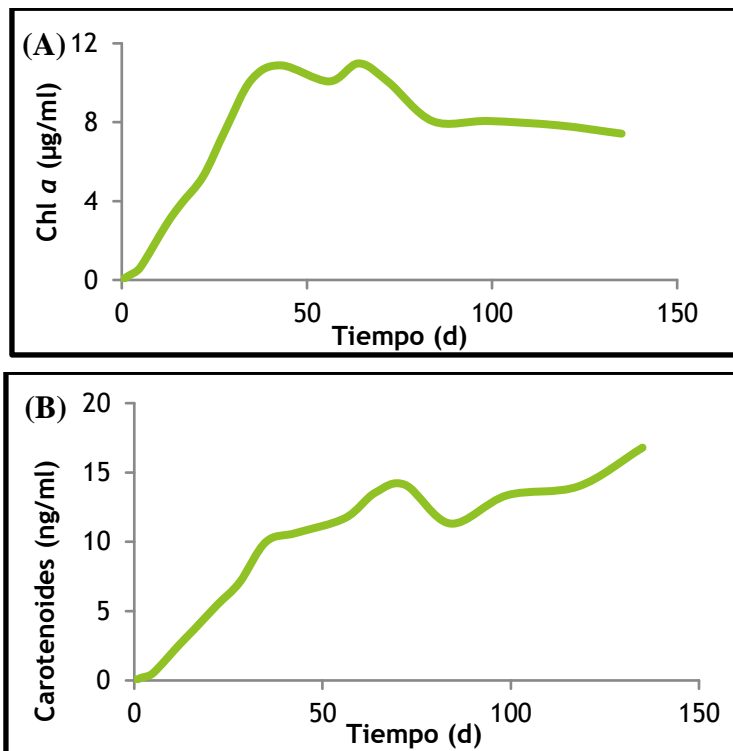


Figura 4.2: Variación del contenido de (A) Chl a y (B) carotenoides durante el cultivo de *C. vulgaris*.

4.2.1.3 Índice de Margalef (IM)

La última medida que se empleó para el seguimiento del cultivo fue el Índice de Margalef (Figura 4.3), que indica el estado fisiológico en el que se encuentra el cultivo, al relacionar el contenido celular de Chl *a* con los carotenoides.

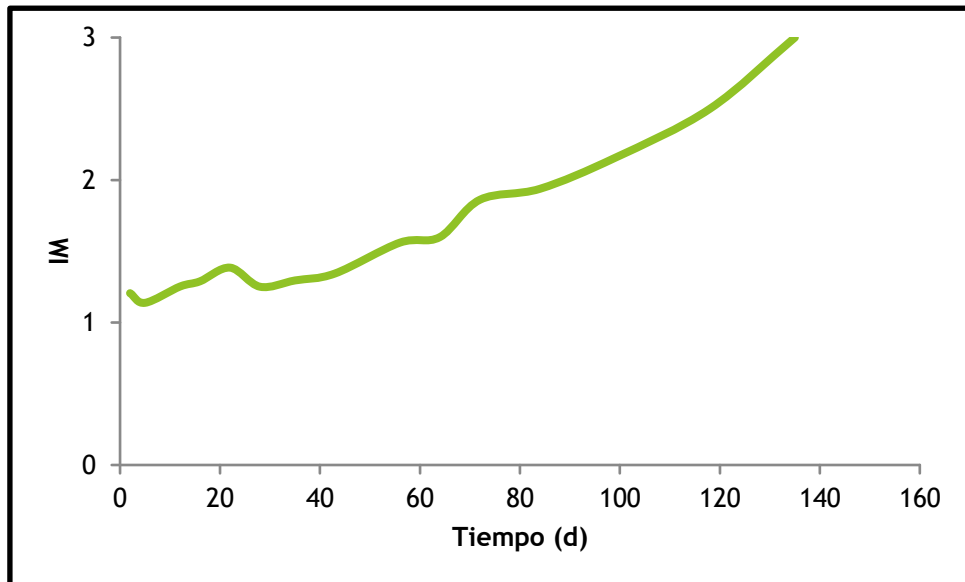


Figura 4.3: Variación del Índice de Margalef (IM) durante el cultivo de *C. vulgaris*.

Como se observa, tras 120 días de incubación, el cultivo se encontraba en fase estacionaria según la medida por turbidez. Por otro lado, la medida de los pigmentos fotosintéticos y de IM muestran que el estado fisiológico de las células estaría envejeciendo. Por lo tanto, lo adecuado sería cosechar el cultivo antes de 120 días. Aun así, cada cultivo evoluciona de forma distinta por lo que se calcularon estos parámetros en cada cultivo, realizando seguimientos individuales y cosechando siempre en las condiciones más similares posibles.

4.2.2 Cosecha del cultivo

Se estudiaron dos métodos de cosecha para *C. vulgaris*: mediante adsorción a MNPs y mediante centrifugación.

4.2.2.1 Cosecha por adsorción a MNPs

Al presentar *C. vulgaris* una pared celular cargada negativamente, se realizó una cosecha añadiendo al cultivo celular MNPs con grupos $-OH$ y funcionalizadas con grupos $-NH_2$. Ambos tipos de MNPs son capaces de establecer interacciones polares con la pared celular de las microalgas. Además, las MPN- NH_2 también pueden establecer interacciones iónicas. Se estudió que tipo de MNPs adsorbía mejor las células de las microalgas.

4.2.2.1.1 Selección del tipo de MNP

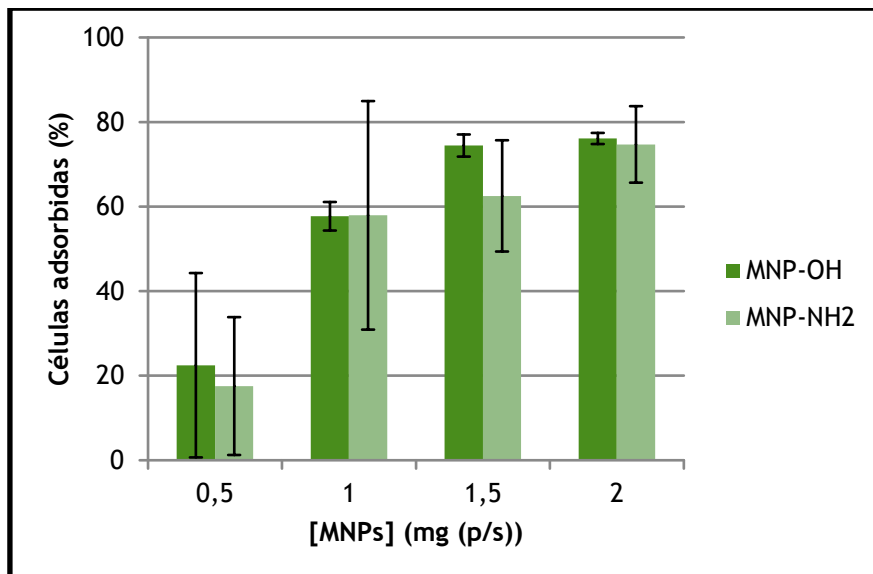


Figura 4.4: Adsorción de microalgas (19 $\mu\text{g/ml}$ Chl *a*) con distintas cantidades de MNP-OH y MNP-NH₂ después de incubar con agitación el cultivo durante 5 minutos. El porcentaje de adsorción celular se midió determinando la presencia de clorofilas en el sobrenadante.

Como se observa (Figura 4.4), el error experimental era menor en el caso de las MNPs-OH. Por otro lado, no se observó diferencia de adsorción significativa empleando un tipo u otro de MNPs. Por lo tanto, se eligieron las MNPs-OH para realizar los siguientes experimentos, al ser más fáciles y más baratas de sintetizar.

4.2.2.1.2 Efecto del volumen en la incubación

Al tratarse de una adsorción por múltiples interacciones de las MNPs con las microalgas, se dedujo que podía ser un factor relevante el volumen final en el que se realizaba la incubación. Por lo tanto, se fijó una misma cantidad de células (calculada por el contenido de clorofilas) y se varió el volumen final de incubación (Figura 4.5).

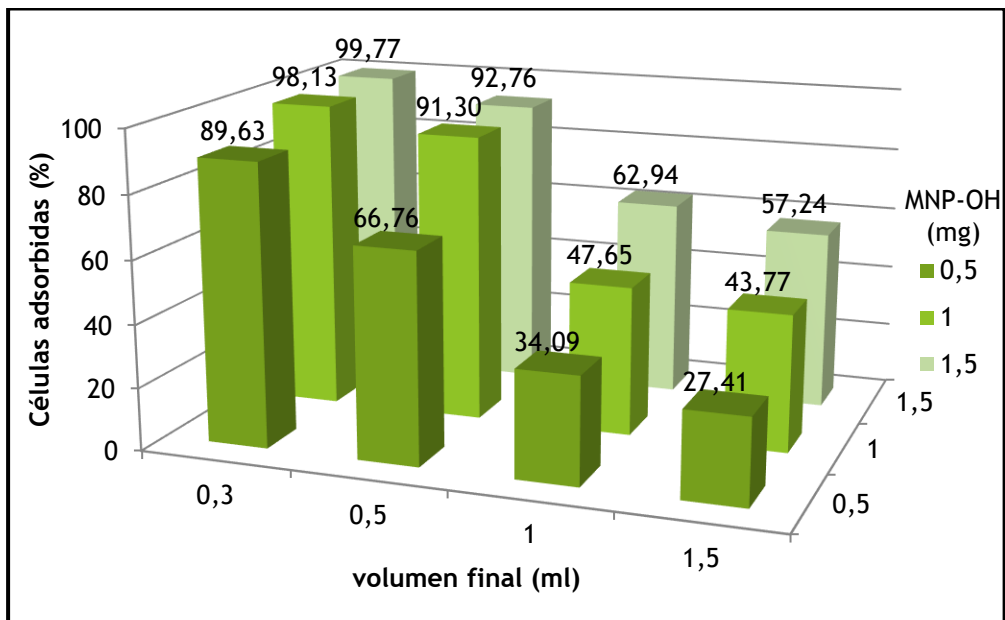


Figura 4.5: Efecto del volumen final de incubación en la adsorción de las microalgas a MNPs-OH. Se fijó 200 μ l de células (Chl a 3.5 μ g/ml) y se varió el volumen final (añadiendo medio de cultivo fresco sin células) y la cantidad de MNPs (mg (p/s)).

Se comprobó que el volumen final de la incubación parece crítico en el proceso de adsorción. Como se observa, aunque se añadan más MNPs si el volumen final de incubación aumenta, la probabilidad de interacción MNP-célula disminuye.

4.2.2.1.3 Efecto de la cantidad de microalgas

Sabiendo que el volumen final de incubación era un factor importante para la adsorción celular, se probó a variar para un mismo volumen de medio la cantidad de microalgas (Figura 4.6). Ya que, al tratarse de una adsorción por interacción física, al aumentar la cantidad de microalgas para un mismo volumen también debería aumentar la interacción.

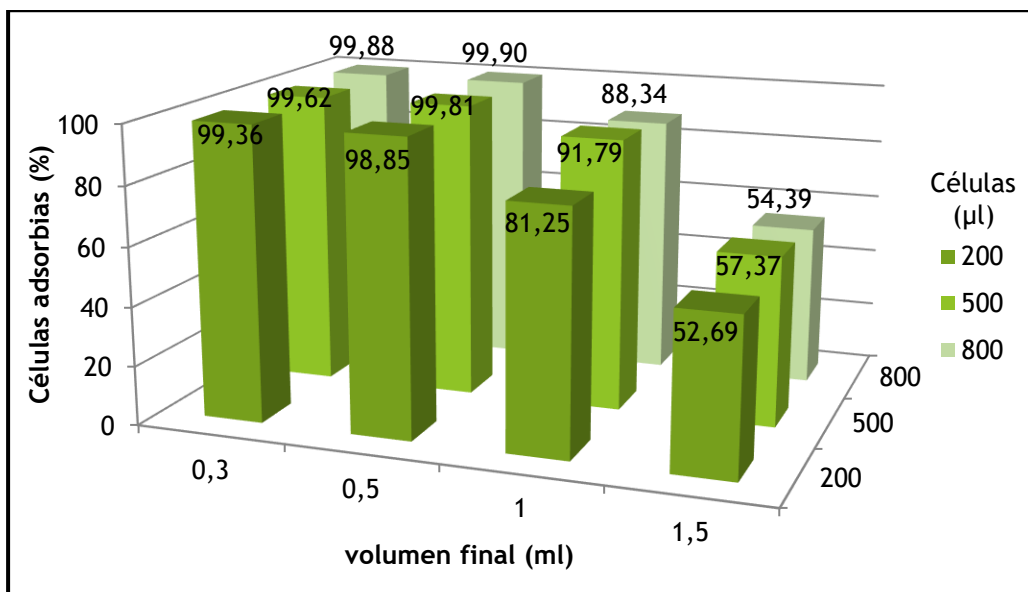


Figura 4.6: Efecto del volumen final y la cantidad de células en la adsorción de MNPs-OH a microalgas. Se fijó la cantidad de MNPs (1.5 mg (p/s)) y se añadieron 200, 500 y 800 µl de volumen celular en distintos volúmenes finales añadiendo medio de cultivo fresco sin células.

Quedó demostrado, que no solo el volumen celular afecta, sino que también lo hace la cantidad de células presentes en ese volumen final. Se puede observar que, al añadir más células al mismo volumen, aumenta la adsorción, ya que la posibilidad de interacción es mayor.

4.2.2.1.4 Efecto del pH

Al estar las células cargadas negativamente, y las MNPs de forma positiva, las interacciones que se producen, son interacciones electrostáticas (polares), por lo que el pH debería ser un factor determinante que afecte al proceso de adsorción. Por ello, se realizó un estudio del proceso de adsorción variando el pH al que se realizaba, alcalinizando o acidificando el pH del medio de cultivo (7.5) (Figura 4.7).

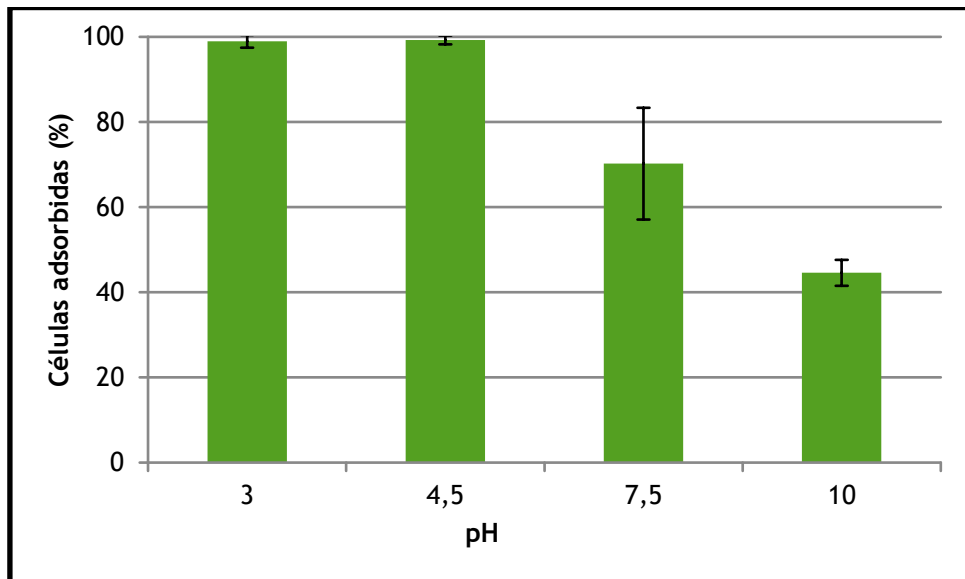


Figura 4.7: Efecto del pH del medio en la adsorción de 200 μ l de cultivo celular (Chl a 3.4 μ g/ml) en un volumen final de 1 ml al pH indicado y empleando 1.5 mg (p/s) de MNPs-OH.

Se observó que a pH ácido la adsorción era prácticamente del 100% y, a medida que se alcalinizaba, disminuía el porcentaje de adsorción, tal como indican Zhu *et al.* (2019). Como se ha mencionado anteriormente, el pH es un factor que depende del tipo de microalga que se emplee (Xu *et al.*, 2011) (Hu *et al.*, 2013), dado que la composición de las envolturas celulares varía significativamente de un tipo a otro de microalga.

4.2.2.1.5 Desorción

El interés de la cosecha por adsorción a MNPs es poder reutilizar esas MNPs después de desorberlas de las microalgas. Por ello, se probaron distintos métodos de desorción.

En el primer caso, se empleó ácido sulfúrico (al 10% v/v) durante 1 hora con distintos tipos de agitación.

Como se observa en la Figura 4.8 (A) el tratamiento con sonorreactor era el más eficiente según la medición de Chl *a* en el sobrenadante. Pero en la Figura 4.8 (B) se comprobó que, tras el tratamiento, las MNPs se disolvieron y las microalgas se lisaron. En este caso, este método de desorción no es adecuado, ya que los compuestos de interés quedan destruidos en el proceso, como indican Wang *et al.* (2015).

Comprobado que el pH afecta al proceso de adsorción, se estudió variar el pH del medio de las células adsorbidas como método de desorción (Figura 4.9).

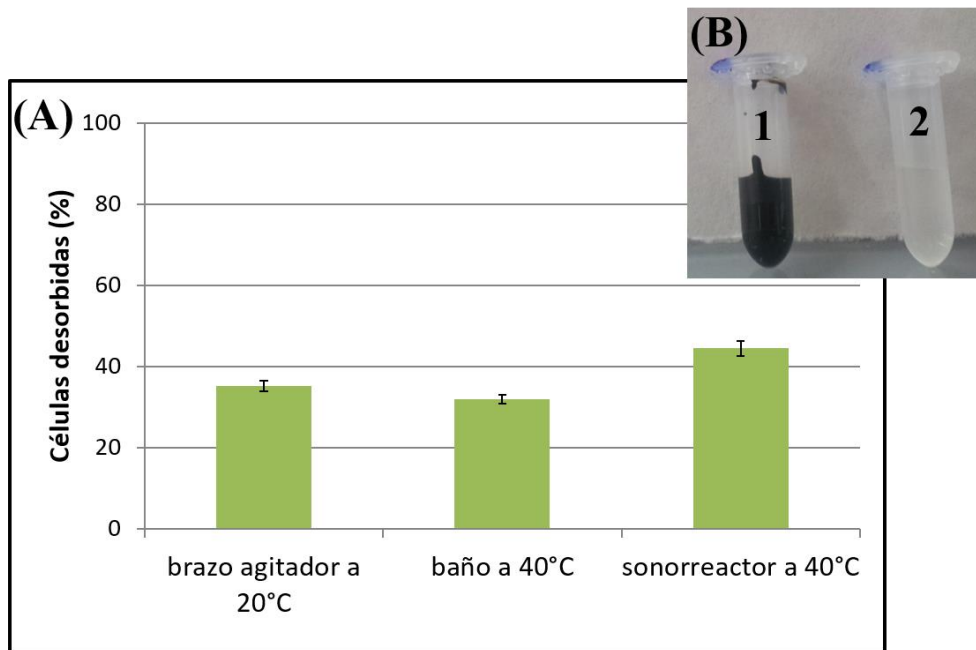


Figura 4.8: (A) Desorción de microalgas adsorbidas en MNPs-OH empleando H₂SO₄ (10% v/v) durante 1 hora en brazo agitador a temperatura ambiente, baño agitado a 40°C o en un sonorreactor (32 kHz) a 40°C. (B) Desorción mediante sonorreactor antes de tratarlas (1) y tras 1 hora con H₂SO₄ (2).

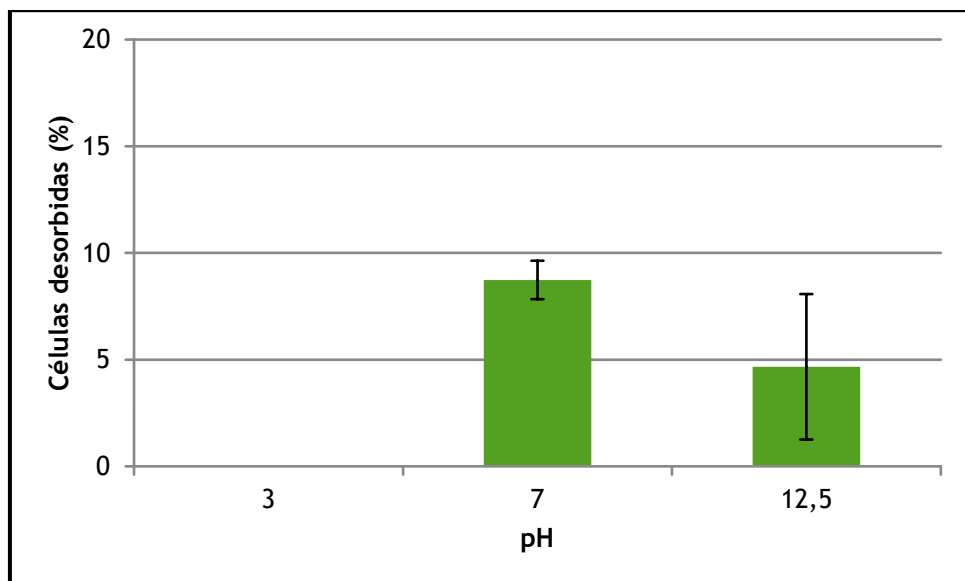


Figura 4.9: Desorción de las MNPs a las microalgas empleando tampón glicina/HCl (pH 3.0), tampón fosfato (pH 7.0) y tampón KCl/NaOH (pH 12.7) mediante agitación mecánica en un brazo agitador a temperatura ambiente.

En ningún caso se obtuvo más del 10% de desorción de microalgas. Por lo tanto, se puede concluir que el pH es un factor crucial para adsorber las células. Una vez adsorbidas las microalgas a las MNPs, no se sabe qué tipo de interacciones se están produciendo, por lo que serían necesarios más estudios para que la cosecha de *C. vulgaris* con MNPs sea factible, tal como indican Wang *et al.* (2015).

Por otro lado, las células adsorbidas a MNPs se pudieron volver a cultivar, por lo que se demuestra que esta interacción no afecta a su viabilidad.

4.2.3 Extracción de biomasa microalgal

Al ser de interés en este trabajo la extracción de biomasa microalgal lo más intacta posible, se estudiaron distintos métodos de extracción de biomasa a partir de cultivo liofilizado y de cultivo fresco: molino de bolas del cultivo liofilizado, prensado del cultivo liofilizado resuspendido en tampón, y prensado de cultivo fresco obtenido por centrifugación y resuspendido en tampón.

Para comprobar cuál era el mejor método, se determinó la cantidad de proteína presente en las muestras (20 mg/ml) analizadas por el método de Bradford (1976) (Tabla 4.1).

En las muestras de biomasa microalgal liofilizada no se detectó extracción de proteína. Debido a que las paredes celulares están compuestas por celulosa, es difícil la extracción del contenido celular, por lo que se necesitó emplear métodos de ruptura más agresivos. Como se observa, la utilización del molino de bolas para romper las células permitió extraer algo de proteína, pero en menor cantidad que tras prensar las muestras utilizando la prensa de French. Se descartó así la liofilización y el empleo del molino de

bolas como métodos de extracción. La cantidad de proteína (mg/ml) extraída por prensado del cultivo liofilizado y del cultivo fresco analizada por el método de Bradford (1976) presentó valores muy similares. Al ser un método colorimétrico, la presencia de clorofilas interfiere en el análisis, por lo que se decidió realizar una comprobación de la proteína extraída mediante SDS-PAGE (Figura 4.10), empleando como control negativo el cultivo liofilizado.

Tabla 4.1: Cantidad de proteína inicial presente con los diferentes métodos de tratamiento microalgal. La proteína (mg/ml) obtenida mediante Bradford. También se siguió la hidrólisis de proteínas por SDS-PAGE.

Método	Bradford	SDS-PAGE
Liofilizado	0	✓
Ruptura con molino de bolas de células liofilizadas	35.55	ND
Ruptura por prensado de las células liofilizadas	72.09	✓
Ruptura por prensado de células frescas	78.92	✓

Mediante SDS-PAGE se demostró que el método que permitía obtener mayor cantidad de proteína era el prensado de células frescas. Esto indicaba que, a pesar de que la liofilización permitía un fácil manejo y almacenamiento del cultivo, el proceso dificultaba la obtención de proteína soluble.

Por último, se comprobó por microscopía óptica la imagen de una muestra representativa de los cultivos fresco, liofilizado y prensado (Figura 4.11).

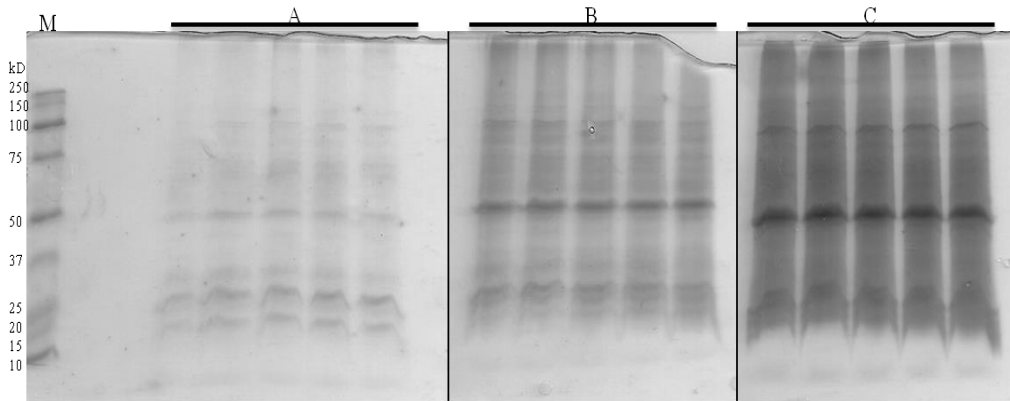


Figura 4.10: Análisis por SDS-PAGE de la proteína presente en *C. vulgaris* empleando distintos métodos de extracción. Se analizaron 20 μ l de extracto de microalgas por calle. (A) Proteína obtenida tras liofilización, (B) proteína obtenida mediante prensado del cultivo liofilizado (20 mg (p/s)/ml) y (C) proteína obtenida por prensado del cultivo fresco centrifugado (20 mg (p/s)/ml). (M) Marcadores de baja masa molecular.

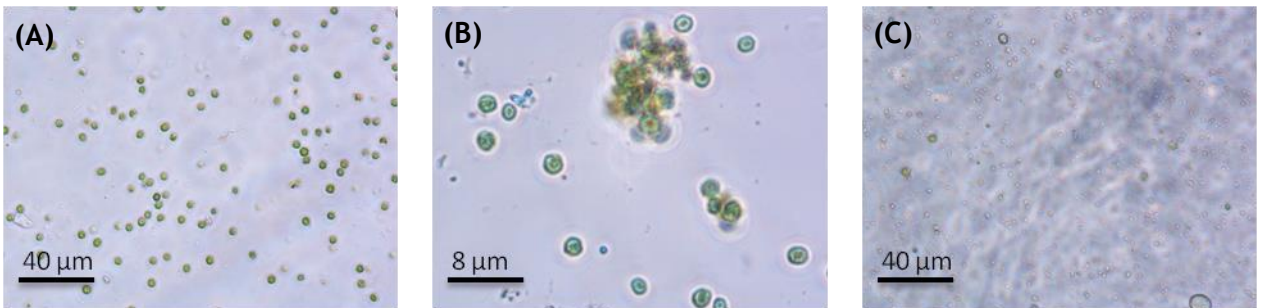


Figura 4.11: Imágenes obtenidas por microscopía óptica de la biomasa microalgal sometida a distintos tratamientos. (A) Cultivo fresco, (B) cultivo liofilizado resuspendido y (C) cultivo sometido a 5 ciclos de prensa de French.

De esta forma se comprobó que tras la liofilización del cultivo las células formaban agregados, e incluso se podía ver cambios de color y forma. Además, se comprobó que, tras el empleo de la prensa de French, las células estaban completamente rotas.

Finalmente, viendo los resultados obtenidos en los distintos procesos de ruptura y extracción, se seleccionó el prensado de células frescas como mejor

método para obtener extractos de microalgas para su posterior hidrólisis enzimática.

Capítulo V

Obtención de Hidrolizados de
Polisacáridos empleando
Glucosidasas

5.1 Introducción

El almidón es uno de los polisacáridos más empleados, tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica. En la industria alimentaria, el almidón se hidroliza principalmente empleando α -amilasa (EC 3.2.1.1) y glucoamilasa (EC 3.2.1.3) para obtener glucosa (Bian *et al.*, 2018). Pero, actualmente, el aumento del consumo energético y la reducción de aceites asequibles para obtener biodiesel ha provocado un creciente interés en el almidón como alternativa energética (Shokrkar y Ebrahimi, 2018). Al ser necesario para la alimentación humana, el almidón obtenido de la agricultura, no es una fuente adecuada para la producción de bioetanol (Bezerra y Ragauskas, 2016).

Las microalgas son capaces de acumular grandes cantidades de almidón, y por ello está aumentando su interés para la producción de bioetanol como una alternativa al material procedente de la agricultura (Brényiková *et al.*, 2011; Jhon *et al.*, 2011). Una de las ventajas que presentan las microalgas frente a otros materiales fuente, es que, generalmente, los carbohidratos no contienen lignina, por lo que puede hidrolizarse más fácilmente en monosacáridos (Bibi *et al.*, 2017). Estos azúcares son empleados en la industria farmacéutica y en la alimentaria, pero también como azúcares fermentables para la obtención de bioetanol.

5.1.1 Hidrólisis de polisacáridos en microalgas

Existen diversos métodos para la sacarificación de los polisacáridos microalgales que permiten la obtención de monosacáridos fermentables. Actualmente, los más empleados son la hidrólisis ácida y la enzimática (Kahn *et al.*, 2018).

5.1.1.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es muy efectiva para transformar los polisacáridos de las microalgas en monómeros, pero la temperatura necesaria en el proceso, entre 120 y 200°C, es demasiado elevada para que el tratamiento sea rentable. El rendimiento del proceso está determinado por la fuerza del ácido, el tiempo de tratamiento y la temperatura. Los ácidos empleados habitualmente son ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico, el sulfúrico y el nítrico. En este proceso es muy importante la selección del tipo de ácido, ya que un ácido demasiado débil no sería efectivo y uno demasiado fuerte puede convertir los azúcares en furfural, inhibiendo la fermentación (Park et al., 2013).

5.1.1.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es, actualmente, el proceso más productivo y ventajoso (Choi *et al.*, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2011). Los catalizadores comúnmente empleados son las amilasas, celulasas e invertasas, que permiten hidrolizar enlaces glicosídicos de los polisacáridos para la obtención de monosacáridos. Sin embargo, el empleo de enzimas a gran escala encarece demasiado el proceso.

5.1.2 Glucosidasas

Las glucosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de azúcares complejos, transformándolos en oligosacáridos y monosacáridos. Por lo general, este tipo de enzimas se obtiene de bacterias o de hongos, y están presentes de forma intra o extracelular. Son comúnmente muy utilizadas en distintas industrias, como la textil, alimentaria y papelera, entre otras. Sin embargo, cabe destacar a la α -amilasa y a la glucoamilasa como

las glucosidasas más empleadas para la hidrólisis de almidones. Estos dos enzimas, obtenidos a partir de fuentes fúngicas, como *Aspergillus*, han ganado mucho interés debido a su fácil obtención y al sencillo crecimiento y mantenimiento del hongo (Shruti *et al.*, 2013).

5.1.2.1 α -amilasa

La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es un enzima extracelular con actividad endohidrolasa que hidroliza al azar enlaces $1\alpha \rightarrow 4$ glucosídicos entre unidades de glucosa, obteniéndose oligosacáridos de distinto tamaño. Estos enzimas presentan, al menos, un átomo de calcio por molécula de enzima, pero no actúa como coenzima, sino que son calcio metalo dependientes (Stein *et al.*, 1960). La α -amilasa de *Aspergillus oryzae* presenta un centro de unión al calcio entre dos dominios que se encarga de estabilizar el bucle que conforma el centro de unión del sustrato (Brzozowski y Davies, 1997; Sahnoun *et al.*, 2016) (Figura 5.1).

5.1.2.2 Glucoamilasa

La glucoamilasa (amiloglucosidasa) (EC 3.2.1.3) es un enzima desramificante que presenta actividad exohidrolasa, hidrolizando enlaces $1\alpha \rightarrow 4$ y $1\alpha \rightarrow 6$ glucosídicos, de manera no secuencial desde el extremo no reductor, liberando monómeros de glucosa (Figura 5.1).

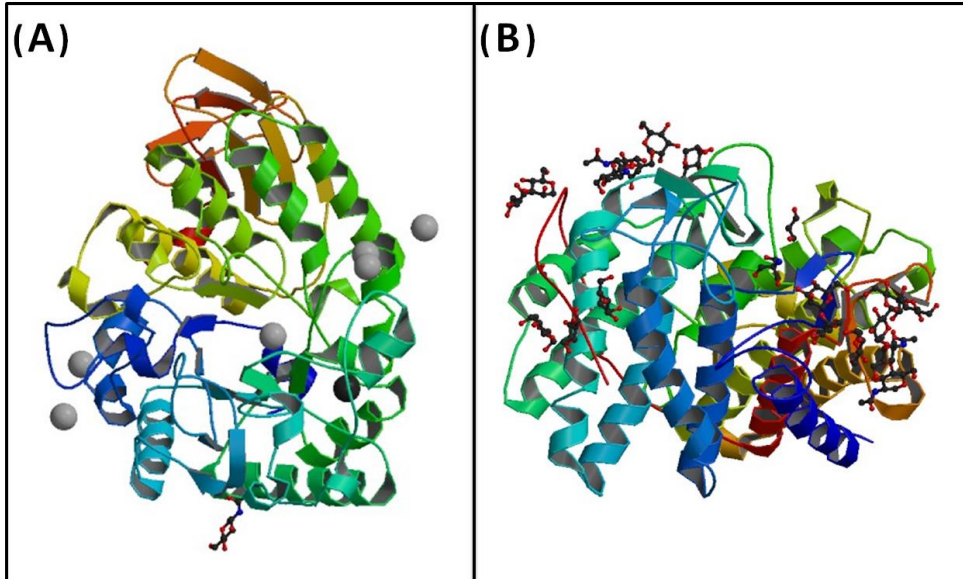


Figura 5.1: Estructura tridimensional obtenidas por difracción de rayos X de (A) α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Sugahara *et al.*, 2013) y (B) glucoamilasa de *Apergillus niger* (Lee y Paetzel, 2011).

5.1.2.3 Empleo de las glucosidasas en la hidrólisis de polisacáridos microalgales

Actualmente las glucosidasas, principalmente α -amilasa y glucoamilasa, son los enzimas más empleados en la hidrólisis de polisacáridos microalgales para la obtención final de bioetanol. El proceso de sacarificación es uno de los más importantes en la obtención de monosacáridos fermentables en la producción de bioetanol (Milano *et al.*, 2016). Para ello, se emplean las endo-amilasas como la α -amilasa para hidrolizar los enlaces $1\alpha \rightarrow 4$ glicosídicos, produciéndose dextrinas que posteriormente se hidrolizan con glucoamilasas obteniéndose glucosa u otros monosacáridos fermentables (Ometto *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015). Este proceso de hidrólisis enzimática presenta muchas ventajas frente a los procesos químicos anteriormente empleados, siendo los más destacados la eliminación de productos tóxicos y una mayor obtención de carbohidratos simples (Velazquez-Lucio *et al.*, 2018).

Viendo la gran efectividad de estos enzimas en las hidrólisis de polisacáridos microalgales, se han realizado distintos estudios con el fin de optimizar el proceso. Uno de los mayores problemas al trabajar con almidón es su insolubilidad, que conlleva la formación de gránulos de almidón que disminuyen el rendimiento de la actividad hidrolítica de los enzimas, al no poder acceder a todos los enlaces hidrolizables. Mediante un tratamiento térmico del sustrato (a 90°C) se facilita su disolución, y se evita la formación de estos gránulos aumentando el rendimiento de las glucosidasas solubles (Souilah *et al.*, 2015). Además, también se indica en la literatura que un aumento del Ca^{2+} aumentaría el rendimiento de la α -amilasa (Dojnov *et al.*, 2008). Este aumento puede ser de hasta un 40% en el rendimiento en ciertos tipos de α -amilasas (Peng *et al.*, 2018).

A pesar de que se ha visto un alto rendimiento por parte de las glucosidasas en la hidrólisis de polisacáridos microalgales, son pocos los estudios en los que se ha empleado extracto microalgal completo, ya que principalmente se extrae el almidón presente en las microalgas y después se trata enzimáticamente. El tratamiento de la biomasa completa permitiría un mayor rendimiento del proceso de biorefinería, es por ello, que en este estudio se ha empleado biomasa microalgal completa, y se han estudiado todos estos factores con el fin de optimizar al máximo el proceso a microescala.

5.2 Resultados y discusión

Una vez cosechadas las microalgas, y sintetizadas las mCLEAs de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1) (Novozymes) y de glucoamilasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3) (Novozymes), se optimizó la hidrólisis de polisacáridos. Para ello, se caracterizaron los enzimas solubles y sus mCLEAs, empleando sustratos modelo como el almidón gelificado y la dextrina hervida. Posteriormente, se estudió la hidrólisis de polisacáridos en biomasa microalgal, tanto con enzimas solubles como inmovilizados en mCLEAs, ajustando los parámetros necesarios para obtener el mayor rendimiento posible en la obtención de monosacáridos.

Para facilitar la comprensión, a lo largo de este Capítulo se asignan los siguientes símbolos: \triangle α -amilasa soluble, \blacktriangle α -amilasa en mCLEAs, \circ glucoamilasa y \bullet glucoamilasa en mCLEAs.

5.2.1 Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo

Al tratarse de preparaciones de enzimas comerciales (tanto α -amilasa como glucoamilasa), se analizaron ambas preparaciones por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Este análisis permitió detectar la presencia de otros enzimas y/o proteínas contaminantes presentes en el preparado comercial (Figura 5.2).

Además, de la banda correspondiente a la proteína de interés, se observa que los enzimas comerciales no presentan una contaminación muy elevada, de otras proteínas. Generalmente, estas contaminaciones no afectan a la actividad de los enzimas, a los que también se les añaden otros compuestos que actúan como estabilizantes para mantener la actividad.

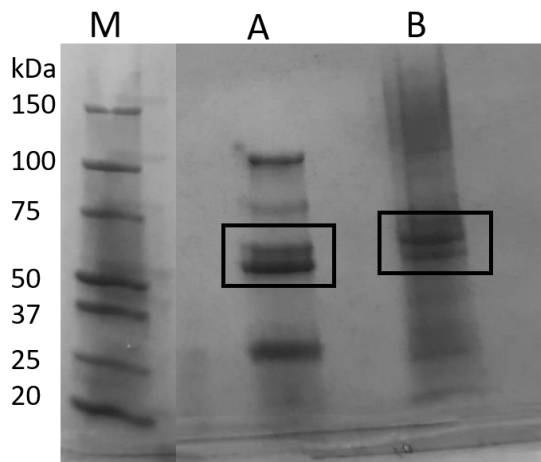


Figura 5.2: Análisis por SDS-PAGE de las glucosidasas comerciales. (M) Marcador de baja masa moléculas, (A) α -Amilasa de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1), (B) Glucoamilasa de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3). Las bandas correspondientes a los enzimas comerciales aparecen enmarcadas en un recuadro.

En ambos casos, la banda principal corresponde al enzima de interés, siendo 51 kDa para α -amilasa y 63 kDa para glucoamilasa.

Finalmente, se analizó con el reactivo de Bradford la concentración (mg/ml) total de proteína presente en ambas preparaciones comerciales siendo 110.91 mg/ml en α -amilasa y 81.93 mg/ml en glucoamilasa.

5.2.1.1 Determinación del pH óptimo de actividad

El pH de los enzimas solubles se determinó en un intervalo de 3.5 a 6 empleando tampón acético-acetato sódico y tampón ácido cítrico-citrato sódico (Figura 5.3).

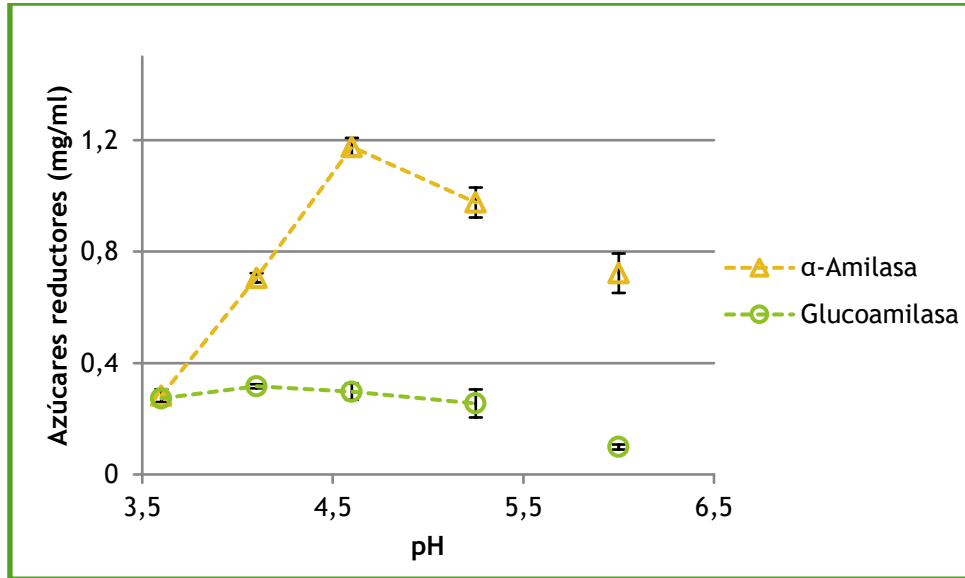


Figura 5.3: Determinación del pH óptimo de actividad de la α -amilasa y glucoamilasa. Se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 3.6, 4.1, 4.6, y 5.25, y tampón ácido cítrico-citrato sódico (50 mM) pH 6.0. Se añadieron 10 nl de E/ml de mezcla de incubación y se incubaron con agitación rotatoria a 40°C para α -amilasa y 45°C para glucoamilasa. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron mediante el método del DNS.

La actividad de ambas enzimas era mayor a pH ácidos. En el caso de α -amilasa, a pH 4.6 se obtenían los mejores resultados, mientras que con glucoamilasa la actividad óptima ocurría por debajo de 4.5. Se seleccionó un pH intermedio de 4.5 para poder trabajar posteriormente cuando se combinaron ambas enzimas.

5.2.1.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se estudiaron tres temperaturas para cada enzima en un intervalo de 35 a 50 °C (Figura 5.4).

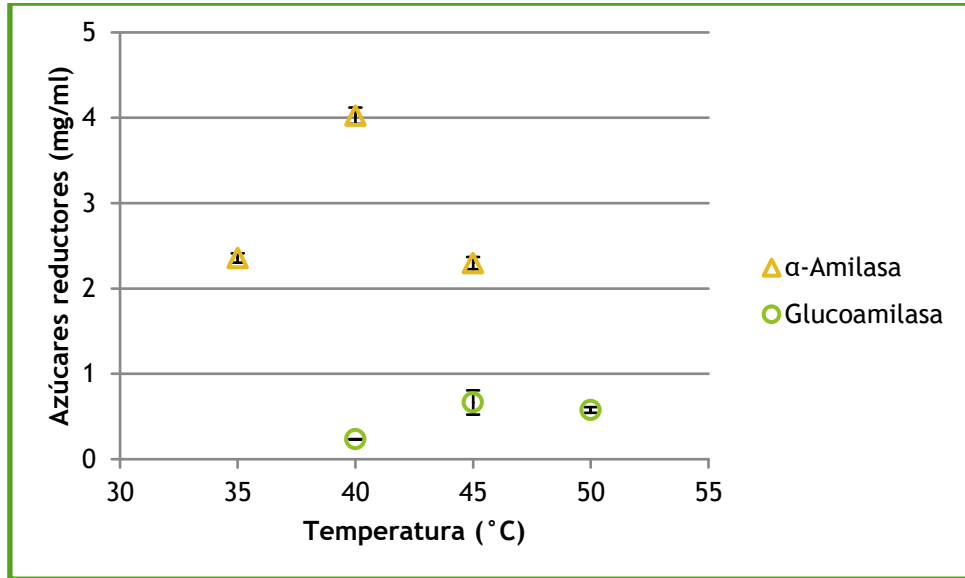


Figura 5.4: Determinación de la temperatura óptima de actividad de α -amilasa y glucoamilasa. Se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) y se añadieron 10 ml de E/ml de mezcla de incubación. Las muestras se incubaron con agitación rotatoria y los azúcares reductores obtenidos se analizaron mediante el método del DNS.

Se determinó la temperatura óptima de actividad para α -amilasa y glucoamilasa, siendo 40°C para la primera y 45°C para la segunda enzima.

5.2.1.3 Determinación de la cantidad de enzima

Una vez seleccionados el pH y la temperatura óptima de trabajo, se determinó la cantidad de enzima mínima necesaria para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores (Figura 5.5).

En ambos casos, empleando 10 ml de E/ml de mezcla de incubación, se obtuvo el mayor grado de hidrólisis. También se observó que glucoamilasa, al tratarse de una exohidrolasa, origina menor cantidad de azúcares reductores

para la misma cantidad de enzima y almidón. Al hidrolizar únicamente por los extremos terminales la reacción es más lenta que con α -amilasa que es una endohidrolasa.

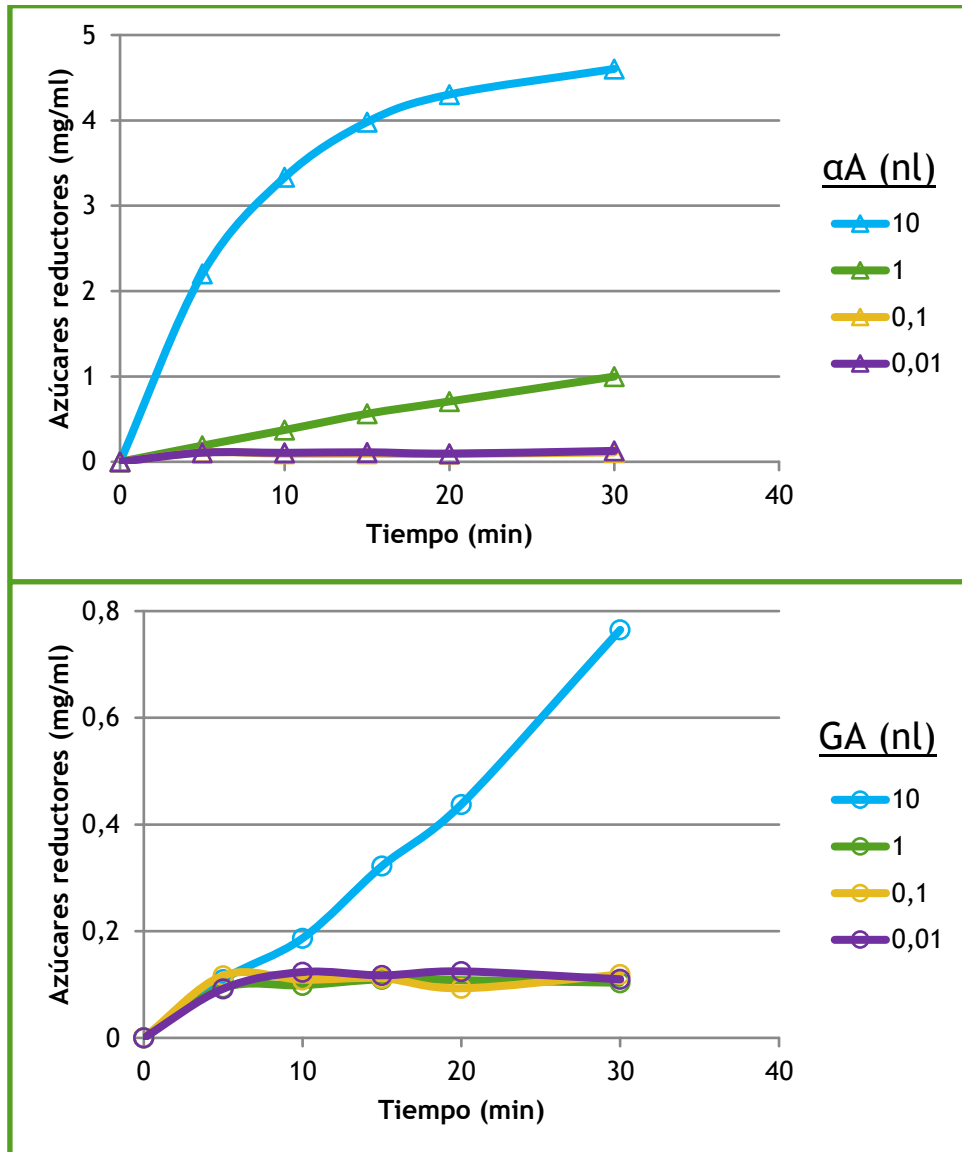


Figura 5.5: Determinación de la cantidad de enzima. Como sustrato se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM pH 4.5) y se añadieron distintas cantidades de enzima comercial. La reacción se llevó a cabo con agitación rotatoria a 40°C para α -amilasa y 45°C para glucoamilasa. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron mediante el método del DNS.

5.2.1.4 Determinación de la afinidad enzimática

Para determinar la afinidad de ambas enzimas, se estudió la velocidad (v) frente a la concentración de sustrato (almidón gelificado mg/ml) empleada (Figura 5.6).

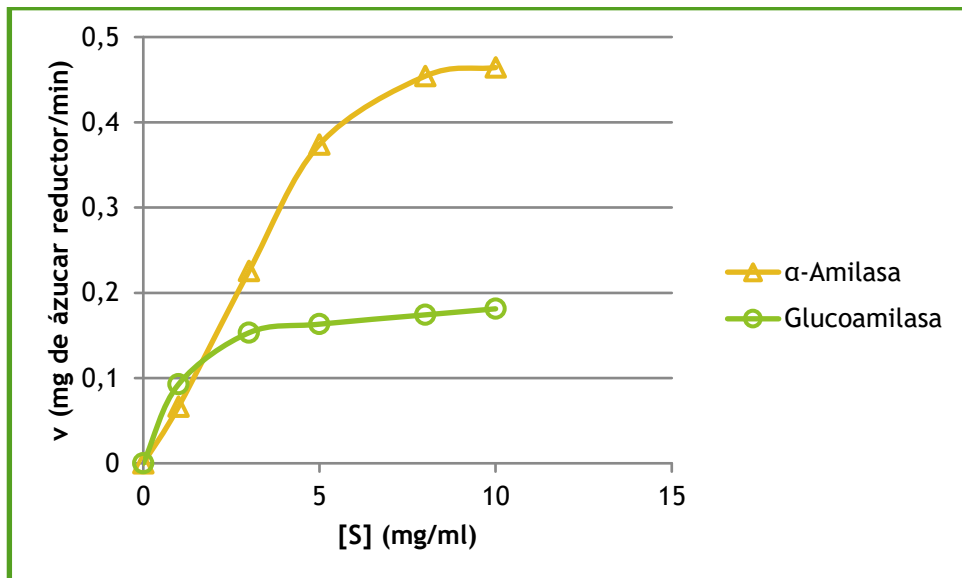


Figura 5.6: Representación directa de v frente $[S]$. Se varió la concentración de almidón de 1 a 10 mg/ml en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) empleando 10 nl de α -amilasa/ml de mezcla de incubación y 100 nl de glucoamilasa/ml de mezcla de incubación. Las reacciones se llevaron a cabo con agitación rotatoria a 40 y 45°C, respectivamente. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron mediante el método del DNS.

A partir de la representación de Michaelis-Menten por regresión no lineal, y de la representación de doble recíproca por regresión lineal se pudo calcular la K_m y la V_{max} de ambas enzimas comerciales. Los parámetros se determinaron después de ajustar los datos por iteración usando el SOLVER de Excel (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: V_{max} y K_m de α -amilasa y glucoamilasa calculadas por regresión lineal y no lineal.

	α -Amilasa		Glucoamilasa	
	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal
V_m (mg azúcar reductor/min)	0,8743	0,6492	0,1829	0,1893
K_m (mg/ml)	7,9124	8	0,8274	1,0123
MSSE	0,0032	5,8266	0,0005	1,0407

En el caso de glucoamilasa, la baja actividad está provocada por la viscosidad del almidón tras gelificarse. No ocurre lo mismo al emplearse α -amilasa, ya que al tratarse de una endohidrolasa la reacción ocurre más rápidamente reduciendo la viscosidad del medio.

5.2.1.5 Combinación de enzimas para la hidrólisis de sustratos modelo

Como se ha mencionado anteriormente, α -amilasa es una endohidrolasa y glucoamilasa una exohidrolasa, por lo que la hidrólisis del almidón y la obtención de monosacáridos ocurre de forma distinta.

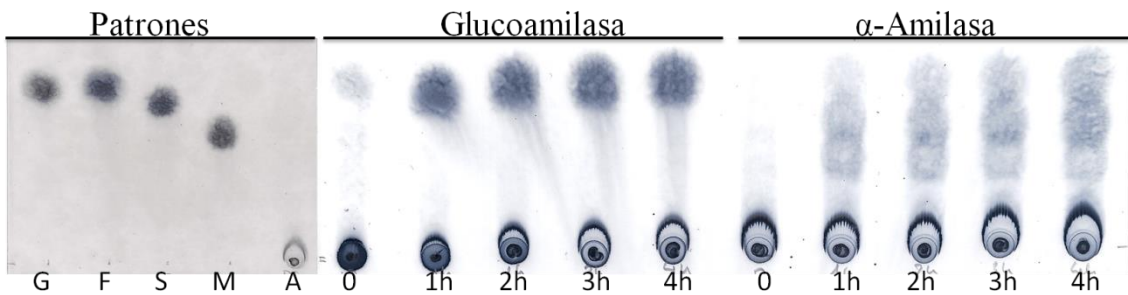


Figura 5.7: Hidrólisis de almidón por glucoamilasa y α -amilasa analizada por TLC. Como patrones se emplearon (G) glucosa, (F) fructosa, (S) sacarosa, (M) maltosa y (A) almidón. Como sustrato se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) y se añadieron 10 nl de E/ml de mezcla de incubación en ambos casos. La reacción se llevó a cabo con agitación rotatoria a 40°C para α -amilasa y 45°C para glucoamilasa.

Obtención de Hidrolizados de Polisacáridos empleando Glucosidasas

Mediante la TLC (Figura 5.7) se comprueban las diferencias entre la hidrólisis de glucoamilasa, en la que el producto principal obtenido fueron monosacáridos, y α -amilasa, donde inicialmente se obtenían oligosacáridos de distintos tamaños, y posteriormente monosacáridos.

Una vez caracterizado el tipo de hidrólisis que catalizaba cada enzima, se pensó que la combinación de ambos podría permitir una obtención de monosacáridos más rápida. Por ello, se hidrolizó primeramente el almidón empleando α -amilasa para obtener oligosacáridos de distintos tamaños facilitando la posterior hidrólisis mediante glucoamilasa al disponer de un mayor número de extremos accesibles (Figura 5.8).

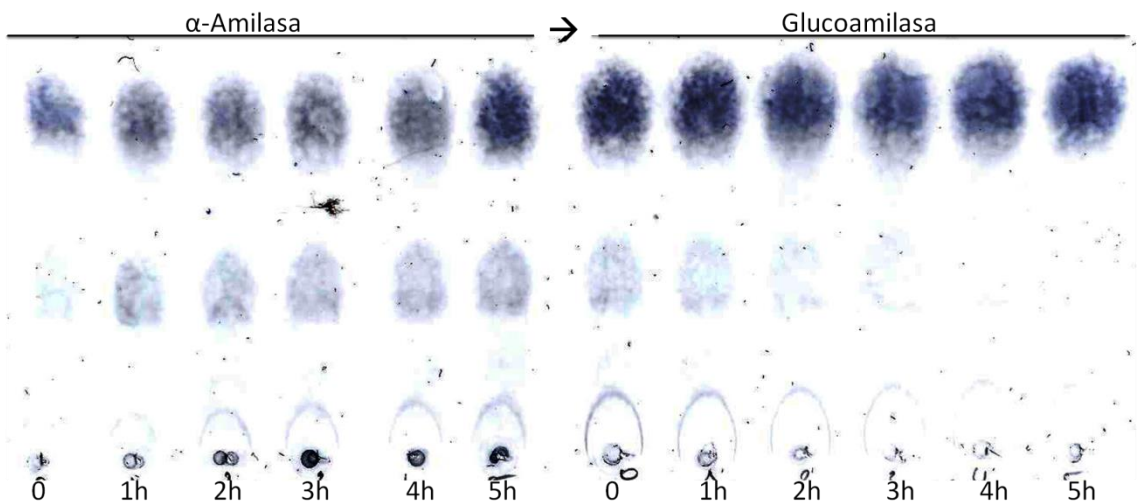


Figura 5.8: Análisis por TLC de la hidrólisis de almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) empleando primero α -amilasa (10 nl de E/ml de mezcla de incubación) y posteriormente glucoamilasa (10 nl de E/ml de mezcla de incubación) a 42.5°C con agitación rotatoria.

De esta forma, quedó demostrado que una primera hidrólisis del almidón llevada a cabo por α -amilasa facilitaba la posterior hidrólisis con glucoamilasa.

5.2.1.5.1 Estequiometría enzimática en la hidrólisis de almidón

Para combinar ambos enzimas en la misma mezcla de reacción, y acelerar la hidrólisis del almidón, se estudiaron combinaciones en distinta proporción de cada uno de ellos. Ya que α -amilasa facilitaba la hidrólisis se fijó como el valor 1 la cantidad de enzima correspondiente a 15 nl de E/ml de mezcla de incubación (Figura 5.9).

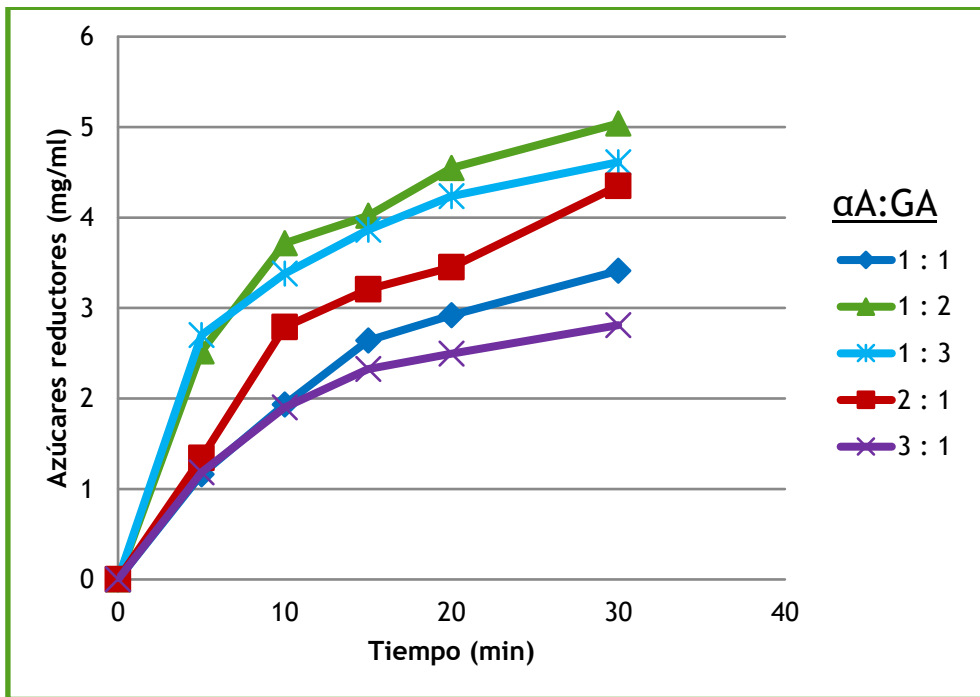


Figura 5.9: Hidrólisis de almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH4.5) combinando α -amilasa y glucoamilasa con agitación rotatoria a 42.5°C. Se emplearon distintas relaciones estequiométricas donde 1= 15 nl de E/ml de mezcla de incubación. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

Se observó que la mejor opción era aumentar la cantidad de glucoamilasa frente a una cantidad constante de α -amilasa. En la estequiometría 1:2 (α A:GA) la cantidad de glucoamilasa es el doble que la de α -amilasa. Al compararla con la estequiometría 1:1 (α A:GA) se dedujo que, al liberarse más oligosacáridos de distinto tamaño, y por lo tanto más extremos accesibles.

Aumentar la cantidad de glucoamilasa permitía una hidrólisis más rápida de estos productos. La proporción 1:3 (α A:GA) demuestra que la proporción 1:2 (α A:GA) es suficiente para estas condiciones de hidrólisis. Por otro lado, la estequiometría 2:1 (α A:GA) liberaba más oligosacáridos hidrolizables por glucoamilasa, aumentando así la velocidad de reacción. Sin embargo, como se observó en la condición 3:1 (α A:GA), un exceso de α -amilasa provocaba una disminución del rendimiento de hidrólisis.

5.2.2 Caracterización de mCLEAs empleando sustratos modelo

Para la caracterización de las mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa se emplearon como sustratos almidón gelificado y dextrina hervida. Al gelificar el almidón, aumentaba mucho la viscosidad del medio, y las mCLEAs no difundían fácilmente por lo que se substituyó el almidón por dextrina para disminuir la viscosidad del medio.

5.2.2.1 Determinación de la temperatura óptima de actividad

La determinación de la temperatura óptima de actividad se realizó empleando dextrina como sustrato para facilitar la hidrólisis al disminuir la viscosidad (Figura 5.10).

La temperatura óptima de α -amilasa era de 35°C, mientras que la de glucoamilasa era a 55°C. Debido a la diferencia entre ambas enzimas, y teniendo en cuenta que posteriormente se iban a emplear conjuntamente en la misma mezcla de reacción, se seleccionó la temperatura de 45°C para glucoamilasa.

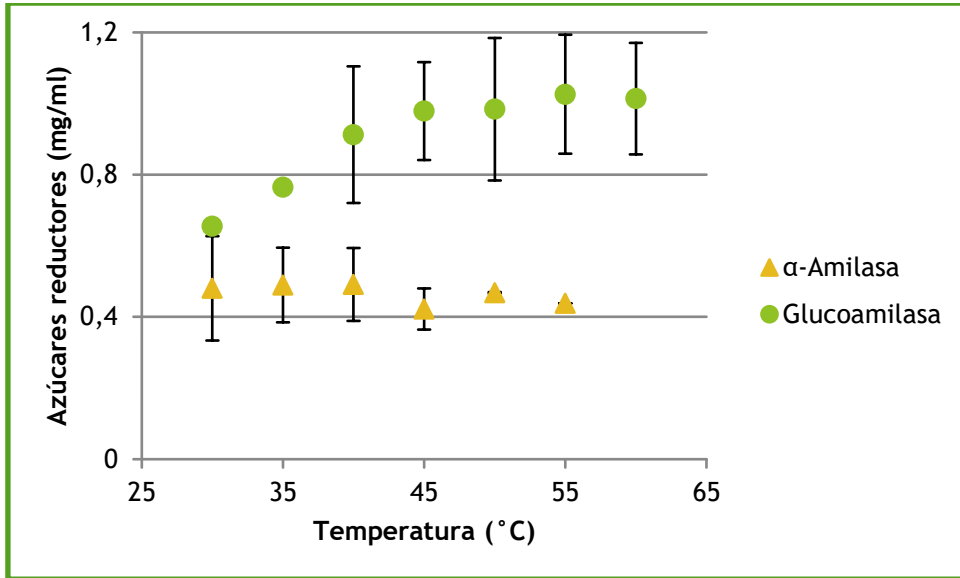


Figura 5.10: Determinación de la temperatura óptima. Se emplearon 4 mg (p/s) de mCLEAs para la hidrólisis de 7 ml de dextrina (0.5% p/v) en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.6. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria y los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

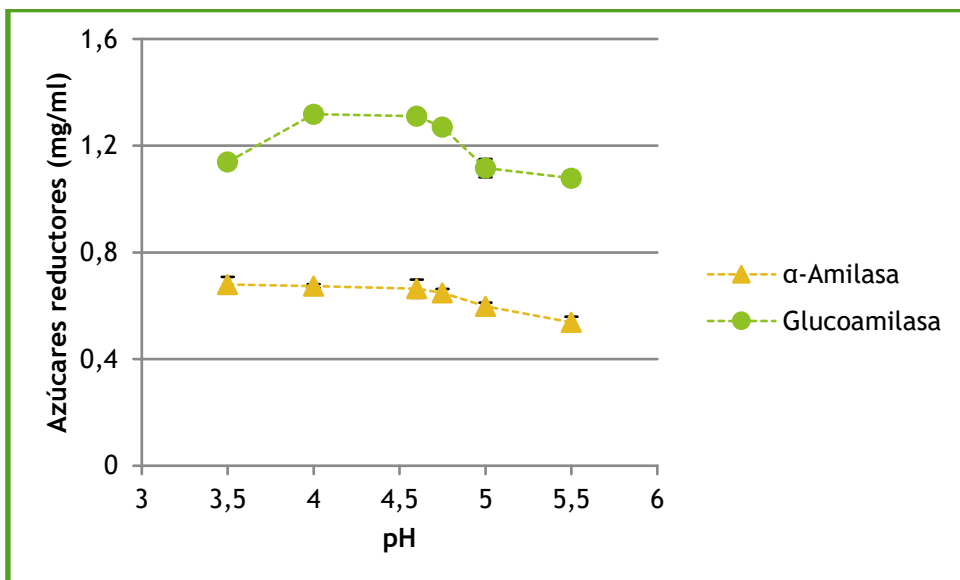


Figura 5.11: Determinación del pH óptimo de actividad. Se emplearon 4 mg (p/s) de mCLEAs para 7 ml de dextrina (0.5% p/v) en tampón acético-acetato sódico (50 mM). Las reacciones se llevaron a cabo con agitación rotatoria a 40°C para α-amilasa y 45°C para glucoamilasa. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

5.2.2.2 Determinación del pH óptimo de actividad

Se estudiaron distintos pH, entre 3.5 y 5.5, para determinar el pH óptimo de actividad de las mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa (Figura 5.11).

Los pH óptimos en ambos casos se determinaron entre 4 y 4.5. Para posteriores estudios se seleccionó como pH de trabajo 4.5.

5.2.2.3 Selección de la cantidad de mCLEAs y del sustrato

Se emplearon distintas cantidades de mCLEAs de α -amilasa y de glucoamilasa para hidrolizar almidón gelificado (Figura 5.12) y dextrina hervida (Figura 5.13).

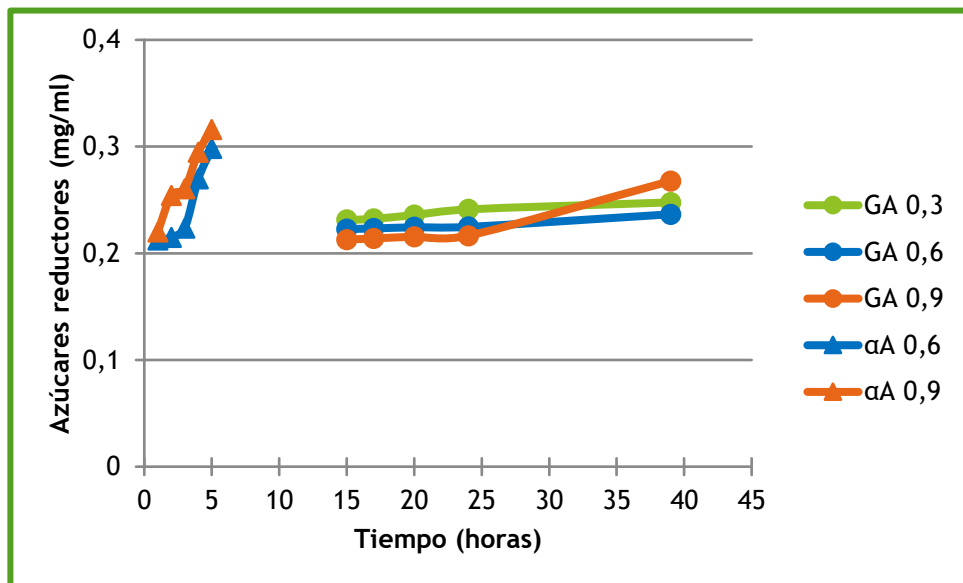


Figura 5.12: Efecto de la cantidad de mCLEAs en la hidrólisis de almidón. Se empleó almidón (2.5 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM) pH 4.5. Se emplearon 0.6 y 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación para α -amilasa y 0.3, 0.6 y 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación de glucoamilasa. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40 y 45°C, respectivamente. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

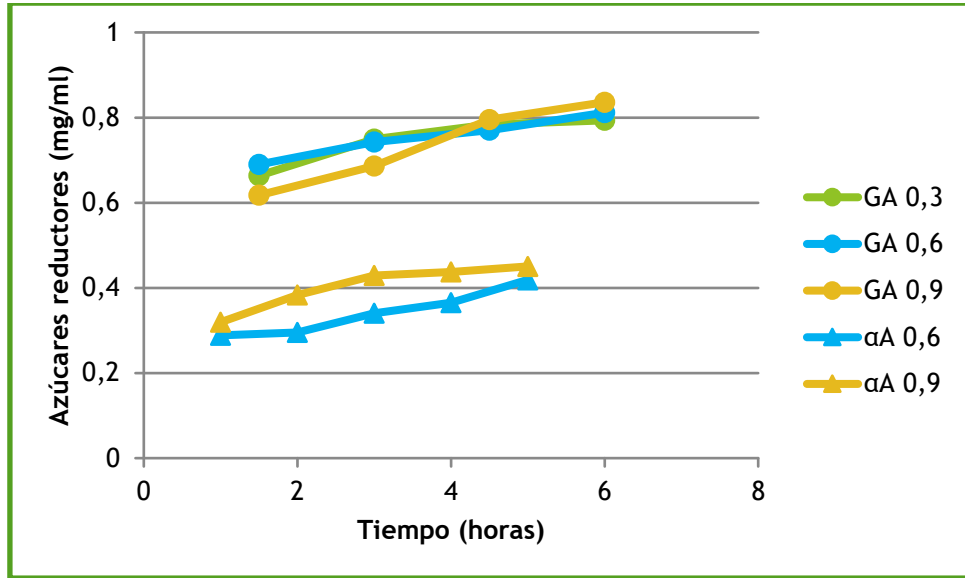


Figura 5.13: Efecto de la cantidad de mCLEAs en la hidrólisis de dextrina. Se empleó dextrina (2.5 mg/ml) hervida en tampón acético-acetato sódico (50 mM) pH 4.5. Se emplearon 0.6 y 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación para α -amilasa y 0.3, 0.6 y 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación para glucoamilasa. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40 y 45°C, respectivamente. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

En ambos casos, es suficiente 0.6 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. En el caso de α -amilasa, con 0.3 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación se obtenía una hidrólisis de sustrato muy baja. La hidrólisis obtenida con 0.6 y 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación con ambos enzimas era similar, por lo que se optó por seleccionar 0.6 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación como la cantidad óptima. Para glucoamilasa 0.3 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación era suficiente para la hidrólisis de los sustratos, no obstante, se seleccionó 0.6 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación para realizar estudios comparativos con α -amilasa.

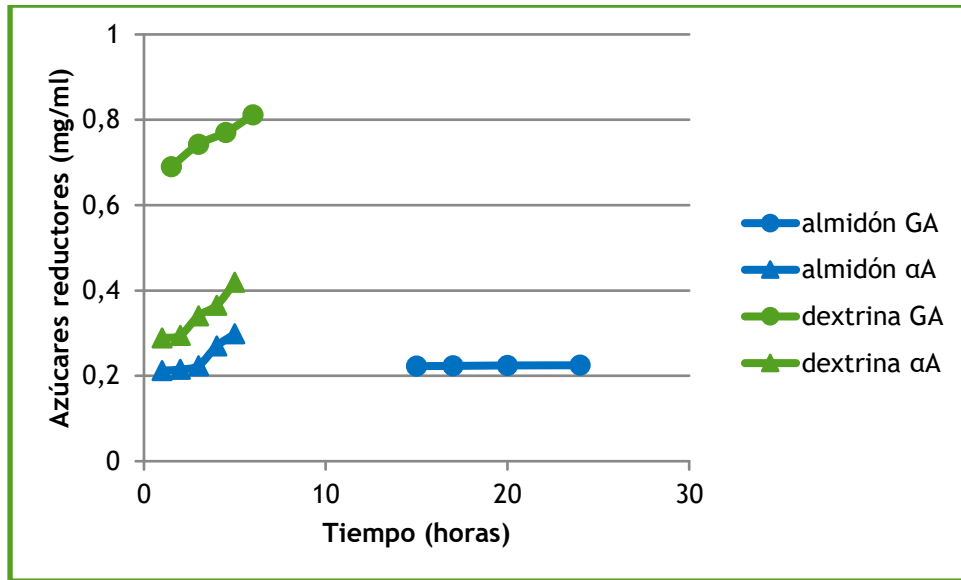


Figura 5.14: Comparación de la hidrólisis de almidón y dextrina empleando mCLEAs (0.6 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación) de α -amilasa y glucoamilasa. Se emplearon 2.5 mg/ml sustrato en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.6). Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40 y 45 °C, respectivamente. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

En ambos casos, se obtuvo mayor rendimiento de hidrólisis empleando dextrina como sustrato en vez de almidón (Figura 5.14). La dextrina proporcionaba menor viscosidad al medio, y al estar menos ramificada que el almidón, facilita una hidrólisis más rápida. La hidrólisis, añadiendo almidón como sustrato, era más eficiente con las mCLEAs de α -amilasa, principalmente porque permitía más puntos de corte que glucoamilasa. La estructura ramificada del almidón impedía que glucoamilasa tuviera acceso a muchos de los extremos hidrolizables. Además, en el caso de la glucoamilasa empleando dextrina como sustrato, la producción de azúcares reductores era casi el doble que con α -amilasa. Se dedujo, que la estructura menos ramificada de la dextrina presenta más extremos accesibles e hidrolizables por glucoamilasa. No ocurrió así en el caso de α -amilasa.

Quedó claro, que el empleo de almidón gelificado y mCLEAs no era eficiente debido, principalmente a la viscosidad que se generaba. Por otro lado,

el empleo de dextrina como sustrato, facilitaba su hidrólisis, ya que la viscosidad se reducía y al presentar menos ramificaciones que el almidón permitía un mejor acceso del enzima a los extremos hidrolizables.

Finalmente, el bajo rendimiento de hidrólisis de las mCLEAs de α -amilasa, empleando como sustrato tanto almidón como dextrina, indicaba que al inmovilizar el enzima se producía una disminución de su actividad. Esto se debía, posiblemente, por el bloqueo de alguno de sus centros activos y por la dificultad que presenta el agregado enzimático para difundir a través de las ramificaciones del sustrato.

5.2.2.4 Combinación de las mCLEAs para la hidrólisis de sustratos modelo

Como sucedía con los enzimas solubles, la combinación de las mCLEAs de ambos enzimas permitiría un mejor rendimiento de la hidrólisis. Además, la actividad de los enzimas inmovilizados era mucho menor que la de los enzimas solubles, por lo que la combinación de ambos podría aumentar la velocidad de hidrólisis.

Se establecieron una serie de relaciones estequiométricas entre las mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa para hidrolizar dextrina hervida. Se comparó el empleo de las mCLEAs en esa proporción en solitario y en combinación (Figura 5.15).

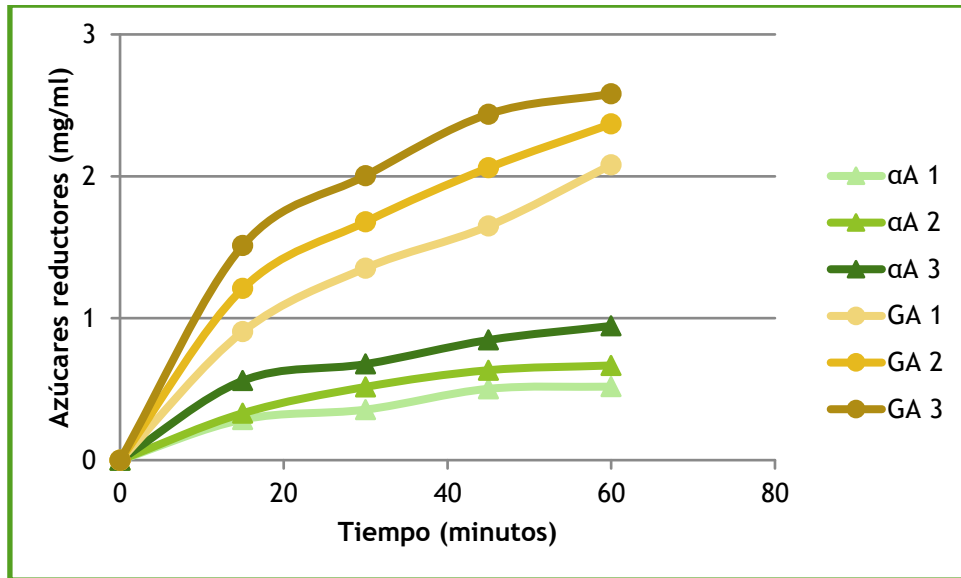


Figura 5.15: Hidrólisis de dextrina (10 mg/ml) hervida en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) empleando mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 45°C y los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS. El valor 1=0.3, 2=0.6 y 3=0.9 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación de mCLEAs.

En todos los casos, el aumento de cantidad de mCLEAs provoca un aumento en el rendimiento de la hidrólisis de dextrina. La cantidad máxima de azúcares reductores se obtuvo empleando 0.9 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación de glucoamilasa.

A continuación, se realizaron reacciones de hidrólisis de dextrina combinando ambos tipos de mCLEAs en distintas proporciones (Figura 5.16).

Comparando ambas Figuras (5.15 y 5.16) se concluye que las mCLEAs de glucoamilasa son las que prácticamente hidrolizan completamente el sustrato. Al aumentar las mCLEAs de α -amilasa no se observó ninguna diferencia con los resultados de glucoamilasa sola. La cantidad de azúcares reductores obtenidos era similar.

Se puede concluir que, a diferencia de lo que sucedía con los enzimas solubles, la combinación de ambos enzimas inmovilizados no supone ningún

aumento en el rendimiento de la hidrólisis. Incluso se podría, decir que la participación de las mCLEAs de α -amilasa es prácticamente nula.

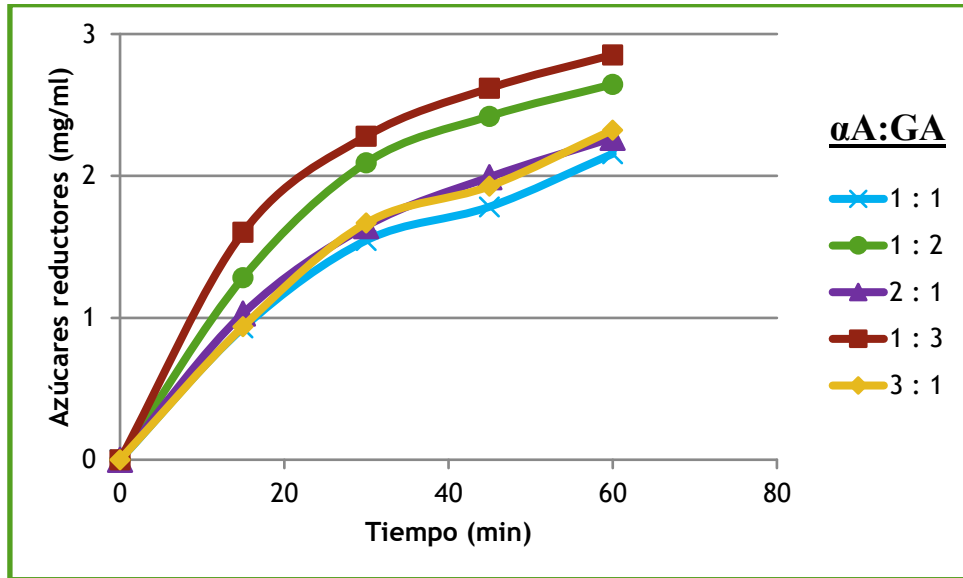


Figura 5.16: Combinación de mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa para la hidrólisis de dextrina (10 mg/ml) hervida en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 45 °C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS. El valor 1 corresponde a 0.3 mg de mCLEAs (p/s)/ml de mezcla e incubación.

5.2.3 Hidrólisis de polisacáridos de biomasa microalgal empleando α -amilasa y glucoamilasa solubles

Se estudió la hidrólisis de los polisacáridos presentes en la biomasa microalgal, obtenida por prensado de células frescas, empleando α -amilasa y glucoamilasa solubles ya caracterizados con sustratos modelo. Para ello, se optimizó el proceso basándose en lo obtenido anteriormente, y caracterizando de nuevo los enzimas con el sustrato a emplear.

5.2.3.1 Determinación del pH óptimo de actividad

Se emplearon distintos tampones a distinto pH para determinar el pH óptimo de trabajo. En este caso, los azúcares reductores no se pudieron analizar por el método del DNS, ya que tras la centrifugación del homogeneizado microalgal, el sobrenadante quedaba de color verde, con mayor intensidad a medida que se aumentaba el pH. Por lo tanto, se realizó un seguimiento del proceso por TLC (Figura 5.17).

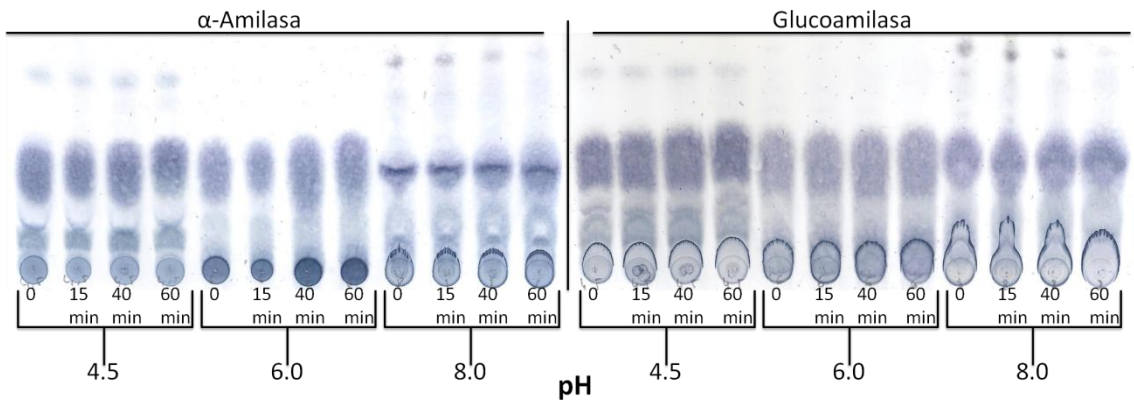


Figura 5.17: Determinación de pH óptimo para la hidrólisis de polisacáridos de la biomasa microalgal prensada. Se emplearon tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5 y 6.0, y tampón Tris/HCl (50 mM) para pH 8.0. Se añadieron 450 nI E/mg (p/s) de microalga de α -amilasa y 200 nI E/mg (p/s) de microalga de glucoamilasa. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40°C para α -amilasa y 45°C para glucoamilasa.

A la vista de los resultados obtenidos por TLC, se seleccionó el tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5 como pH de trabajo. Además, a este pH el sobrenadante de la preparación se mantenía transparente, evitando así las interferencias con el método del DNS.

5.2.3.2 Determinación de la temperatura óptima

La temperatura en este caso era un factor importante. Se analizaron distintas temperaturas (Figura 5.18) y se tuvo en cuenta que no se produjera hidrólisis espontáneas del sustrato de forma térmica.

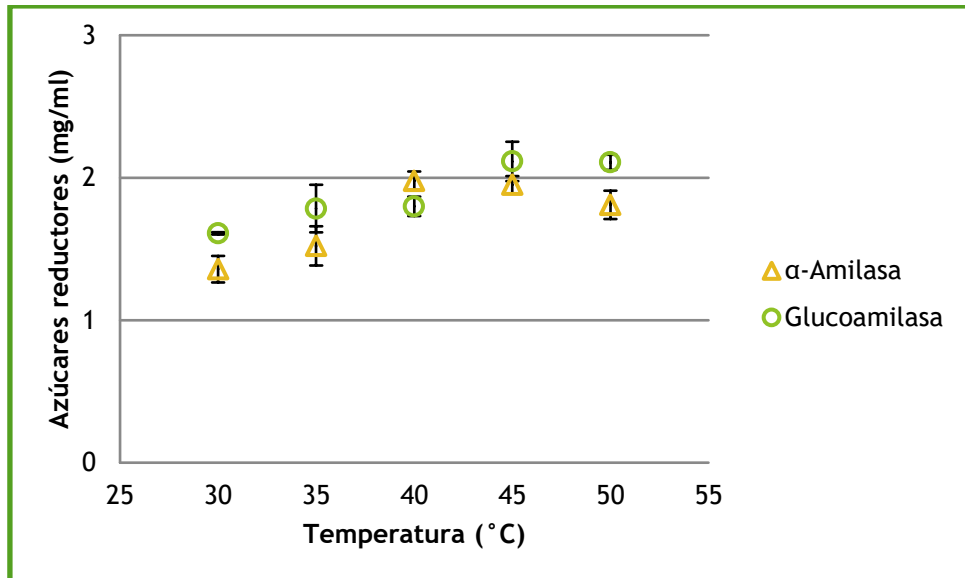


Figura 5.18: Determinación de la temperatura óptima. Se empleó homogeneizado de microalgas sin centrifugar en tampón acético-acetato sódico (50 mM) a pH 4.5. Se añadieron 45 nl de E/mg (p/s) de microalgas de α -amilasa y 20 nl de E/mg (p/s) de microalgas de glucoamilasa. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria entre 35 y 50°C. Los azúcares reductores se analizaron por el método del DNS:

La temperatura a la que se obtuvo mayor cantidad de azúcares reductores era a 45 °C para α -amilasa y 50°C para glucoamilasa. Se seleccionaron como temperaturas óptimas 40 y 45°C, respectivamente, comprobándose que la hidrólisis térmica del sustrato era nula o despreciable.

5.2.3.3 Optimización del proceso de hidrólisis

Para optimizar el proceso de hidrólisis, se estudió el efecto del pretratamiento térmico del sustrato y la adición de iones de calcio a la mezcla

de reacción. La mayor fuente de carbohidratos en las microalgas se encuentra como almidón, que se presenta formando gránulos compactos e insolubles. El pretratamiento térmico del sustrato permite desestabilizar esta estructura sólida y facilitar la obtención de oligo o monosacáridos, catalizada por los enzimas. Además, se estudió el efecto que produce la adición de iones calcio en la α -amilasa, ya que estos iones tienen una función estructural y activadora del enzima y activan la catálisis enzimática.

5.2.3.3.1 Efecto del pretratamiento térmico del sustrato

Se realizó, durante 5 minutos, un pretratamiento térmico a 90°C de la biomasa microalgal de células frescas prensadas. Se comparó el rendimiento de hidrólisis de la biomasa sin pretratar y pretratada térmicamente, empleando α -amilasa y glucoamilasa (Figura 5.19).

Se observó, que el pretratamiento térmico, provocaba un aumento notable en el rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el homogeneizado microalgal. En el caso de glucoamilasa este aumento era tres veces superior.

Se dedujo que la pérdida de la estructura rígida de los almidones, permitía a α -amilasa acceder mejor a los distintos puntos de corte. Por otro lado, a pesar de que glucoamilasa presenta actividad exohidrolítica, esta pérdida, de estructura debida al pretratamiento térmico, podría facilitarle el acceso a más extremos susceptibles de ser hidrolizados.

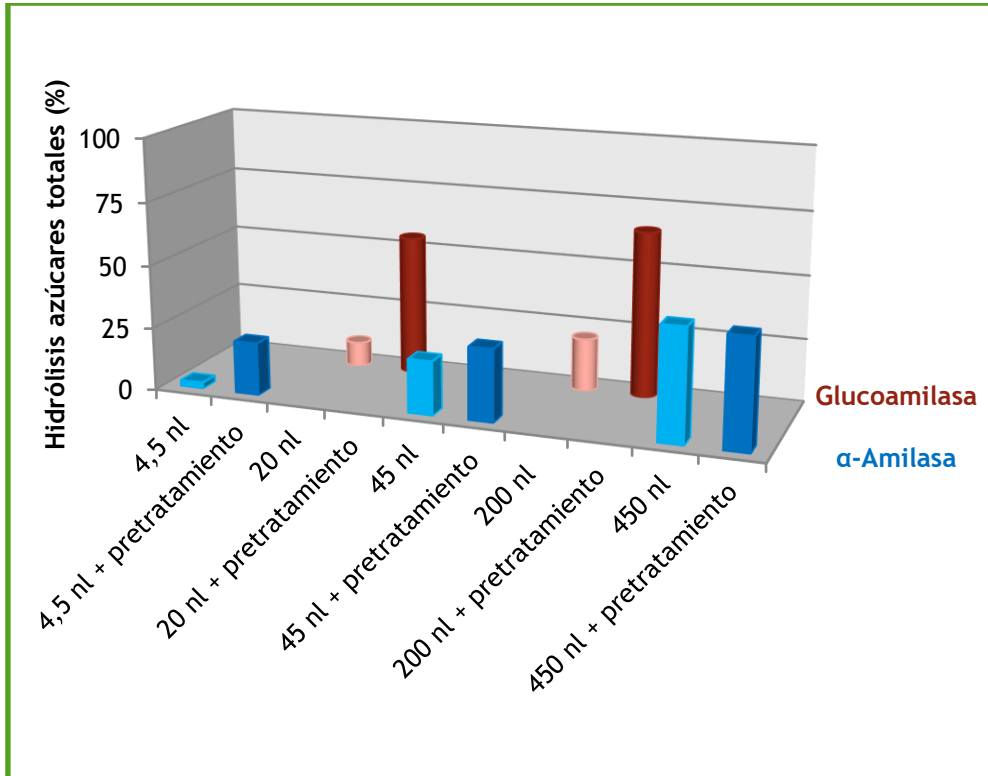


Figura 5.19: Efecto del pretratamiento térmico del sustrato. Se empleó biomasa microalgal de células frescas prensadas en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) sin pretratamiento y pretratadas a 90°C durante 5 minutos. En el caso de α-amilasa se emplearon 450, 45 y 4.5 nl de E/mg (p/s) de microalga y para glucoamilasa se emplearon 200 y 20 nl de E/mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40°C para α-amilasa y 45°C para glucoamilasa. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS. El rendimiento de hidrólisis se calculó a partir de la cantidad total de azúcares reductores presentes en la biomasa.

Estas conclusiones se pueden deducir a partir de la Figura 5.20, donde por análisis en TLC se ve cómo cambia la hidrólisis empleando biomasa microalgal sin pretratar y pretratada.

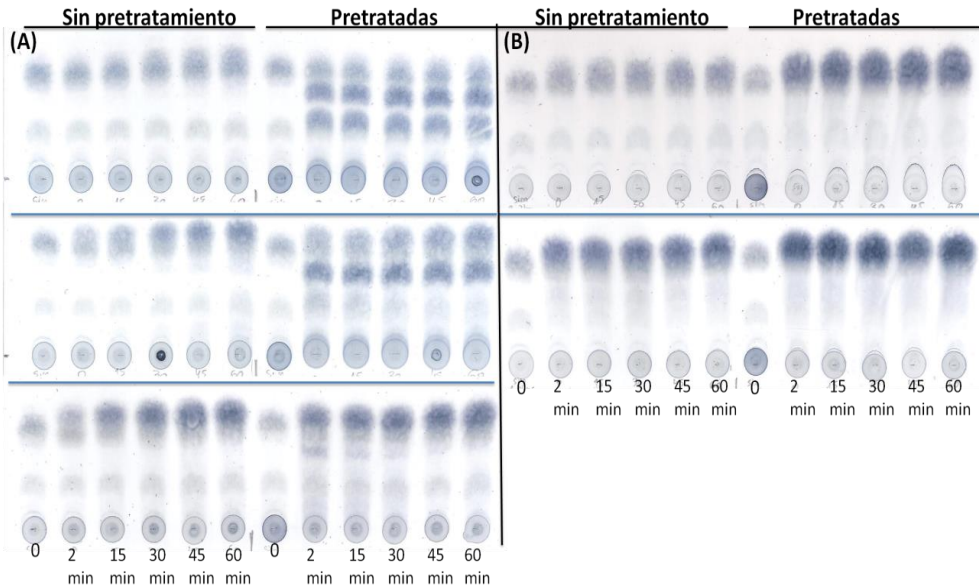


Figura 5.20: Análisis por TLC de las reacciones de la Figura 5.19. (A) Reacciones catalizadas por α -amilasa (450, 45 y 4.5 nl de E/mg (p/s) microalga) y (B) reacciones catalizadas por glucoamilasa (200 y 20 nl de E/mg (p/s) microalga).

En el caso de α -amilasa, se observa mayor presencia de oligosacáridos de distinto tamaño empleando homogeneizado microalgal pretratado, corroborando así, que el pretratamiento térmico facilita el acceso del enzima a distintos puntos de corte. Con glucoamilasa se aprecia un aumento notable de los monosacáridos obtenidos al emplear homogeneizado microalgal pretratado térmicamente. En este caso, no se observa un aumento de los oligosacáridos, por lo que el pretratamiento, no parece hidrolizar el almidón en oligosacáridos de menor tamaño que faciliten la actividad hidrolítica de glucoamilasa, sino que, se demuestra que la pérdida de la rigidez del almidón permite acceder a puntos de corte, que no serían accesibles sin este pretratamiento.

5.2.3.3.2 Efecto de los iones de calcio en la actividad de la α -amilasa

Para estudiar el efecto de los iones de calcio en la α -amilasa se empleó biomasa microalgal pretratada a 90°C durante 5 minutos (Figura 5.21).

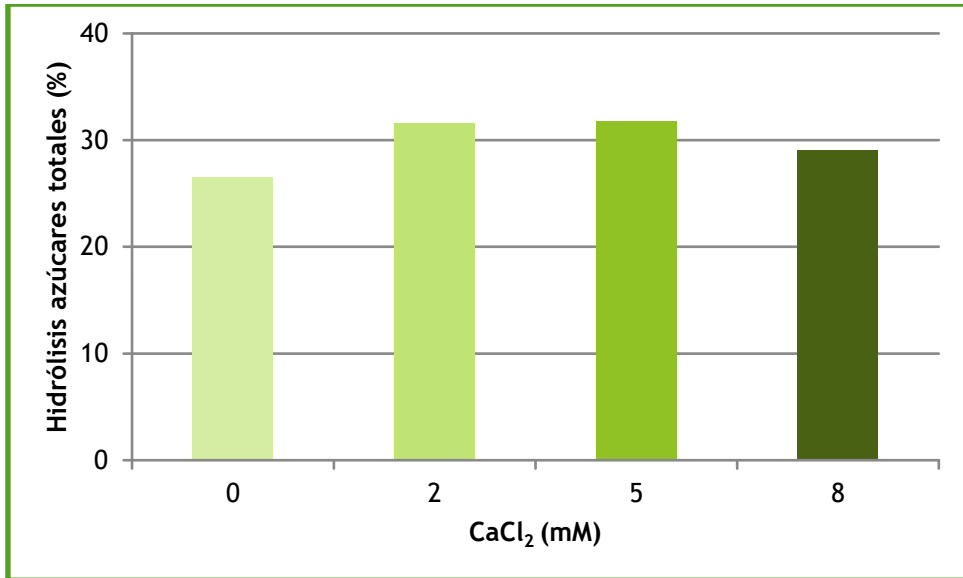


Figura 5.21: Efecto de los iones calcio en la actividad de α -amilasa. Se empleó homogeneizado microalgal (20 mg/ml (p/s)) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) pretratado térmicamente y se añadieron 4.5 ml de E/mg (p/s) de microalga. Se añadieron 0, 2, 5 u 8 mM de CaCl₂. La reacción se llevó a cabo con agitación rotatoria a 40°C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

Los iones de calcio aumentaban mínimamente el rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos cuando se empleaba biomasa microalgal prensada. En los controles (Figura 5.22), se observó que el efecto de los iones calcio era más significativo aumentando en 1 mg/ml la cantidad de azúcares reductores obtenidos. Si se dializaba el enzima este aumento era casi de 1.5 mg/ml.

La adición de iones calcio a α -amilasa, cuando se emplean sustratos modelo, provoca un aumento del rendimiento siendo mayor cuando el enzima está dializado. Esto, es debido a que el Ca²⁺ actúa como activador esencial del

Obtención de Hidrolizados de Polisacáridos empleando Glucosidasas

enzima y al eliminarlo, por diálisis, la actividad del enzima disminuye. Pero si se añade de nuevo recupera prácticamente su actividad inicial.

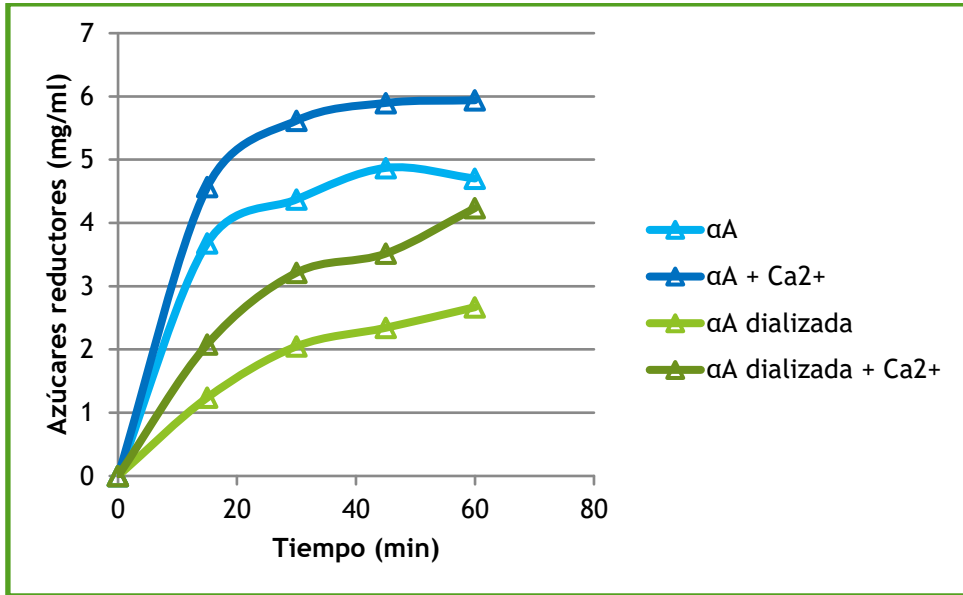


Figura 5.22: Control del efecto de los iones calcio en α -amilasa empleando almidón como sustrato. Se empleó almidón (10 mg/ml) gelificado en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) y se añadieron 10 ml de E/ml de mezcla de incubación dializada y sin dializar. Los iones calcio se añadieron como CaCl_2 a 0 y 2 mM. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 40°C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

La adición de iones calcio no tenía un efecto significativo en el aumento del rendimiento de la hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado microalgal. Se puede suponer, que el propio homogeneizado contiene suficientes iones de calcio, y por ello su adición no provoca un aumento significativo de la actividad del enzima.

Por lo tanto, empleando un homogeneizado microalgal pretratado térmicamente aumenta la actividad de ambas enzimas. Sin embargo, la adición de iones calcio no es relevante en la actividad.

5.2.3.4 Combinación de glucosidasas para hidrolizar polisacáridos de la biomasa microalgal

La combinación de α -amilasa como endohidrolasa y de glucoamilasa como exohidrolasa, debería aumentar el rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el homogeneizado de microalgas pretratadas térmicamente, como ocurría con el almidón gelificado.

Para comprobar esta hipótesis, se estudió la hidrólisis de estos polisacáridos empleando ambos enzimas en combinación, añadidos en distintas proporciones (Figura 5.23).

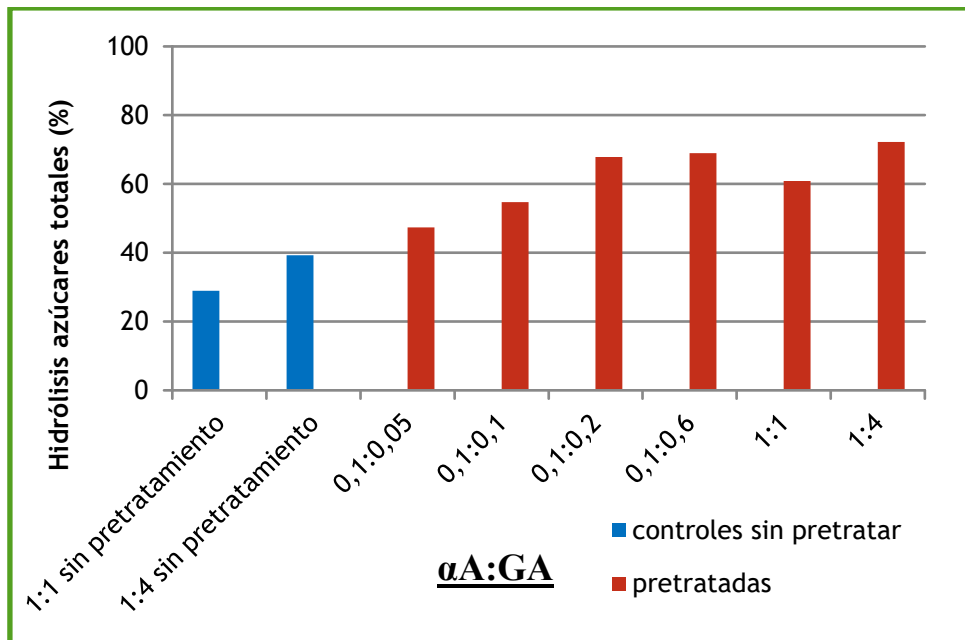


Figura 5.23: Combinación de α -amilasa y glucoamilasa para la hidrólisis de polisacáridos de la biomasa microalga pretratada térmicamente. Se utilizó homogeneizado de microalgas (20 mg (p/s)/ml) en acético-acetato sódico 50 mM a pH 4.5. Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 42.5°C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS. El valor 1 corresponde a 4.5 nl de E/mg (p/s) microalga.

Como se observó empleando almidón gelificado, el aumento de glucoamilasa es el factor principal para obtener un mayor rendimiento de hidrólisis. Por lo tanto, la mayor parte de la hidrólisis de estos polisacáridos la

Obtención de Hidrolizados de Polisacáridos empleando Glucosidasas

cataliza glucoamilasa. Además, en función de la cantidad de glucoamilasa empleada la α -amilasa era prescindible.

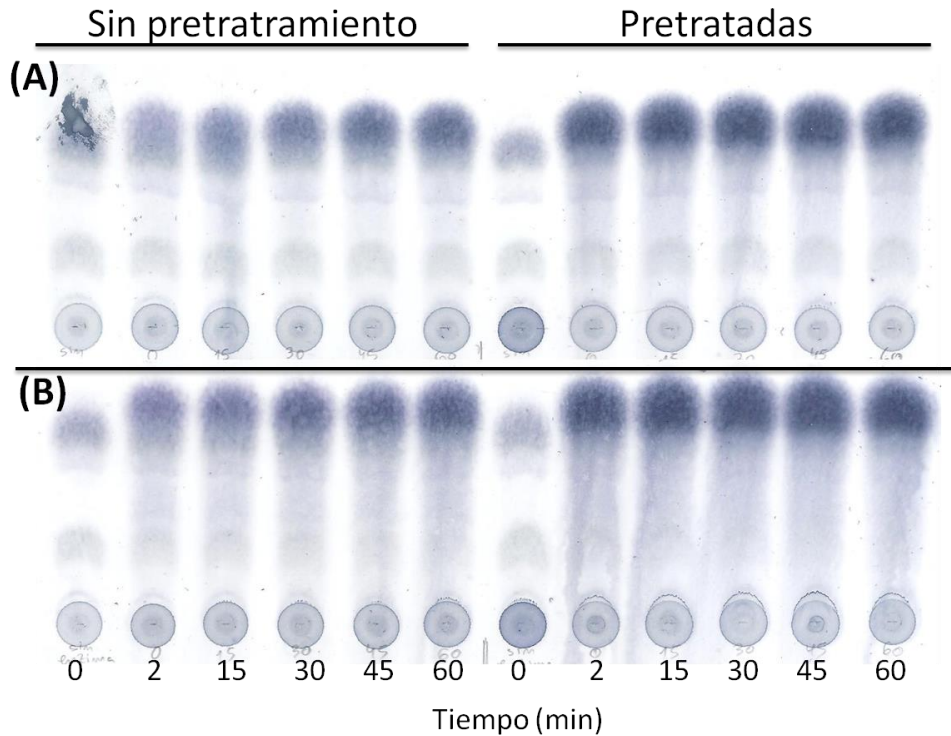


Figura 5.24: Análisis por TLC de las combinaciones 1:1 y 1:4 (α A:GA) con y sin pretratamiento térmico del homogeneizado microalgal (20 mg/ml (p/s)) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). (A) 1:1(α A:GA) y (B) 1:4(α A:GA). Las reacciones se llevaron a cabo con agitación rotatoria a 42.5°C. El valor 1 corresponde a 4.5 ml de E/mg (p/s) microalga.

En ambos casos, se aprecia un aumento de monosacáridos libres al emplear biomasa pretratada térmicamente. Cuando se emplea la estequiometría 1 : 4 (α A:GA), al aumentar la cantidad de glucoamilasa era lógico que aumentaran también los monosacáridos. Pero al emplear la proporción 1 : 1 (α A:GA) debería verse también un aumento de oligosacáridos, ya que el pretratamiento afectaba al rendimiento de los dos enzimas. La Figura 5.24 muestra, que tras el pretratamiento térmico y la combinación de ambos

enzimas la función de α -amilasa en este proceso hidrolítico era prácticamente despreciable.

5.2.4 Hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado microalgal empleando mCLEAs

Finalmente, una vez caracterizados los enzimas con sustratos modelo, y los enzimas solubles con el homogeneizado de microalgas, se estudió la hidrólisis de los polisacáridos presentes en los extractos microalgales empleando mCLEAs de α -amilasa y glucoamilasa.

A la hora de seleccionar el pH, ocurría lo mismo que al emplear enzimas solubles, tras la centrifugación el sobrenadante adquiría color verde a pH superiores a 5, impedimento la medición. Por ello, se seleccionó pH 4.5 como pH óptimo.

5.2.4.1 Efecto del pretratamiento térmico del sustrato

Al igual que con los enzimas solubles, se estudió el pretratamiento térmico del homogeneizado microalgal, ya que con los enzimas solubles había sido un paso crucial para aumentar notablemente el rendimiento de hidrólisis del sustrato.

Conociendo los problemas que habían presentado la mCLEAs en la hidrólisis del almidón gelificado, este paso podía solventar los impedimentos que se producían al hacer más accesible el almidón presente en el homogeneizado.

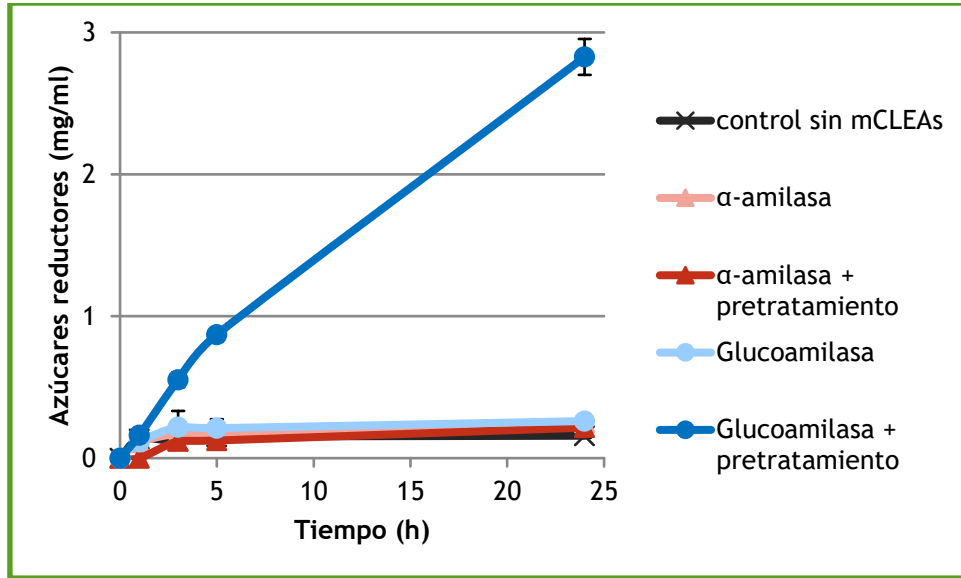


Figura 5.25: Efecto del pretratamiento térmico del sustrato. Se empleó homogeneizado microalgal (20 mg/m) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5) sin pretratar y pretratado a 90°C durante 10 minutos. En todos los casos se añadieron 0.05 mg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) microalga. La reacción se incubó con agitación rotatoria a 55°C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

Como ocurría al emplear almidón como sustrato, la hidrólisis era mínima. En este caso, además, parece que la hidrólisis dependía del tiempo y de la temperatura de incubación. Sin embargo, al realizar el pretratamiento térmico, se triplicaba la actividad de las mCLEAs de glucoamilasa (Figura 5.25).

Se concluyó, que las mCLEAs de α -amilasa, no eran eficientes para hidrolizar los polisacáridos del homogeneizado microalgal. Por lo tanto, se descartó su empleo y se trabajó únicamente con las mCLEAs de glucoamilasa.

5.2.4.2 Determinación de la temperatura óptima

Se caracterizó, nuevamente, la temperatura óptima de las mCLEAs de glucoamilasa, empleando homogeneizado de algas frescas pretratado térmicamente como sustrato (Figura 5.26).

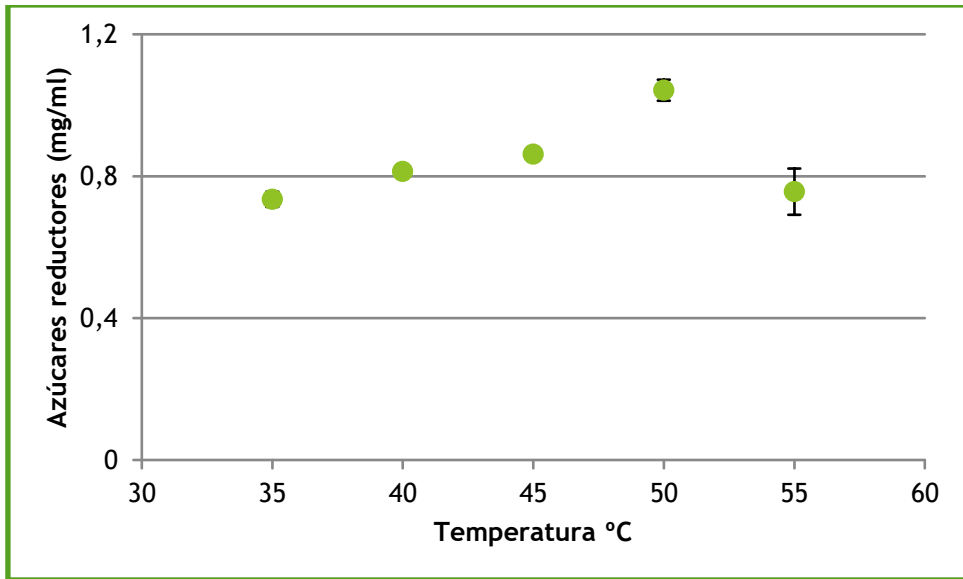


Figura 5.26: Determinación de la temperatura óptima. Se empleó como sustrato homogeneizados microalgales (20 mg (p/s)/ml) en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las reacciones se llevaron a cabo con agitación rotatoria y los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

Empleando homogeneizado microalgal como sustrato, se determinó 50°C como la temperatura óptima para las mCLEAs de glucoamilasa al. Por esto, la temperatura de trabajo de los siguientes experimentos se mantuvo en 50°C.

5.2.4.3 Determinación de la cantidad de mCLEAs de glucoamilasa

Una vez determinados los parámetros experimentales, se estudió la cantidad mínima de mCLEAs necesarias para conseguir el mayor rendimiento en la obtención de azúcares reductores (Figura 5.27).

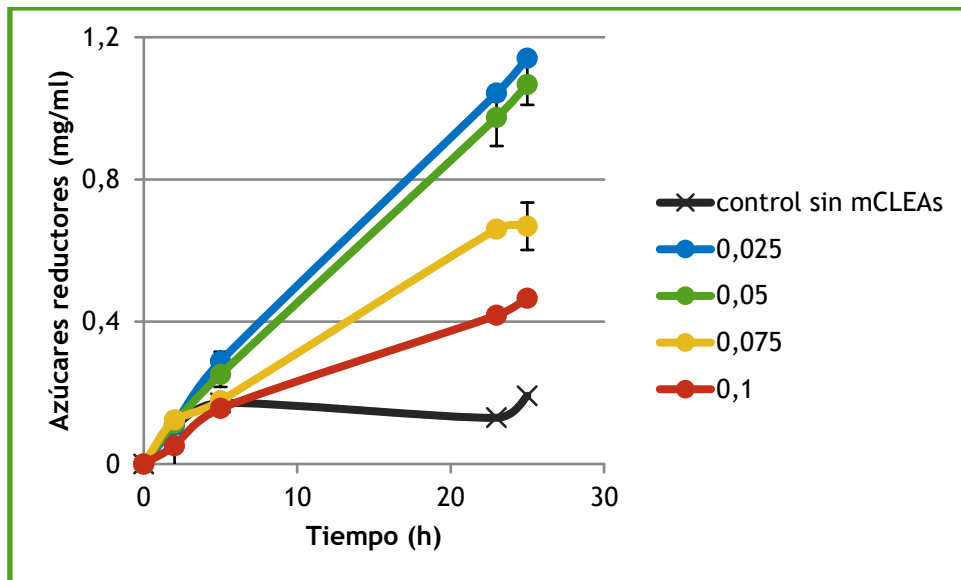


Figura 5.27: Determinación de la cantidad óptima de mCLEAs. Se emplearon 0, 0,025, 0,05, 0,075 y 0,1 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. Se empleó como sustrato homogeneizado microalgal (20 mg (p/s)/ml) pretratado térmicamente en tampón acético-acetato sódico (50 mM, pH 4.5). Las reacciones se incubaron con agitación rotatoria a 50°C. Los azúcares reductores obtenidos se analizaron por el método del DNS.

Se observó hidrólisis espontánea en muestras en las que no se había añadido enzima, debida, probablemente al efecto de la temperatura de incubación, a la agitación y al tiempo. Además, la cantidad de mCLEAs necesaria para obtener el mayor rendimiento era con 0,025 y 0,05 mg (p/s) de mCLEAs/ml de mezcla de incubación. Por otro lado, a medida que se aumentaba la cantidad de mCLEAs, disminuía la obtención de azúcares reductores, probablemente debido a problemas de difusión.

Capítulo VI

Obtención de Hidrolizados de
Proteínas empleando Proteasas

6.1. Introducción

Se define como hidrolizado de proteína a la mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos que se obtienen a partir de fuentes de proteínas por hidrólisis parcial de estas (Schaafsma, 2009). Actualmente, los hidrolizados de proteínas tienen distintas aplicaciones. En alimentación humana se emplean en forma de bebidas energéticas, suplementos deportivos y suplementos dietéticos, entre otros (Frokjaer, 1994). También se están empleando los hidrolizados proteicos en aplicaciones clínicas para tratar distintas enfermedades, así como, herbicidas en la industria agrícola y como suplemento en los piensos de la industria ganadera, principalmente (Clemente, 2000; Christians *et al.*, 1994). En los últimos años ha aumentado mucho la demanda de hidrolizados proteicos para consumo humano de fuentes vegetales (McCarthy *et al.*, 2013).

Se ha identificado a las microalgas como una fuente proteica alternativa, en respuesta a la oferta insuficiente de proteínas de fuentes convencionales, provocada por el aumento de la población mundial (Becker, 2007). Además, contienen proteínas de alto valor nutricional y presentan cantidades similares de proteína al huevo, la soja, la carne y la leche (Fleurence *et al.*, 1999; Gouveia, *et al.*, 2008).

6.1.1. Obtención de proteínas de microalgas

La obtención de las proteínas microalgales supone un proceso largo que abarca desde el cultivo celular hasta la purificación de los metabolitos de interés (Show *et al.*, 2015). Pero, el punto crítico del proceso, se da en el momento de la extracción de las proteínas. Para ello, es necesario romper las envolturas celulares microalgales para permitir el acceso a los componentes

internos (Safi et al., 2014). Como se describe en el Capítulo IV, existen diversos métodos que permiten la ruptura de la pared y envolturas celulares y la obtención de proteínas intracelulares. Finalmente, éstas proteínas pueden ser purificadas mediante precipitación en el punto isoeléctrico, concentración por ultrafiltración tangencial, HPLC o por cromatografía de afinidad (Chiong *et al.*, 2016).

Uno de los factores más importantes, al analizar las proteínas para consumo alimenticio, es su digestibilidad. En el caso de la proteína microalgal este factor es muy pobre (Bleakley y Hayes, 2017). Para aumentar la digestibilidad, se recomienda hidrolizar las proteínas obtenidas de microalgas (Morris, 2008).

6.1.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos presentes en las proteínas, obteniéndose péptidos pequeños y/o aminoácidos libres. Al emplear moléculas de agua en la ruptura de éstos enlaces, las proteasas se clasifican como hidrolasas y pertenecen a la Clase 3. Las proteasas se encuentran en animales, plantas y microorganismos y participan en un gran número de procesos biológicos. Las proteasas se dividen en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas actúan únicamente en los extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas tienen preferencia por los enlaces peptídicos de las regiones internas (Rao *et al.*, 1998) (Tabla 6.1).

Actualmente, las proteasas se emplean en distintos sectores industriales como pueden ser la industria farmacéutica, actuando como dianas de fármacos (Saeki *et al.*, 2007), o la industria biotecnológica como los detergentes (Turk, 2006).

Tabla 6.1: Clasificación de las proteasas (Rao *et al.*, 1998).

Exopeptidasas	Aminopeptidasas
	Carboxipeptidasas
	Omega peptidasas
Endopeptidasas	Serin proteasas
	Cisteín proteasas
	Aspártico proteasas
	Metaloproteasas
	Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido

En éste trabajo se estudiará la hidrólisis de proteínas empleando preparaciones de los enzimas comerciales Alcalase[®] y Neutrase[®] (Novozymes).

6.1.2.1. Alcalase[®]

La Alcalase[®] de *Bacillus licheniformis* (Subtilisina A) (EC 3.4.21.62) pertenece a las serin-endopeptidasas (Figura 6.1). Presenta una especificidad muy amplia, por lo que es capaz de hidrolizar cualquier enlace peptídico (Novozymes). Sin embargo, presenta cierta especificidad, dividida equitativamente, entre el sitio P1 (aminoácido del sustrato que aporta el grupo carbonilo) y el P4.

La Alcalase[®] se emplea desde 1960 en la formulación de detergentes para eliminar las manchas de base proteica (grasa, sangre...) (National Center for Biotechnology Education; Sigma-Aldrich). Éste enzima se ha utilizado, también, para preparar hidrolizados de proteínas óseas de pollo (pierna) con el fin de evaluar los péptidos con actividad inhibidora de la ACE (Angiotensin-I

Converting Enzyme), (Cheng *et al.*, 2009), y en la hidrólisis de extractos de proteínas de *Chlorella pyrenoidosa* durante un estudio de sus actividades antitumorales (Wang y Zhang, 2013).

6.1.2.2. Neutrase®

La Neutrase® de *Bacillus amyloliquefaciens* (Bacilolisina) (EC 3.4.24.28) es una zinc metalo endopeptidasa (Figura 6.1). Es una proteasa relativamente inespecífica que prefiere hidrolizar el extremo amino de aminoácidos hidrofóbicos en el sitio P1. Por otro lado, también facilita la síntesis enzimática de oligopéptidos mediante proteólisis inversa empleando el zinc como catalizador (Novozymes).

La Neutrase® se emplea industrialmente para mejorar las proteínas de origen animal y vegetal, como el reblandecimiento del gluten del trigo (National Center for Biotechnology Education).

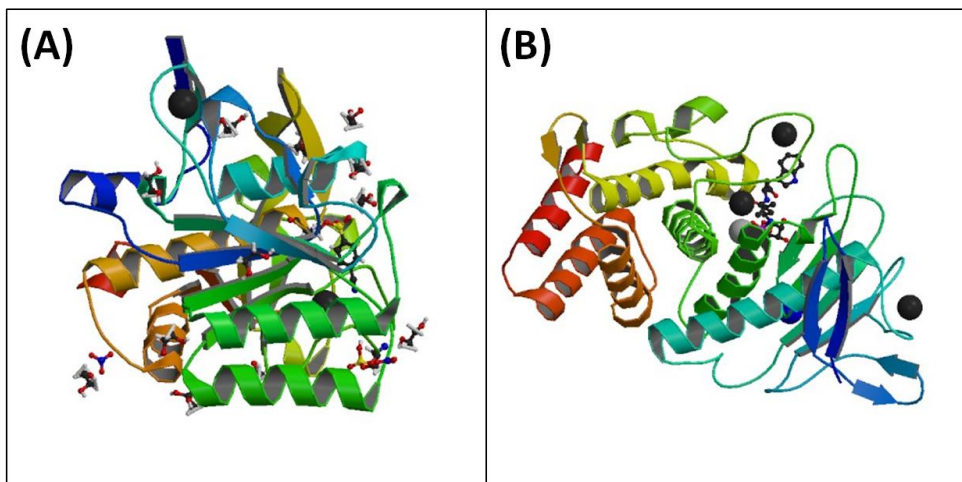


Figura 6.1: Estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X de (A) Alcalase®, subtilisin serin proteasa de *Bacillus licheniformis* (Luo *et al.*, 2019) y (B) Neutrase®, metaloproteasa expresada en *Bacillus amyloliquefaciens* (Ruf *et al.*, 2013).

6.1.2.3. Empleo de proteasas con las microalgas

Actualmente, el empleo de proteasas en microalgas está enfocado en la ruptura de la pared celular para la obtención de los productos intracelulares de las microalgas, principalmente lípidos, como método alternativo a la ruptura empleando disolventes. Aunque se ha demostrado que el empleo de otros enzimas, como la celulasa o la snailasa, son más efectivos a la hora de romper las paredes celulares (Liang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). Además, los métodos físicos como la ultrasonación, muestran mejores resultados que los enzimáticos (Wang y Wang, 2012). Por lo tanto, el empleo de proteasas, como método de ruptura celular, no es el más adecuado.

Sin embargo, se ha observado que un pretratamiento de la biomasa microalgal mediante el empleo de proteasas, muestra el mejor rendimiento para solubilizar los compuestos orgánicos de las microalgas, para la producción de metano por digestión anaerobia (Magdalena *et al.*, 2018).

6.2. Resultados y discusión

Una vez cosechadas las microalgas y obtenidas las mCLEAs de Alcalase[®] *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62) (Novozymes) y de Neutrase[®] de *Bacillus amyloliquefaciens* (EC 3.4.24.28) (Novozymes), se optimizó la hidrólisis de proteínas. Para ello, se caracterizaron los enzimas solubles y sus mCLEAs empleando como sustrato modelo caseína desnaturalizada. Posteriormente, se estudió la hidrólisis de proteínas de la fracción soluble del homogeneizado microalgal, tanto con enzimas solubles como inmovilizados en mCLEAs, ajustando los parámetros necesarios para obtener el mayor rendimiento.

Para facilitar la comprensión, a lo largo del Capítulo se asignarán los siguientes símbolos: ◇ Alcalase[®] soluble, ◆ Alcalase[®] en mCLEAs, □ Neutrase[®] y ■ Neutrase[®] en mCLEAs.

6.2.1. Caracterización de los enzimas solubles empleando sustratos modelo

Se realizó un análisis por SDS-PAGE, de los preparados comerciales de Alcalase[®] y Neutrase[®], para conocer la presencia de otros enzimas y/o proteínas contaminantes (Figura 6.2).

Mediante este análisis se puede observar que los enzimas comerciales no presentan una contaminación muy elevada de otras proteínas. Las bandas principales que aparecen en el gel coinciden con la masa molecular de los enzimas de trabajo, siendo Alcalase[®] 29,5 kDa y Neutrase[®] 46 kDa (Vasantha *et al.*, 1984).

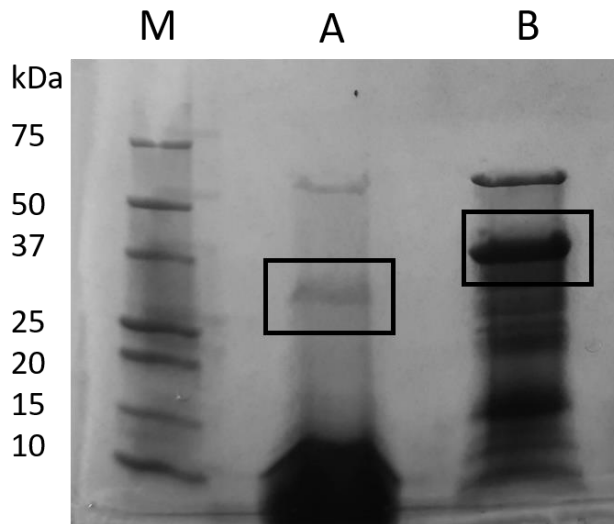


Figura 6.2: Análisis por SDS-PAGE de los enzimas comerciales. (M) Marcador de baja masa molecular, (A) Alcalase® de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62) y Neutrase® de *Bacillus amyloliquefaciens* (EC 3.4.24.28).

Finalmente, se analizó con el reactivo de Bradford la concentración (mg/ml) total de proteína presente, siendo 48.09 mg/ml en la Alcalase® y 14.82 mg/ml en la Neutrase®.

6.2.1.1. Determinación del pH óptimo de actividad

El pH de los enzimas solubles se determinó en un intervalo de 5.7 a 11.0 para la Neutrase® y de 7.5 a 13.0 para la Alcalase® (Figura 6.3).

La actividad óptima de los enzimas se determinó a pH 8.0 en tampón Tris/HCl (50 mM) para la Neutrase® y pH 12.7 en tampón KCl/NaOH (50 mM) para la Alcalase®.

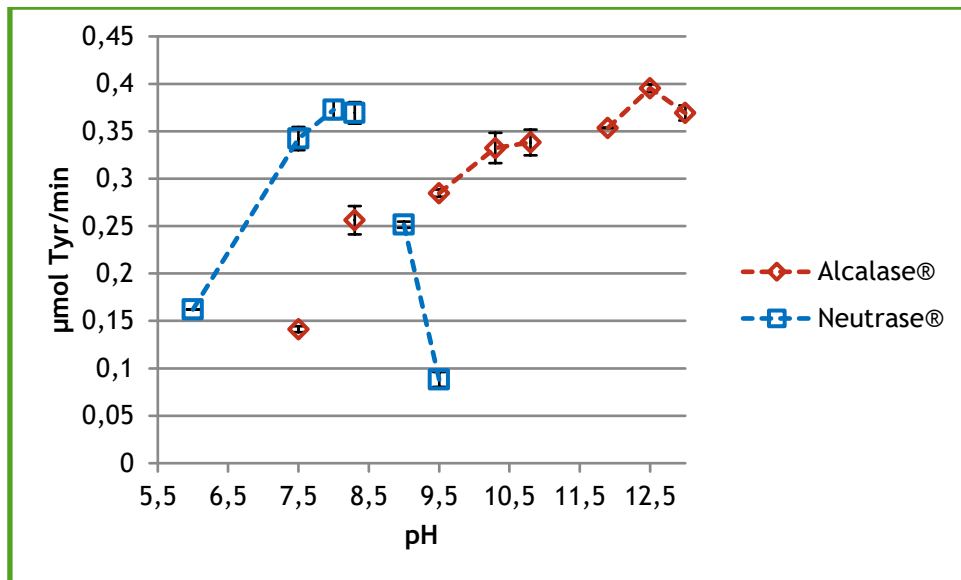


Figura 6.3: Determinación del pH óptimo de actividad de la Neutrase® y de la Alcalase®. Se empleó caseína (10 mg/ml) desnaturalizada en tampón fosfato 850 mM pH 5.7-8.0, Tris/HCl (50 mM) pH 8.0-8.5 y tampón carbonato/bicarbonato (50 mM) pH 9.0-11.0 para la Neutrase® y en tampón fosfato (50 mM) pH 7.0, tampón Tris /HCl (50 mM) pH 8.0, tampón carbonato/bicarbonato (50 mM) pH 9.0-11.0 y tampón KCl/NaOH (50 mM) pH 12.0-13.0 para la Alcalase®. Se añadieron 9 μ l de E/ml de mezcla de incubación de Neutrase® y 4 μ l de E/ml de mezcla de incubación para la Alcalase®. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

6.2.1.2. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para determinar la temperatura óptima de actividad de ambas proteasas se estudiaron distintas temperaturas en un intervalo de 30 a 50°C (Figura 6.4).

La temperatura óptima de actividad se determinó en 35°C para la Alcalase® y en 40°C para la Neutrase®.

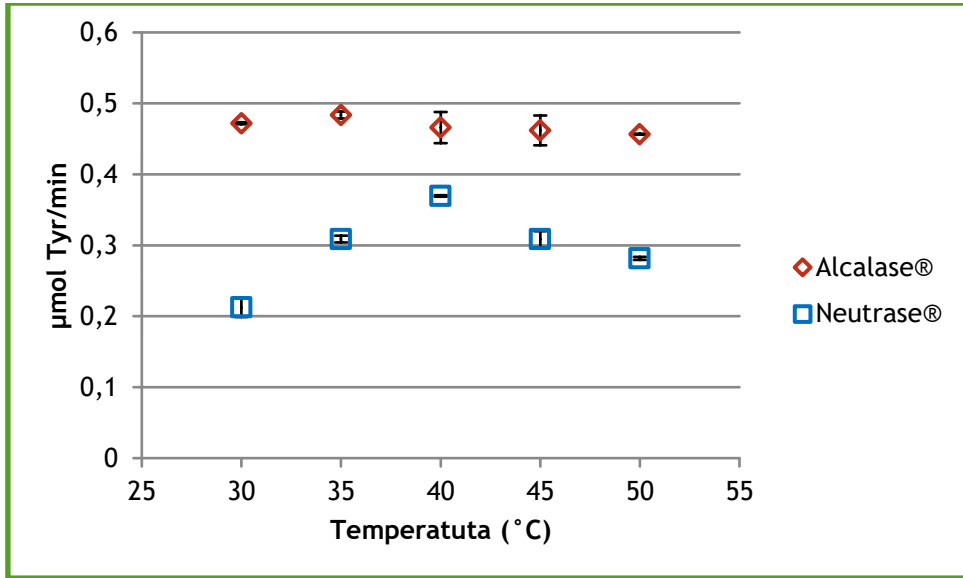


Figura 6.4: Determinación de la temperatura óptima de actividad de Alcalase® y Neutrase®. Se empleó como sustrato caseína (10 mg/ml) desnaturalizada en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) para la Alcalase® y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0) para la Neutrase®. Se añadieron 280 nl de E/ml de mezcla de incubación en ambos casos y se incubaron las reacciones durante 30 minutos. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

6.2.1.3. Determinación de la cantidad de enzima

Tras seleccionar el pH y la temperatura óptima de trabajo, se determinó la cantidad óptima de enzima (Alcalase® o Neutrase®) para obtener la mayor hidrólisis de proteína (Figura 6.5).

Se determinó que la cantidad óptima de enzima para la obtención del mayor grado de hidrólisis de proteína era 500 nl de E/ml de mezcla de incubación para la Alcalase® y 1 μl de E/ml de mezcla de incubación para la Neutrase®.

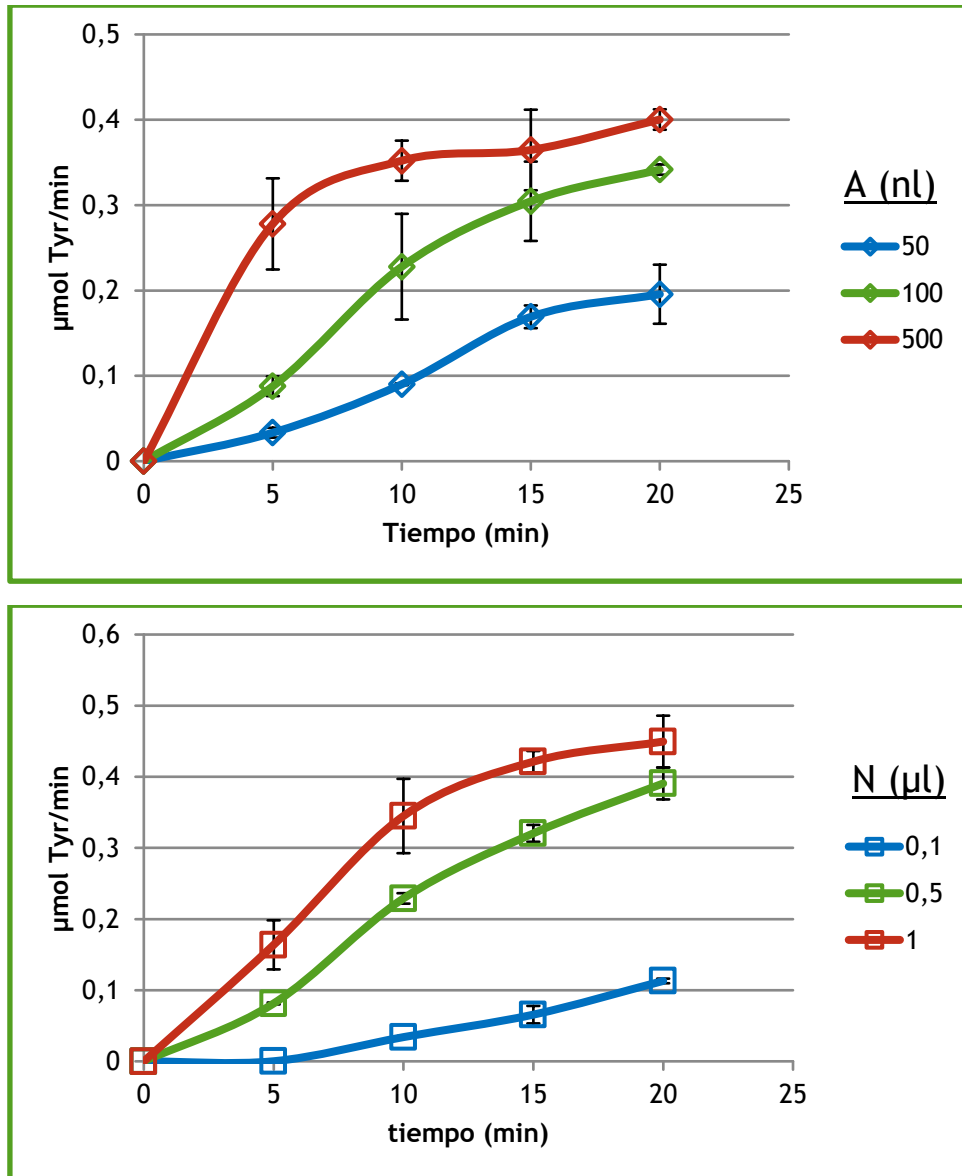


Figura 6.5: Determinación de la cantidad óptima de enzima. Se empleó caseína (10 mg/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) para la Alcalase® y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8) para la Neutrase®. Se añadieron entre 50-500 nl de E/ml de mezcla de incubación o 0.1-1 µl de E/ml de mezcla de incubación, respectivamente. Las muestras se incubaron 20 minutos a 35°C para la Alcalase® y 40°C para la Neutrase®. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

Se necesita casi el doble de Neutrase® que de Alcalase® para obtener una cantidad similar de µmoles de Tirosina. Esto se debe a la amplia especificidad

Obtención de Hidrolizados de Proteínas empleando Proteasas

que presenta ésta última, mientras que la Neutrase® presenta mayor inespecificidad y prefiere hidrolizar por los extremos amino de aminoácidos hidrofóbicos, reduciendo así su rendimiento.

6.2.1.4. Determinación de la actividad enzimática

Para determinar la afinidad de las proteasas se estudió la velocidad (v) frente a la concentración de sustrato (caseína hervida mg/ml) empleada (Figura 6.6)

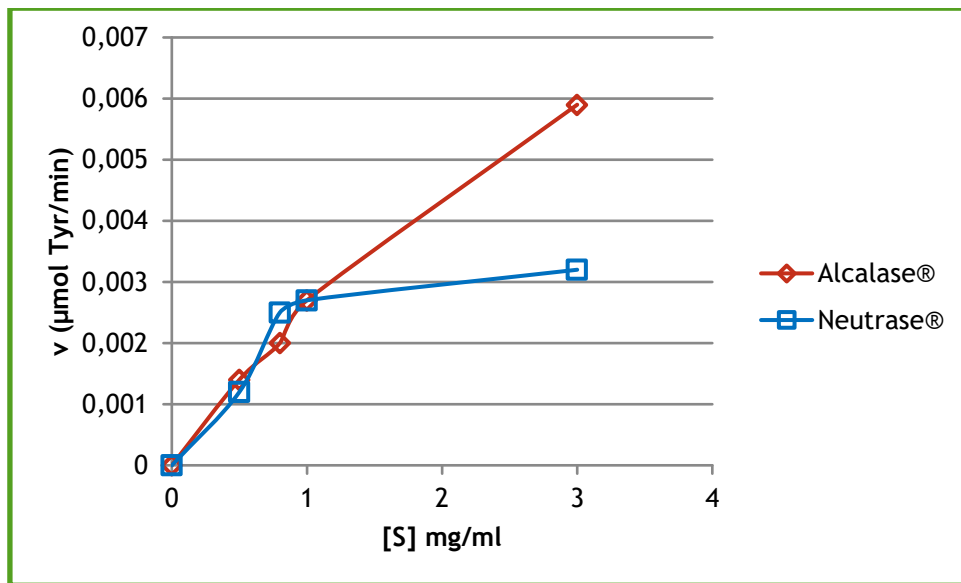


Figura 6.6: Representación directa de v frente a $[S]$. Se varió la concentración de caseína de 0.5 a 3 mg/ml en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) y 28 nl de E/ml de mezcla de incubación para la Alcalase®, y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8) y 100 nl de E/ml de mezcla de incubación para la Neutrase®. Las muestras se incubaron a 35 y 40°C, respectivamente y se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

A partir de la representación directa v vs $[S]$ por regresión no lineal a una hipérbola, y por regresión lineal a una doble recíproca ($1/v$ vs $1/[S]$) se determinaron los parámetros cinéticos K_m y la V_{max} de ambas enzimas comerciales (Tabla 6.2).

Tabla 6.2: V_{max} y K_m de Alcalase® y Neutrase® calculada por regresión lineal y no lineal.

	Alcalase®		Neutrase®	
	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal
V_m (nmol Tyr/min)	16.6	17	6.8	8.3
K_m (mg/ml)	5.44	5.44	2.26	2.61

Con estos datos queda demostrado que la Neutrase® presenta menor actividad que Alcalase®, esto es debido a las distintas especificidades de los enzimas. Así, la Alcalase® puede hidrolizar los mismos enlaces, y en los mismos lugares que Neutrase®, y otros más. De esta forma, la Alcalase® permite hidrolizar más enlaces por lo que la hidrólisis del sustrato se da más rápidamente.

6.2.2. Caracterización de mCLEAs empleando sustratos modelo

Para la caracterización de las mCLEAs de Alcalase® y Neutrase® se empleó dextrina hervida como sustrato. Al hervir la dextrina aumentaba su viscosidad que suponía un problema para la correcta difusión de las mCLEAs en la mezcla de reacción.

6.2.2.1. Determinación del pH óptimo de actividad

Se determinó el pH óptimo de actividad de las mCLEAs de ambas proteasas empleando distintos tampones y pH (Figura 6.7).

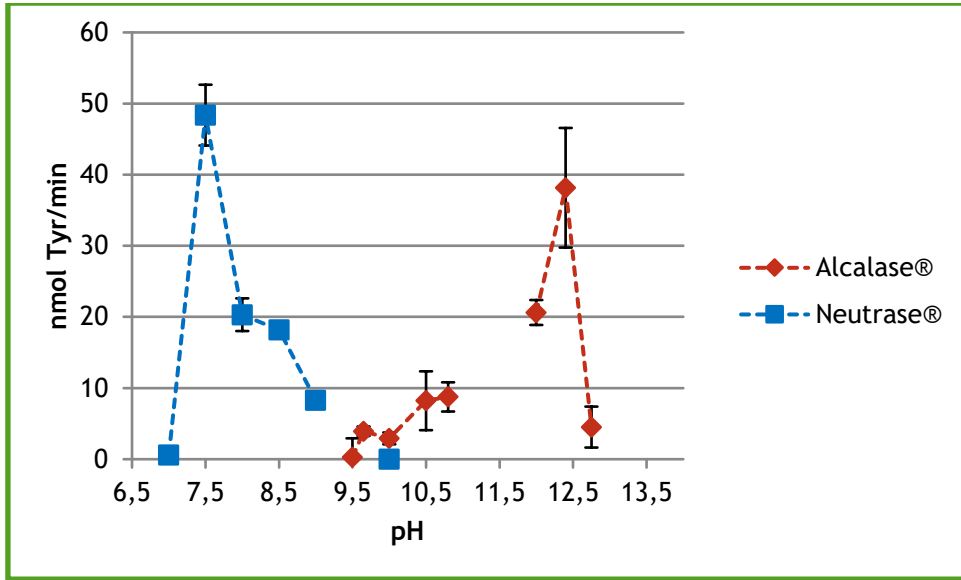


Figura 6.7: Determinación del pH óptimo de actividad. Se preparó caseína (10 mg/ml) en tampón carbonato-bicarbonato sódico (50 mM, pH 9.5-10.8) o en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12-12.75) y se añadieron 0.3 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación de mCLEAs de Alcalase® y se incubaron durante 30 minutos. Y caseína (5 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 7.0-9.0) o carbonato-bicarbonato sódico (50 mM, pH 10.0) con 0.4 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación de mCLEAs de Neutrase® y se incubaron durante 3 horas. Todas las reacciones se mantuvieron a 55°C y se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

La viscosidad del medio, que impide la correcta difusión de las mCLEAs, y la poca especificidad de la Neutrase® reducen aún más su actividad con respecto a la Alcalase®. Por ello, las mCLEAs de Neutrase® se incubaron durante 3 horas para poder determinar correctamente su pH óptimo de actividad.

Se determinó el pH óptimo de Alcalase® en 12.5 y de la Neutrase® en 7.5.

6.2.2.2. Determinación de la temperatura óptima

Se estudiaron distintas temperaturas entre 40 y 60°C para determinar la temperatura óptima de actividad de ambas proteasas comerciales (Figura 6.8).

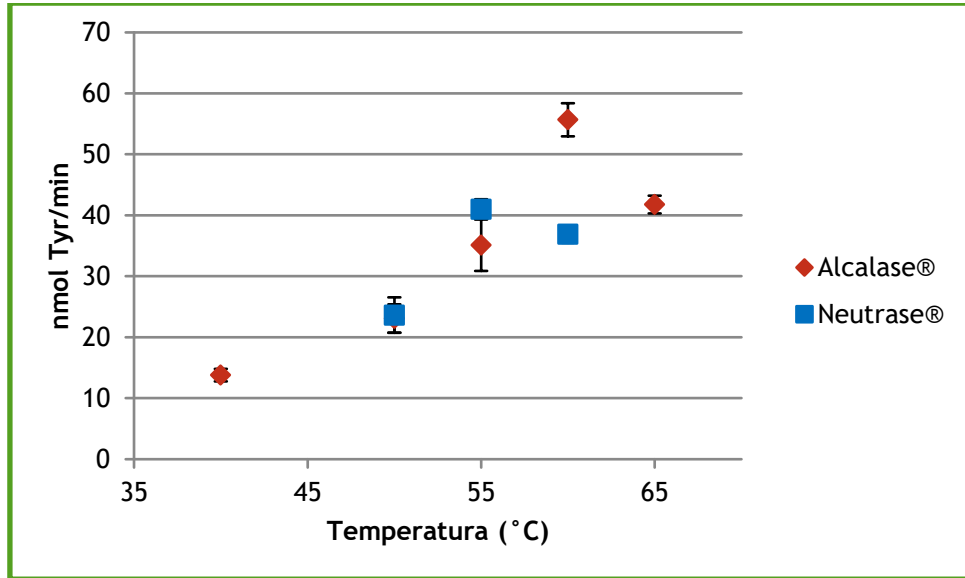


Figura 6.8: Determinación de la temperatura óptima de actividad. Se empleó caseína (10 mg/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.5) y 0.3 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación de Alcalase®, y caseína (5 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 7.5) con 0.4 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación de Neutrase®. Las reacciones se incubaron durante 1 hora entre 40 y 65°C. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

La temperatura óptima de actividad se determinó en 55°C para la Neutrase® y en 60°C para la Alcalase®. Al considerarse 60°C una temperatura demasiado alta se decidió incubar las reacciones de Alcalase® a 55°C.

6.2.2.3. Selección de la cantidad de mCLEAs

Se emplearon distintas cantidades de mCLEAs de Alcalase® y Neutrase®, para la hidrólisis de caseína desnaturalizada por ebullición, con el fin de determinar la cantidad mínima de mCLEAs necesarias para la hidrólisis máxima del sustrato (Figura 6.9).

Para la Alcalase®, 0.3 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación, se obtenía la mayor cantidad de nmol de Tyr/min y aumentando más la cantidad de mCLEAs no aumentaba la cantidad de Tyr. Por lo tanto con 0.3 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación era suficiente. En el caso de la Neutrase®, la cantidad

Obtención de Hidrolizados de Proteínas empleando Proteasas

de caseína (mg/ml) era la mitad con el fin de disminuir la viscosidad y aumentar la difusión de las mCLEAs. Aun así, la cantidad de Tyr/min obtenida al de 15 minutos, era mucho menor que con la Alcalase[®], debido a la falta de especificidad del enzima mencionada anteriormente.

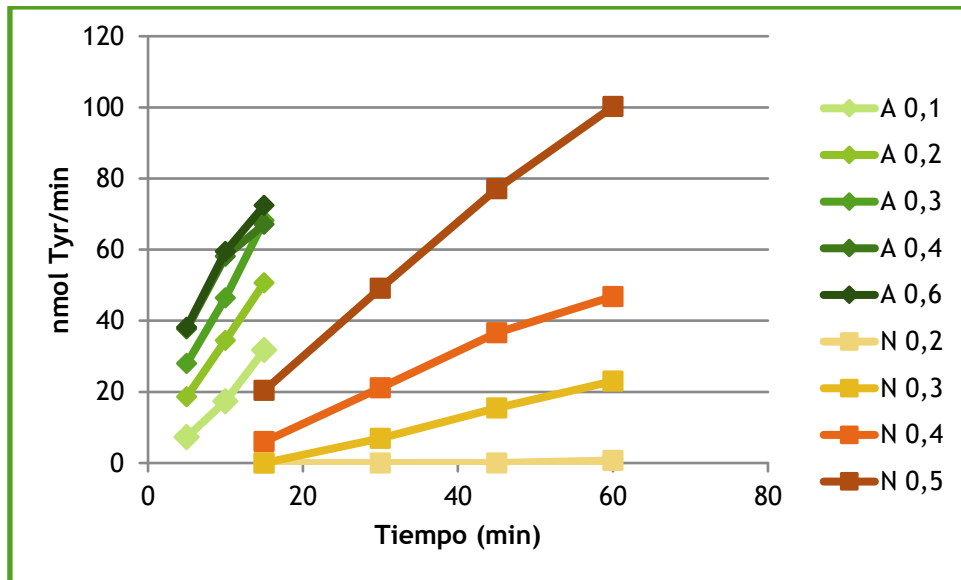


Figura 6.9: Efecto de la cantidad de mCLEAs en la hidrólisis de caseína. Se empleó caseína (10 mg/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM) a pH 12.7 para la Alcalase[®] y caseína (5 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM) a pH 7.5 para la Neutrase[®]. La cantidad de mCLEAs se varió entre 0.1 y 0.6 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación. Las muestras se incubaron entre 10 y 60 minutos a 55°C y se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

Las reacciones con Neutrase[®] se incubaron durante 1 hora para observar diferencias aceptables en la obtención de Tyr. La cantidad óptima de mCLEAs de Neutrase[®] que proporcionaba mayor cantidad de Tyr/min era 0.5 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación. Pero añadir una cantidad tan alta de mCLEAs, puede provocar problemas de difusión de éstas, más aún, si se aumenta la concentración de caseína. Por lo tanto, se seleccionó 0.4 mg (p/s)/ml de mezcla de incubación para la Neutrase[®] para evitar éstos problemas.

6.2.2.4. Selección del tipo de agitación

Para evitar los problemas de difusión de las mCLEAs en la mezcla de reacción y aumentar su rendimiento de hidrólisis, se probó a variar el tipo de agitación. Se comparó la agitación mecánica en un brazo agitador con una agitación magnética más fuerte (Figura 6.10).

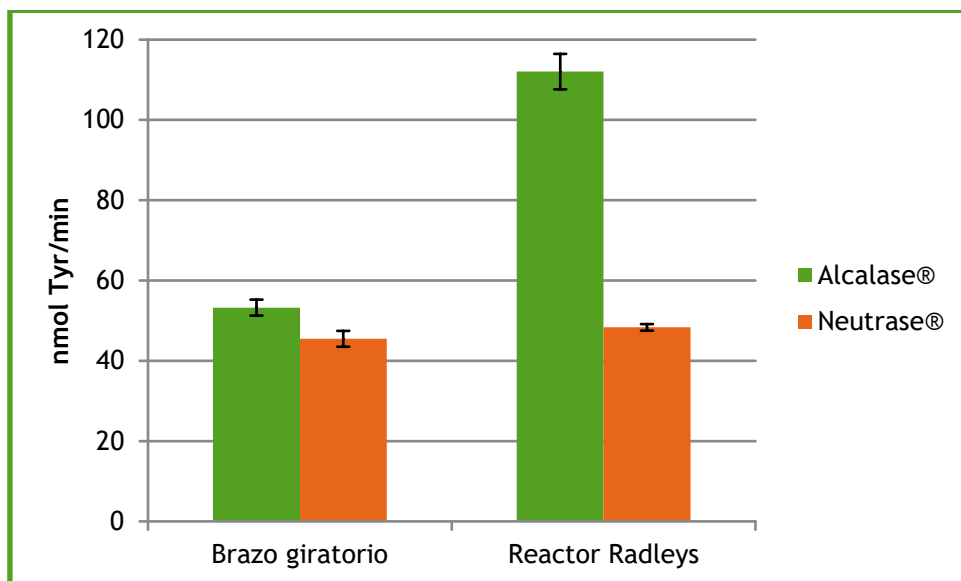


Figura 6.10: Selección del tipo de agitación. Se emplearon 0.3 mg (p/s)/ ml de mezcla de incubación de mCLEAs de Alcalase® y 0.4 mg (p/s)/ ml de mezcla de incubación de mCLEAs de Neutrase® para hidrolizar caseína (10 mg/ml) en tampón KCL/NaOH (50 mM, pH 12.7) y caseína (5 mg/ml) en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 7.5), respectivamente. Las reacciones se incubaron a 55°C en un brazo agitador o en el reactor Radleys, durante 20 minutos para la Alcalase® y 1 hora para la Neutrase®. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

El reactor Radleys, al tratarse de una agitación magnética, provoca una agitación más vigorosa facilitando la difusión de las mCLEAs. En el caso de las mCLEAs de Neutrase® no se obtuvo ningún resultado relevante. Por otro lado, se observó que la agitación magnética aumentaba al doble el rendimiento de las mCLEAs de Alcalase®. Pero tras la reacción, las mCLEAs quedaban dañadas o adheridas al imán, por lo que, posteriormente no podrían ser

reutilizadas. Se determinó, así, que era más importante la recuperación de las mCLEAs que el aumento del rendimiento de la hidrólisis.

6.2.3. Hidrólisis de proteína del extracto soluble de microalgas empleando Alcalase® y Neutrase® solubles

Se estudió la hidrólisis de las proteínas solubles presentes en el homogeneizado de microalgas centrifugado, empleando Alcalase® y Neutrase® solubles ya caracterizadas con sustratos modelo. Para ello, se optimizó el proceso, basándose en lo obtenido anteriormente, y caracterizando nuevamente los enzimas con el sustrato a emplear.

6.2.3.1. Detección de las proteínas mayoritarias mediante LC-MS/MS

Se analizaron por LC-MS/MS las bandas de proteína mayoritarias en el extracto microalgal soluble. Las bandas seleccionadas fueron las correspondientes a 25 kDa y 50 kDa (Figura 6.11).

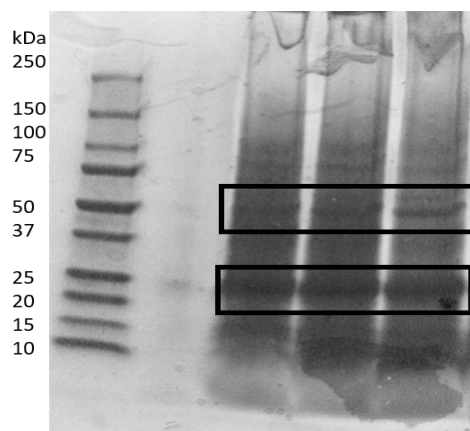


Figura 6.11: Análisis por SDS-PAGE del extracto soluble de microalgas. Los recuadros marcan las bandas mayoritarias a 50 y 25 kDa después de teñirse con Azul de Coomassie.

Mediante el análisis por LC-MS/MS, se determinó que la proteína presente más abundante a 50 kDa correspondía a la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) tanto del cloroplasto, como de plástidos. También se detectaron distintas ATP sintasas y proteínas del sistema fotosintético. La banda correspondiente a 25 kDa presentaba una mayor cantidad de proteínas diversas con una presencia mayoritaria de ATP sintasas y proteínas del sistema fotosintético.

6.2.3.2. Determinación del pH óptimo de actividad

Considerando los resultados obtenidos anteriormente con caseína, se estudió el pH óptimo de actividad de ambas proteasas comerciales empleando homogeneizado microalgal centrifugado como sustrato (Figura 6.12).

Se determinó el pH óptimo de actividad para la Alcalase[®] en 12.7 y para la Neutrase[®] en 8.0. Los valores de Tyr/min de la Neutrase[®] están sobreestimados debido al color verde que presentan los sobrenadantes de las muestras y que interfieren en la medición.

6.2.3.3. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se estudió la temperatura óptima de actividad de ambas proteasas comerciales con el fin de seleccionar la temperatura adecuada para que se produzca el mayor rendimiento en la hidrólisis enzimática del sustrato, sin que se produzca una participación significativa de hidrólisis química provocada por la temperatura (Figura 6.13).

En el caso de la Alcalase[®] se aprecia un aumento notable en la hidrólisis a 35°C, seleccionándose ésta temperatura como óptima para el enzima. En el caso de la Neutrase[®], las diferencias de hidrólisis no son tan significativas,

Obtención de Hidrolizados de Proteínas empleando Proteasas

aunque se aprecia un ligero aumento a 40°C, por lo que se seleccionó este valor como su temperatura óptima de actividad.

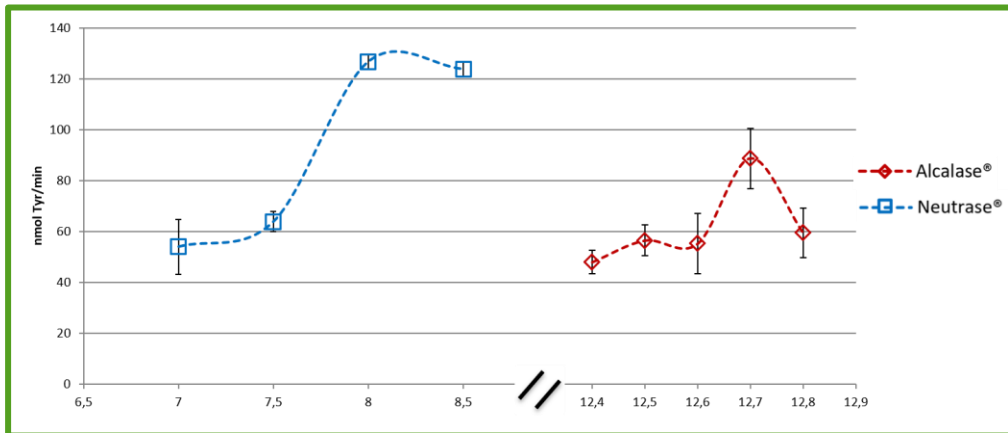


Figura 6.12: Determinación del pH óptimo de actividad. Se empleó homogeneizado microalgal (20 mg (p/s)/ml) centrifugado en tampón KCl/NaOH (50 mM) a pH entre 12.4 y 12.8 para la Alcalase®, o tampón Tris/HCl (50 mM) a pH entre 7.0 y 8.5 para la Neutrase®. Se añadieron 0.5 µl de Alcalase®/mg (p/s) de microalga o 1 µl de Neutrase®/mg (p/s) y se incubaron durante 1 hora a 37 y 55°C, respectivamente. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

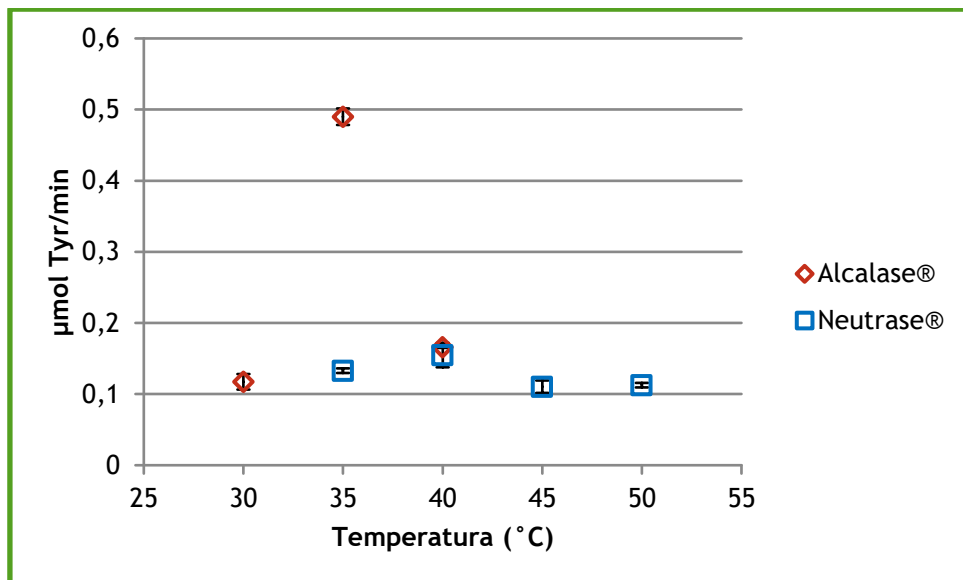


Figura 6.13: Determinación de la temperatura óptima de actividad. Se empleó como sustrato biomasa microalgal (20 mg (p/s)/ml) centrifugada en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) para la Alcalase® y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0) para la Neutrase®. Se añadieron 50 nl de E/mg microalga (p/s) o 1 µl de E/mg microalga (p/s), respectivamente. Las reacciones se incubaron durante 1 hora entre 30 y 50°C. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

6.2.3.4. Determinación de la cantidad óptima de enzima

Para seleccionar la cantidad óptima de enzima se estudiaron distintas cantidades de Alcalase® y de Neutrase® en la hidrólisis del homogeneizado soluble de biomasa microalgal (Figura 6.14).

La inespecificidad de la Neutrase® también se observa en la hidrólisis de la proteína soluble del homogeneizado microalgal, necesitándose 250 veces más enzima que con Alcalase®. Por otro lado, la hidrólisis llevada a cabo por esta última es más rápida, necesitándose menos horas para llegar a los mismos valores de $\mu\text{mol Tyr}/\text{min}$. Por lo tanto, se seleccionó como cantidad óptima de enzima 5 nl de E/mg (p/s) microalga para la Alcalase® y 2 μl de E/ mg (p/s) microalga para la Neutrase®.

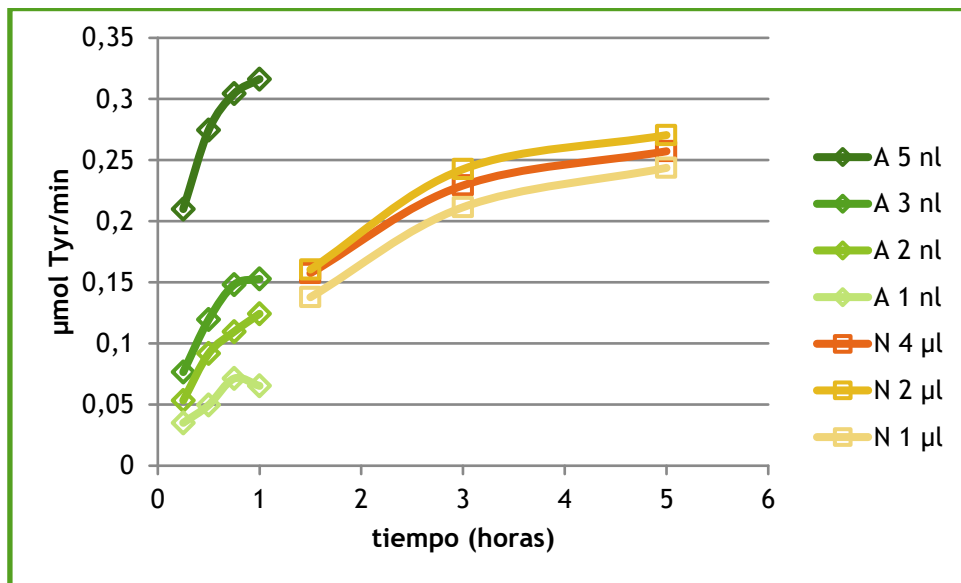


Figura 6.14: Selección de la cantidad óptima de enzima. Se empleó homogeneizado soluble de biomasa microalgal (20 mg (p/s)/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) para la Alcalase® y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0) para la Neutrase®. Se emplearon distintas cantidades de E/mg (p/s) microalga y se incubaron entre 1 y horas a 35 y 40°C respectivamente. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

Para seguir la hidrólisis de la proteína soluble del homogeneizado microalgal, se cargaron geles de poliacrilamida para separar por SDS-PAGE muestras a distintos tiempos de reacción. Se observó la desaparición de la banda de 50 kDa que corresponde, en su mayoría, a la subunidad grande de la Rubisco (Figura 6.15).

Lo primero que se observa, es que durante el tiempo de reacción no se produce hidrólisis espontánea del sustrato. La banda correspondiente a 50 kDa, desaparece más rápidamente al añadir Alcalase[®] que Neutrase[®]. Por otro lado, en el gel de la Neutrase[®] se observa que, además de la hidrólisis de la proteína sustrato se produce una hidrólisis del propio enzima. Por lo tanto, al analizar la hidrólisis de proteína soluble del homogeneizado microalgal, empleando Neutrase[®], la cantidad de Tyr/min medida por el método de Anson y Folin-Ciocalteu, se sobreestima la hidrólisis real del sustrato.

De ésta forma, se demostró que la actividad de la Alcalase[®], para la hidrólisis de la proteína soluble del homogeneizado microalgal, era mucho más eficiente que la Neutrase[®], empleándose menor cantidad de enzima y obteniendo mayor cantidad de producto en menos tiempo.

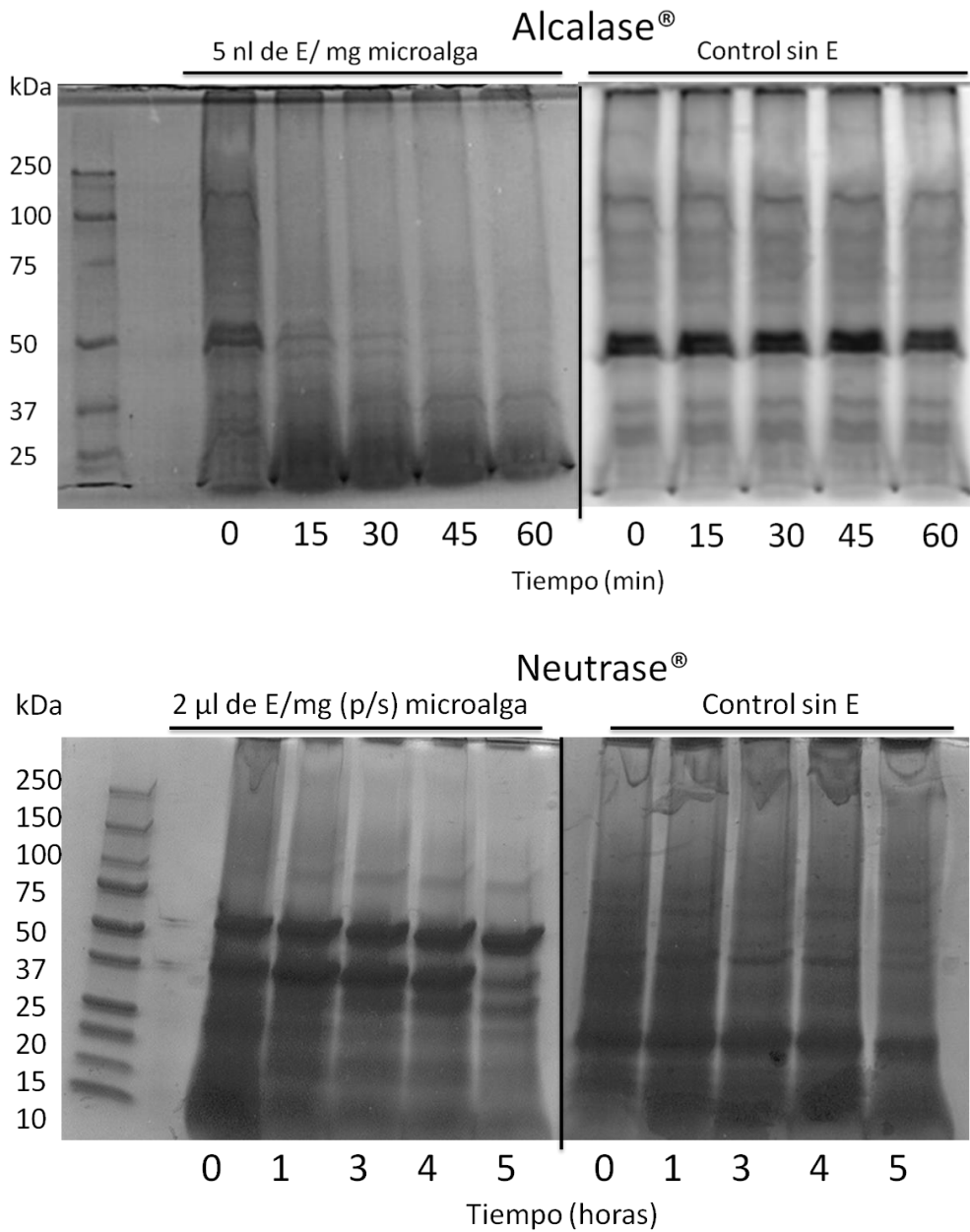


Figura 6.15: Análisis por SDS-PAGE de la hidrólisis de la proteína soluble del homogeneizado de microalgas en condiciones óptimas de pH, temperatura y cantidad de enzima. La banda de 50 kDa corresponde, en su mayoría, a la subunidad grande de la Rubisco. En el gel de la Neutrase® aparecen entre 37 y 50 kDa, y entre 50 y 75 kDa las bandas correspondientes al enzima. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

6.2.4. Hidrólisis de proteínas del extracto soluble de microalgas empleando mCLEAs

Finalmente, una vez caracterizados los enzimas con sustratos modelo y los enzimas solubles con la fracción soluble del homogeneizado microalgal, se estudió la hidrólisis de las proteínas solubles presentes en los sobrenadantes de extractos microalgales empleando mCLEAs de Alcalase® y de Neutrase®.

6.2.4.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Inicialmente, se determinó la temperatura óptima de actividad de ambos tipos de mCLEAs (Figura 6.16)

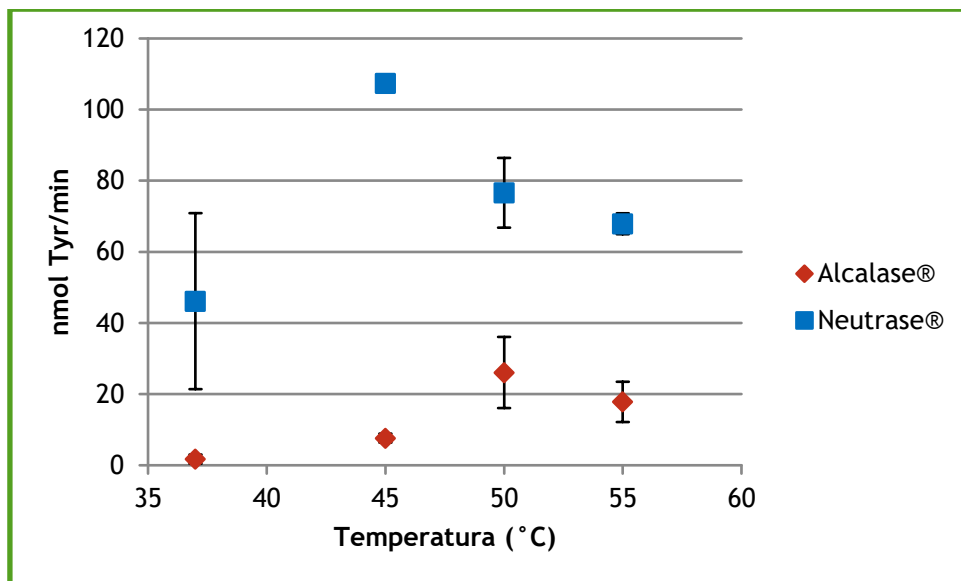


Figura 6.16: Determinación de la temperatura óptima de actividad. Se empleó como sustrato la fracción soluble del homogeneizado de microalgas (20 mg/ml) en tampón KCl/NaOH (50 mM, pH 12.7) para la Alcalase® y en tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0) para la Neutrase®. Se añadieron 0.57 mg (p/s)/mg (p/s) de microalga de cada tipo de mCLEAs y se incubaron durante 24 horas entre 37 y 55°C. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

Se determinó como temperatura óptima de actividad 50 °C para las mCLEAs de Alcalase® y 45°C para as mCLEAs de Neutrase®. En el caso de las mCLEAs de Neutrase® la cantidad de Tyr/ml estaba sobreestimada, debido a la coloración verde que presentaban las muestras, tanto con mCLEAs como los controles sin enzima, y que interferían en el método colorimétrico de análisis (Figura 6.17).

Como se observa en la Figura 6.17, la gran mayoría de la actividad del enzima está sobreestimada por la coloración verde de las muestras. Los controles sin enzima presentaban la misma coloración, por lo que la actividad real de las mCLEAs de Neutrase® correspondería a la resta de la medición sin mCLEAs y con mCLEAs.

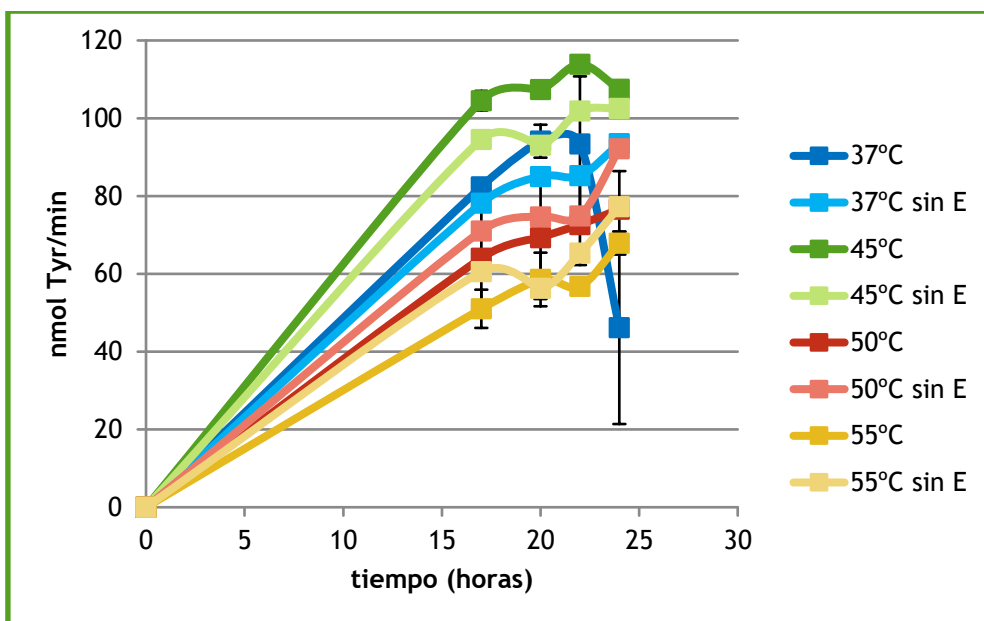


Figura 6.17: Análisis de la temperatura óptima de actividad de las mCLEAs de Neutrase® y sus controles sin enzima durante 1 hora. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

6.2.4.2. Determinación del pH óptimo de actividad

Finalmente, se determinó el pH óptimo de actividad de las mCLEAs (Figura 6.18). Muchas veces la coloración verde de las muestras depende del pH al que se encuentren, por lo que éste era un pasó determinante a la hora de analizar el rendimiento de hidrólisis catalizada por las mCLEAs.

Como se observa en la Figura 6.18, la cantidad de Tyr/min correspondiente a las mCLEAs de Neutrase[®] no parece diferenciarse de la obtenida en los controles sin mCLEAs. Por otro lado, las mCLEAs de Alcalase[®] presentan actividad en comparación con sus controles, aunque esta actividad también parece sobreestimada.

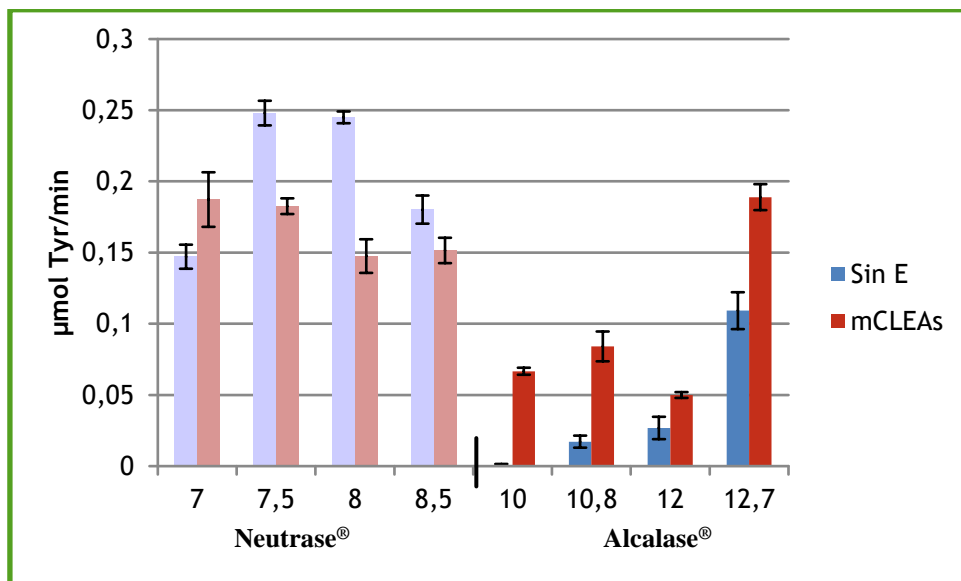


Figura 6.18: Determinación del pH óptimo de actividad. Se empleó como sustrato la fracción soluble del homogeneizado de microalgas (20 mg/ml) en tampón carbonato/bicarbonato sódico (50 mM) a pH 10.0 y 10.8 y tampón KCl/NaOH (50 mM) a pH 12.0 y 12.7 para la Alcalase[®], y en tampón Tris/HCl (50 mM) a pH entre 7.0 y 8.5 para la Neutrase[®]. En ambos casos se añadieron 1.14 mg (p/s)/mg (p/s) de microalga de mCLEAs y se incubaron durante 24 horas a 50 y 45°C, respectivamente. Las muestras se analizaron por el método de Anson y Folin-Ciocalteu.

Para observar la actividad real se analizaron las muestras con mCLEAs y sin ellas a los distintos pH mediante SDS-PAGE (Figura 6.19).

Como se observa en los geles, no existe diferencia entre la hidrólisis obtenida con mCLEAs y sin ellas. Por lo tanto, se puede deducir que la hidrólisis obtenida es consecuencia de la temperatura y el tiempo de incubación.

El empleo de mCLEAs de Alcalase[®] y de Neutrase[®] para la hidrólisis de proteína soluble del homogeneizado microalgal no resulta útil, ya que las mCLEAs no parecen presentar actividad, o es muy baja, hidrolizándose la proteína únicamente por el efecto del tiempo y la temperatura.

Por tanto, se puede concluir, que la hidrólisis de la proteína soluble de las microalgas es posible si el enzima se emplea en forma soluble, sobre todo en el caso de Alcalase[®] ya que necesita muy poca cantidad de enzima. Se observa también, que las mCLEAs quedaban contaminadas con restos de extracto microalgal, pudiendo ser ésta la razón de la pérdida de su actividad. Ya que la actividad de las mCLEAs parece no verse afectada al emplear sustratos modelo, podría ser una solución extraer únicamente la proteína de las microalgas sin otros contaminantes que puedan interferir en su actividad.

Obtención de Hidrolizados de Proteínas empleando Proteasas

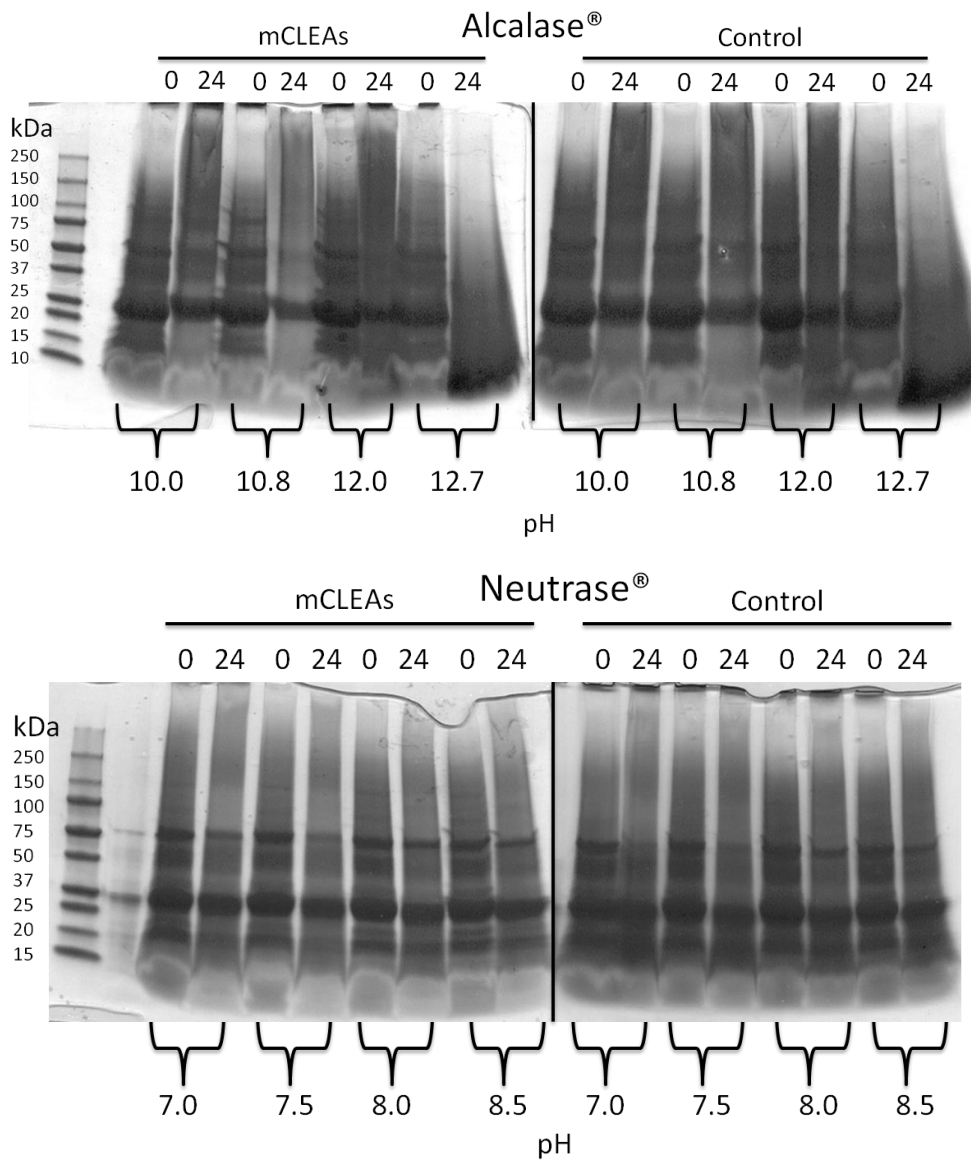


Figura 6.19: Análisis por SDS-PAGE de la hidrólisis de la proteína soluble del extracto microalgal (20 mg/ml), a distintos pH con mCLEAs de Alcalase® y de Neutrase® y sin mCLEAs durante 24 horas.

Capítulo VII

Deslipidación de las microalgas

7.1 Introducción

EL biodiesel se ha convertido en uno de los biocarburantes de mayor interés, debido a la disminución de las reservas de los depósitos de combustibles fósiles. Además, presenta varias ventajas respecto a los combustibles convencionales: provienen de fuentes renovables, están libres de tóxicos de azufre y presentan mayor lubricidad (Aransiola *et al.*, 2014). El 69% del biodiesel se produce a partir de aceites vegetales (Naylor y Higgins, 2017). Esto genera un gran dilema al emplear fuentes comestibles para la producción de biodiesel que, además, necesitan grandes extensiones de cultivo que a la larga no serán sostenibles. Todo esto, ha llevado a los investigadores a las microalgas, cuyos aceites son considerados como el biodiesel de tercera generación (Goh *et al.*, 2019).

Las microalgas contienen lípidos neutros que se pueden emplear para producir biodiesel. Generalmente, estos organismos no producen una gran cantidad de lípidos en condiciones normales, pero en condiciones de estrés esta cantidad tiende a aumentar (Nogueira *et al.*, 2015).

7.1.1 Extracción de los lípidos microalgales

Existen un gran número de métodos para la extracción de lípidos en microalgas, que se pueden dividir en procesos mecánicos y no mecánicos. Estos métodos permiten la ruptura de la pared celular para liberar las moléculas de interés (Capítulo IV).

A gran escala el método más empleado, es la extracción con disolventes (etanol, metanol, hexano y cloroformo) que permite la separación específica de los lípidos de forma sencilla y con un bajo gasto energético. Por otro lado, estos disolventes son productos de gran toxicidad, que afectan de forma

negativa al medio ambiente y pueden afectar a la calidad y disolver otros productos de interés (Mubarak *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017).

Se han estudiado varios procesos de extracción lipídica con disolventes, de los cuales los que mejores resultados han obtenido para la extracción en microalgas son los siguientes (Tabla 7.1) (Picó *et al.*, 2018):

Tabla 7.1: Resumen de resultados de los métodos más empleados para la extracción de lípidos en microalgas. Se muestran los disolventes empleados, así como, la temperatura, el tiempo empleados en el proceso y los rendimientos en porcentajes (Picó, 2017).

Método de extracción	Disolventes empleados	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Lípidos (%)	TAGs (%)
Matraz agitado	Cloroformo:metanol (2:1, v/v)	72°C	1h	25%	12.8%
Saponificación directa	Etanol y KOH n-Hexano	65°C	3h	34.7%	96%

Estos procesos presentan resultados prometedores para extraer los lípidos en microalgas, sin prestar atención al resto de productos de interés. Dado que el proceso de biorrefinería busca la obtención y el empleo de proteínas y polisacáridos microalgales, conocer el efecto de estos procesos en el resto de productos de interés parece crucial para considerarlos eficientes.

7.2 Resultados y discusión

Se delipidizaron células de *C. vulgaris* mediante los procesos anteriormente mencionados por Picó *et al.* (2018) para seguir el efecto que tenían en proteínas y polisacáridos microalgales y su posterior hidrólisis.

7.2.1 Análisis de los lípidos extraídos

Se realizó un análisis por TLC (Figura 7.1) de los lípidos extraídos en matraz agitado y por saponificación para determinar de forma cualitativa qué método resultaba más adecuado.

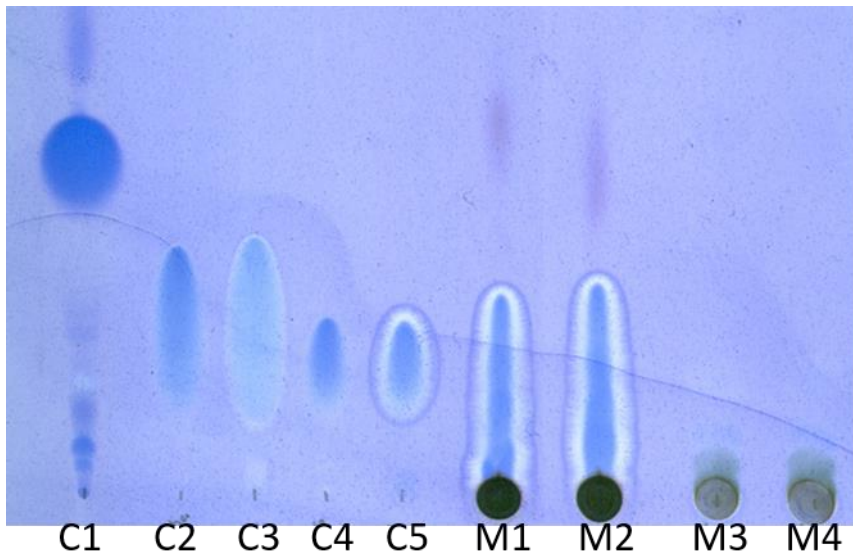


Figura 7.1: Cromatografía en capa delgada de los lípidos extraídos de las microalgas. La fase móvil contenía n-hexano:acetato de etilo:ácido acético (90:10:1, v/v/v) y las placas se tiñeron por inmersión durante 1 minuto en Coomassie Blue R-350 al 0.02% (p/v) en metanol:ácido acético:DW (3:1:6, v/v/v). (C1) Aceite de oliva virgen extra Carbonell® (C2) Ácido palmítico (C3) Ácido mirístico (C4) Ácido esteárico (C5) Ácido oleico (M1; M2) Fracción saponificable de la saponificación directa (M3; M4) Lípidos extraídos mediante matraz agitado.

Como se muestra en la Figura 7.1, empleando la saponificación directa, la extracción lipídica era más eficiente como indicó Picó (2017). Por lo tanto,

se seleccionó este método para estudiar su efecto en las proteínas y los polisacáridos microalgales.

7.2.2 Análisis de proteínas

Una vez deslipidizadas las células, y tras prensarlas, se estudió el efecto del proceso de deslipidación en las proteínas. Para ello, se analizaron por SDS-PAGE extractos de células sin deslipidizar y deslipidizadas, así como el lavado con agua realizado a estas últimas (Figura 7.2).

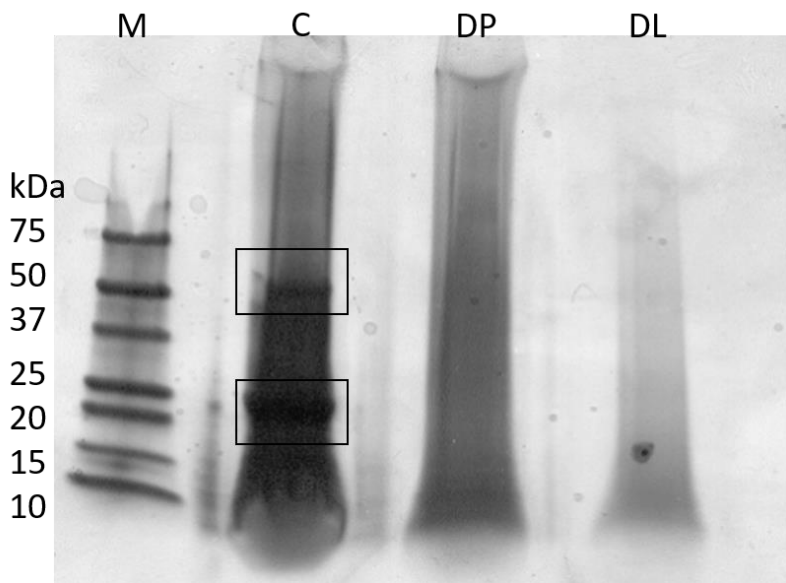


Figura 7.2: SDS-PAGE de las proteínas tras deslipidizar las células. Se empleó la fracción soluble de células prensadas, tanto deslipidizadas como sin deslipidizar. Enmarcadas en rectángulos aparecen las bandas correspondientes a la proteína soluble del extracto microalgal. (M) Marcador de proteínas de baja masa molecular (C) Fracción soluble de células prensadas sin deslipidizar (DP) Fracción soluble de células prensadas deslipidizadas (DL) Lavado de las células deslipidizadas.

Mediante este análisis, se observó que tras deslipidizar las células las bandas correspondientes a la proteína soluble del extracto microalgal desaparecían. Como se observa en la Figura 7.2, la banda de Rubisco desaparecía en ambas muestras de las células deslipidizadas. Se analizaron las

muestras por el método Folin-Ciocalteu (1927) para observar la presencia de compuestos fenólicos. Este análisis no detectó ninguno de estos compuestos, por lo que la hipótesis de la hidrólisis de las proteínas microalgales por el empleo de disolventes quedó descartada. De esta forma, se dedujo que, las proteínas microalgales se extrajeron en alguna de las fases de la extracción lipídica.

De esta forma, se demuestra que la extracción de lípidos con disolventes orgánicos afecta de forma negativa a las proteínas.

7.2.3 Análisis de polisacáridos

El análisis de polisacáridos se llevó a cabo midiendo los azúcares totales presentes en las células (Figura 7.3).

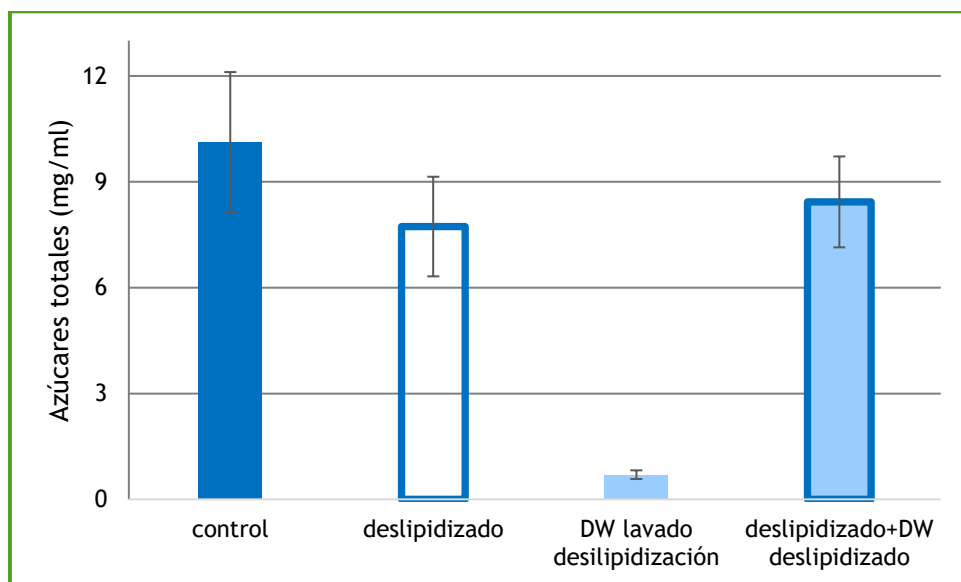


Figura 7.3: Azúcares totales presentes en células tratadas medidos por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951). El control corresponde al homogeneizado de microalgas sin deslipidizar, el deslipidizado a la fracción soluble de las muestras deslipidizadas, el DW al lavado realizado a las células deslipidizadas y finalmente la suma de las dos fracciones correspondientes a las células deslipidizadas.

Según la Figura 7.3, la deslipidación no parece afectar significativamente a los polisacáridos celulares. Por tanto, los polisacáridos podrían emplearse en un posterior proceso de hidrólisis enzimática.

7.2.4 Hidrólisis de polisacáridos

Tras comprobar la presencia de polisacáridos en las células deslipidizadas, se realizó la hidrólisis de estos mediante glucosidasas optimizado en el Capítulo V. Para ello, se empleó como sustrato el homogeneizado de microalgas deslipidizado y sin deslipidizar.

7.2.4.1 Glucosidasas solubles

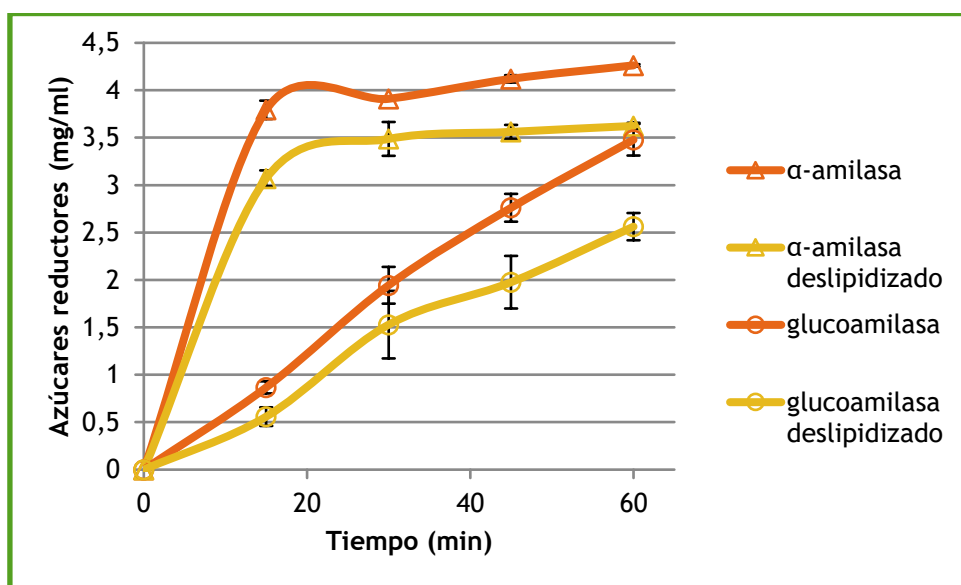


Figura 7.4: Hidrólisis de polisacáridos de células deslipidizadas y sin deslipidizar catalizada por glucosidasas. Se añadieron 4.5 nl de α -amilasa/mg (p/s) de microalgas y 2 nl de glucoamilasa/ mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 40° y 45°C, respectivamente. Las muestras se analizaron por el método del DNS.

Como se observa en la Figura 7.4, la obtención de azúcares reductores empleando como sustrato homogeneizado de microalgas deslipidizadas es

menor que empleando células sin deslipidizar. Parece que la cantidad de azúcares totales y la hidrólisis de estos polisacáridos no difiere mucho entre las células deslipidizadas y las que contienen lípidos. De esta forma, se comprueba que la hidrólisis de polisacáridos con glucosidasas solubles es perfectamente viable empleando células deslipidizadas.

7.2.4.2 mCLEAs de glucoamilasa

Finalmente, tras comprobar que la hidrólisis con enzimas solubles era efectiva, se pasó a estudiar la hidrólisis de estos polisacáridos de células deslipidizadas, empleando las mCLEAs de glucoamilasa, siguiendo los parámetros optimizados en el Capítulo V.

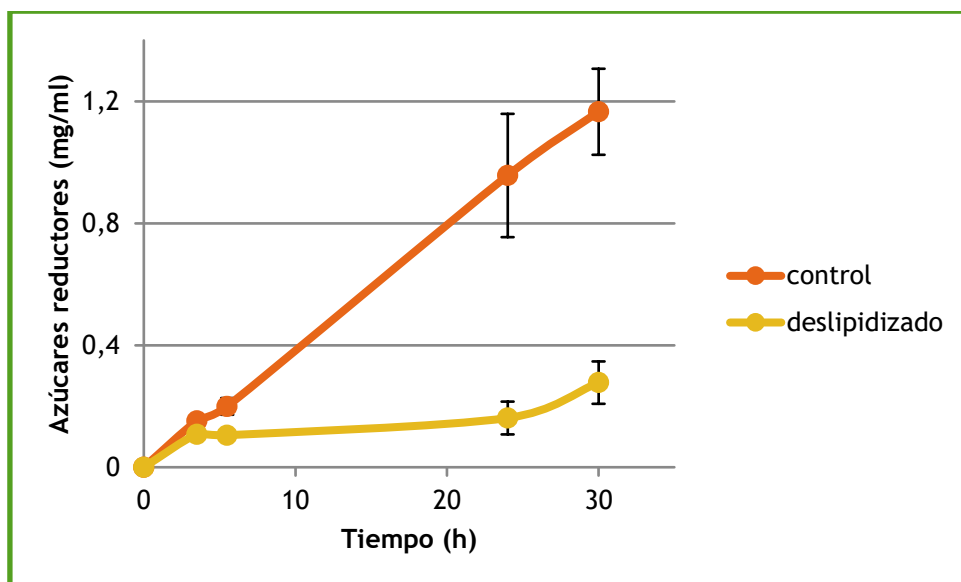


Figura 7.5: Hidrólisis de polisacáridos del homogeneizado de microalgas deslipidizadas y sin deslipidizar empleando mCLEAs de glucoamilasa. Se añadieron 25 μg (p/s) de mCLEAs/mg (p/s) de microalga. Las reacciones se incubaron durante 30 horas a 50°C. las muestras se analizaron por el método del DNS.

La Figura 7.5 muestra una disminución importante de la obtención de azúcares reductores empleando mCLEAs de glucoamilasa en el homogeneizado de microalgas deslipidizado.

Durante el proceso de deslipidación, el sedimento deslipidizado que se obtiene al final es una pastilla muy compacta cuya resuspensión en medio acuoso es compleja. Es posible que esta compactación final, también provoque la compactación de los almidones presentes. De esta forma, aun pretratando la muestra térmicamente, los almidones no llegan a disolverse correctamente. Por ello, la cantidad de azúcares totales no varía mucho, pero la hidrólisis de los polisacáridos sí. Empleando enzimas solubles se aprecia una ligera disminución de la actividad debida, posiblemente, a que los enzimas no pueden acceder a las cadenas del almidón de la misma forma que en las células no deslipidizadas. En el caso de las mCLEAs, esta disminución de actividad es mucho más notable, las mCLEAs son estructuras más grades por lo que tendrán mayores problemas para acceder a estas cadenas del almidón.

Capítulo VIII

Discusión General

La crisis energética, el cambio climático y el agotamiento de fuentes energéticas naturales ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes energéticas como pueden ser las microalgas. Pero el empleo de microalgas solo para la producción de biocombustibles no es viable económicamente. Por lo tanto, la extracción de otros metabolitos de interés presentes en las microalgas, como carbohidratos o proteínas, puede ser una solución. Además, la optimización de la cosecha de microalgas, la extracción de sus productos de interés y su tratamiento son factores cruciales para reducir los costes de la biorrefinería.

En este trabajo, se han cosechado células de *C. vulgaris* por centrifugación y se han extraído la biomasa intracelular mediante prensado. Se han obtenido hidrolizados de proteínas y polisacáridos del homogeneizado microalgal. La hidrólisis se ha llevado a cabo mediante el empleo de las proteasas comerciales Alcalase[®] (3.4.21.62) y Neutrase[®] (3.4.24.28) y de las glucosidasas comerciales α -amilasa (3.2.1.1) y glucoamilasa (3.2.1.3). Se han sintetizado mCLEAs de estos enzimas, siendo las mCLEAs de glucoamilasa las únicas funcionales. Finalmente se ha demostrado que la extracción lipídica empleando disolventes orgánicos tóxicos es muy eficiente para extraer los lípidos microalgales, pero provoca la pérdida o destrucción de otros metabolitos de interés disminuyendo, así, la rentabilidad del proceso.

Uno de los factores más importantes en la biorrefinería de las microalgas es la cosecha celular, ya que supone el 30% de la inversión económica del proceso (Jankowska *et al.*, 2017) (Milledge y Heaven, 2013). Aunque se han estudiado distintos métodos de cosecha, actualmente se ha prestado bastante atención a la cosecha de microalgas empleando nanopartículas magnéticas (MNPs), que se unen rápidamente a las células y permiten su fácil separación del medio (Schwertmann y Cornell, 2007; Prochazkova *et al.*, 2012). Son varios los factores que afectan a este proceso, como la concentración celular en el medio, el volumen final del medio, y la cantidad de MNPs empleadas,

obteniendo una mejor cosecha cuando la concentración celular es mayor para el mismo volumen, cuando el volumen es menor para la misma concentración celular, y cuando se emplea mayor cantidad de MNPs. Por otro lado, el pH del medio parece ser un factor crucial a la hora de cosechar las microalgas que, además, varía dependiendo del tipo de microalga que se quiera cosechar (Xu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2019). De esta forma, los pH ácidos facilitan la cosecha de células de *C. vulgaris*. Sin embargo, la imposibilidad de desorber las microalgas de las MNPs impide la reutilización de estas últimas lo que hace que este proceso no sea factible, ya que se necesitan más estudios para comprender el tipo de interacciones que ocurren entre las MNPs y las microalgas (Wang *et al.*, 2015). A escala de laboratorio la cosecha de microalgas mediante centrifugación, y la posterior extracción de la biomasa microalgal mediante prensado, permite obtener tanto las proteínas como los polisacáridos intracelulares de las microalgas de forma óptima y sin daños en los compuestos. Pero, el proceso a mayor escala sería muy lento y costoso.

Las microalgas presentan gran cantidad de polisacáridos hidrolizables, que pueden emplearse en distintos campos, pero, sobre todo, tienen gran interés en la producción de bioetanol (Bibi *et al.*, 2017). La hidrólisis enzimática de estos carbohidratos es más productiva y ventajosa que los métodos químicos (Choi *et al.*, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2011). El empleo de glucosidasas presenta un rendimiento muy alto en la hidrólisis de polisacáridos como único sustrato, y son pocos los estudios en los que se emplea extracto microalgal completo que contiene diversos metabolitos que pueden interferir en el proceso catalítico o de detección del producto. El tratamiento térmico del extracto microalgal facilita el acceso de las glucosidasas a los distintos puntos de corte del almidón, permitiendo la hidrólisis completa de éstos. Por otro lado, la dependencia de iones Ca^{2+} de α -amilasa (Stein *et al.*, 1960) no parece tener ningún efecto cuando se emplea como sustrato homogeneizado microalgal,

debido, posiblemente, a la presencia de iones Ca^{2+} en el extracto. La combinación de la actividad endocatalítica de la α -amilasa y la exocatalítica de la glucoamilasa en una proporción 1: 2 ($\alpha\text{A}:\text{GA}$, siendo 1=15 nl de E/mg (p/s) de microalga) permite la hidrólisis prácticamente completa de los almidones presentes en el extracto. De esta forma, la cantidad de enzima empleada para la hidrólisis completa de los polisacáridos presentes en el extracto es muy baja, disminuyendo el coste del proceso. Finalmente, el empleo de mCLEAs de α -amilasa para hidrolizar polisacáridos presentes en las microalgas no parece ser efectivo, a pesar del pretartamiento térmico del sustrato. Posiblemente exista algún tipo de interacción con algún compuesto presente en el extracto que inhibe su actividad. Por otro lado, el empleo de mCLEAs de glucoamilasa tras 24 horas de incubación, es bastante eficiente. La extracción únicamente del almidón presente en las microalgas podría ser una solución a los problemas de actividad.

Las microalgas también contienen gran cantidad de proteínas, que se han identificado como una fuente alternativa de proteínas de gran valor nutricional (Fleurence *et al.*, 1999; Gouveia, *et al.*, 2008). Los estudios aquí realizados se han centrado, únicamente, en la extracción de estas proteínas y no en su hidrólisis. En este estudio se ha conseguido hidrolizar la proteína soluble presente en el extracto de microalgas empleando proteasas comerciales (Alcalase[®] y Neutrase[®]). Las mCLEAs de estas proteasas no presentan actividad al emplear extracto microalgal como sustrato. Sin embargo, el empleo de Alcalase[®] en forma soluble a muy baja concentración, tras una hora de incubación, parece suficiente para hidrolizar las proteínas solubles presentes. Este proceso a escala industrial resulta factible, pero habría que estudiar a mayor escala si la cantidad de enzima a emplear resultara muy costoso económicamente.

La saponificación directa de los aceites de microalgas es un proceso de extracción adecuado y muy eficiente (Picó *et al.*, 2018). La cantidad de proteína presente en *C. vulgaris* corresponde al 50% de su peso seco, pero, tras este proceso, las proteínas solubles microalgales se pierden al ser extraídas en alguno de los pasos de la saponificación. La pérdida de polisacáridos no parece importante, pero sí se observa una disminución de la hidrólisis de éstos, al emplear glucosidasas solubles y en mayor medida al emplear mCLEAs de glucoamilasa. Parece que el proceso de deslipidación provoca algún cambio en la estructura de estos polisacáridos que impiden su hidrólisis.

Se puede concluir que el proceso de biorrefinería resulta más rentable económicamente si se emplean todos los compuestos que puedan ser de interés y no únicamente los lípidos. de esta forma, la extracción de lípidos empleando disolventes orgánicos no solo es perjudicial para el medio ambiente, sino que, resulta perjudicial para otros metabolitos de interés. Por otro lado, el empleo de extractos microalgales nos permite emplear la biomasa completa de las microalgas, pero la hidrólisis de estos compuestos resultaría más eficiente si se separasen previamente. Existen distintos estudios empleando líquidos iónicos o ultrafiltración que facilitarían esta separación, pero resultan muy costosos económicamente. Por lo tanto, tras demostrar que la hidrólisis enzimática es factible la optimización de la cosecha y la extracción de los compuestos a gran escala y la separación de los metabolitos de interés serían un punto de inflexión para optimizar el proceso de biorrefinería.

Capítulo IX

Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer, entre otras, las siguientes conclusiones:

- I. Se han cosechado células de *C.vulgaris* mediante adsorción a MNPs.
 - a. El empleo de MNP-OH o MNP-NH₂ resulta indiferente.
 - b. La adsorción depende de la concentración de células, del volumen final y de la cantidad de MNPs empleados.
 - c. El pH del medio es un factor crucial en el proceso.
 - d. Las células de *C. vulgaris* se adsorben mejor a las MNPs a pH ácido.
 - e. No se ha conseguido la desorción de las microalgas de las MNPs.
- II. La cosecha de células de *C. vulgaris* mediante centrifugación y la extracción de la biomasa mediante prensado son muy eficientes.
 - a. Permite la completa extracción, tanto de proteínas como de polisacáridos, sin resultar dañados.
- III. Se han caracterizado los enzimas comerciales, tanto solubles como en mCLEAs, empleando sustratos modelo.
 - a. Se han determinado las condiciones óptimas de actividad y los parámetros cinéticos de las glucosidasas comerciales en forma soluble, empleando almidón como sustrato modelo, y en mCLEAs, empleando dextrina como sustrato modelo.
 - b. Se han determinado las condiciones óptimas de actividad y los parámetros cinéticos de las proteasas comerciales en forma soluble y en mCLEAs empleando caseína como sustrato modelo.

- IV. Se ha logrado la hidrólisis enzimática de polisacáridos de extractos microalgales empleando glucosidasas solubles y en mCLEAs.
- El pretratamiento térmico del sustrato aumenta el rendimiento de la hidrólisis, y permite disminuir la cantidad de biocatalizador, tanto con enzimas solubles como en mCLEAs.
 - La combinación de α -amilasa y glucoamilasa solubles aumenta el rendimiento de la hidrólisis y disminuye la cantidad de biocatalizador necesario.
 - El empleo de iones Ca^{2+} en α -amilasa soluble no tiene efecto al emplear extracto microalgal como sustrato.
 - Las mCLEAs de glucoamilasa permiten hidrolizar el sustrato aumentando el tiempo de incubación a 24 horas.
 - Las mCLEAs de α -amilasa no son activas con extracto microalgal como sustrato.
- V. Se ha logrado hidrolizar enzimáticamente la proteína soluble de extracto microalgal empleando proteasas solubles.
- La Alcalase[®] soluble permite una hidrólisis más eficiente del sustrato que la Neutrase[®] soluble.
 - Las mCLEAs de ambas proteasas no parecen tener actividad con extracto microalgal soluble como sustrato.
- VI. La deslipidización de las microalgas es más eficiente mediante saponificación directa.
- El tratamiento provoca la pérdida de proteína soluble, al ser extraída en el proceso por los disolventes orgánicos.

- b. La cantidad de polisacáridos presentes en las microalgas no parece verse alterada.
- c. Tras el tratamiento, no es significativa la reducción en el rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos empleando glucosidasas solubles.
- d. Tras el tratamiento se produce una disminución notable del rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos empleando mCLEAs de glucoamilasa.

Capítulo X

Bibliografía

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C. (1995).** Microalgas: cultivos y aplicaciones. Universidad de A Coruña, España.
- Adachi, S. (1965).** Thin-layer chromatography of carbohydrates in the presence of bisulfite. *J. Chromatog.* 17: 295-299.
- Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. (2012).** Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* 7: 1–13.
- Anson, M. L. (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Anu, ME., Saravanakumar, MP. (2017).** A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *OP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 263: 032019.
- Aransiola, EF., Ojumu, TV., Oyekola, OO., Madzimbamuto, TF., Ikhu-Omoregbe, DIO. (2014).** A review of current technology for biodiesel production: state of the art. *Biomass. Bioenerg.* 61:276–97.
- Becker, EW. (2007).** Microalgae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25: 207-210.
- Bernfeld, P. (1955).** Amylase α and β . *Method. Enzymol.* 1: 149-158.
- Bezerra, TL., Ragauskas, AJ. (2016).** A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuel. Bioprod. Bioref.* 10: 634-647.
- Bian, H., Sun, B., Cui, J., Ren, S., Lin, T., Feng, Y., Jia, S. (2018).** Bienzyme magnetic nanobiocatalyst with Fe^{+3} -tanic acid film for one-pot starch hydrolysis. *J. Agr. Food. Chem.* 66: 8753-8760.

- Bibi, R., Ahmad, Z., Imran, M., Hussain, S., Ditta, A., Mahmood, S., Khalid, A. (2017).** Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 71: 976-985.
- Biehl, P., von der Lühe, M., Dutz, S., Schacher, F. (2018).** Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings. *Polymers-Basel.* 10, 91.
- Bleakley, S., Hayes, M. (2017).** Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods.* 6, 33.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vitová, M. (2011).** Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108: 766-776.
- Brzozowski, AM., Davies, GJ. (1997).** Structure of the *Aspergillus oryzae* α -Amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* 36: 10837-10845.
- Buzea, C., Pacheco, I. (2017).** Nanomaterials and their classification. *EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials. Advanced Structured Materials*, vol 62. Springer.
- Campbell, CJ., Laherrère, JH. (1998).** The end of the cheap oil. *Sci. Am.* March: 78-83.
- Chang, CT., Tang, MS., Lin, CF. (1995).** Purification and properties of α -amylase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 185-1930.

- Chapman, J., Ismail, AE., Dinu, CZ. (2018).** Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*. 8: 238-264.
- Chen, L., Li, R., Ren, X., Liu, T. (2016).** Improved aqueous extraction of microalgal lipid by combined enzymatic and thermal lysis from wet biomass of *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresource. Technol.* 214: 138-143.
- Cheng, FY., Wan, TC., Liu, YT., Chen, CM., Lin, LC., Sakata, R. (2009).** Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with Alcalase. *Anim. Sci. J.* 80: 91-7.
- Chew, KW., Yap, JY., Show, PL., Suan, NH., Juan, JC., Ling, TC., Lee, DJ., Chang, JS. (2017).** Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource. Technol.* 229: 53-62.
- Chiba, S., Shimomura, T. (1965).** Thin-layer chromatography of oligosaccharides. *Agr. Biol. Chem.* 29: 486-487.
- Chiong, T., Acquah, C., Iau, SY., Khor, EH., Danquah, MK. (2016).** Microalgal-based protein by-products: extraction, purification, and applications. *Protein Byproducts*. 3: 213-234.
- Cho, EJ., Holback, H., Liu, KC., Abouelmagd, SA., Park, J., Yeo, Y. (2013).** Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol. Pharm.* 10: 2093-2110.
- Choi, SP., Nguyen, MT., Sim, SJ. (2010).** Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour Technol.* 101: 5330–5336.

- Christians, NE., Garbutt, JT., Liu, D. (1994).** Preemergence weed control using plant protein hydrolysate. U.S. patent 5,290,749, 1 March.
- Chu, S.P., (1942).** The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. *J. Ecol.* 30: 284-325.
- Clemente, A. (2000).** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends. Food Sci. Tech.* 11: 254–262.
- Clemons, T.D., Kerr, RH., Joos, A. (2018).** Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. In D. L. Andrews, R. H. Lipson, T. Nann, & R. V. Goreham (Eds.), *Comprehensive nanoscience and nanotechnology: Volume 3: Biological nanoscience (2nd ed., Vol. 3, pp. 193-210)*.
- Clogston, JD., Patri, AK. (2011).** Zeta potential measurement. *Methods. Mol. Biol.* 697: 63–70.
- Cruz-Izquierdo, A. (2013).** Production of magnetic biocatalysts by immobilization of lipase to magnetic nanoparticles. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- Cruz-Izquierdo, Á., Picó, EA., Antón-Helas, Z., Boeriu, CG., Llama, MJ., Serra, JL. (2012).** Lipase immobilization to magnetic nanoparticles: methods, properties and applications for biobased products. *New. Biotechnol.* 29: S100-S101.
- Cruz-Izquierdo, Á., Picó, EA., López, C., Llama, MJ., Serra, JL. (2014).** Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* lipase: an efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. *PloS One* 9: e115202.
- Datta, S., Christena, LR., Rajaram, YRS. (2013).** Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 3: 1-9.

- Dojnov, B., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., & Vujčić, Z. (2008).** Purification and properties of midgut α -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* Part B. 149: 153-160.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P., Smith, F. (1951).** A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168, 167.
- Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigorí, M. D., Siñeriz, F. (1996).** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 327-332.
- Fleurence, J. (1999).** Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends. Food. Sci. Technol.* 10: 25–28.
- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927).** On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73: 627-650.
- Frokjaer, S. (1994).** Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* 48: 86–88.
- Gemeiner, P. (1992).** Materials for enzyme engineering. In Gemeiner P (ed) enzyme engineering. Ellis Horwood, New York. 13-119.
- Goh, BHH., Ong, HCO., Cheah, MY., Chen, WH., Yu, KL., Mahlia, TMI. (2019).** Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 107: 59-74.
- Goodarzi, A., Sahoo, Y., Swihart, MT., Prasad, PN. (2003).** Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 789.

- Gouveia, L.; Batista, A.P.; Sousa, I.; Raymundo, A.; Bandarra, N. (2008).** Microalgae in Novel Food Products. In Food Chemistry Research Development; Konstantinos, N., Papadopoulos, P.P., Eds.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, pp. 75–112.
- Grancharov, SG., Zeng, H., Sun, S., Wang, SX., O'Brien, S., Murray, CB., Kirtley, JR., Held, GA. (2005).** Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor. *J. Phys. Chem. B.* 109: 13030-13035.
- Grima, EM., Medina, AR., Giménez, AG., Pérez, JS., Camacho, FG., Sánchez, JG. (1994).** Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 71: 955-959.
- Harris, LA., Goff, JD., Carmichael, AY., Riffle, JS., Harburn, JJ., St. Pierre, TG., Saunders, M. (2003).** Magnetite nanoparticle dispersions stabilized with triblock copolymers. *Chem. Mater.* 15: 1367-1377.
- Harun, R., Singh, M., Forde, GM., Danquah, MK. (2010).** Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14: 1037-1047.
- Hasan, S. (2015).** A Review on Nanoparticles: Their synthesis and types biosynthesis: mechanism. *Res. J. Recent. Sci.* 4: 9–11.
- Hassan, ME., Tamer, TM., Omer, AM. (2016).** Methods of enzyme immobilization. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 7: 385-392.

- 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. *Chem. Eng. J.* 262: 939-945.
- Ho, SH., Chen, CY., Lee, DJ., Chang, JS. (2011).** Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – a review. *Biotechnol. Adv.*, 29: 189-198.
- Horii, A., McCue, P., Shetty, K. (2007).** Seed vigour studies in corn, soybean and tomato in response of fish protein hydrolysates and consequences on phenolic-linked responses. *Bioresour. Technol.* 98, 2170-2177.
- Hussain, I., Singh, NB., Singh, A., Singh, H., Singh, SC. (2016).** Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnol. Lett.* 38: 545–60.
- Issa, B., Obaidat, IM., Albiss, BA., Haik, Y. (2013).** Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 21266–21305.
- Jebor, MA., Ali, ZM., Hassan, BA. (2014).** Purification and characterization of the glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3: 63-75.
- Jeong, U., Teng, XW., Wang, Y., Yang, H., Xia, YN. (2007).** Superparamagnetic colloids: controlled synthesis and niche applications. *Adv. Mater.* 19: 33–60.
- John, R., Anisha, GS., Nmpoothiri, KM., Pandey, A. (2011).** Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* 102: 186-193.

- Kahn, MI., Shin, JH., Kim, JD. (2018).** The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell. Fact.* 17: 36-57.
- Kickelbick, G., Schubert, U. (2003).** Advances in nanophase materials and nanotechnology, M.I. Baraton, Ed.; American Scientific Publishers: CA, Vol. Functionalization and surface treatment of nanoparticles, pp. 91-102.
- Kolhatkar, AG., Jamison, AC., Litvinov, D., Willson, RC., Lee, TR. (2013).** Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 15977–16009.
- Kumar, SPJ., Kumar, GV., Dash, A., Scholz, P., Banerjee, R. (2017).** Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: a review. *Algal Res.* 21: 138–47.
- Kuzminska, M., Carlier, N., Backov, R., Gaigneaux, EM. (2015).** Magnetic nanoparticles: improving chemical stability via silica coating and organic grafting with silanes for acidic media catalytic reactions. *Appl. Catal. A-gen.* 505: 200-212.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, J., Paetzel, M. (2011).** Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Acta. Cryst.* F67, 188–192.
- Liang, K., Zhang, Q., Cong, W. (2012).** Enzyme-assisted aqueous extraction of lipid from microalgae. *J. Agric. Food. Chem.* 60: 11771-11776.

- Liu, Z., Liu, Y., Yao, K., Ding, Z., Tao, J., Wang, X. (2002).** Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *J. Mater. Synth. Proces.* 10: 83-87.
- Longwell, HJ. (2002).** The future of the oil and gas industry: past approaches, new challenges. *World Energy.* <https://www.aspo-australia.org.au/References/Exxon-WE-Longwell-dec-02.pdf>.
- Luo, M., Eaton, C.N., Hess, K.R., Phillips-Piro, C.M., Brewer, S.H., Fenlon, E.E. (2019).** Paired spectroscopic and crystallographic studies of protease active sites. *Chemistryselect* 4: 9836-9843.
- Magdalena, JA., Ballesteros, M., González-Fernandez, C. (2018).** Efficient anaerobic digestion of microalgae biomass: proteins as a key macromolecule. *Molecules.* 23: 1098.
- Maity, D., Agrawal, DC. (2007).** Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *J. Magn. Mater.* 308: 46-55.
- Margalef, R. (1983).** *Limnología.* 1ª edición. Ediciones Omega, Barcelona.
- Massart, R. (1981).** Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEE. T. Mag.* 17: 1247-1248.
- Mata, TM., Martins, AA., Caetano, NS. (2010).** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14: 217-232.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, JM. (2000).** Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 1: 142-148.

- McCarthy, AL., O'Callaghan, YC., and O'Brien, NM. (2013).** Protein hydrolysates from agricultural crops—bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture*. 3: 112-130.
- Milano, J., Chyuan, H., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Kee, M. (2016).** Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew. Sust. Energy. Rev.* 58: 180-197.
- Miller, G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Moon, JH., Shul, YG., Hong, SY., Choi, YS., Kim, HT. (2005).** A study on UV-curable adhesives for optical pick-up: II. silane coupling agent effect. *Int. J. Adhes.* 25: 534-542.
- Morales, MdP., Veintemillas-Verdaguer, S., Montero, M., Serna, C., Roig, A., Casas, L., Martinez, B., Sandiumenge, F. (1999).** Surface and internal spin canting in γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *Chem. Mater.* 11: 3058-3064.
- Morris, HJ. (2008).** Cuba: protein hydrolysates from green microalgae. *Ind. Bioprod.* 30: 7-14.
- Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, TV. (2015).** A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res.* 7: 117–23.
- Naylor, RL., Higgins, MM. (2017).** The rise in global biodiesel production: Implications for food security. *Glob. Food. Secur.* 16: 75-84.
- Nogueira, DPK., Silva, AF., Araújo, OQF., Chaloub, RM. (2015).** Impact of temperatura and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass. Bioenerg.* 72:280–287.

- Norsker, NH., Barbosa, MJ., Vermue, MH., Wijffels, RH. (2011).** Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29: 24-27.
- Nunes, D., Pimentel, A., Santos, L., Barquinha, P., Pereira, L., Fortunato, E., Martins, R. (2019).** Metal Oxide Nanostructures: synthesis, properties and applications. *Material Oxides Series*. 1st Edition. Elsevier.
- Ometto, F., Quiroga, G., Pšenička, P., Whitton, R., Jefferson, B., Villa, R. (2014).** Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water Res.* 65: 350-361.
- Pal, G., Rai, P., Pandey, A. (2019).** **Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019).** Green synthesis of nanoparticles: a greener approach for a cleaner future. *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles. Adv. Mat. Res.* 1–26.
- Panahi, Y., Khosroshahi, AY., Sahebkar, A., Heidari, HR. (2019).** Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. *Adv. Pharm. Bul.* 9: 182-194.
- Park, JH., Cheon, HC., Yoon, JJ., Park, HD., Kim, SH. (2013).** Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. *Int. J. Hydrogen. Energy.* 38: 6130–6136.
- Peng, H., Zhai, L., Xu, S., Xu, P., He, C., Xiao, Y., Gao, Y. (2018).** Efficient hydrolysis of raw microalgae starch by α -amylase (AmyP) of glycoside hydrolase subfamily GH13_37. *J. Agr. Food. Chem.* 66: 12748-12755.

- Picó EA. (2017).** Empleo de CLEAs magnéticas de CALB para la obtención de biodiesel a partir de lípidos de microalgas. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- Picó, EA., López, C., Cruz-Izquierdo, Á., Munarriz, M., Iruretagoyena, FJ., Serra, JL., Llama, MJ. (2018).** Easy reuse of magnetic cross-linked enzyme aggregates of lipase B from *Candida antarctica* to obtain biodiesel from *Chlorella vulgaris* lipids. *J. Biosci. Bioeng.* 126: 451-457.
- Porath, J., Axen, R. (1976).** Immobilization techniques, immobilization of enzymes to agar, agarose, and sephadex supports. Academic, New York. 3: 19-45.
- Posten, C., Chen, SF. (2016).** Microalgae biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 153.
- Prochazkova, G., Safarik, I., Branyik, T. (2013).** Harvesting microalgae with microwave synthesized magnetic microparticles. *Bioresource Technol.* 130: 472-477.
- Răcuciu, M. (2009).** Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Curr. Appl. Phys.* 9: 1062-1066.
- Raman, JK., Abang, S., Poncet, D., Chan, E., Ravindra, P. (2008).** Production of biodiesel using immobilized lipase—A critical review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 253-264.
- Rao, MB., Tanksale, AM., Ghatge, MS., DESHPANDE, VV. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597–635.

- Ravi Kumar, MNV., Bakowsky, U., Lehr, CM. (2004).** Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*. 25: 1771-1777.
- Rehm, FBH., Chen, S., Rehm, BHA. (2016).** Enzyme engineering for insitu immobilization. *Molecules* 21: 1370-1389.
- Richmond, A. (2004).** Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd.
- Ruf, A., Stihle, M., Benz, J., Schmidt, M., Sobek, H. (2013).** Structure of gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*. *Acta Crystallogr, Sect.D* 69: 24.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., Ito, S. (2007).** Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J. Biosci. Bioeng.* 103: 501-8.
- Safi, C., Ursu, AV., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, PY., Vaca-Garcia, C. (2014).** Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. *Algal Res.* 3: 61-65.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, PY., Vaca-Garcia, C. (2014).** Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35: 265-278.
- Sahnoun, M., Jemli1, S., Trabelsi, S., Ayadi, L., Bejar, S. (2016).** *Aspergillus Oryzae* S2 α -Amylase domain C involvement in activity and specificity: in vivo proteolysis, molecular and docking studies. *PLoS ONE* 11(4): e0153868. doi:10.1371/journal.pone.0153868.

- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Fukuda, H. (2000).** Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 180-183.
- Sankaran, R., Show, PL., Chang, JS. (2016).** Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 10: 896-916.
- Schaafsma, G. (2009).** Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63: 1161–1168.
- Shen, X., Fang, X., Zhou, Y., Liang, H. (2004).** Synthesis and characterization of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Chem. Lett.* 33: 1468-1469.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. and Mann M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850–858.
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S. (2018).** Synergism of cellulases and amylolytic enzymes in the hydrolysis of microalgal carbohydrates. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 12: 749-755.
- Show, KY., Lee, DJ., Tay, JH., Lee, TM., Chang, JS. (2015).** Microalgal drying and cell disruption: recent advances. *Bioresour. Technol.* 184: 258-266.
- Shruti, P., Arora, M., Loveleen, S. (2013).** Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *Inte. J. Res. Pure. App. Microbiol.* 3: 83-88.

- Souilah, R., Boudries, N., Djabali, D., Belhadi, B., Nadjemi, B. (2015).** Kinetic study of enzymatic hydrolysis of starch isolated from sorghum grain cultivars by various methods. *J. Food. Sci. Tech. Mys.* 52, 451-457.
- Souilah, R., Boudries, N., Djabali, D., Belhadi, B., Nadjemi, B. (2018).** Kinetic study of enzymatic hydrolysis of starch isolated from sorghum grain cultivars by various methods. *J. Food. Technol.* 52: 451-457.
- Stein, EA., Junge, JM., Fischer, EH. (1960).** The amino acid composition of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Chem.* 235: 371-378.
- Sugahara, M., Takehira, M., Yutani, K. (2013).** Effect of heavy atoms on the thermal stability of a-amylase from *Aspergillus oryzae*. *PLoS ONE* 8(2): e57432. doi:10.1371/journal.pone.0057432.
- Taniguchi, N. (1974).** On the basic concept of “Nano-Technology”. Proceedings of the international conference on production engineering. Tokyo, Part II, Japan society of precision engineering. Nano ethics. 1: 1-2.
- Thiruppathi, R., Mishra, S., Ganapathy, M., Padmanabhan, P., Gulyás, B. (2016).** Nanoparticle functionalization and its potentials for molecular imaging. *Adv. Sci.* 4: 1600279.
- Toher, J., Kelly, AM., Bickerstaff, GF. (1990).** Stability properties of two supports for immobilization of enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 313-314.
- Turk, B. (2006).** Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 5:785-99.
- Vasanth, N., Thompson, L. D., Rhoder, C., Banner, C., Nagle, J., Filpula, D. (1984).** Genes for alkaline protease and neutral protease from

- Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol.* 159: 811-819.
- Velazquez-Lucio¹, J., Rodríguez-Jasso, RM., Colla, LM., Sáenz-Galindo, A., CervantesCisneros, DE., Aguilar, CN., Fernandes, BD., Ruiz, HA. (2018).** Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel. Res. J.* 17: 780-791.
- Villegas, VAR., Ramírez, JIL., Guevara, EH., Sicairos, SP., Ayala, LAH., Sanchez, BL. (2019).** Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles for photocatalysis of nitrobenzene. *J. Saudi. Chem. Soc.* 24: 223-235.
- Wahba, MI. y Hassan, ME. (2015).** Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. *Biopolymers.* 103: 675-684.
- Wang, G., Wang, T. (2012).** Lipid and biomass distribution and recovery from two microalgae by aqueous and alcohol processing. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 89: 335-345.
- Wang, L., Zhao, W., Tan, W. (2008).** Bioconjugated silica nanoparticles: development tand applications. *Nano. Res.* 1: 99-115.
- Wang, X., Zhang, X. (2013).** Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biotechnol. Prog.* 29: 681-7.
- Wijffels, RH., Barbosa, MJ. (2010).** An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 329: 796-799.

Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O., Nakasaki, K. (2011).

Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochem.* 46: 2111–2116.

Yen, HW., Hu, IC., Chen, CY., Ho, SH., Lee, DJ., Chang, JS. (2013).

Microalgae-based biorefinery- From biofuel to natural products. *Bioresour. Technol.* 135: 166-174.

Zhang, Y., Yang, M., Portney, NG., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., Ozkan, M., Ozkan, CS. (2008).

Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomed. Microdevices.* 10: 321-328.

Web:

NIES culture collection:

<http://mcc.nies.go.jp/images/100images/nies-0642.jpg>

Novozymes:

[file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Biocatalysis_brochure_Proteases%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Biocatalysis_brochure_Proteases%20(5).pdf)

Sigma-Aldrich:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4860?lang=es®ion=ES>

National Center for Biotechnology Education:

<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/neutrase.html>

<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/alcalase.html>