

PRODUCCIÓN DE
ANABAENA SP. ATCC
33047 Y VALORIZACIÓN
DE LA FRACCIÓN
PROTEICA DE SU
BIOMASA.

Autor: Francisco Miguel García Cuadra.

Fecha: 12/09/2011.

Tutor: Emilio Molina Grima.

VºBº

Fdo.: Emilio Molina Grima

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN.....	4
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
3.1	Sistemas de cultivo.....	5
3.2	Sistema de hidrólisis.....	9
3.3	Hidrólisis de proteínas.....	10
3.3.1	<i>Pretratamientos y condiciones de reacción</i>	14
3.3.2	<i>Procedimientos analíticos</i>	15
4	RESULTADOS.....	17
4.1	Cultivos de <i>Anabaena</i> ATCC 33047.....	17
4.2	Hidrólisis enzimática de la biomasa de <i>Anabaena</i> ATCC 33047.....	24
5	CONCLUSIONES.....	27
6	AGRADECIMIENTOS.....	28
7	REFERENCIAS.....	29

1 RESUMEN.

La cianobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047, se ha cultivado en 3 medios de cultivo exentos de nitrógeno, que varían ligeramente en su composición, más otro medio con fuente de nitrógeno asimilable. Con ello se determinó que el uso de fertilizantes agrícolas exentos de nitrógeno en la formulación de éstos, es adecuado para la producción de esta cianobacteria en sistemas a gran escala. Por otro lado, la adición de una fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, mejoró la viabilidad y velocidad de crecimiento de la cianobacteria.

La biomasa obtenida de *Anabaena*, se ha utilizado para la obtención de un suplemento nutricional para plantas, mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas contenidas en esta biomasa. Este producto, con una concentración en aminoácidos sobre 36 g/L, se obtiene de la separación de la masa sólida residual y de la fase acuosa, de la mezcla hidrolizada enzimáticamente.

2 INTRODUCCIÓN.

El aumento de las explotaciones agrícolas, y las mayores restricciones medioambientales exigidas por autoridades y consumidores, ha generado un aumento en el uso y desarrollo de fertilizantes agrícolas ecológicamente sostenibles. Dentro de este tipo de fertilizantes, se incluye las disoluciones de aminoácidos libres, las cuales son utilizadas en las explotaciones agrícolas intensivas, debido a que poseen un gran poder revitalizante, y son fácilmente asimilables por las planta tanto por hojas como las raíces, aumentando su velocidad de crecimiento.

Dentro de este contexto, se ha desarrollado un proceso de valorización de la biomasa de *Anabaena* ATCC 33047 mediante hidrólisis proteolítica, para obtener disoluciones de aminoácidos, de alto valor añadido, ya que esta cianobacteria tiene en su biomasa un alto porcentaje de proteínas.

Para lograr la puesta en marcha de un mayor número de este tipo de procesos, a escala semi-industrial o industrial, se deben optimizar las condiciones de cultivo para que los procesos sean económicamente viables. Con este fin, en este trabajo, se han llevado a cabo ensayos con distintos medios de cultivo, en volúmenes de 100 litros, comprobando las ventajas e inconvenientes de cada uno de éstos, desde un punto de vista de la concentración y productividad conseguida, además de la salud y viabilidad del cultivo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Sistemas de cultivo.

Algunas de las características principales de *Anabaena*, que se deben considerar para su cultivo son: (a) la formación de cadenas, cuyo número varía entre unas pocas unidades y un centenar de células, (b) la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico mediante la formación de células diferenciadas (heterocistos), (c) la capacidad de sintetizar, por esta especie y bajo ciertas condiciones de cultivo, un tipo de exopolisacarido, cuya secreción al medio se ve favorecida por el aumento del caudal de aireación en el cultivo, la temperatura y la irradiación lumínica, viéndose inhibida por la presencia de fuentes de nitrógeno en el medio o el aumento de la concentración de NaCl en éste [1].

Los cultivos de *Anabaena* se han realizado a diferentes escalas de trabajo, que varían entre matraces de 50 mL a 400 mL, agitados mediante sistema orbital, pasando por sistemas aireados de 1-2 litros, y botellones de 5 o 10 litros, hasta llegar a columnas de burbujeo de 10 litros y 100 litros. Los sistemas de cultivo de 10 litros o menores se han llevado a cabo en una cámara de cultivo con ambiente controlado a 24°C, siendo la única finalidad de éstos servir de inóculo de sistemas de mayor volumen.

Columnas de 100 L. Este sistema de cultivo está formado por 3 columnas de 200 mm de diámetro y 100 L, en metacrilato y PVC (Figuras 2 y 4). El sistema dispone de control de pH todo-nada por inyección de CO₂, que se introduce junto al aire por la parte inferior de las columnas. Además dispone de un sistema para la introducción de medio de cultivo, formado por un depósito de 200 litros de capacidad, una bomba de circulación de medio controlada por un presostato, dos filtros de cartucho, uno de 5 µm y otro de 1 µm, y un ozonizador comunicado con el depósito del medio de cultivo.

También hay un sistema de control de temperatura formado por tres sondas (electrodos de pH-temperatura), un depósito de 300 litros con agua, una bomba circuladora controlada por un presostato, 3 serpentines en acero inoxidable (uno por columna), 3 resistencias eléctricas de 300 W, 100 W, 25 W (dentro del depósito de agua) y un sistema de refrigeración del depósito (Figuras 2 y 3). Cada columna dispone de 4 luminarias formada por 2 tubos fluorescentes (OSRAM SILVANIA) de 58 W y 765 mm de longitud, dando una irradiación promedio utilizando 2 luminarias (una por cada lado de la columna) de $189 \mu\text{E}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$; y en el caso de utilizar las 4 luminarias es de $377 \mu\text{E}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. También dispone de una válvula para la toma de muestras, y una válvula de 3 vías por la cual se introduce los gases en la columna, se comunica con el resto de columnas y se realizar el vaciado (Figuras 1 y 2).

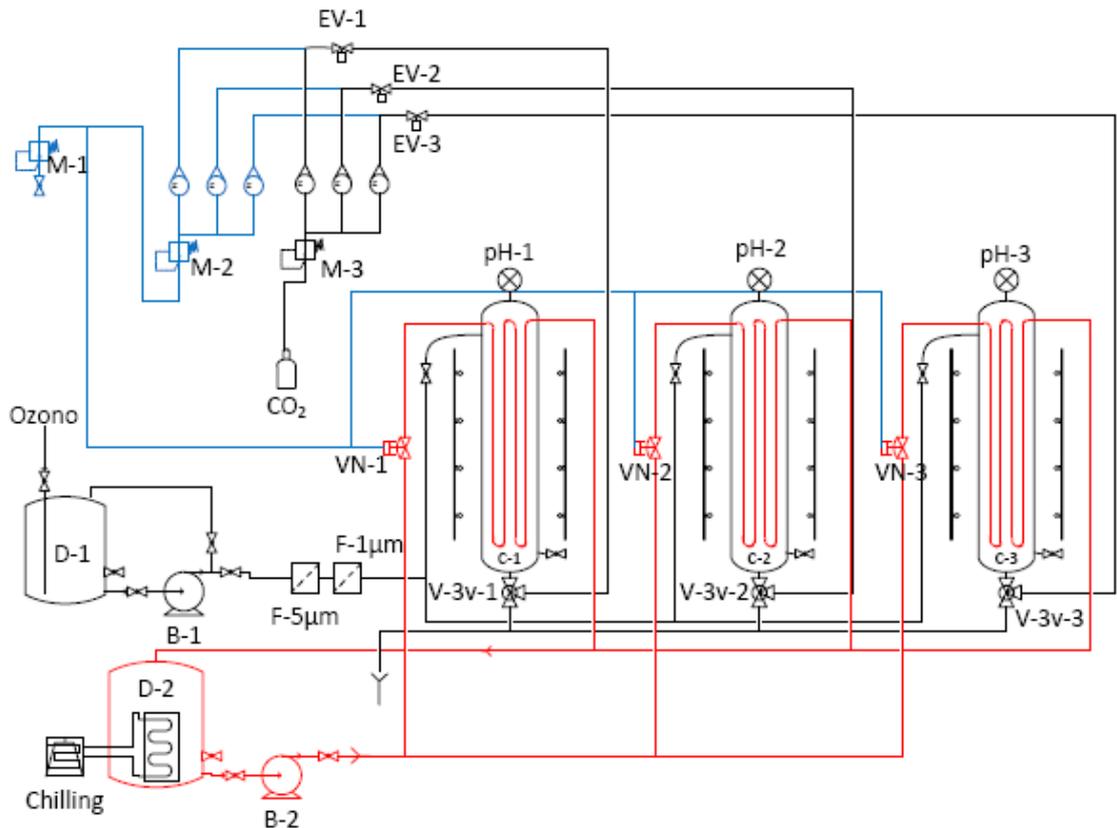


Figura 1. Diagrama de flujo de la instalación de las columnas de burbujeo.

Tabla 1. Descripción equipos del diagrama de flujo (Figura 1).

Item	Equipo	Item	Equipo
B-1	Bomba medio de cultivo	M-1	Manoreductor aire general
B-2	Bomba agua refrigeración/calefacción	M-2	Manoreductor aire entrada columnas
C-1	Columna de burbujeo 1	M-3	Manoreductor CO ₂
C-2	Columna de burbujeo 2	pH-1	Sensor pH-T ^a de columna 1
C-3	Columna de burbujeo 3	pH-2	Sensor pH-T ^a de columna 2
D-1	Depósito medio de cultivo	pH-3	Sensor pH-T ^a de columna 3
D-2	Depósito agua refrigeración/calefacción	VN-1	Válvula neumática control T ^a de C1
F-1 μm	Filtro cartucho 1 micra	VN-2	Válvula neumática control T ^a de C2
F-5 μm	Filtro cartucho 5 micras	VN-3	Válvula neumática control T ^a de C3
EV-1	Electroválvula control pH de columna 1	V-3v-1	válvula 3 vías de columna 1
EV-2	Electroválvula control pH de columna 2	V-3v-2	válvula 3 vías de columna 2
EV-3	Electroválvula control pH de columna 3	V-3v-3	válvula 3 vías de columna 3



Figura 2. Descripción de elementos de las columnas de cultivo de 100 L.

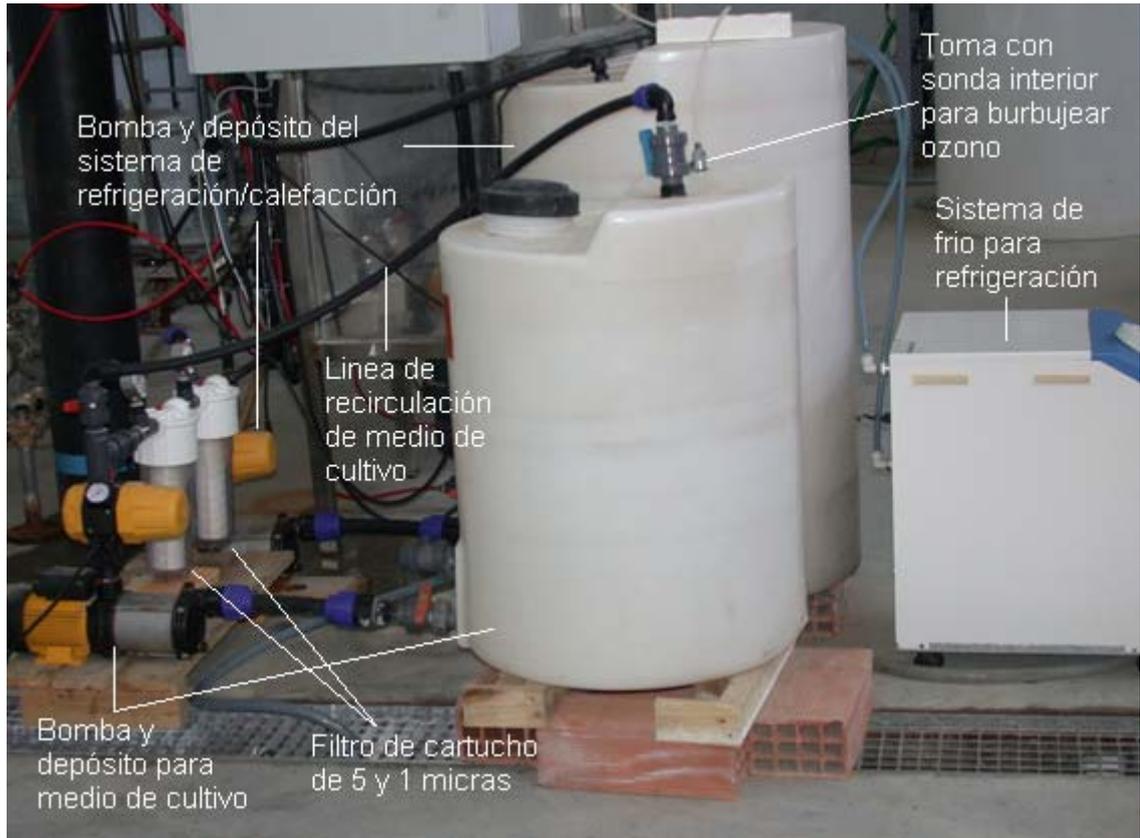


Figura 3. Sistema de alimentación de medio de cultivo y sistema de control de temperatura de las columnas.

En primer lugar, se observa el depósito de medio de cultivo conectado con la bomba de inyección, que además posee una línea de recirculación, para mejorar la mezcla dentro del depósito. A continuación de esta bomba, se disponen los dos filtros de cartucho, primero uno de 5 μm y después otro de 1 μm , con objeto de limitar la contaminación, para finalmente bombear el medio de cultivo a cada columna, que dispone de una válvula de esfera para el control de la entrada de líquido. Además, se puede burbujear ozono en el medio de cultivo, con fin de esterilizarlo.

En segundo lugar, se observa el depósito de inercia de 300 L y la bomba que impulsa agua a los serpentines de las columnas, para refrigerarlas o calentarlas según necesidades. A la derecha de la Figura 3, está colocado el equipo de “chilling” (sistema

de enfriamiento del agua para refrigerar el cultivo), aunque puede realizar las funciones de calentar y enfriar, sólo se utiliza para esta segunda función.



Figura 4. Fotobiorreactor 100 L con cultivo de *Anabaena*.

3.2 Sistema de hidrólisis.

El reactor utilizado tiene una capacidad útil de 2 litros (Figura 5), con una relación altura-diámetro (\varnothing 120 mm) aproximada a 2.2, siendo el fondo tipo “koppler” (abombado) y salida mediante válvula de esfera con paso de 6 mm. En su parte superior dispone de 5 tubuladuras, una para la colocación de la sonda de pH, otra para la sonda de temperatura, otra para entrada de disolución de NaOH, otra para la entrada de enzimas y H_2SO_4 , y finalmente la última para muestreo. Por otra parte este reactor posee 4 tabiques deflectores de acero inoxidable (9 mm de ancho). La agitación se lleva a cabo con una turbina Ruston 6 palas (50 mm de diámetro).

Para la modificación y corrección del pH, se utiliza disoluciones de NaOH 2M, y H₂SO₄ 25% en volumen, para no se produzca un aumento apreciable del volumen de reacción, efectuándose la entrada al sistema de la disolución de NaOH mediante una bomba de membrana, a un caudal de 10 mL/minuto. Además el sistema posee control automático del pH (todo-nada).

El muestreo y la entrada de la disolución de enzimas también se realizan mediante sonda, para que cualquier muestra sea representativa de todo el contenido del reactor



Figura 5. Reactor de hidrólisis enzimática.

D_{interno} : 120 mm

D_{agitador} : 50 mm

$\text{Altura}_{\text{cilindro}}$: 240 mm.

$\text{Altura}_{\text{total}}$: 275 mm.

$\text{Altura}_{\text{agitador}}$: 175 mm.

(en las alturas se toma como referencia la tapa del reactor).

3.3 Hidrólisis de proteínas.

Para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas de una biomasa, se debe actuar sobre el enlace peptídico que forman los distintos aminoácidos que constituyen el polipéptido, rompiéndolo y liberando el grupo amino y carboxilo de los péptidos, o aminoácidos cuando la reacción se completa totalmente, siendo ésta la unidad básica de las proteínas y producto buscado.

La concentración de aminoácidos conseguida depende del grado de rotura que se consigue en las proteínas, y de la solubilidad de éstos en agua, es decir, del tipo de aminoácido hidrolizado, del pH, de la temperatura y de la salinidad de la disolución.

La hidrólisis proteolítica no es una reacción única y unidireccional, sino que es un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura entre, y a lo largo, de las cadenas polipeptídicas, por lo que el proceso es de gran complejidad por el número de especies reactivas que intervienen, y de equilibrios existentes.

Además, la hidrólisis de proteínas se puede llevar a cabo mediante la denominada “hidrólisis química”, en la cual, las proteínas son expuestas al ataque de agentes como NaOH, HCl, o H₂SO₄ en condiciones que varían entre 105°C y 250°C, y tiempos que varían entre minutos a días [10]. Junto a los ácidos y las bases, se añaden compuestos que favorecen las reacciones, como fenol, ácido trifluoroacético, ácido p-toluensulfónico, triptamina-3-(2-aminoetil)-indol, ácido mercaptoetanosulfónico. Otra alternativa es la llamada “hidrólisis enzimática”, que a pesar de utilizar catalizadores relativamente caros, tiene una serie de ventajas como: (a) emplear unas condiciones menos agresivas de pH y temperatura, (b) son reacciones más selectivas, (c) no se usan agente químicos tóxicos para favorecer las reacciones, y (d) no se produce la degradación de ciertos aminoácidos como triptófano, serina, tiamina, ni modificaciones de otros como en la hidrólisis química.

Debido a estas razones, en este trabajo la hidrólisis se llevó a cabo mediante la utilización de enzimas proteolíticas, que en función de los mecanismos de actuación se pueden clasificar en:

- a) Endoproteasas: Son aquellas que actúan rompiendo los enlaces peptídicos al azar en el interior de las cadenas proteicas.

- b) Exoproteasas: Son aquellas que actúan sobre los enlaces peptídicos que se encuentran en el exterior.

Para conseguir mayor rendimiento en la recuperación de aminoácidos a partir de las proteínas, se utiliza una combinación de ambas actividades, aplicando endoproteasas para degradar inicialmente la mayor parte de las proteínas, actuando posteriormente las exoproteasas cuando las cadenas polipeptídicas están muy fracturadas.

Las enzimas utilizadas son dos preparados comerciales denominados:

- a) Alcalase® 2.5L

El preparado Alcalase® 2.5L contiene una enzima proteolítica preparada por fermentación de una cepa seleccionada del *Bacillus Licheniformis*. El principal componente enzimático de Alcalase® 2.5L es Subtilisin A, que es una endoproteasa de tipo serínico. El preparado es un líquido ámbar semitransparente totalmente miscible en agua. La densidad del preparado sin diluir es de 1,05 kg/m³, la viscosidad máxima es de 0,1 kg/m·s, con una actividad de 2,5 unidades Anson por gramo (AU/g), estandarizado por el proceso modificado de Anson. La influencia del pH y la temperatura en la actividad se muestra en las figuras 6 y 7:

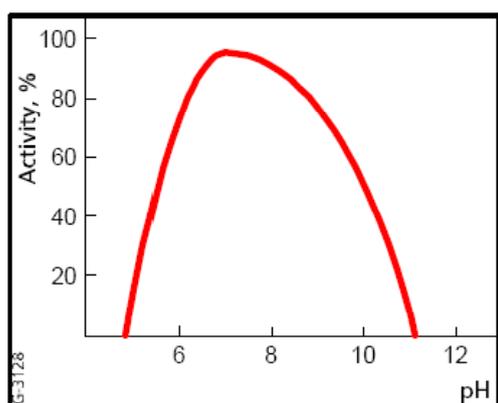


Figura 6. La influencia del pH en la actividad de Alcalase® 2.5 L (2).

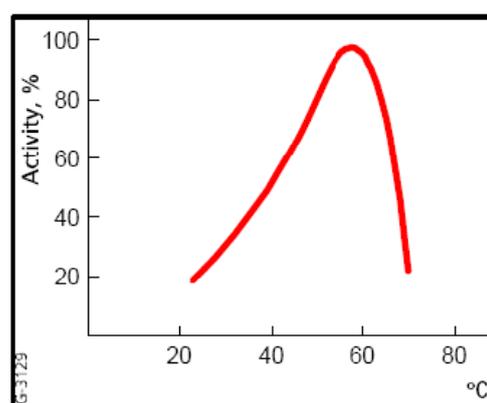


Figura 7. La influencia de la temperatura en la actividad de Alcalase® 2.5 L (1).

- (1) Condiciones: concentración enzima 0,06AU/L, pH=8, 10 min de reacción y método Anson modificado.

- (2) Condiciones: concentración enzima 0,06AU/L, $T^a=60\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min de reacción y método Anson modificado.

b) Flavourzyme® 1000 L.

El preparado Flavourzyme® 1000L es un complejo enzimático de origen fúngico, obtenido por fermentación de una variedad seleccionada de *Aspergillus oryzae*, y que contiene tanto actividad endoproteasa como exoproteasa. El preparado es un líquido marrón de 1,27 kg/m³ de densidad. La actividad de Flavourzyme se estandariza en LAPU/g (Leucine Amino Peptidase Units per gram). Un LAPU es la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de L-Leucina-p-nitroanilida por minuto siendo de 1000 LAPU/g.

La influencia de la temperatura y del pH en la actividad se muestra en las figuras: 8 y 9:

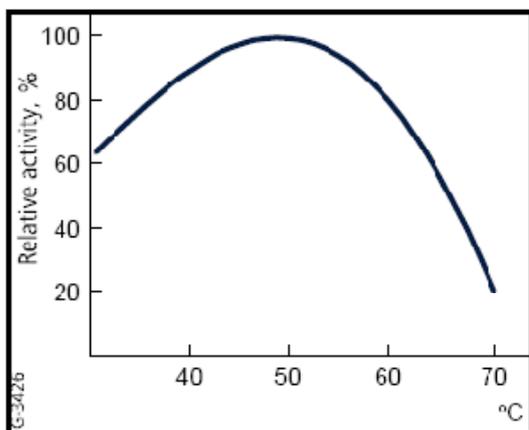


Figura 8. La influencia de la temperatura en la actividad de Flavourzyme® 1000 L (1).

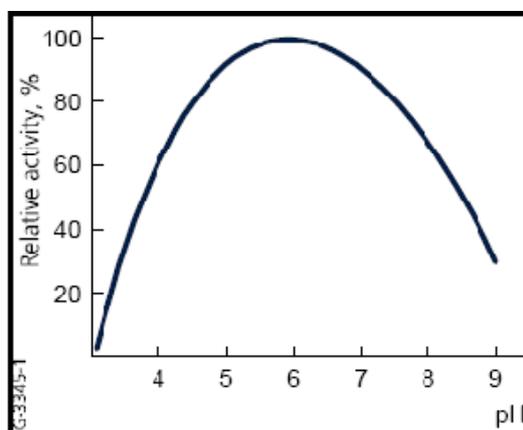


Figura 9. La influencia del pH en la actividad de Flavourzyme® 1000 L (2).

- (1) Condiciones: 8% de proteína, 33 LAPU/g de proteína, $T^a=50\text{ }^\circ\text{C}$ y método de medición de aminoácidos del ácido trinitribencenosulfónico (TNBS).
- (2) Condiciones: 8% de proteína, 33 LAPU/g de proteína, $T^a=50\text{ }^\circ\text{C}$ y método de medición de aminoácidos del ácido trinitribencenosulfónico (TNBS).

3.3.1 *Pretratamientos y condiciones de reacción.*

El primer lugar, a la biomasa de *Anabaena* se le realizó un pretratamiento, que consistió en una molturación en un molino de bolas de 160 mm de diámetro y 145 mm de altura, con 40 bolas de 27,7 mm de diámetro y 26,8 gramos de peso. La molturación se realizó durante 30 minutos para cada 100 gramos de biomasa, a una velocidad giro del molino de entre 150 – 200 rpm aproximadamente.

Posteriormente esta biomasa (220 gramos), se mezcló con 720 mL de agua y un 2% (p/v) de Viscozyme® L (β -glucanasa), la cual ayuda a eliminar grumos y hacer más fluida la mezcla, para posteriormente añadir agua hasta alcanzar una concentración final de 200 g/L. Los pretratamientos continúan mediante una homogeneización de alta presión, a 1000 ± 200 bares. En la operación con el homogeneizador se añade agua hasta alcanzar una concentración final de 150 g/L.



Figura 10. Homogeneizador de alta presión.

Tras estos pretratamientos, la mezcla se lleva al reactor en donde se añade antiespumante, y se ajustan las condiciones de reacción, que son: 50°C de temperatura, mantenidos mediante la camisa del reactor y un baño de agua regulado por un

termostato y una resistencia. Los pH's de las reacciones son: de 8 para Alcalasa 2.5 L (primera enzima) y pH 7 para Flaurvozyme 1000 L (segunda enzima). El cambio de enzima se realiza cuando el parámetro grado de hidrólisis, (descrito en el apartado 3.3.2 Procedimientos analíticos) apenas varíe (aproximadamente a las 2 horas del inicio de la reacción con cada enzima).

3.3.2 *Procedimientos analíticos.*

Para medir el avance de la reacción de hidrólisis, se utiliza un parámetro llamado grado de hidrólisis (GH). Este parámetro nos indica en qué porcentaje el contenido inicial de proteínas de una biomasa se ha hidrolizado en aminoácidos libre, dependiendo por tanto el resultado final obtenido, del análisis previo del contenido proteico de la muestra a hidrolizar.

Este parámetro se mide mediante el "Metodo OPA" descrito por Nielsen, Petersen y Damrmann, [2], por el cual los reactivos dialdehído ftálico (OPA) y threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanodiol (DDT) reaccionan con los grupos α -amino libre de los aminoácidos dando lugar a un compuesto que absorbe la luz a 340nm.

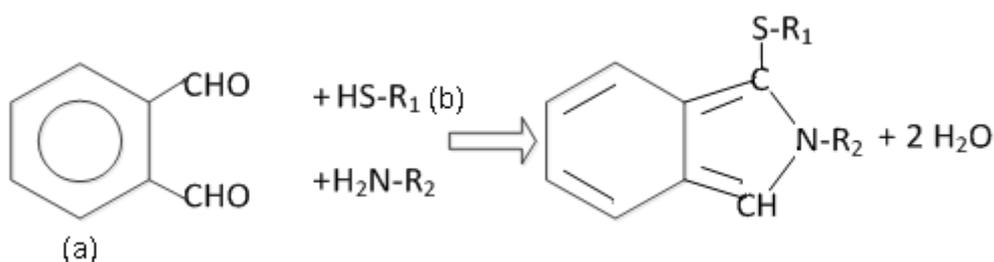


Figura 11. Reacción de los aminoácidos, con los reactivos dialdehído ftálico (a) y threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanodiol (b).

Este método es muy adecuado para el seguimiento de reacciones de hidrólisis proteica, ya que es rápido al realizarlo por vía espectrofotométrica, y se correlaciona

bien con el establecido método de medición de aminoácidos del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) [4], aunque no tiene los inconvenientes de toxicidad, inestabilidad y la peligrosidad de manipulación y para el medio ambiente del TNBS.

El grado de hidrólisis según el método “OPA” se mide según la ecuación $GH = h/h_{tot} \cdot 100$, en donde h_{tot} es el número de cadenas peptídicas por equivalente de proteína, siendo $h = (\text{serina-NH}_2-\beta)/\alpha$, meqv/g proteína. La serina es utilizada como aminoácido patrón en el seguimiento de la reacción. Los parámetros β , α y h_{tot} fueron descritos por J. Alder-Niessen, 1986, [3]:

Tabla 2. Parámetros α , β y h_{tot} del método “OPA” para distintas materias primas.

Proteínas	α	β	h_{tot}
Soja	0.97	0.342	7.8
Gluten*	1.00	0.40	8.3
Caseína	1.039	0.383	8.2
Trigo*	1.00	0.40	8.8
Gelatina	0.796	0.457	11.1
Carne*	1.00	0.40	7.6
Pescado*	1.00	0.40	8.6

*Cuando la materia prima no ha sido analizada, los valores de α y β son 1.00 y 0.40, respectivamente.

Al no estar descrita la proteína de la biomasa utilizada, los valores utilizados son de $\beta = 0.4$, $\alpha = 1$ y $h_{tot} = 8$.

Paralelamente a esta medida, se ha realizado una recta de calibrado con distintas concentraciones de serina frente absorbancia a 340nm (dato no mostrado), utilizando la misma metodología y principios descritos en este método “OPA”. De esta forma, una medida de absorbancia permite obtener el grado de hidrólisis y un valor de concentración de aminoácidos en la disolución bastante fiable.

4 RESULTADOS.

4.1 Cultivos de *Anabaena* ATCC 33047.

Los cultivos semi-continuos se han llevado a cabo en fotobioreactores de 100 litros. Se realizaron ensayos en los que se modificó la composición de los medios de cultivo, variando la calidad de los componentes de éstos, para comprobar cómo afecta a esta cepa, sobre todo, en lo referente a la velocidad de crecimiento. Para ello, se comprobó la evolución de la concentración de biomasa con el tiempo para cada medio de cultivo y para 3 velocidades de dilución diferentes. Las condiciones de iluminación fueron constantes ($377 \mu\text{E}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), al igual que el pH, que se mantuvo a 7.9 y la temperatura (28°C).

Los medios empleados han sido el “medio marina” y dos variantes de éste, utilizando como nutrientes fertilizantes agrícolas (“medio fertilizantes”) en los macronutrientes y en los micronutrientes, y un medio en donde los macronutrientes son añadidos como fertilizantes y los micronutrientes como sales puras (“medio mixto”).

Tabla 3. Concentraciones de nutrientes en los diferentes medios de cultivo.

Medio fertilizantes, g/L		Medio mixto, g/L		Medio marina, g/L	
Sal refinada	5	NaCl	5	NaCl	5
NaHCO ₃	4,2	KCl	----	KCl	0,6
K ₂ HPO ₄	0,145	NaHCO ₃	4,2	NaHCO ₃	4,2
MgSO ₄	0,124	K ₂ HPO ₄	0,145	K ₂ HPO ₄	0,145
Solución comercial de micronutrientes	8 mL/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,124	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,124
		CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,051	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,051
		H ₃ BO ₃	0,00286	H ₃ BO ₃	0,00286
		MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,00181	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,00181
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,00126	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,00126
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00012	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00012
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00008	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00008
		CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,00004	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,00004
		Fe EDTA	1 mL/L	Fe EDTA	1 mL/L
		NaVO ₃	0,000459	NaVO ₃	0,000459

Tabla 4. Composición de la solución de micronutrientes empleada en el cultivo de *Anabaena* ATCC 33047, en el “medio fertilizantes”.

Solución comercial de micronutrientes	
Hierro (Fe)	2,4 % p/p (3,00% p/v) quelatado por DTPA
Manganeso(Mn)	1,5 % p/p (1,87 % p/v) quelatado por EDTA
Cobre (Cu)	0,14 % p/p (0,17 % p/v) quelatado por EDTA
Zinc (Zn)	1,00 % p/p (1,25 % p/v) quelatado por EDTA
Boro (Bo)	0,52 % p/p (0,65 % p/v) forma borato
Molibdeno (Mo)	0,12 % p/p (0,14 % p/v) forma molibdato

Las velocidades de dilución (D) con las que se trabajó son $0,17 \text{ día}^{-1}$, $0,13 \text{ día}^{-1}$ y $0,09 \text{ día}^{-1}$ (promediadas a una semana). Respecto a los cambios de medios de cultivo, se realizan mediante el purgado del depósito de 200 L, lavado y realización del nuevo medio dentro de éste. Posteriormente, se vacía un determinado volumen de cultivo, según la velocidad de dilución ensayada en cada columna, adicionando el mismo volumen de medio de cultivo nuevo. Los resultados obtenidos se pueden observar en las siguientes figuras:

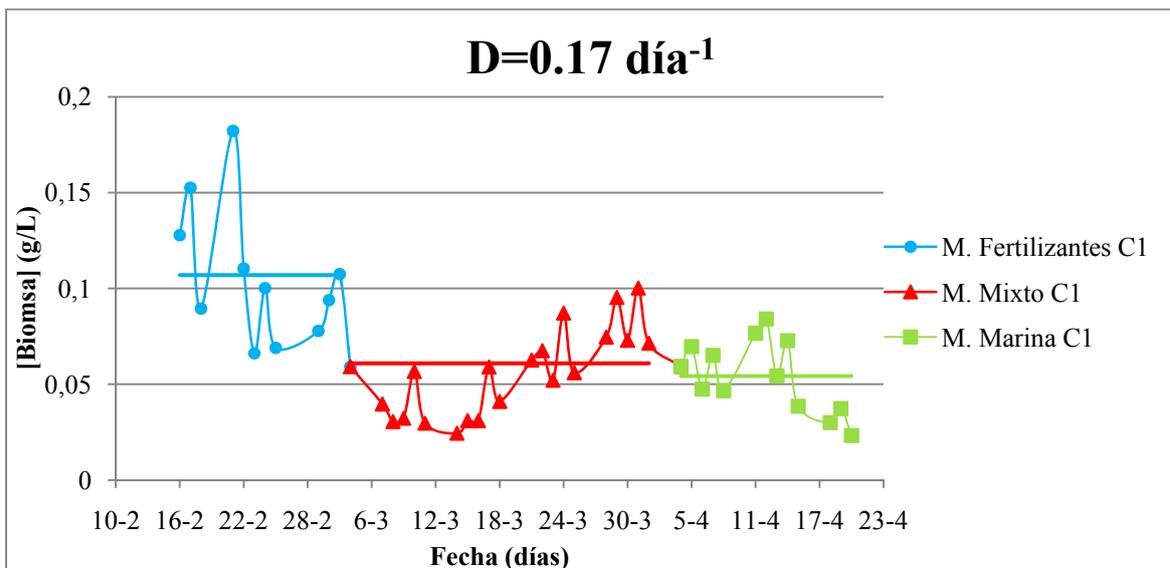


Figura 12. Evolución de la concentración de *Anabaena* para $D= 0.17 \text{ día}^{-1}$ con los diferentes medios utilizados.

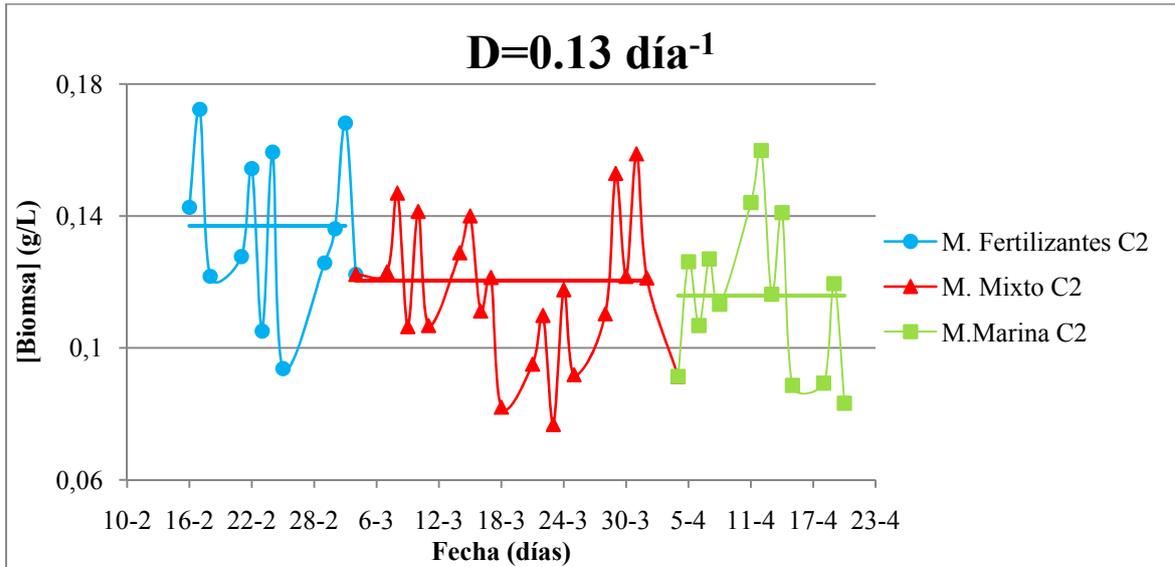


Figura 13. Evolución de la concentración de *Anabaena* para $D= 0.13 \text{ día}^{-1}$ con los diferentes medios utilizados.

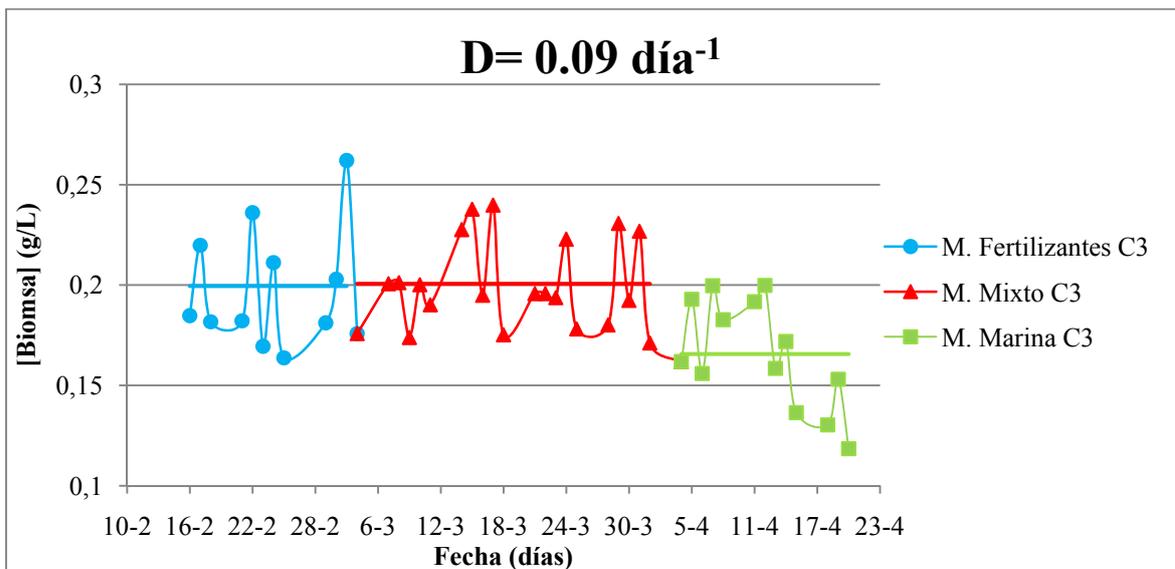


Figura 14. Evolución de la concentración de *Anabaena* para $D= 0.09 \text{ día}^{-1}$ con los diferentes medios utilizados.

Para la mayor velocidad de dilución, la concentración de pseudoestado estacionario estuvo en 0.074 gramos de biomasa seca por litro. Además, a esta tasa de dilución, el cultivo tiene inicialmente dificultades para crecer debido a la baja

concentración de células. En cambio, para la velocidad de dilución de 0.13 día^{-1} , la concentración del cultivo se mostró bastante estable, oscilando entre los 0.12-0.14 g/L.

En cambio, en el ensayo a 0.09 día^{-1} , la concentración se estabilizó entorno al 0.2 g/L, hasta llegar al final del ensayo, en donde la formación de un biofilm, provocó la bajada de la concentración. Este fenómeno tuvo lugar tanto en la columna con $D=0.09 \text{ día}^{-1}$, como en la columna con $D=0.17 \text{ día}^{-1}$, debiéndose la bajada de la concentración de biomasa, a la limitación de luz y a que las propias células se adhieren a este biofilm.

Por otra parte, las concentraciones medias de biomasa seca y la productividad, medida mediante espectrofotometría a 750nm (en el momento de cosechar) se resumen en la tabla 5:

Tabla 5. Concentraciones promedio de biomasa (C_b) y productividades promedio (P) del ensayo con distintos medios de cultivo y velocidades de dilución.

D (día^{-1})	Medio	C_b (g/L)	C_{bm} (g/L)	P (g/L·día)	P_m (g/L·día)
0,17	Fertilizantes	0,179		0,030	
	Mixto	0,089	0,118	0,015	0,020
	Marina	0,087		0,015	
0,13	Fertilizantes	0,189		0,025	
	Mixto	0,171	0,173	0,022	0,022
	Marina	0,158		0,021	
0,09	Fertilizantes	0,225		0,020	
	Mixto	0,246	0,226	0,022	0,020
	Marina	0,205		0,018	

A partir de los valores mostrados en la tabla 5 (medidos por espectrofotometría a 750nm), se deduce que la mayor productividad se consigue a 0.13 día^{-1} , con un valor promedio para los distintos medios de cultivo de $0.022 \text{ g/L}\cdot\text{día}$, frente a $0.020 \text{ g/L}\cdot\text{día}$ conseguidos a 0.17 y a 0.09 día^{-1} .

Por otra parte, podemos comparar los valores de productividades, estimados mediante espectrofotometría a 750nm a partir de muestras de las columnas de 100 litros,

(Tabla 5) con respecto a la productividad medida experimentalmente por pesada directa de la biomasa seca producida de *Anabaena* en las 3 columnas, se obtiene un valor promedio de biomasa cosechada seca de 0,020 g/L·día, a una velocidad de dilución media (para las 3 columnas) de 0,13 día⁻¹

En la siguiente gráfica se muestra las cantidades de biomasa cosechada, y la estimada en función de la concentración medida por espectrofotometría a 750 nm justo antes del cosechado.

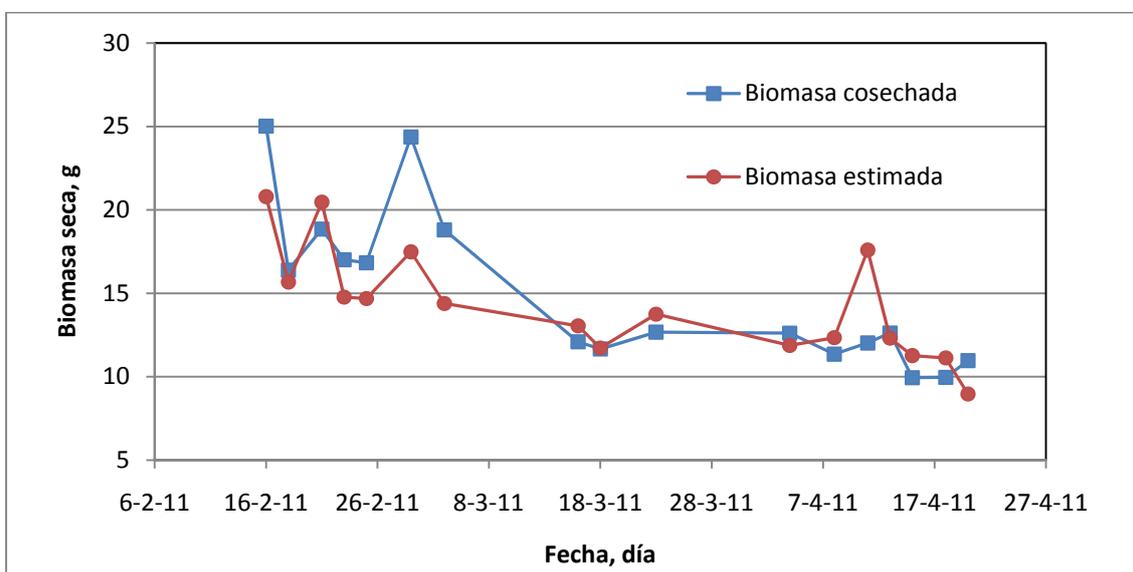


Figura 15. Comparación entre la cantidad real de biomasa cosechada (para D_{media} de 0.13 día⁻¹) y la estimada por espectrofotometría a 750nm.

Junto los ensayos anteriores, también se ha cultivado *Anabaena* con un medio con fuente de nitrógeno en las columnas de 100 litros, bajo las mismas condiciones que con los 3 medios anteriores, en modo discontinuo. En este caso, el medio utilizado fue BG-11, variando la concentración de NaNO_3 a 1 gramo por litro. También se le ha añadido a este medio NaVO_3 a una concentración de $4.59 \cdot 10^{-4}$ g/L.

Tabla 6. Concentración de los componentes de BG-11.

Composición BG-11, (g/L)		
Macronutrientes	NaNO ₃	1
	K ₂ HPO ₄	0,04
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,036
	EDTANa ₂	0,001
Tampón	Ácido cítrico	0,006
	Citrato-Fe-NH ₄	0,006
	Na ₂ CO ₃	0,02
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	0,00286
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,00181
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,00039
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00022
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00008
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,00005

La evolución de la concentración de biomasa con el tiempo se ha comparado para un mismo intervalo de tiempo con un cultivo con “medio marina”.

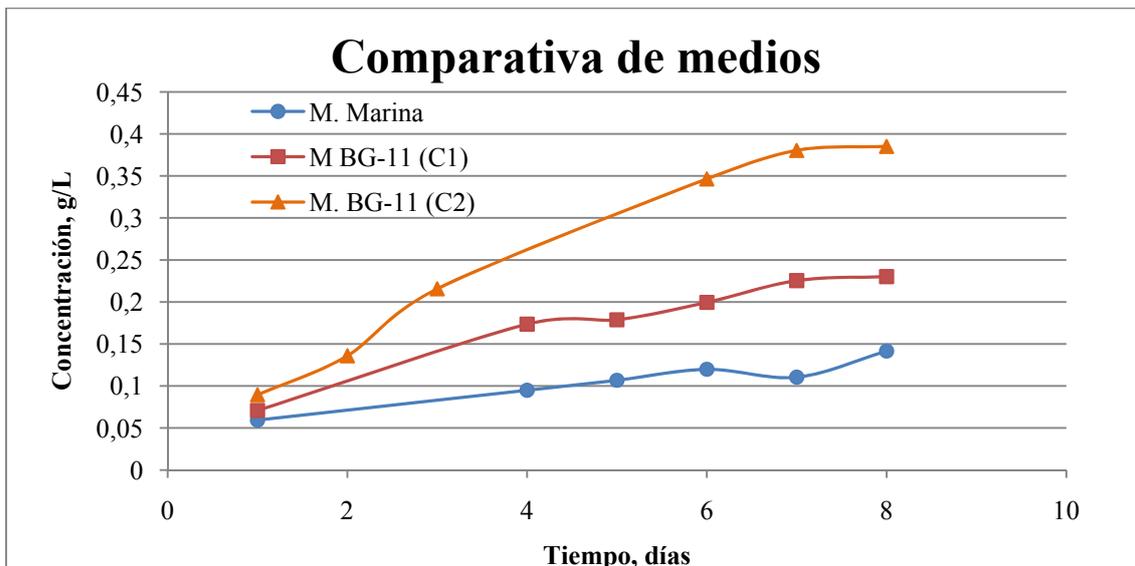


Figura 16. Comparación en la evolución de la concentración con los diferentes medio empleados, en cultivos en modo discontinuo.

Como se observa en la gráfica, los cultivos que disponen de un medio con fuente de nitrógeno que sea fácilmente asimilable por *Anabaena*, aumenta la biomasa de forma más rápida, ya que no tiene que asimilar el nitrógeno atmosférico. Otro hecho que se puede constatar de los datos, es que un ligero aumento de la concentración inicial del cultivo, va a lograr que se alcance más altas concentraciones en menor tiempo, como se puede observar en las productividades deducidas de la Figura 16, que son de 0.011 g/L·día para el cultivo con “medio marina”, 0.023 g/L·día para BG-11 (C1) y 0.044 g/L·día para BG-11 (C2), aunque no justifica la variación entre los valores de productividad de C1 y C2.

De la biomasa cosechada de las columnas con “medio marina”, se han realizado distintos análisis resultando un perfil bioquímico que se muestra a continuación:

Tabla 7. Perfil bioquímico de *Anabaena* ATCC 33047, en porcentajes en peso seco.

<u>PERFIL BIOQUÍMICO ANABAENA</u>	
PROTEINAS	47,63%
CENIZAS	17,50%
CARBOHIDRATOS	17,20%
LÍPIDOS TOTALES	9,91%
Ácidos Grasos	5,90%
Ácido mirístico, 14:0	0,035%
Ácido palmítico, 16:0	1,478%
Ácido palmitoleico, 16:1n7	0,339%
Ácido esteárico, 18:0	0,300%
Ácido oleico, 18:1n9	0,067%
Ácido linoleico, 18:2n6	0,588%
Ácido α -linolénico, 18:3n3	1,072%

El contenido en proteínas fue medido mediante el método “Lowry” [6], los lípidos se determinaron por el método “Kochert” [7], los ácidos grasos por el procedimiento propuesto por Rodríguez-Ruiz. [8], y los carbohidratos se determinó por el método de Fenol- Ácido sulfúrico [9].

4.2 Hidrólisis enzimática de la biomasa de *Anabaena* ATCC 33047.

Tras aplicar los pretratamientos, y llevar a cabo la reacción de hidrólisis enzimática de la biomasa de *Anabaena*, en la tabla 8, aparece la biomasa utilizada, los consumos de las enzimas, y de las soluciones de NaOH 2 M y H₂SO₄ 25% v/v.

Tabla 8. Tabla resumen de los consumos y las condiciones de hidrólisis.

Cantidad de biomasa seca empleada	220 g
Volumen de agua desionizada empleada	1.46 L
Pretratamientos utilizados:	
Molturación molino bolas	30 min.
Viscozyme® L	4,4 mL (2% p/v)
Homogeneización	1000±200 bares
Antiespumante (p. Pasteur)	3 gotas
Agitación empleada	600±10 rpm
Cantidad de Alcalase® 2.5 L empleada	8,8 mL (4% p/v)
Cantidad de Flavourzyme® 1000 L empleada	8,8 mL (4% p/v)
Volumen de NaOH 2 M empleada	190 mL
Volumen de H₂SO₄ 25% (v/v) empleada	17 mL

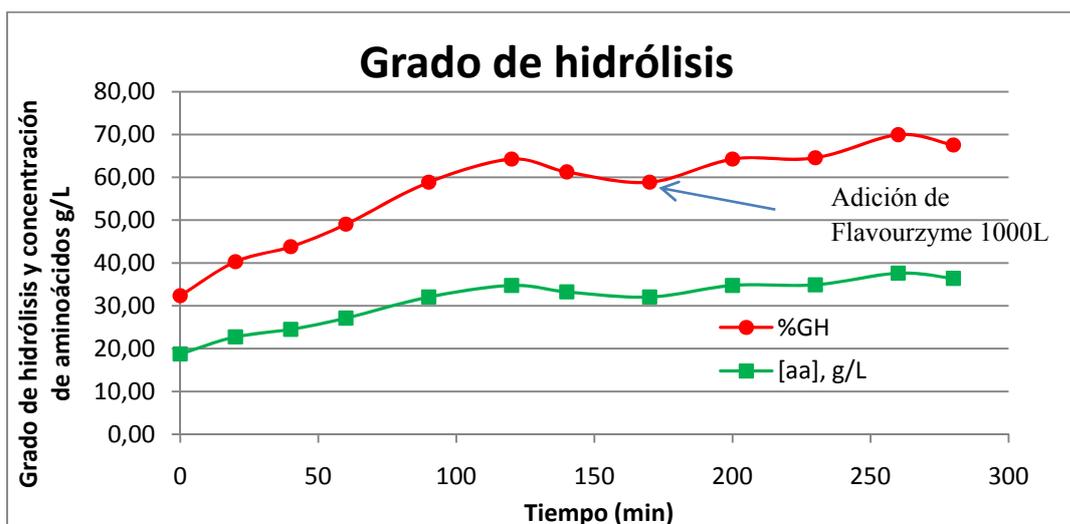


Figura 17. Evolución del grado de hidrólisis y concentración de aminoácidos con el tiempo.

Como se observa en la Figura 17, el valor del grado de hidrólisis a tiempo 0 es de entorno a 32%. Este hecho se debe a que el tiempo transcurrido entre el muestreo y la medición, es de varios minutos, ya que esta muestra se centrifuga durante 3 minutos, para posteriormente, diluir el sobrenadante en agua desionizada y mezclar con una alícuota de esta dilución con el reactivo “OPA”. También cabe destacar de la Figura 17, que el mayor grado de hidrólisis se consigue bajo la acción de Alcalase® 2.5 L.

Tabla 9. Resumen de los resultados de la hidrólisis de la biomasa de *Anabaena* ATCC 33047.

Grado de hidrólisis obtenido	
GH Alcalase 2.5 L, 0-170 minutos*	58.87 %
GH Flavourzyme 1000 L, 170-280 minutos*	08.69 %
Grado de hidrólisis total	67.56 %
Separación de la disolución de aminoácidos por centrifugación a 7500 rpm	
Centrifugación durante 5 minutos	1 Tratamiento
Centrifugaciones durante 10 minutos	2 Tratamientos
Volumen de disolución de aminoácidos	920 mL
Residuo sólido húmedo	747.26 g
Humedad del residuo sólido	82.3%
Concentración de la disolución de aminoácidos	36.41 g/L

*En el primer apartado (GH), se muestra la variación en el grado de hidrólisis con respecto al tiempo, para cada enzima empleada.

Para separar la biomasa residual de la disolución de aminoácido, siendo ésta el producto deseado, se ha aplicado la centrifugación, ya que una filtración “convencional” no es práctica, debido a la viscosidad del fluido y al rápido bloqueo de los poros del medio filtrante. Para esta centrifugación, se ha utilizado una centrífuga discontinua de vasos (6 de 250 mL) con una característica de 10380g. El tratamiento consistió en una primera etapa de centrifugación a 7500rpm durante 5 minutos, para eliminar el grueso de la biomasa, y una segunda etapa en donde se realiza dos tratamientos bajo las mismas

condiciones, pero a mayor tiempo (10 minutos). De esta forma, se consigue un líquido clarificado, ya que las partículas pueden sedimentar mejor en los campos centrífugos al disminuir la concentración de biomasa.

El resultado del proceso, una disolución de aminoácidos y un residuo sólido, se muestra en la figura 17:



Figura 18. Hidrolizado final de *Anabaena* (izquierda) y residuo sólido (derecha).

5 CONCLUSIONES.

En lo referente al cultivo de *Anabaena*, cabe destacar que puede ser cultivada en temperatura entorno a 24-28 °C, y aunque se aumente la temperatura del cultivo entorno a 34°C, no muestra signos de que el cultivo se vea afectado. (En bibliografía se describe que esta cepa tolera temperaturas de más de 40°C [1]).

De los resultados obtenidos en los ensayos de modificación de los medios, se puede concluir que los fertilizantes agrícolas son muy adecuados para el cultivo de esta cepa a gran escala, y respecto a la velocidad de dilución, la mayor productividad se obtiene a 0,13 día⁻¹ bajo las condiciones en las que han sido cultivadas, no recomendando el cultivo a 0,17 día⁻¹, ya que *Anabaena* se diluye demasiado y cualquier condición que genere estrés sobre las células, puede producir el lavado del cultivo.

Para mantener el cultivo durante periodos largos de tiempo, se recomienda una velocidad de dilución de 0.09 día⁻¹, ya que va a mantener una concentración adecuada de células, y se contiene la contaminación, que en estos sistemas es difícil de evitar, en unos rangos aceptables.

Con respecto a la hidrólisis enzimática de *Anabaena*, destacar la importancia de los pretratamientos aplicados, ya que sin éstos, aumentaría la dificultad para correcta ejecución del proceso, y los rendimientos disminuirían. Los resultados obtenidos de grado de hidrólisis y concentración de aminoácidos para la biomasa de *Anabaena*, son buenos en comparación a los conseguidos con la biomasa de otras microalgas (datos no mostrados), debido principalmente al mayor contenido de proteínas de *Anabaena*.

Finalmente, destacar que la utilización de *Anabaena* sp. ATCC 33047 es adecuada para el fin de obtener biofertilizantes, siendo un factor clave, la optimización de las condiciones de cultivo para mejorar las productividades, y disminuir el contenido de exopolisacáridos, que dificulta el tratamiento de la biomasa.

6 AGRADECIMIENTOS.

Quiero dar mi agradecimiento, en primer lugar a mi tutor, Don Emilio Molino Grima, por su trabajo y orientación, y al director de mis investigaciones, Francisco Gabriel Acién Fernández, ya que sin su confianza no hubiera sido posible realizar este trabajo.

También quiero agradecer su apoyo, a David Carrasco Flores, a mis compañeros de los laboratorios 1.30 y 1.25, en especial, a Juan Miguel Romero García, y al departamento de Ingeniería química de la Universidad de Almería.

7 REFERENCIAS.

- [1] J. Moreno, M. A. Vargas, H. Olivares, J. Rivas, M. G. Guerrero. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. Vol 60, Dec. 1997, p: 175-182.
- [2] P.M.Nielsen, D. Petersen and C. Cambmann. Improved Method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science*. Vol. 66, No 5, 2001, p: 642-646.
- [3] J. Alder-Nissen. Enzymic hydrolysis of food protein. *Elsevier Applied Science Publishers*. 1986, p: 110-169.
- [4] J. Alder-Nissen. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Agric. Food. Chem.* 27, 1979, p: 1256-1262.
- [5] "Bacteria ATCC® Number: 33047TM [Internet]". Available from: <http://www.atcc.org/ATCCadvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNAT=33047&Template=bacteria>.
- [6] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough , A.L. Farr y R.J. Randall. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p: 265-275.
- [7] G. Kochert. Quantitation of the Macromolecular Components of Microalgae, in Handbook of Phycological Methods. Phycological and Biochemical Methods, J.Hellebust and S. Cragie (Eds.) Cambridge University Press, London 189. 1978.
- [8] J. Rodríguez-Ruiz, E. Belarbi, J. García y D. López. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology Techniques* 12, 1998. p 689-691.
- [9] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. and F. Smith. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem* 28, 1956, p:350-358
- [10] A. Jarunrattanasri, C. Theerakulkait, and K. R. Cadwallader. Aroma Components of Acid-Hydrolyzed Vegetable Protein Made by Partial Hydrolysis of Rice Bran Protein. *J. Agric. Food. Chem.* Apr. 18, 55(8), 2007, p: 3044-50.