



“Una red de centros tecnológicos para desarrollar una biorefinería a base de algas”

EFA037/15

*Obtención de extractos ricos en proteínas y carbohidratos a partir del residuo desgrasado de *Chlorella protothecoides**

Actividad_1

11/12/2017

Título de Informe	Obtención de extractos ricos en proteínas y carbohidratos a partir del residuo desgrasado de <i>Chlorella protothecoides</i>
Version	
Responsable del Entregable	NEIKER
Actividad	Actividad 1.
Autor	Iratxe Urreta Gómez
Colaborador/es	All partners
Referencia	EFA037/15
Programa	Programa INTERREG V-A España-Francia-Andorra POCTEFA 2014-2020
Fecha de comienzo del Proyecto	01/06/2016
Duración	36 meses
Jefe de Filas	NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

RESUMEN

La hidrólisis enzimática de las proteínas y carbohidratos presentes en los residuos orgánicos permite obtener soluciones más o menos concentradas de aminoácidos y azúcares solubles. Estos "hidrolizados" pueden emplearse como nutrientes para el crecimiento de plantas, microalgas y otros microorganismos. Esta es por tanto una vía potencial para la valorización de residuos orgánicos, que se podrían reciclar como nutrientes para la obtención de nueva biomasa con valor económico.

En esta actividad se han establecido las condiciones óptimas de hidrólisis para extraer estos nutrientes a partir del residuo derivado de la extracción de aceite de biomasa de *Chlorella protothecoides* (CP) empleando proteasas y carbohidratasas.

El proceso de hidrólisis establecido permite obtener un producto líquido que contiene 3.2 g/L de nitrógeno total, 15 g/L de aminoácidos y 28 g/L de glucosa. Además, este hidrolizado se puede almacenar a 4°C durante 60 días con una pérdida del 15% de nitrógeno y conservando la estabilidad de los carbohidratos totales.

El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

INDICE

RESUMEN	2
1. METODOLOGÍA EMPLEADA	3
1.1 Acondicionamiento y caracterización del residuo R1.....	3
1.2 Proceso de hidrólisis enzimática y optimización.....	3
1.3 Obtención y caracterización de los productos resultantes de la hidrólisis.....	4
1.4 Escalado del proceso de hidrólisis.....	4
1.5 Estabilidad temporal del hidrolizado	5
2. RESULTADOS.....	5
2.1 Optimización del proceso de hidrólisis.....	5
2.2 Escalado del proceso de hidrólisis.....	8
2.3 Estabilidad temporal del hidrolizado	11
3. CONCLUSIONES.....	12

1. METODOLOGÍA EMPLEADA

1.1 Acondicionamiento y caracterización del residuo R1

El residuo del alga desgrasada, suministrado por CATAR, se deshidrató por bien por liofilizado o bien a 60° C en estufa. El residuo seco se homogenizó y caracterizó mediante análisis por combustión (método LECO) para la determinación CHN total.

1.2 Proceso de hidrólisis enzimática y optimización

El protocolo de hidrólisis empleado inicialmente había sido desarrollado para la hidrólisis de biomasa de *Schizochytrium limacinum* SR21 en el departamento de Producción Vegetal de Neiker-Tecnalia. El proceso consistió en la adición sucesiva de las enzimas descritas en la tabla 1, bajo las condiciones de trabajo que en la misma se muestran. Las enzimas fueron suministradas por Novozymes (Copenhague, Dinamarca).

Tabla 1. Enzimas empleadas en la hidrólisis y condiciones de trabajo

Enzima	concentración	pH	tiempo	Actividad
Viscozyme	1%	6-7	30 min	endoglucanasa
Alcalase 2.4L FG	1U/g prot	8	3h	endoproteasa
Flavourzyme 500 MG	200 LAPU/g prot	7	3h	exoproteasa

La relación biomasa/agua se estableció en 1/7 (g/ mL) y la hidrólisis se llevó a cabo en agitación orbital a 140 rpm y 50°C por triplicado.

Las muestras se sometieron a 100°C durante 10 minutos para desactivar las enzimas, se centrifugaron a 13.000 rpm y se guardaron el sobrenadante y el residuo sólido a -20°C hasta su análisis.

A partir de estas condiciones se optimizaron la concentración enzimática, la presencia/ausencia de viscozyme y el ratio biomasa/H₂O.

1.3 Obtención y caracterización de los productos resultantes de la hidrólisis

Tras el proceso de hidrólisis, la mezcla se esterilizó mediante autoclavado (121°C, 20 min) y se separó por centrifugación en la fase líquida (hidrolizado) y el residuo sólido (R4).

El hidrolizado se caracterizó por LECO, y se cuantificaron aminoácidos libres y carbohidratos simples mediante métodos colorimétricos utilizando los reactivos Antrona y Ninhydrina, respectivamente. También se calculó la cantidad de sólidos en suspensión mediante filtrado utilizando filtros PAL, Whatman y de nitrocelulosa (Sartorius).

El residuo sólido (R4) se caracterizó mediante LECO y gravimetría tras su liofilizado y homogeneización.

El grado de hidrólisis de cada proceso se determinó mediante la hidrólisis ácida (HCl 6M, 24 horas) del R1 y el cálculo se realizó mediante la fórmula (Segura-Campos et al. 2013; Wang and Zhang, 2012):

$$DH = [(htn - hto) / htot] \times 100$$

Donde, *htot* es el n^o total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína, *htn* es el n^o de enlaces en el hidrolizado, y *hto* es el n^o de enlaces antes de la hidrólisis.

1.4 Escalado del proceso de hidrólisis

El escalado de las condiciones optimizadas se llevó a cabo en reactores Biostat B+ de Sartorius con 5L de capacidad, provistos de pala agitadora tipo rushton, sensor de temperatura y sensor de pH.

Para ajustar el pH se utilizó NaOH (1M) y HCl (12M) que se añadieron mediante las bombas peristálticas de acuerdo a lo fijado en el equipo.

La temperatura de trabajo se fijó en 50°C, no se utilizó aireación y la agitación se modificó en base a las necesidades del proceso.

1.5 Estabilidad temporal del hidrolizado

El hidrolizado fue almacenado a 4°C durante 60 días, y se determinaron tanto el contenido de aminoácidos libres como carbohidratos a los 7, 14, 30, 45 y 60 días. Asimismo, se determinó la estabilidad del mismo en condiciones de -20°C chequeando los parámetros previamente mencionados tras 30 y 60 días de almacenamiento.

Alternativamente al almacenamiento en forma líquida, se evaluó de forma preliminar el liofilizado y reconstitución del hidrolizado tras su almacenamiento a 4°C durante 7 días.

2.RESULTADOS

2.1 Optimización del proceso de hidrólisis

La caracterización LECO del lote 1 de R1 dio como resultado un contenido en proteínas del 10% (Tabla 2).

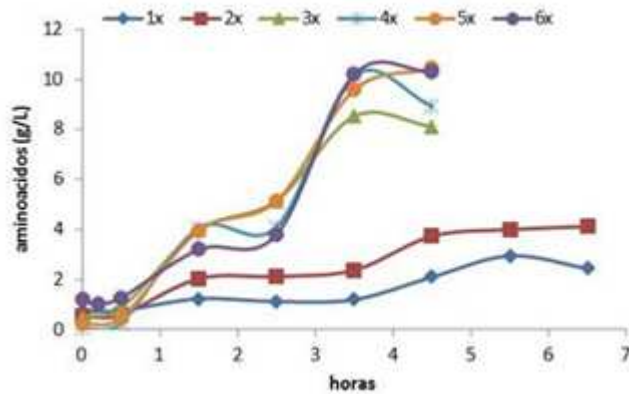
Tabla 2. Contenido en nitrógeno, carbono e hidrógeno del lote 1 de R1 en base a su análisis por LECO

CATAR lote 1		
	media	sd
N _t (%)	1,66	0,03
C _t (%)	39,46	0,11
H _t (%)	6,75	0,13
Proteínas (%)	10,35	0,2

2.1.1. Efecto de la concentración enzimática

En base a este dato se añadieron las enzimas en las concentraciones establecidas en la metodología, a las que se denominó condición 1x. La concentración enzimática se fue aumentando gradualmente hasta multiplicarla por 6, momento en el que no se detectó un aumento en la cantidad de aminoácidos en el hidrolizado (Fig. 1A) ni en el grado de hidrólisis (DH) (Fig.1B).

El contenido en aminoácidos alcanzó un máximo de 10.43±0.45 g/L bajo las condiciones 5x lo que se tradujo en un DH del 79.8%. Bajo estas condiciones se cuantificaron 40.27±1.51 g/l de carbohidratos en el hidrolizado.



B

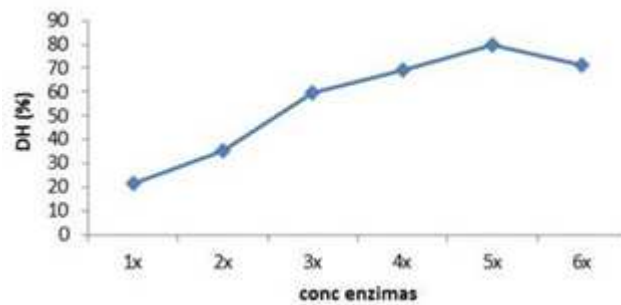


Figura 1. Evolución temporal de la liberación de aminoácidos durante la hidrólisis bajo diferentes concentraciones enzimáticas.

Como se observa en la Figura 1A, no solo se modificó la concentración enzimática, sino que también se pudo acortar el tiempo de hidrólisis en dos horas (condiciones 1 y 2x respecto al resto).

En la tabla 3 se muestra la caracterización del hidrolizado y del residuo sólido (R4) resultante del proceso de hidrólisis bajo condiciones 5x.

Tabla 3. Caracterización de los productos obtenidos del proceso de hidrólisis

	Hidrolizado		Residuo (R4)	
	media	ds	media	ds
Nitrógeno (%)	0.24	0.01	1.35	0.03
Carbono (%)	3.33	0.02	31.33	0.21
Hidrógeno (%)	10.24	0.40	4.90	0.06
Aminoácidos (g/L)	10.43	0.45	-	-
Carbohidratos (g/L)	40.27	1.51	-	-
Peso seco (%)	-	-	64.75	-

El hidrolizado contiene 2,4 g/L de N_{total} además de 40 g/l de carbohidratos y el residuo sólido (R4) supone el 64% de la biomasa inicial utilizada.

2.1.2. Efecto de la viscozyme

El producto viscozyme contiene una endoglucanasa que hidroliza los enlaces $\beta(1-3)$ en D-glucanos, y se utiliza para disminuir la viscosidad de las mezclas. En este caso, al observar un contenido de 40 g/L de carbohidratos en el hidrolizado final, se ha querido determinar el efecto de este producto sobre el proceso de hidrólisis, y determinar si se puede obviar o no del mismo.

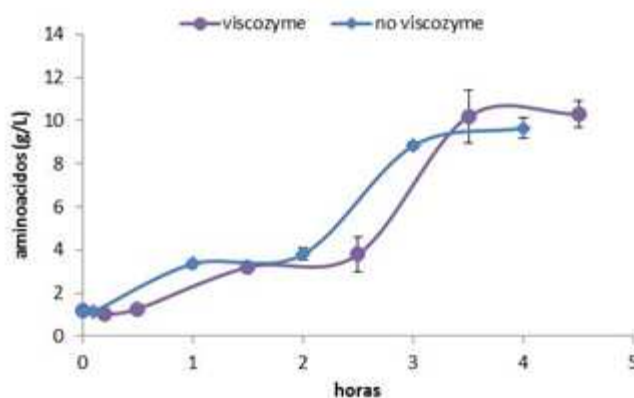


Figura 2. Evolución temporal de la liberación de aminoácidos a lo largo del proceso de hidrólisis con y sin viscozyme.

La ausencia de viscozyme supone una ligera caída en el contenido de aminoácidos libres, tal y como se observa en la Fig 2. Además supone una disminución del 8.5% en el contenido de carbohidratos y un 6.5% en el grado de hidrólisis.

2.1.3. Efecto del ratio biomasa/agua

La concentración de biomasa es un factor importante desde el punto de vista económico, pero condiciones de altas concentraciones pueden dar problemas de homogeneización.

En este caso, el ratio 1/7 supone emplear una concentración de 142.85 g/L que genera problemas a la hora de homogeneizar la mezcla (Tabla 4). Por esta razón se han ensayado ratios más bajos en los que se aumenta la cantidad de agua.

La disminución de la concentración de biomasa repercute de forma negativa en el grado de hidrólisis, cayendo hasta un 35% cuando se duplica la cantidad de agua (Tabla 4).

Tabla 4. Cambio en el grado de hidrólisis teniendo en cuenta el ratio 1/7 como referencia

Ratio	Concentración (g/L)	Δ GH (%)
1/7	142.85	
1/9	111.11	-5
1/14	71.42	-35

2.2 Escalado del proceso de hidrólisis

De los ensayos de optimización del proceso de hidrólisis se decidió escalar el proceso en base a las siguientes condiciones:

- ✓ Concentración enzimática 5x
- ✓ Presencia de viscozyme
- ✓ Ratio 1/7
- ✓ 4,5 horas de proceso (30 min viscozyme; 2h alcalase; 2h flavourzyme)

El escalado se realizó con R1 del Lote 1 y del Lote 2, por separado, al llegar el 2º lote con posterioridad. En la Tabla 5 se muestra la caracterización del Lote 2 de R1, que tenía un contenido en proteínas 1.5 veces superior al Lote1.

Tabla 5. Caracterización del Lote 2 de R1 mediante LECO

CATAR lote 2		
	media	sd
N _t (%)	2,64	0,02
Ct (%)	39,74	0,12
H _t (%)	6,74	0,18
Proteínas (%)	16.5	0,13

Nt: nitrógeno total; Ct: carbono total; Ht: hidrógeno total

Durante el proceso de hidrólisis y cosechado se observaron algunas diferencias entre los lotes (Figura 3). En primer lugar, el hidrolizado del Lote 1 tenía un color más amarillento al final del proceso, mientras que el del lote 2 era más marrón (Fig. 3B-C). Tras el centrifugado se presentaron problemas con el lote 1 debido a la presencia de una capa lipídica sobre el sobrenadante que no quedó del todo translúcido (Fig. 3D). En cambio, en el lote 2 no se observó la capa lipídica (Fig. 3E), lo que facilitó en gran medida la obtención de un hidrolizado translúcido aunque con un color muy diferente (Fig. 3F).



Figura 3. Imágenes representativas del proceso de hidrólisis de los Lotes 1 y 2. A, cuba de 5L de capacidad durante la hidrólisis; B y C, aspecto del hidrolizado final de los lotes 1 y 2, respectivamente; D, cosechado del lote 1; E-F, cosechado del lote 2.

Estas diferencias en el proceso físico también se observaron en la liberación de aminoácidos y carbohidratos (Figura 4). El hidrolizado del Lote 2 mostró un 50% más de aminoácidos que el Lote 1 (Fig.4A), aunque el contenido en carbohidratos fue un 30% menor (Fig.4B).

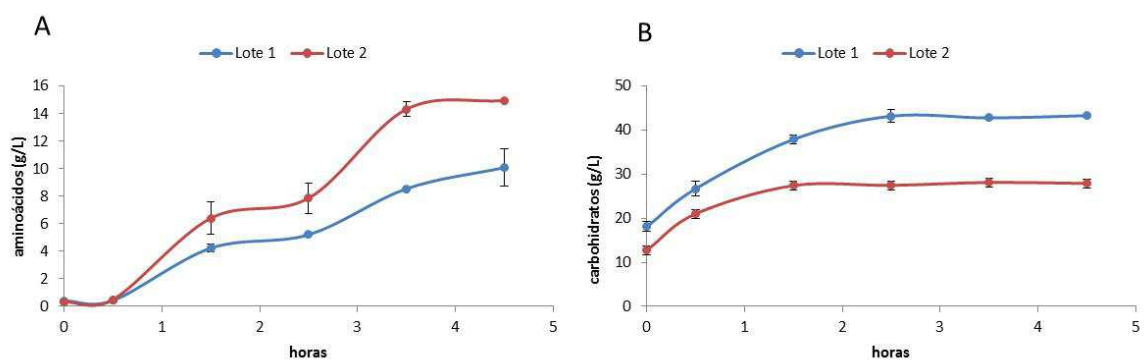


Figura 4. Evolución temporal de la liberación de aminoácidos (A) y carbohidratos (B) a lo largo del proceso de hidrólisis.

En la tabla 6 se resumen las características químicas de los productos obtenidos del proceso de hidrólisis de ambos lotes. Lo más destacable es la bajada en el grado de hidrólisis del lote 2, y la mayor

cantidad de residuo sólido obtenido, que alcanzó el 80% respecto a la biomasa inicialmente utilizada.

La cantidad de sólidos en suspensión fue 2.6 veces menor en el Lote 2 lo que reflejaría la diferencia de turbidez de ambos lotes.

Tabla 6. Características químicas de los productos obtenidos de la hidrólisis de los lotes 1 y 2 de RI

	Lote 1		Lote 2	
	hidrolizado	Residuo sólido	hidrolizado	Residuo sólido
Nt	0.22±0.01	1.53±0.01	0.32±0.01	1.62±0.02
Ct	3.62±0.02	33.81±0.69	3.44±0.06	33.53±0.77
Ht	2.52±0.23	5.40±0.09	2.11±0.15	5.43±0.06
Aminoácidos (g/L)	10.08±1.36	-	14.95±0.02	-
Carbohidratos (g/L)	43.31±0.01	-	27.90±0.79	-
GH (%)	79	-	57.9	-
Peso seco (%)		60		80
Sólidos en suspensión (g/L)	12.2		4.65±0.26	

A pesar de las discrepancias observadas entre los diferentes lotes de RI, el escalado del Lote 1 permitió comparar estos datos con los de matraz (Figura 5) y se pudo observar que eran completamente reproducibles. El grado de hidrólisis fue muy similar (79.8% frente a 79%), así como los resultados de contenido de aminoácidos y carbohidratos. En la figura se muestra la curva de liberación de carbohidratos del proceso de escalado, que se puede comparar con el dato de la tabla 3. El N_t fue del 0.24% y 0.22% para matraz y batch, respectivamente.

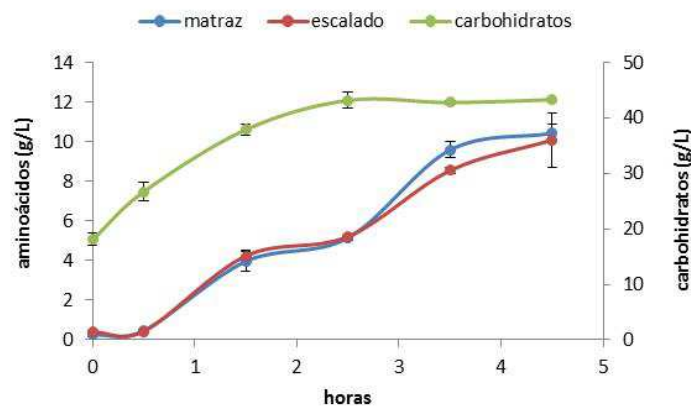


Figura 5. Evolución temporal de la liberación de aminoácidos y carbohidratos durante el proceso de hidrólisis en condiciones de matraz y escalado en reactor.

2.3 Estabilidad temporal del hidrolizado

Una vez cosechado el hidrolizado se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a 4°C durante 2 meses, y que se analizaron en base al contenido de aminoácidos y carbohidratos a los días 7-15-30-45-60 días. Así mismo, se analizó la estabilidad de los hidrolizados tras su almacenamiento a -20°C durante 30 y 60 días aproximadamente.

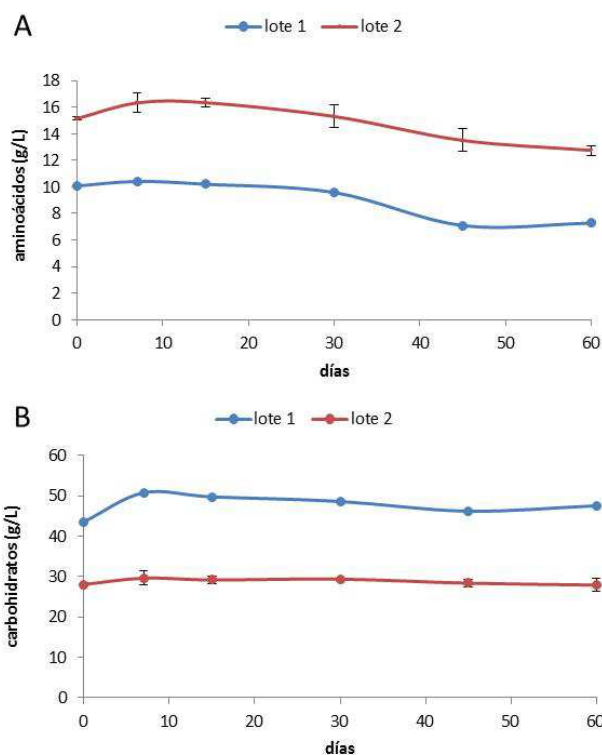


Figura 6. Cantidad de aminoácidos (A) y carbohidratos (B) a lo largo de un periodo de 60 días de almacenamiento a 4°C.

La Fig. 6 muestra que la tendencia en ambos lotes fue muy similar. La cantidad de aminoácidos se mantuvo constante durante los primeros 30 días y después sufrió una bajada del 27% en el Lote 1, mientras que en el Lote 2 se observó un ligero incremento durante los primeros 15 días de almacenamiento para después descender un 15% (Fig. 6A).

En el caso de los carbohidratos no se produjo pérdida de estabilidad en ninguno de los lotes (Fig. 6B) sino todo lo contrario, pues en el lote 1 se detectó un aumento del 9% al final del periodo ensayado. En este lote se observó un repunte hasta los 50 g/L a los 7 días que después fue disminuyendo progresivamente hasta 47.5 g/L.

La tabla 7 muestra que el almacenamiento a -20°C da resultados muy similares a los de 4°C en ambos lotes y para ambos parámetros.

Tabla 7. Cuantificación de aminoácidos y carbohidratos tras su almacenamiento a -20C durante 30 y 60 días.

	Lote 1		Lote 2	
	30 días	60 días	30 días	60 días
Aminoácidos (g/L)	9.4	7.2	16.2±0.5	12.1±0.1
Carbohidratos (g/L)	47.8	45.8	30.3±3.2	27.5±0.2

Alternativamente al almacenamiento en forma líquida, se analizó de forma preliminar, la posibilidad de liofilizar el hidrolizado (Lote 2) y guardarlo a 4°C. Tras 6 días a 4°C, el hidrolizado se reconstituyó con agua y se determinó la cantidad de aminoácidos, que dio como resultado 14.9 g/L.



Figura 7. Imagen del hidrolizado del Lote 2 tras su liofilizado (izda.) y una vez reconstituido (dcha.)

3.CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo para la hidrólisis enzimática de biomasa residual R1 (proveniente del proceso de extracción de lípidos de *Chlorella protothecoides*) que permite hidrolizar a aminoácidos el 79% del contenido proteico de la biomasa
- El proceso de hidrólisis se reprodujo a escala de 5 litros manteniendo la eficiencia.
- La estabilidad de la composición química del residuo (materia prima de la hidrólisis) resulta clave para replicar el grado de hidrólisis bajo las condiciones establecidas. De hecho, la eficiencia de hidrólisis se redujo en un 25% cuando el residuo empleado presentaba un contenido de nitrógeno total 40% superior al del residuo empleado para la optimización del proceso.
- El hidrolizado contiene 3.2 g/L de Nt, 15 g/L de aminoácidos y 28 g/L de carbohidratos.
- El hidrolizado mantiene sus características químicas relativamente estables tras 60 días almacenado a 4°C.