

Treball de fi de grau

Desenvolupament de bioestimulants proteics sostenibles basats en aminoàcids lliures a partir de la hidròlisi de la microalga *Scenedesmus sp.*

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Josep Maria Serrat

Co-tutor: Montse Jorba

Vic, octubre de 2021

Agraïments

Volia agrair aquests mesos en que he pogut desenvolupar el meu treball de final de grau a la meva tutora de l'entitat, Montse Jorba, gràcies per confiar en mi des del principi i donar-me aquesta meravellosa oportunitat, per incloure'm en els projectes i fer-me sentir una més dins de l'equip. Al meu tutor de la universitat, Josep Maria Serrat, ja són molts anys junts, gràcies per la teva implicació amb els teus alumnes i per fer-me de guia. A les meves companyes a Leitat: Gal·la Ramis, de tu he après a prendre'm els problemes que van sorgint, com un repte a aconseguir. També a la Irina Chiriac, gràcies per la teva positivitat, la teva alegria i els teus consells. A la Estefanía Fernandez i la Marina Vidal, heu fet que el treball pugui ser un lloc de connexió i desconnexió, hem treballat i hem gaudit en el treball. Les professionals de la Sandra Balsells i la Cristina, gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat. Per últim, gràcies a l'Anna Margenat, una boníssima professora i investigadora.

Per una altra banda, donar-li les gràcies a l'Alfonso Perote, el meu tiet, que m'ha obert les portes en el món del sector agroalimentari i sense ell tot això no hagués estat possible. A tota la meva família per sempre estar-hi i donar-me forces per seguir endavant, per creure en mi i animar-me en totes les meves decisions, sou el meu àngel de la guarda.

He gaudit com una nena petita que fa les coses per primer cop, des de les reunions fins els cafès de l'Alberto i l'Agustina.

Gràcies a tots els que s'han creuat en aquest camí.

Us recordaré sempre,

Laia Perote.



“Agost, 2021. Equip de l'àrea Bioresources & Agrifood Technologies, Leitat, Vilanova del Camí. Sandra Balsells, Montse Jorba, Irina Chiriac, Estefanía Fernandez, Anna Margenat, Laia Perote i Gal·la Ramis.”

Resum

Títol: Desenvolupament d'aminoàcids lliures per formular bioestimulants proteics a partir de la microalga *Scenedesmus sp.*

Autora: Laia Perote Acin

Co-tutores: Josep Maria Serrat i Montse Jorba

Data: 27 d'octubre de 2021

Paraules clau: *Scenedesmus*, microalga, economia circular, bioestimulant, biofertilitzant, enzim, hidròlisi, aminoàcids, optimització.

Les microalgues són una font de proteïnes d'alta qualitat i amb un bon perfil aminoacídic que les fa altament competitives en el mercat. A més, es poden introduir en diversos processos, i ara més que mai, és el moment d'estudiar la seva funcionalitat i aplicabilitat i realitzar estudis d'extracció i solubilització de compostos intracel·lulars.

Aquest estudi proporciona un mètode vàlid per al desenvolupament d'un bioestimulant proteic basat en aminoàcids lliures a partir de la hidròlisi de la microalga *Scenedesmus sp.* L'estudi forma part del projecte europeu FERTIMANURE (FERTIlisers from animal MANURE), dins del marc de l'economia circular.

La producció del bioestimulant es va realitzar mitjançant un procés químic i enzimàtic, amb biomassa fresca de *Scenedesmus*, que consistia en dues fases diferenciades: 1) el trencament de la paret cel·lular mitjançant un tractament amb NaOH i la β -glucanasa Viscozyme a pH 4 i 50°C, i 2) la posterior hidròlisi proteica per a l'obtenció de pèptids i aminoàcids lliures mitjançant la endoproteasa i exopeptidada Alcalase i Flavourzyme, respectivament, a pH 6 i 65°C. Es va realitzar un disseny experimental per a cada fase gràcies al software Design Expert, en un disseny de superfície de resposta. Les condicions variables del disseny van ser: la concentració de proteases, la concentració de NaOH i el temps d'hidròlisi química i enzimàtica. Les condicions fixes van ser: el pH, la temperatura i la relació biomassa:aigua. El procés es va optimitzar i posteriorment es va escalar en un fermentador de 2 L amb biomassa liofilitzada.

Es van obtenir rendiments d'extracció proteica de fins al 80% spf i una quantitat d'aminoàcids lliures de fins al 10% sps. Els rendiments més elevats es van observar en les mostres tractades amb NaOH al 5% (p/p). Tot i així, la major quantitat d'aminoàcids lliures no es va observar en les mostres amb rendiments més elevats sinó que es van observar en mostres sense NaOH, a pH 4 i 50°C durant 48h.

Summary

Title: Enzymatic hydrolysis for protein bioestimulants development from microalgae *Scenedesmus* sp.

Author: Laia Perote

Supervisor: Josep Maria Serrat and Montse Jorba.

Date: October 27th, 2021

Keywords: *Scenedesmus*, microalgae, circular economy, bioestimulant, biofertilizer, enzyme, hydrolysis, amino acid, optimization.

Microalgae are a good quality protein source as they contain a high aminoacidic profile which makes them very competitive in the market. They also take place in loads of processes, now most than ever, is time to study their functionality and applications as for the extraction and solubilization of intracellular compounds.

In this study, microalgae are disrupted, and intracellular compounds are extracted in order to develop a protein bioestimulants based on free aminoacids. This study takes place in FERTIMANURE (FERTIlisers from animal MANURE), a European project involved in the circular economy strategy.

The bioestimulants development was made under a two phased chemical and enzymatical process using biomass of microalgae *Scenedesmus sp*: 1) cell wall disruption through an alkaline pre-treatment with NaOH in mild conditions and a β -glucanase Viscozyme in pH 4 and 50°C, and 2) an enzymatic hydrolysis to obtain peptides and free aminoacids by using endoprotease and exopeptidase Alcalase and Flavourzyme, respectively, in pH 6 and 65°C. An experimental design was developed in both phases through the software Design Expert, in a surface-response design model. Variable conditions of the model were: concentration of NaOH and the time of both chemical and enzymatic hydrolysis. Fixed conditions were: pH, temperature and biomass:water relation. To finish, all the parameters of the process were optimized and scaled-up in a 2L fermenter with lyophilized biomass.

The analysis response was the protein extraction yield and the quantification of free aminoacids. Yields for protein extraction reached out 80% on wet weight and an aminoacidic profile of 10% on dry weight. The highest yield for protein extraction was observed under the alkaline pre-treatment at 5% NaOH (w/w) even though the aminoacidic profile was highest without the pre-treatment step, in a pH 4 and 50°C during 48h.

Acrònims

Aa: Aminoàcids

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FL: Fracció líquida

FMOC: fluorenylmethyloxycarbonyl chloride

HSD: digestió d'alta velocitat

HPLC: High pressure liquid chromatography

OPA: orto-ftalaldehido

RP-HPLC: Reverse phase high pressure líquid chromatography

RSM: model de superfície de resposta

Spf: Sobre pes fresc

Sps: Sobre pes sec

TCA: àcid tricarboxilic

Índex

1	Introducció	11
1.1	Descripció del projecte FERTIMANURE	11
1.2	Tractament dels purins de porc a la planta pilot d'Espanya	13
1.3	Microalgues com a font de proteïnes	14
1.4	La microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	15
1.5	Bioestimulants vegetals	16
1.5.1	Tipus de bioestimulants vegetals en el mercat	17
1.5.2	Funcions dels aminoàcids com a bioestimulants en plantes	17
1.6	Hidròlisi enzimàtica de proteïnes	18
2	Objectius	19
3	Metodologia	20
3.1	Diagrama de flux del procés	20
3.2	Mètodes analítics	20
3.2.1	Determinació d'humitat i residu sec	20
3.2.2	Determinació de nitrogen total de la biomassa fresca	20
3.2.3	Determinació de nitrogen dels hidrolitzats de proteïna	21
3.2.4	Determinació del contingut de proteïna	21
3.2.5	Caracterització de la composició d'aminoàcids	21
3.3	Metodologia experimental	21
3.3.1	Screening	22
3.4	Disseny experimental	24
A)	Plantejament experimental per al trencament de la paret cel·lular	24
B)	Plantejament experimental de la hidròlisi enzimàtica	26
4	Resultats	28
4.1	Screening	28
4.2	Disseny experimental	31
A)	Plantejament experimental per al trencament de la paret cel·lular	31
B)	Plantejament experimental de la hidròlisi enzimàtica	36
4.3	Escalat	39
5	Discussió	39
5.1	Discussió dels resultats de l'screening	39
5.2	Discussió dels resultat del disseny experimental	¡Error! Marcador no definido.
6	Conclusions	42

7	Limitacions i recomanacions a realitzar en projectes futurs.....	42
8	Bibliografia.....	44
	Annex I: Caracteritzacions.....	46

Llista de taules

Taula 1. Comparació dels aminoàcids que posseeix la soja i la microalga <i>Scenedesmus so</i> , presentats en mg/aa/g, (Quevedo et al., 2008).....	16
Taula 2. Característiques dels enzims comercials que es van considerar a l'hora de realitzar proves pel trencament de la paret cel·lular de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	22
Taula 3. Característiques dels enzims comercials que es van considerar en la hidròlisi enzimàtica de les proteïnes intracel·lulars i en l'obtenció d'aminoàcids lliures.....	22
Taula 4. Condicions de l'screening. 1) Es comparen relacions mostra:líquid. 2) Augmenta el temps d'hidròlisi. 3) Es comparen B-glucanases i s'afegeix un pre-tractament alcalí 4) Es realitza un procés que inclou el trencament de la paret cel·lular i hidròlisi enzimàtica de proteïnes....	23
Taula 5. Condicions del disseny en l'optimització del trencament de la paret cel·lular.	24
Taula 6. Condicions del disseny per l'optimització del tractament d'hidròlisi proteica..	26
Taula 7. Caracterització de la biomassa fresca de <i>Scenedesmus sp.</i> , expressada spf.	28
Taula 8. Caracterització de nitrogen per cada extracte en el disseny experimental per l'optimització del tractament de disrupció cel·lular, spfr.....	46
Taula 9. Caracterització de nitrogen per cada extracte en el disseny experimental per l'optimització del tractament d'hidròlisi enzimàtica, spf.....	48
Taula 10. Condicions i resultats dels extractes del disseny experimental per la disrupció cel·lular. A la taula es mostren, entre altres, els resultats dels rendiments per cada extracte i els aminoàcids lliures, sobre pes sec.....	50
Taula 11. Condicions i resultats dels extractes del disseny experimental per la hidròlisi enzimàtica. A la taula es mostren, entre altres, els resultats dels rendiments per cada extracte i els aminoàcids lliures.	51

Llista de figures

Figura 1. Estratègia global del projecte FERTIMANURE (font: FERTIMANURE, s.f.).	12
Figura 2. Consorci del projecte FERTIMANURE (font: FERTIMANURE, s.f.).	13
Figura 3. Diagrama del procés del tractament de purins de porc, a la planta pilot d'Espanya (font: FERTIMANURE, s.f.).	14
Figura 4. Foto-bioreactors del cultiu de <i>Scenedesmus</i> sp. en l'empresa AlgaEnergy, Madrid.	14
Figura 5. Microalga <i>Scenedesmus</i> (Maria Solé-Bundó, 2017).	15
Figura 6. Característiques de la paret cel·lular (font: Novozymes A/S).	16
Figura 7. Trencament de la proteïna amb una endoproteasa.	19
Figura 8. Trencament de pèptids per l'obtenció d'aminoàcids lliures amb una exopeptidasa.	19
Figura 9. Diagrama de flux del procés per l'obtenció	20
Figura 10. Biomassa fresca de <i>Scenedesmus</i> sp. obtinguda de l'empresa AlgaEnergy, Madrid (font: pròpia).	21
Figura 11. A l'esquerra es mostra el bany tèrmic amb agitació, a la dreta es mostra un exemple dels tubs d'assaig un després del tractament tèrmic al bany.	25
Figura 12. A l'esquerra es mostra la Centrifuga Allegra 25R. A la dreta es pot observar un exemple dels tubs d'assaig després de la centrifugació i durant la filtració.	25
Figura 13. Termòstat HT200S per digerir les mostres a alta velocitat, kit LCK 338, espectrofotòmetre DR 3900 Lange Hach.	26
Figura 14. A) Filtrats obtinguts del primer screening, després del tractament amb β -glucanases 2h i les proteases 4h. B) Filtrats obtinguts del segon screening després del tractament amb β -glucanases 2h i les proteases 6h. C) Filtrats obtinguts del tercer screening on les mostres han estat sotmeses a un pre-tractament amb NaOH i diferents β -glucanases (sense proteases). D) Filtrats obtinguts del quart screening després del pre-tractament amb NaOH, β -glucanases i proteases.	28
Figura 15. Resultats dels screenings en diferents tractaments i condicions. Rendiments expressats spf.	29
Figura 16. Rendiments de les proves realitzades amb Viscozyme i UltrafloXL en un temps d'hidròlisi de 4h i relacions (1:5-1:10) biomassa:permeat, del primer i segon screening.	29
Figura 17. Comparativa dels screenings 1 i 2 de les mostres amb Viscozyme augmentant el temps d'hidròlisi enzimàtica de les proteïnes.	30
Figura 18. Rendiments obtinguts amb les diferents beta-glucanases comercials Pectinex, Celluclast 1.5, Viscozyme i Ultraflo XL.	30
Figura 19. Rendiments obtinguts sota una hidròlisi química i enzimàtica per la disrupció cel·lular i una hidròlisi enzimàtica per les proteïnes solubles.	31
Figura 20. Hidrolitzats obtinguts del disseny experimental per la disrupció cel·lular.	32
Figura 21. Rendiments obtinguts en el disseny experimental per optimitzar el procés de trencament de la paret cel·lular, expressats spf. Cada barra correspon a les mostres del disseny i sota es descriuen les condicions del tractament per cada hidrolitzat. Es descriuen les concentracions i el temps de la pre-tractament químic, i el temps d'hidròlisi enzimàtica amb Viscozyme.	32
Figura 22. Percentatge d'aminoàcids lliures expressat sps per cada hidrolitzat sota les condicions del disseny experimental.	33

Figura 23. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert pel tractament de disrupció cel·lular, amb la màxima concentració de Viszozyme.....	34
Figura 24. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert pel tractament de disrupció cel·lular, amb la màxima mínima concentració de Viscozyme	34
Figura 25. Model quadràtic ANOVA del disseny experimental per l'optimització del tractament de disrupció cel·lular.	35
Figura 26. Model òptim segons Design expert pel tractament de trencament de la paret cel·lular.....	35
Figura 27. Hidrolitzats obtinguts del disseny experimental de la hidròlisi enzimàtica.....	36
Figura 28. Rendiments obtinguts en el disseny experimental per optimitzar el procés d'hidròlisi proteica. Cada barra correspon a les mostres del disseny i sota es descriuen les condicions del tractament per cada extracte. Es descriuen els temps d'hidròlisi per les proteases Alcalase (A) i Flavourzyme (F), i la concentració de cada enzim.....	37
Figura 29. Percentatge d'aminoàcids lliures expressat sps per cada hidrolitzat sota les condicions del disseny experimental.	37
Figura 30. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert per l'optimització del tractament d'hidròlisi enzimàtica de proteïnes, amb la màxima concentració de Flavourzyme.	38
Figura 31. Model òptim segons Design Expert pel tractament d'hidròlisi enzimàtica de proteïnes.	38
Figura 32. Escalat del procés en un fermentador biològic Braun Biotech Biostat B de 2L.	39
Figura 33. Reactor de 100 L a la planta pilot de Leitat, Vilanova del Camí.....	43

1 Introducció

El treball realitzat consisteix en posar a punt un procés per al desenvolupament d'un producte bioestimulant vegetal basat en aminoàcids lliures (de concentració superior al 6%) a partir de la hidròlisi de microalgues. El procés es realitza amb biomassa microalgal de *Scenedesmus sp.* cultivada en aigua purificada del tractament dels purins de granges d'Osona.

Aquesta memòria forma part del projecte europeu H2020 FERTIMANURE.

La motivació per al desenvolupament d'aquest treball radica en la seva contribució a dissenyar nous productes sostenibles en el sector agronòmic.

A continuació, es descriurà detalladament el projecte. També s'explicaran els bioestimulants com a tal i els beneficis dels bioestimulants vegetals per a les plantes, els aminoàcids com a bioestimulants (producte principal) i la hidròlisi enzimàtica. Tota la part teòrica té per finalitat que el lector tingui una visió més clara del producte que s'obté en el procés experimental del treball. Finalment, a la metodologia es troba tota la documentació experimental que s'ha dut a terme per obtenir aminoàcids lliures a partir de la microalga *Scenedesmus sp.*

1.1 Descripció del projecte FERTIMANURE

FERTIMANURE (FERIlisers from animal MANURE) és un projecte innovador i estratègic que aposta per reemplaçar els fertilitzants minerals d'origen fòssil per biofertilitzants minerals i orgànics, entre altres productes, re-valoritzant-los i donant-los una nova aplicació en el mercat. Entre els productes obtinguts es troben concentrats rics en nutrients, àcid fosfòric, amoni i bioestimulants, essent els últims l'objectiu principal d'aquesta investigació.

A dia d'avui, s'utilitzen més recursos dels que la Terra proveeix, es fa un ús ineficient d'aquests recursos i es contribueix dràsticament en els gasos amb efecte d'hivernacle (o GEI). Tot això es coneix que té efecte directe en el canvi climàtic, la contaminació i la destrucció d'hàbitats terrestres i aquàtics. La revolució industrial, a partir del segle XVIII, va alterar de manera significativa els sistemes de producció, de consum, de mercat i es va expandir la urbanització. No hi ha cap dubte en que va ser un gran progrés econòmic, científic i social, tot i que a dia d'avui és necessari reconsiderar una era industrial innovadora i sostenible, que permeti abastir la demanda creixent de la població, mitjançant nous processos i productes. És de vital importància apostar per les noves tecnologies i aconseguir dissenyar nous processos que permetin aprofitar correctament els recursos que actualment s'estan malgastant

El projecte FERTIMANURE aposta per un model d'economia circular mitjançant la re-valorització de purins i fems d'animals de granja. Gestiona els productes de rebuig per obtenir components valuosos i dur al mercat nous fertilitzants amb base biològica (BBF). L'objectiu principal és aconseguir una gestió integral dels purins sense generació de residus (*Fig. 1*).

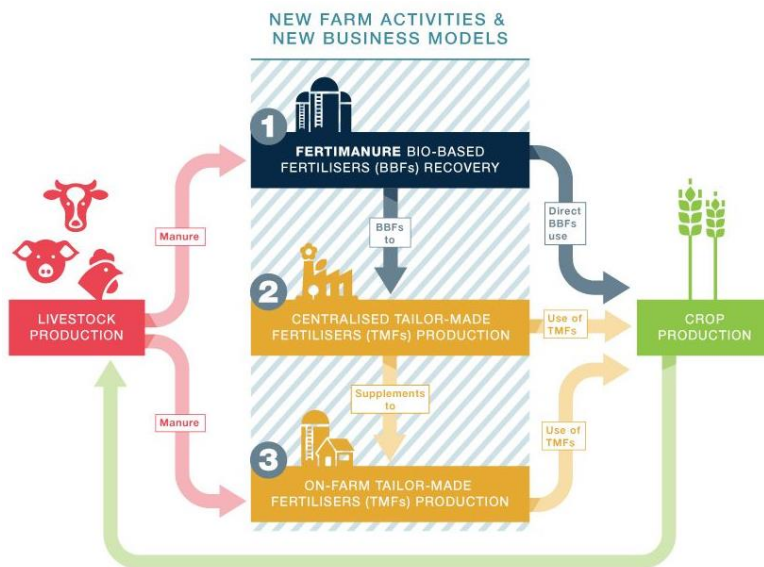


Figura 1. Estratègia global del projecte FERTIMANURE (font: FERTIMANURE, s.f.).

En la UE existeix una gran dependència de fertilitzants minerals d'origen fòssil. L'economia lineal actual no només utilitza recursos escassos com el gas natural, l'aigua dolça per agricultura o les reserves limitades de fosfats, sinó que també està causant un desequilibri en certes regions de la UE en la fabricació de pinsos per animals i en la fabricació de fertilitzants per a les plantes.

S'han identificat tres productes de rebuig principals que podrien ser estudiats perquè mitjançant diversos processos es poguessin reutilitzar i fer servir com a font principal per obtenir fertilitzants biològics. Aquests productes són els fems d'animals de granja, els fangs dels dipòsits d'aigües residuals i els residus de la cadena alimentària. Tot i que el principal flux residual, que a més conté el 70% dels nutrients, són els fems d'animals de granja. Els purins i els fems s'haurien de gestionar bé ja que són una font renovable de nutrients que permet limitar l'ús de fertilitzants minerals tradicionals com per exemple els compostos nitrogenats, la producció i el transport dels quals requereix de molta energia.

Els fems es poden utilitzar com a nutrients per al sòl, es poden incinerar, exportar o utilitzar per produir fertilitzants d'origen biològic i altres productes valuosos. Tot i que al voltant d'un 90% dels fems són retornats als camps agrícoles, en excés resulten perjudicials per a la pròpia natura i per al medi ambient. És important identificar els nuclis ramaders on es produeixen més fems dels que es poden reutilitzar en els camps agrícoles locals i així re-valoritzar-los per donar-los una nova aplicació (FERTIMANURE, s.f.).

Per altra banda, també és crucial que aquests processos siguin viables econòmicament.

El projecte va començar l'any 2020 i té una durada de 4 anys, està coordinat pel CT BETA de la UVic-UCC i compta amb un total de 20 socis de diversos països europeus, incloent també un soci d'Argentina i Xile (Fig. 2). Entre aquests socis trobem la Universitat de Vic (UVIC) i LEITAT. Les especificacions en quant a la investigació i el desenvolupament de tecnologies i processos per a l'obtenció de fertilitzants d'origen renovable es duu a terme en cinc plantes pilots, ubicades a Espanya, els Països Baixos, Alemanya, Bèlgica i França.

El cost total del projecte és de 8.419.670,75€ i l'UE ha finançat un total de 7.784.512,25€ gràcies al programa *EU Horizon 2020 Research and innovation Programme*.

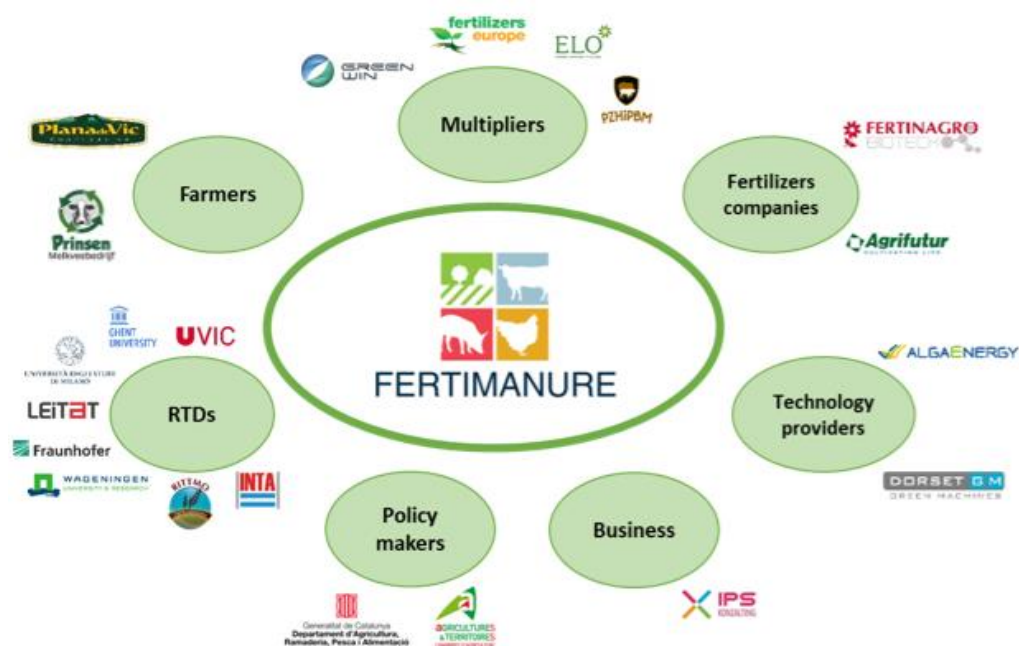


Figura 2. Consorci del projecte FERTIMANURE (font: FERTIMANURE, s.f.).

L'estudi experimental del present treball es duu a terme en el centre tecnològic Leitat, en el departament d'Economia Circular, concretament a l'Àrea de *Biorecursos & Tecnologies Agroalimentàries* (Centre d'Innovació Anoia, Vilanova del Camí).

1.2 Tractament dels purins de porc a la planta pilot d'Espanya

La planta pilot d'Espanya està situada a la comarca catalana d'Osona, en la granja de porcs "Cal Cos", Muntanyola.

La planta integra dos tractaments diferents, un per a la fracció sòlida i l'altre per a la fracció líquida dels purins de porc, punts 1,2 i 3 de la *Figura 3*.

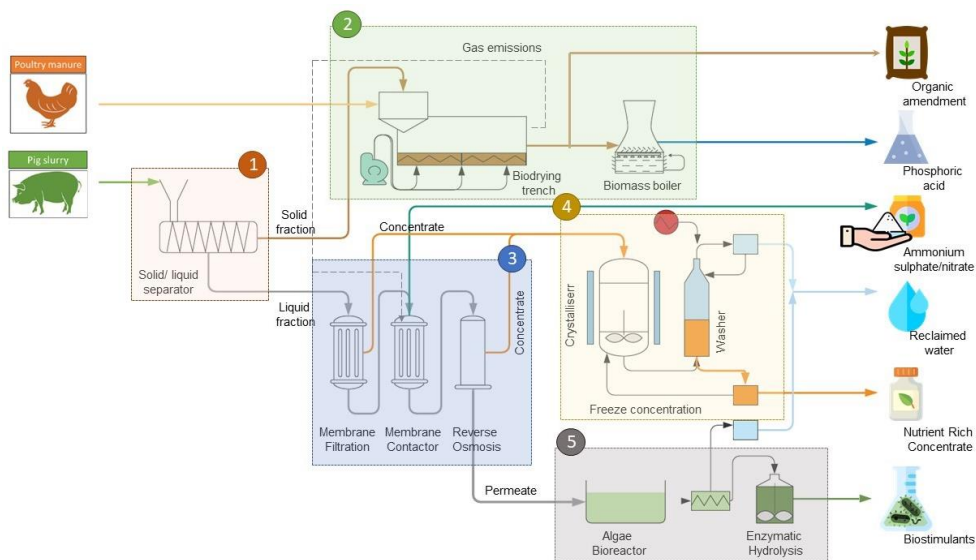


Figura 3. Diagrama del procés del tractament de purins de porc, a la planta pilot d'Espanya (font: FERTIMANURE, s.f.).

De la fracció líquida (FL) se n'obté aigua purificada que es fa servir per al cultiu de la biomassa fresca de l'alga *Scenedesmus sp.* necessària per dur a terme la part experimental d'aquest treball.

La FL purificada, anomenada permeat, integra un tractament de tres membranes: membrana de filtre, membrana contractora i membrana osmòtica (punt 3, Fig. 3).

Per tal d'aconseguir l'objectiu residu zero, amb les emissions gasoses produïdes durant el sistema de filtració es fabriquen solucions de nitrat o sulfat d'amoni. D'altra banda, el permeat s'envia a l'empresa AlgaEnergy, Madrid, on l'utilitzaran com a aigua de cultiu per a la microalga *Scenedesmus sp* en foto-bioreactors (Fig. 4).



Figura 4. Foto-bioreactors del cultiu de *Scenedesmus sp.* en l'empresa AlgaEnergy, Madrid.

La biomassa algal s'envia a Leitat, on es desenvolupa el tractament d'hidròlisi enzimàtica per a la producció d'aminoàcids lliures aptes per aplicacions agrícoles com a bioestimulants proteics. El present treball correspon a aquesta part de l'estudi. El punt 5 de la Figura 3 inclou l'etapa del creixement de l'alga i la hidròlisi enzimàtica.

1.3 Microalgues com a font de proteïnes

Diversos anàlisis i estudis científics han demostrat que les microalgues contenen alts continguts en proteïnes d'alta qualitat i un perfil aminoacídic que les fa potencialment competitives en el mercat. De fet, contenen una quantitat elevada de pèptids, lípids, vitamines

i àcids grassos poliinsaturats (omega-3 i omega-6), també presenten quantitats apreciables de carbohidrats, minerals, pigments i antioxidants (carotens) (Quevedo et al., 2008).

Algunes de les espècies de microalgues que es poden esmentar són: *Anabaena cylindrica*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Euglena gracilis*, *Porphyridium cruentum*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirogyra* sp., *Arthrospira maxima*, *Spirulina platensis*, *Synechococcus* sp., entre altres.

No totes les microalgues esmentades s'utilitzen a gran escala. És possible esmentar-ne algunes que sí, com per exemple *Chlorophyceae*, *Chlorella* sp. i *Scenedesmus obliquus*, (i el cianobacteri *Spirulina* sp. i *Arthrospira* sp.).

1.4 La microalga *Scenedesmus* sp.



Figura 5. Microalga *Scenedesmus* (Maria Solé-Bundó, 2017).

En tots els assajos experimentals d'aquest treball d'investigació s'utilitza biomassa de microalgues del gènere *Scenedesmus* sp. És un gènere de microalga eucariota i pertany a un grup d'algues verdes que se solen trobar en el plàncton d'aigua dolça. Són microorganismes fotoautòtrofs, és a dir creixen en presència de CO₂ com a font de carboni i llum solar com a font d'energia. Dins d'aquest gènere es troben 456 espècies, de les quals 72 han estat acceptades taxonòmicament. Es troben individualment o agrupades en colònies de 2 a fins 32 cèl·lules, tot i que aquestes se solen trobar en forma individual o en colònies de 4-8 cèl·lules. La seva morfologia és diversa, tant poden tenir forma esfèrica, com allargada o fusiforme. La seva paret cel·lular és rígida i conté una capa d'hemicel·lulosa, conjunt de polisacàrids heterogenis formats per monòmers units per enllaços β, formant una cadena lineal ramificada (Suárez, 2014).

Així com en el cas de les plantes superiors, les microalgues contenen paret cel·lular i poden ser més o menys rígides depenent del gènere. La paret cel·lular està composta per un 25-30% de cel·lulosa, 15-20% d'hemicel·lulosa, 35% de pectines i 5-10% de glicoproteïnes (Ahmed Mahdy et al., 2014). A la Figura 6 es pot observar un exemple de paret cel·lular.

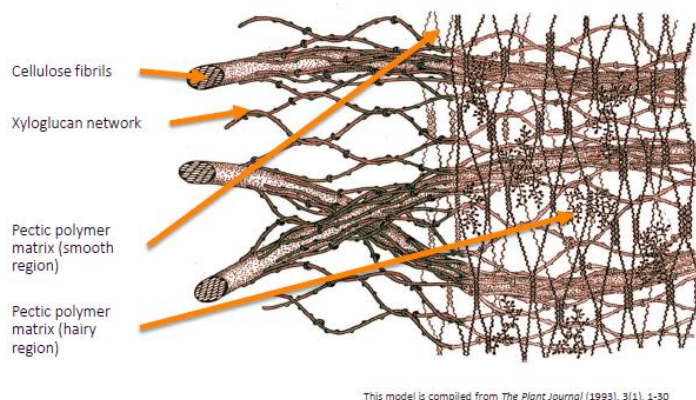


Figura 6. Característiques de la paret cel·lular (font: Novozymes A/S).

El contingut proteic de la microalga *Scenedesmus* varia depenent del mètode de disrupció cel·lular, el medi de cultiu emprat per fer créixer la biomassa, el tipus d'espècie, entre altres factors, però el rang oscil·la entre un 30-50% (Blecker et al., 2016).

En quant als aminoàcids, a la *Taula 1* es poden observar els nivells d'aminoàcids que conté l'alga *Scenedesmus sp.* en comparació amb la soja.

Taula 1. Comparació dels aminoàcids que posseeix la soja i la microalga Scenedesmus so, presentats en mg/aa/g, (Quevedo et al., 2008).

Aminoàcids	Soja	<i>Scenedesmus sp.</i>
Leucina	170	123
Lisina	160	230
Fenilalanina	110	100
Tirosina	80	74
Metionina	30	43
Cistina	30	243
Treonina	85	84
Valina	130	61
Isoleucina	120	42
Triptòfan	15	-

1.5 Bioestimulants vegetals

Es consideren bioestimulants vegetals les substàncies o microorganismes amb capacitat per millorar la resposta a l'estrès biòtic o abiòtic (García, 2017). L'estrès biòtic és el dany ocasionat a un organisme a causa d'un altre organisme com per exemple bacteris, fongs, paràsits, insectes, entre altres. L'estrès abiòtic és ocasionat per fenòmens externs com la temperatura, la humitat, la salinitat o la llum solar (Balachandran et al., 2006).

En grans cultius, no sempre es tenen les condicions ambientals òptimes i a causa del canvi climàtic, molts agricultors es veuen afectats econòmicament per les males collites. És per això que l'ús de bioestimulants s'està estenent en molts països ja que no es poden controlar els canvis d'humitat, temperatures o llum solar. Els bioestimulants, per tant, provoquen un efecte positiu en la planta en quant a germinació, desenvolupament, creixement vegetatiu i floració. Són, per tant, substàncies que activen funcions fisiològiques i que milloren el metabolisme, millorant la resposta a l'estrès, a més de qualsevol aspecte important pel cultiu, color, sabor, o eficàcia nutricional.

És important diferenciar els bioestimulants dels fertilitzants, els primers ajuden a l'absorció de nutrients de la planta i milloren la resposta a l'estrès, mentre que els segons aporten directament nutrients al sòl. La utilització de bioestimulants pot ajudar a disminuir l'ús de fertilitzants, una de les estratègies segons la UE per a 2030: "disminuir l'ús de fertilitzants en un 20%" (Certis, 2021).

1.5.1 Tipus de bioestimulants vegetals en el mercat

Existeixen diferents tipus de bioestimulants depenent de la seva composició (Certis, 2021):

- **Àcids húmics i fúlvics.** Formen part de la matèria orgànica del sòl, d'origen natural.
- **Aminoàcids i barreges de pèptids.** S'obtenen a partir d'hidròlisi química o enzimàtica.
- **Extractes d'algues i plantes.** Utilitzats des de fa molt de temps com a fertilitzants i s'ha demostrat el seu potencial ús com a bioestimulants.
- **Quitans i altres biopolímers.** Poden produir-se tant de forma natural com industrial, tenen un rang ampli d'aplicacions, en cosmètica, medicina, alimentació o biofertilitzants.
- **Compostos inorgànics.** Aquest grup engloba diversos elements químics com l'alumini, el cobalt o el sodi que, en les quantitats adequades produeixen efectes beneficiosos, com el reforçament de les parets cel·lulars o la millora a l'estrès biòtic.
- **Fongs i bacteris.** Encara que molts d'ells provoquen tot tipus de danys i malalties, alguns tipus de fongs i bacteris són positius per a les plantes, ja que aporten nutrients i incrementen la eficiència de l'absorció.

1.5.2 Funcions dels aminoàcids com a bioestimulants en plantes

- Per contrarestar l'efecte de les altes temperatures:

L-prolina, promou la retenció de major quantitat d'aigua en el citoplasma de les cèl·lules vegetals.

L'àcid glutàmic dona robustesa a la membrana citoplasmàtica davant de l'estrès hídric.

La L-serina actua sobre les aquaporines (canals que regulen l'entrada d'aigua a la planta a nivell cel·lular).

La L-valina conserva la integritat de la membrana cel·lular.

- En la fotosíntesis:

La L-glicina, L-alanina, L'àcid glutàmic i la L-arginina milloren la producció de clorofil·la. A conseqüència d'això promouen el procés de fotosíntesi i també incrementen la quantitat de clorofil·la a les fulles, aprofitant així la llum solar.

- Acció sobre els estomes:

L'obertura dels estomes es controlat per factors externs (llum, temperatura, humitat i salinitat) i per factors interns (aminoàcids). Quan els estomes es tanquen, es redueix la fotosíntesi, la transpiració i s'incrementa la respiració i es provoca una disminució del creixement de la planta.

L'àcid glutàmic afavoreix l'apertura dels estomes ja que actua com a factor osmòtic del citoplasma de les cèl·lules protectores.

- Salinitat:

La L-prolina reté aigua intracel·lular davant d'una alta concentració de sals a l'entorn. Col·labora en la absorció d'aigua i incrementa la pressió negativa al xilema.

- Absorció de nutrients:

Els aminoàcids L-glutàmic, L-glicina i L-àcid aspàrtic s'uneixen als nutrients actuant com agents complexants; es a dir, ajuden a la solubilització dels nutrients i formen complexos que la planta capta fàcilment el medi.

- Altres funcions:

També es poden esmentar altres funcions beneficioses com per exemple el creixement radical per la L-metionina i la L-arginina, activadors de fitohormones actuant com a precursors o activadors d'altres hormones vegetals (citoquines, auxines, etc). D' altra banda, poden actuar com a reservoris de nutrients i mantenir un equilibri en la flora microbiana del sòl. La L-prolina i l'àcid glutàmic son essencials en el procés de pol·linització. La valina, isoleucina i leucina estan estretament relacionades amb els processos de maduració del fruit (Sembralia, 2020) (Horticultura, 2021).

1.6 Hidròlisi enzimàtica de proteïnes

La tecnologia d'hidròlisi enzimàtica s'utilitza per a l'obtenció de pèptids de diferents mides i aminoàcids mitjançant l'ús de proteases i peptidases que tallen molècules de proteïna. Els hidrolitzats proteïcs es poden obtenir mitjançant mètodes químics i enzimàtics, però amb el mètode d'hidròlisi enzimàtica s'obtenen productes de major qualitat a l'hora que comporta una eficiència dels recursos energètics (Romero García et al., 2012).

Escollir els enzims necessaris per la hidròlisi sempre és un repte ja que s'han de tenir en compte diversos factors i és la fase més important del procés. No escollir bé els enzims o no establir bé les condicions òptimes pot ocasionar una pèrdua del grau d'hidròlisi esperat o una disminució de la quantitat de pèptids i aminoàcids esperats en la mostra hidrolitzada.

La producció d'aminoàcids a partir de *Scenedesmus sp* és complicada degut a les característiques de la paret cel·lular (*apartat 1.4*). L'extracció dels compostos intracel·lulars s'aconsegueix mitjançant una disrupció de la paret cel·lular. Existeixen diferents pre-tractaments que faciliten la hidròlisi enzimàtica de les proteïnes intracel·lulars, mitjançant el trencament de la paret cel·lular:

- **Mètodes químics.** S'utilitzen pre-tractaments àcids (HCl, H₂SO₄) o alcalins (NaOH). Els pre-tractaments alcalins són un bon mètode per a la disrupció cel·lular de microalgues amb un contingut elevat de cel·lulosa, tot i que en combinació amb altes temperatures pot ocasionar pèrdua i degradació de matèria orgànica (Ahmed Mahdy et al., 2014).
- **Mètodes físics.** S'utilitzen pre-tractaments amb homogeneïtzadors d'alta pressió, microones, congelació, *bead beating*, ultrasons i autoclaus. A l'article (Miranda et al., 2012) s'expliquen amb més detall els mètodes esmentats.
- **Mètodes enzimàtics.** S'utilitzen pre-tractaments enzimàtics amb lisozims que trenquin els enllaços β -glicosídics dels polisacàrids de la paret cel·lular (Ramirez, s.f.). Existeixen diferents tipus d'enzims comercials que serveixen per trencar la paret cel·lular. En la metodologia experimental (*apartat 3.3*) es realitzen diferents assajos amb enzims de la família de les β -glucanases.

En el disseny experimental (*apartat 3.4*) d'aquesta investigació s'utilitza un pre-tractament alcalí amb NaOH i un mètode enzimàtic amb l'enzim Viscozyme per trencar la paret cel·lular de l'alga *Scenedesmus sp.*

L'enzim Viscozyme és un complex multi enzimàtic amb una forta activitat pectolítica i gran part de carbohidrases, inclosa la arabanasa, cel·lulasa, B-glucanasa, hemicelulasa i xilanas (Novozymes, s.f.).

En el moment en que les proteases ja tenen accessibilitat a l'interior de la cèl·lula, es poden escollir els enzims dependent del producte que es vulgui obtenir i el tipus de substrat.

Per al trencament de molècules de proteïnes amb la finalitat d'obtenir pèptids s'utilitzen **endoproteases**, enzims proteolítics que tallen els enllaços peptídics, fragmentant les proteïnes en pèptids més petits (*Fig. 7*).

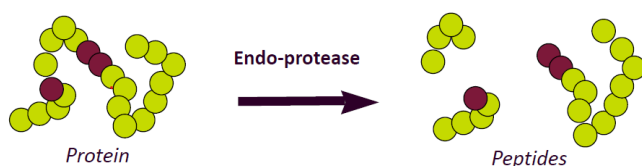


Figura 7. Trencament de la proteïna amb una endoproteasa per obtenir pèptids.

Tal i com es mostra més endavant, en l'apartat 3.4B de metodologia, per a la hidròlisi de pèptids s'utilitza l'endoproteasa comercial Alcalase 2.4L. Aquest enzim no és específic, però té preferència de tall per a aminoàcids hidrofòbics. Reacciona dins un rang ampli de pH (entre 6-10, essent el seu pH òptim 8), i a una temperatura de 65°C.

Per a l'obtenció d'aminoàcids lliures s'utilitzen les **exopeptidases**. Aquests enzims tallen en el grup amino-terminal de les cadenes de pèptids (*Fig. 8*).

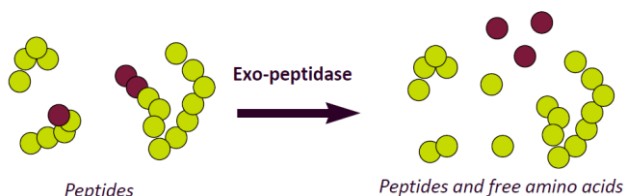


Figura 8. Trencament de pèptids per l'obtenció d'aminoàcids lliures amb una exopeptidasa.

Com a exopeptidasa es va utilitzar Flavourzyme 1000L, reacciona a una temperatura òptima de 50°C i en un rang de pH entre 5.5-7.5.

Les característiques dels enzims, així com part de la bibliografia i les imatges corresponents a aquest apartat, han estat facilitades per l'empresa Novozymes A/S, Dinamarca. Es pot ampliar la informació dels enzims utilitzats en aquest estudi en l'apartat 3.3.

2 Objectius

Objectiu general:

Posar a punt un procés de producció de bio-estimulants proteics, sostenible en el marc de l'economia circular, a partir d'hidrolitzats proteics procedents de microalgues (*Scenedesmus sp.*) cultivades en foto-bioreactors que utilitzen l'aigua purificada del tractament de purins.

Objectius específics:

- a. Dissenyar un estudi experimental per al pre-tractament i la hidròlisi de biomassa algal de *Scenedesmus sp.*
- b. Optimitzar el procés d'hidròlisi.
- c. Caracteritzar les mostres (humitat, residu sec, proteïna i aminoàcids lliures).
- d. Portar a terme l'escalat del procés a escala de laboratori.

3 Metodologia

3.1 Diagrama de flux del procés

El procés experimental consta de les següents etapes (Fig. 9):

1. Inicialment es van dur a terme unes proves prèvies, anomenades screenings, per determinar les condicions de les variables en el posterior disseny experimental.
2. En segon lloc, es va desenvolupar un disseny experimental per al procés de disrupció cel·lular de la microalga *Scenedesmus*, i un altre per a la hidròlisi enzimàtica de les proteïnes solubles.
3. Amb els resultats obtinguts es va optimitzar el procés.
4. L'última etapa consisteix en l'escalat del bioestimulant a partir de l'optimització del procés.

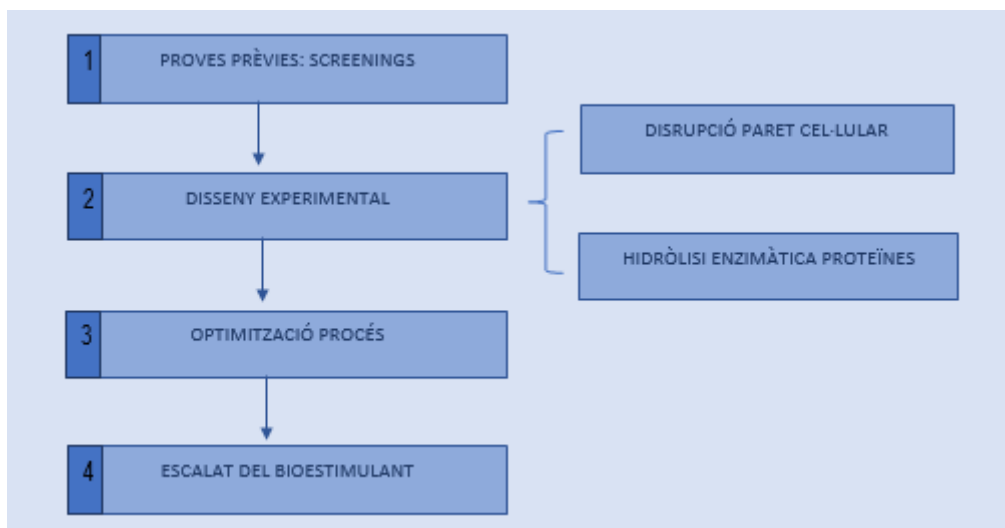


Figura 9. Diagrama de flux del procés experimental.

3.2 Mètodes analítics

3.2.1 Determinació d'humitat i residu sec

La humitat de les mostres es determina mitjançant un mètode indirecte., S'avalua per diferència de pes de les mostres abans i després de ser assecades a 105°C, en una estufa 5h.

3.2.2 Determinació de nitrogen total de la biomassa fresca

El contingut total de nitrogen es determina segons el mètode Kjeldhal. Les mostres es digereixen en una unitat de digestió Gerhardt amb àcid sulfúric i en presència d'un catalitzador (Cu) (9% CuSO₄·5H₂O) que accelera la conversió del nitrogen amínic unit orgànicament en ions d'amoni (NH₄⁺). Les mostres digerides es destil·len en una unitat Gerhardt destil·lador-

valorador, amb una solució d'hidròxid de sodi al 35% i es recullen en àcid bòric al 4%. L'amoníac atrapat en àcid bòric es determina valorant amb àcid clorhídric 0,1N.

3.2.3 Determinació de nitrogen dels hidrolitzats de proteïna

Per analitzar el contingut de nitrogen dels hidrolitzats proteics es va utilitzar el mètode del kit LCK 338 (HACH, Alemanya). Aquest mètode es basa en la digestió de Koroleff, basada en l'oxidació de la matèria orgànica i inorgànica nitrogenada per l'acció del peroxodisulfat en un termòstat HT200S que digereix les mostres amb tecnologia HSD (digestió d'alta velocitat). Aquests ions nitrats reaccionen en una solució àcid sulfúric i fosfòric amb 2,6-dimetilfenol formant un nitrofenol. A partir d'aquí, el contingut de nitrogen es quantifica en mg/L mitjançant un espectrofotòmetre DR 3900 Lange Hach.

3.2.4 Determinació del contingut de proteïna

Per obtenir el valor del contingut de proteïna, es multiplica el percentatge de nitrogen orgànic pel factor 6,25, factor de conversió que recomana la AOAC per als aliments.

3.2.5 Caracterització de la composició d'aminoàcids

Aquesta caracterització es realitza mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució amb sistema HPLC, model Agilent 1200. Les mostres es re-suspenen en una solució amb TCA 5% i es centrifuguen a 5000 revolucions 2 min per precipitar els sòlids. El sobrenedant es dilueix en HCl 0,1N afegint un estàndard intern de sarcosina (SAR). Els aminoàcids es derivatitzen amb OPA / FMOC i es procedeix a la seva separació mitjançant columna 250 x 4 Hypersil BDS-C18 5µm a 40°C sota gradient binari. Els dissolvents utilitzats per fer el gradient d'elució són A = tampó acetat al 100% en 18 min i B = 60% H₂O ultrapura /metanol /acetonitril (20/40/40 v/ v/ v) en 16 min. Els aminoàcids eluïts es quantifiquen amb un detector Diode Array. El triptòfan es determina per RP-HPLC després d'una hidròlisis alcalina segons el mètode de (Yust et al., 2004).

3.3 Metodologia experimental

La biomassa de la microalga *Scenedesmus sp.* utilitzada en aquest estudi experimental s'obté de l'empresa AlgaEnergy, Madrid (Fig. 10).

Degut al fet que la viscositat de l'alga és elevada, s'addiciona una fracció líquida per diluir la mostra, d'aquesta manera els enzims tenen accessibilitat al substrat. La fracció líquida prové d'una microfiltració de purí, obtingut per l'Àrea de Tecnologies Ambientals de Leitat, que també participa en el projecte FERTIMANURE.

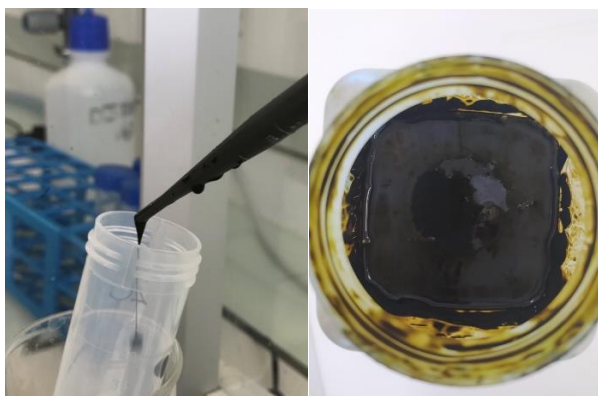


Figura 10. Biomassa fresca de *Scenedesmus sp.* obtinguda de l'empresa AlgaEnergy, Madrid (font: pròpia).

3.3.1 Screening

Es va realitzar un screening per determinar correctament les condicions de les variables a l'hora de desenvolupar un disseny experimental adequat.

Degut al fet que l'alga *Scenedesmus sp.* té la paret vegetal molt resistent (Zhang et al., 2018), es va realitzar un screening per al trencament de la paret cel·lular. En aquest screening es van considerar diferents tipus de β -glucanases per realitzar una hidròlisi enzimàtica de la paret cel·lular i per tal d'augmentar els rendiments d'extracció proteica també es va considerar la hidròlisi química amb NaOH al 5% (w/w) (Mahdy et al., 2014).

En la hidròlisi enzimàtica de les proteïnes intracel·lulars, per l'obtenció de pèptids i aminoàcids lliures, es van considerar les proteases Alcalasa i Flavourzyme degut a l'experiència prèvia de Leitat.

Els enzims comercials que es van utilitzar provenien de l'empresa Novozymes (Taula 2 i Taula 3).

Taula 2. Característiques dels enzims comercials que es van considerar a l'hora de realitzar proves pel trencament de la paret cel·lular de la microalga *Scenedesmus sp.*

	Nom component	Activitat catalítica (U/g)	Altres Activitats	Densitat (g/ml)	pH òptim	T ^a òptima (°C)
Pectinex[®] Ultra AFP	Pectin lyase	8500	Polygalacturonase	1.18	4-5	55-60
Ultraflo[®] XL	Beta-glucanase (endo-1,3(4)-) Xylanase	500 BG 1500 XL	Alpha-amylase	1.21	5	50-65
Celluclast[®] 1.5L	Cellulase	700 EG	Beta-glucanase Cellulase	1.22	4-6	20-50
Viscozyme[®] L	Beta-glucanase (endo-1,3(4)-)	100 FBG	Xylanase Cellulase Hemicellulase	1.21	4	50

Taula 3. Característiques dels enzims comercials que es van considerar en la hidròlisi enzimàtica de les proteïnes intracel·lulars i en l'obtenció d'aminoàcids lliures, respectivament.

	Nom component	Activitat catalítica (U/g)	Altres Activitats	Densitat (g/ml)	pH òptim	T ^a òptima (°C)
Alcalase[®] 2.4 L FG	Protease (Subtilisin)	2.4 AU-A	-	1.27	8	50-60
Flavourzyme[®] 1000L	Aminoamidase	1100 LAP	Protease	1.17	5.5-7.5	50-55

Els enzims s'han afegit tenint en compte la proteïna total de l'alga *Scenedesmus*, mitjançant el residu sec de l'alga i la densitat de l'enzim:

$$ml \text{ enzim} = gr \text{ d'alga} \times \% \text{ residu sec} \times \% \text{ concentració enzim} \times \text{densitat enzim}$$

Com a condicions fixes del screening es van establir els paràmetres següents:

- Concentració enzim del 2% spf
- Temperatura/pH β -glucanases 50°C/pH 4
- Temperatura proteases 65°C/pH 6

Com a condicions variables :

- Relació 1:5 - 1:10 (biomassa:permeat)
- Tipus de β -glucanasa
- Presència/absència NaOH 5% 48h
- Temps proteases

L'screening es va realitzar segons les condicions que es descriuen a la *Taula 4*. Un cop la mostra es va mesclar amb el permeat a la relació indicada, s'ajusta el pH a 4 amb HCl 1N per afegir els diferents tipus de β -glucanases i es deixen actuar durant 2h. Posteriorment en els screenings 1, 2 i 4 s'ajusten a pH a 6 amb NaOH 1N, i s'afegeixen les proteases Alcalase i Flavourzyme durant 4 o 6h. En el cas dels screenings 3 i 4, com que primerament s'afegeix el NaOH al 5% durant 48h, la mostra queda molt alcalina, en aquests casos per ajustar el pH 4 per les β -glucanases es realitza amb HCl al 20%.

Taula 4. Condicions de l'screening. 1) Es comparen relacions mostra:liquid. 2) Augmenta el temps d'hidròlisi. 3) Es comparen B-glucanases i s'afegeix un pre-tractament alcalí 4) Es realitza un procés que inclou el trencament de la paret cel·lular i hidròlisi enzimàtica de proteïnes.

Screening	Tractament químic	Tipus β -glucanasa	Hidròlisi amb proteases	Relació	Temps hidròlisi
1	-	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	10	6
	-	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	5	6
	-	Ultraflo	Alcalasa/Flavorzyme	10	6
	-	Ultraflo	Alcalasa/Flavorzyme	5	6
2	-	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	10	8
	-	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	5	8
	-	Ultraflo	Alcalasa/Flavorzyme	10	8
3	NaOH 5%	Pectinex	-	5	2
	NaOH 5%	Celluclast	-	5	2
	NaOH 5%	Viscozyme	-	5	2
	NaOH 5%	Ultraflo	-	5	2
4	NaOH 5%	Celuclast	Alcalasa/Flavorzyme	5	8
	NaOH 5%	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	5	8
	NaOH 5%	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	5	8
	NaOH 5%	Celuclast	Alcalasa/Flavorzyme	5	8
	NaOH 5%	Viscozyme	Alcalasa/Flavorzyme	10	8

Com a resposta d'anàlisi de l'screening es té en compte el rendiment d'extracció proteica, mitjançant la caracterització de nitrogen dels hidrolitzats de proteïna. Els hidrolitzats amb un major rendiment d'extracció de proteïna es consideraran per realitzar el disseny experimental.

3.4 Disseny experimental

S'estableix un disseny experimental d'anàlisi de superfície de resposta (RSM) amb el software Design Expert 11.1.2.0, on s'indiquen condicions de diferents variables per tal de trobar un model de procés òptim a partir de la resposta del disseny. Es realitzen dos dissenys en paral·lel i s'estableixen les condicions per al trencament de la paret cel·lular i de la hidròlisi enzimàtica a partir dels resultats del screening. En ambdós dissenys la resposta d'anàlisi és el rendiment d'extracció proteica, i permetrà estudiar com afecten al procés les variables i condicions del tractament de les mostres. També es determinarà la concentració d'aminoàcids lliures per a cada mostra tractada.

Segons els resultats obtinguts al screening s'ha seleccionat el següent procediment:

- Aplicació d'un pre-tractament químic amb NaOH
- Una hidròlisi amb β -glucanasa Viscozyme
- Una relació biomassa:permeat de 1:10

A) Plantejament experimental per al trencament de la paret cel·lular

S'estableixen 3 tipus de variables en el disseny d'anàlisi de superfície al Design Expert per analitzar el trencament de la paret cel·lular.

Condicions fixes del disseny:

- Relació 1:10
- Viscozyme 2%
- Temperatura 50°C

Condicions variables:

- NaOH (0-5%) w/w
- Temps NaOH (0-64h)
- Temps Viscozyme (0-3h)

El programa estableix un total de 20 proves diferents per realitzar l'estudi (*Taula 5*).

Taula 5. Condicions del disseny en l'optimització del trencament de la paret cel·lular.

Mostra	NaOH (%)	NaOH (h)	Visco (h)
1	5	48	0
2	0	48	0
3	5	2	1
4	2,5	15	2
5	2,5	64	1
6	5	1	1
7	2,5	24	0
8	2,5	2	1
9	2,5	15	2
10	2,5	24	1
11	2,5	24	2,7
12	2,5	24	1

13	0	48	1
14	5	48	2
15	2,5	2	0
16	5	2	0
17	0	48	2
18	2,5	24	1
19	2,5	24	0
20	0	48	2

Per realitzar les diferents proves s'afegeixen 2.5 g de microalga en una relació 1:10 amb la fracció líquida corresponent. En aquest disseny experimental quan la fracció líquida és NaOH 0% s'aplica permeat directament, en els casos de NaOH al 2,5% i 5% s'aplica la concentració de NaOH formulada amb permeat. Els diferents hidrolitzats es realitzen en un sistema de batch i s'introdueixen en un bany tèrmic amb agitació a 55rpm segons temperatura i temps preestablerts al disseny (Fig. 11).

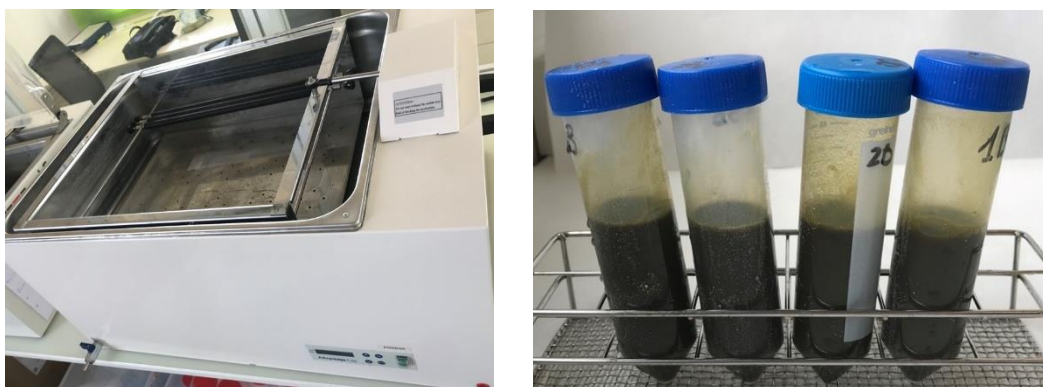


Figura 11. A l'esquerra es mostra el bany tèrmic amb agitació, a la dreta es mostra un exemple dels tubs d'assaig un després del tractament tèrmic al bany.

Un cop acabat el procés, els hidrolitzats s'inactiven a 90°C durant 10 min, amb un posterior centrifugat (Allegra™ 25R) de 10000 rpm a 10°C durant 10' i un filtrat amb paper de resma de porositat <math><40\mu\text{m}</math> (Fig. 12).

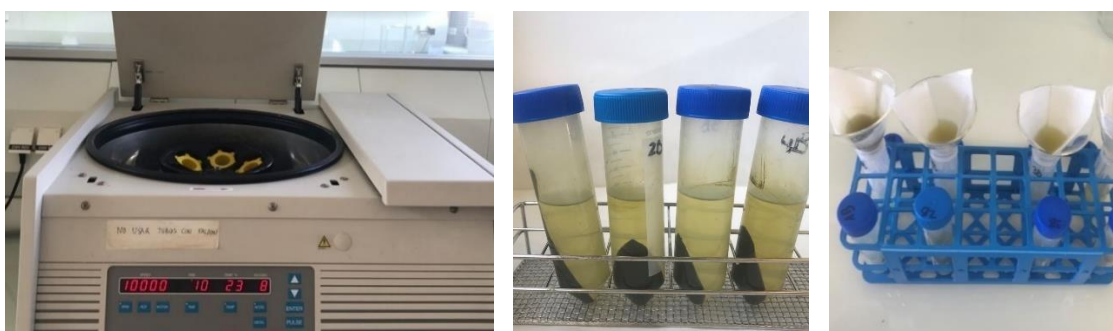


Figura 12. A l'esquerra es mostra la Centrifuga Allegra 25R. A la dreta es pot observar un exemple dels tubs d'assaig després de la centrifugació i durant la filtració.

Es mesura el pes del filtrat en una balança analítica i s'analitza el nitrogen present a l'extracte gràcies al Kit LCK 338 (Fig. 13) i la concentració d'aminoàcids lliures per HPLC (veure apartat 3.2). Es calcula el rendiment d'extracció proteica i s'introdueixen les dades al programa Design Expert.



Figura 13. Termòstat HT200S per digerir les mostres a alta velocitat, kit LCK 338, espectrofotòmetre DR 3900 Lange Hach.

B) Plantejament experimental de la hidròlisi enzimàtica

Degut al fet que els dos dissenys (A i B) es van realitzar en paral·lel, es van establir unes condicions fixes de pre-tractament amb NaOH i la β -glucanasa, abans de la hidròlisi amb proteases.

Per realitzar el disseny d'anàlisi de superfície de resposta es consideren 3 variables.

Condicions fixes del disseny:

- Relació 1:10 (biomassa:permeat)
- Pre-tractament amb NaOH al 5% durant 48h
- Pre-tractament enzimàtic amb Viscozyme 2%

Condicions variables del disseny:

- Alcalase (0-2%)
- Flavourzyme (0-2%)
- Temps d'hidròlisi (0-6h)

El programa informàtic ens mostra un total de 26 proves diferents per realitzar el disseny experimental (Taula 6).

Taula 6. Condicions del disseny per l'optimització del tractament d'hidròlisi proteica..

Mostra	Hidròlisi amb proteases		
	Temps hidròlisi	% Alcalase	% Flavourzyme
1	6	0	2
2	4	1	1
3	4	1	1
4	4	2	2
5	4	2	2
6	4	1	2,5
7	4	1	0
8	4	1	2,5
9	2	2	0

10	2	0	2
11	6	2	2
12	0	0	0
13	2	1	1
14	4	2,5	1
15	7	1	1
16	2	2	2
17	4	0,5	0,5
18	4	0	1
19	4	2,5	1
20	7	1	1
21	2	1	1
22	4	0	1
23	4	0,5	0,5
24	6	2	0
25	4	1	0
26	0	0	0

D'igual manera que en el disseny experimental anterior (A) els processos s'han realitzat en un sistema de batch afegint 2.5 gr de microalga en una relació 1:10. En aquest disseny la fracció líquida en tots els casos es NaOH al 5% formulat amb permeat. Un cop obtinguda la mescla amb l'alga es deixa en agitació al bany tèrmic durant 48h.

Quan finalitza el pre-tractament químic, s'ajusta el pH a 4 amb HCl al 20% i s'afegeix Viscozyme al 2% durant 2h a 50°C en el mateix bany tèrmic, realitzant així la hidròlisi del pre-tractament.

Un cop finalitzat el pre-tractament, s'inicia el disseny experimental d'hidròlisi enzimàtica amb les diferents condicions de hidròlisi proteica. Primer s'ajusta el pH a 6 amb NaOH 1N, s'afegeixen les proteases Alcalase i Flavourzyme a les concentracions que marca el disseny. En aquest cas, la hidròlisi amb proteases es realitza a 65°C en agitació al bany tèrmic.

Un cop acabat el procés, els hidrolitzats s'inactiven a 90°C durant 10 min, amb un posterior centrifugat de 10000 rpm a 10°C durant 10 min i un filtrat amb paper de filtre de porositat <40µm.

S'analitza el nitrogen dels hidrolitzats amb el Kit LCK 338 i la concentració d'aminoàcids lliures per HPLC (veure *apartat 3.2*). Finalment s'introdueixen els resultats al programa Design Expert per avaluar la resposta del disseny.

4 Resultats

4.1 Screening

Primerament es va caracteritzar l'alga fresca de *Scenedesmus* (Taula 7):

Taula 7. Caracterització de la biomassa fresca de *Scenedesmus* sp., expressada spf.

Mostra	Matèria seca (%)	Nitrogen total (%)	Proteïna (%)
Biomassa fresca comercial	16.96 ± 0.71	8,3 ± 0,136	10.59 ± 0.126

Tal i com s'explica en l'apartat 3.3.1 es van realitzar un seguit de proves amb alga fresca, prèvies al disseny, amb la finalitat de poder determinar i ajustar adequadament les condicions i variables del disseny.

Es pot observar a la Figura 14 que el color dels hidrolitzats proteics obtinguts és molt diferent. Els hidrolitzats del primer screening tenen un color bastant transparent (A), igual que en el segon screening (B), mentre que del tercer al quart screening s'aprecia un augment de l'opacitat del líquid. Aquesta coloració fosca de l'hidrolitzat pot voler dir que hi ha hagut una alliberació dels pigments atrapats en les membranes cel·lulars de la microalga *Scenedesmus* i que per tant també s'han alliberat altres molècules com per exemple proteïnes.

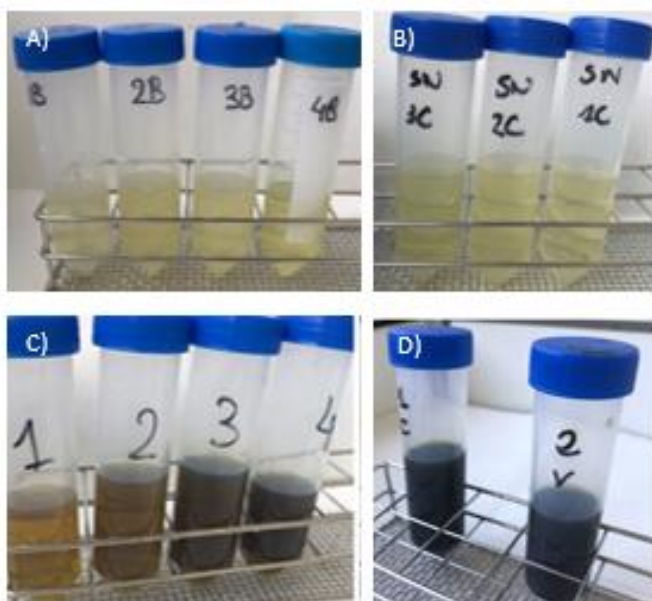


Figura 14. A) Filtrats obtinguts del primer screening, després del tractament amb β -glucanases 2h i les proteases 4h. B) Filtrats obtinguts del segon screening després del tractament amb β -glucanases 2h i les proteases 6h. C) Filtrats obtinguts del tercer screening on les mostres han estat sotmeses a un pre-tractament amb NaOH i diferents β -glucanases (sense proteases). D) Filtrats obtinguts del quart screening després del pre-tractament amb NaOH, β -glucanases i proteases.

A continuació es mostren els resultats dels rendiments d'extracció proteica (Fig.15). Els 4 screenings s'indiquen amb colors diferents. En el primer, s'obtenen rendiments d'extracció proteica molt baixos, per sota del 30%. En el segon, el temps d'hidròlisi augmenta a 8h, i a

conseqüència d'això els rendiments augmenten fins a un 50-60%. En el tercer i quart screening, amb el pre-tractament amb NaOH, s'obtenen rendiments entre 40-70%.

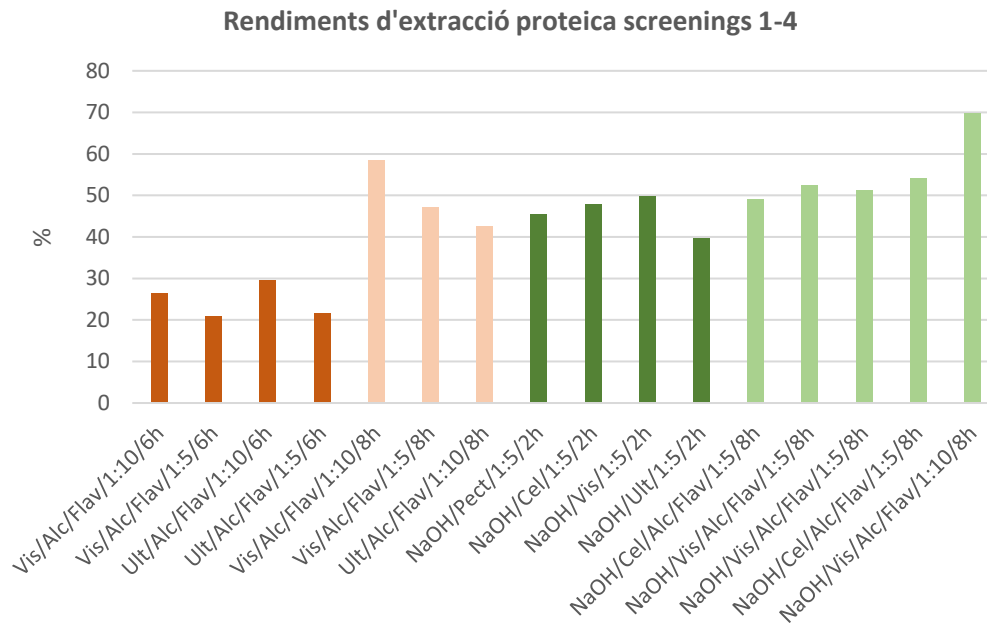


Figura 15. Resultats dels screenings en diferents tractaments i condicions. Rendiments expressats spf.

En la *Figura 16*, es pot observar que en tots els casos les proves realitzades amb una relació 1:10 de biomassa: permeat obtenen millors rendiments d'extracció que en les de relació 1:5.

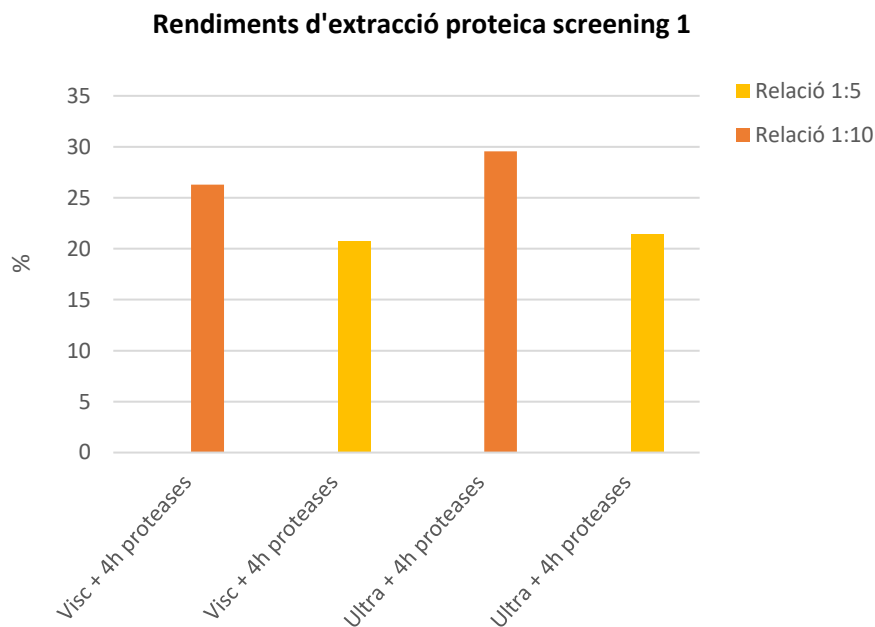


Figura 16. Rendiments de les proves realitzades amb Viscozyme i UltrafloXL en un temps d'hidròlisi de 4h i relacions (1:5-1:10) biomassa:permeat, del primer i segon screening. Expressats spf.

En la *Figura 17*, es poden comparar els rendiments del primer i segon screening; quan augmenta el temps d'hidròlisi es pot observar un rendiment el doble d'elevat.

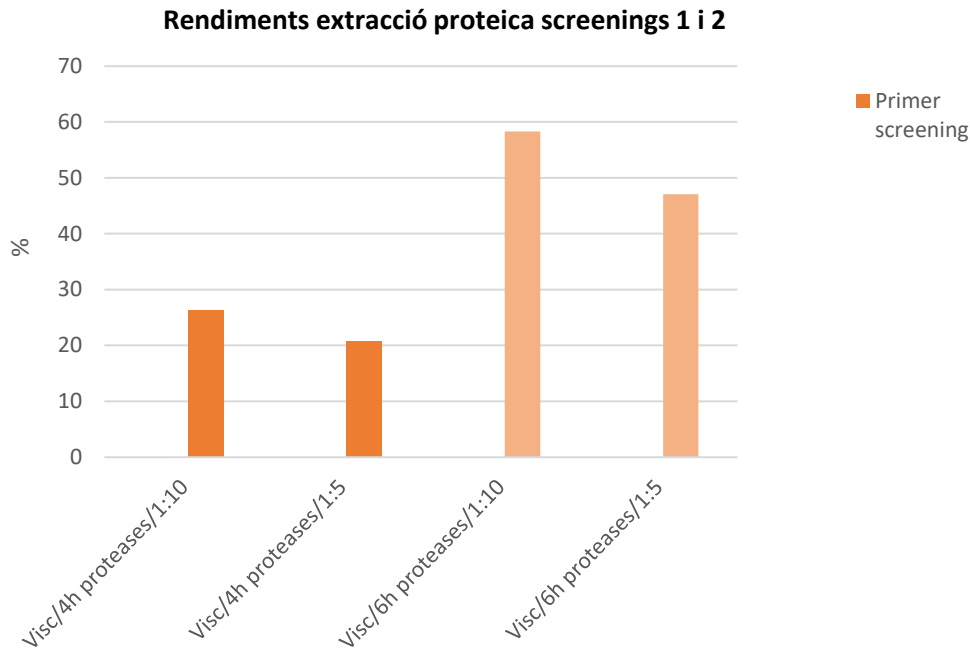


Figura 17. Comparativa dels screenings 1 i 2 de les mostres amb Viscozyme augmentant el temps d'hidròlisi enzimàtica de les proteïnes.

En la *Figura 18*, s'observen els resultats del tercer screening on es comparen les diferents β -glucanases juntament amb el pre-tractament amb NaOH, sense l'aplicació de la hidròlisi enzimàtica amb proteases. S'obtenen rendiments de solubilització proteica lleugerament més elevats per Viscozyme i Celluclast 1.5L.

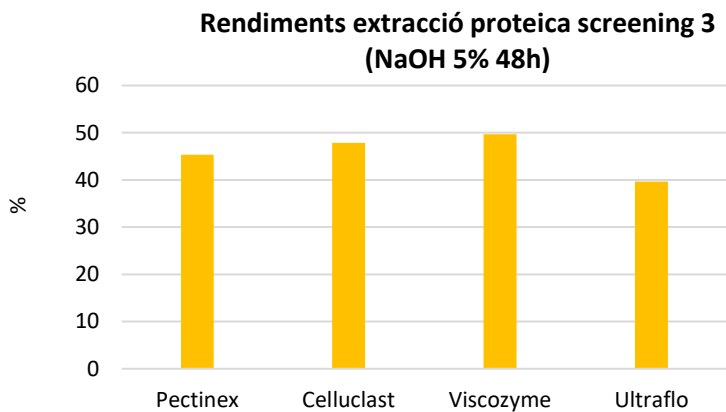


Figura 18. Rendiments obtinguts amb les diferents beta-glucanases comercials Pectinex, Celluclast 1.5, Viscozyme i Ultraflo XL. Expressats spf.

A la *Figura 19*, es poden observar rendiments similars tant per Viscozyme com per Celluclast. L'única diferència que s'observa és per Viscozyme en la relació 1:10, que presenta un rendiment de fins als 70%. Comparant el rendiment obtingut per Viscozyme en el segon i quart screening es pot apreciar com el fet d'haver afegit el pre-tractament químic ha fet augmentar el rendiment d'extracció de fins a un 10%.

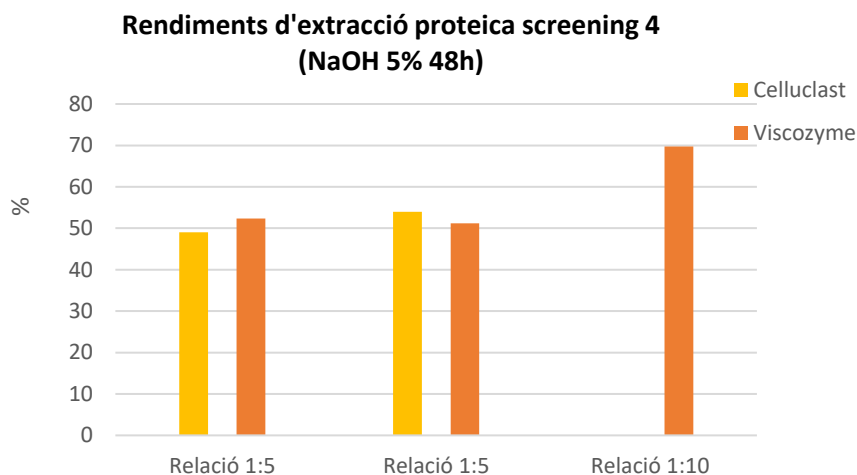


Figura 19. Rendiments obtinguts sota una hidròlisi química i enzimàtica per la disrupció cel·lular i una hidròlisi enzimàtica per les proteïnes solubles. Expressats spf.

Conclusions parcials:

Després de realitzar l'screening es considera que segons els resultats obtinguts, la mostra d'alga *Scenedesmus* s'hidrolitza millor en una relació 1:10 (biomassa:permeat). De totes les β -glucanases provades, Viscozyme és l'enzim que actua millor per al trencament de la paret cel·lular.

Per tant, es decideix utilitzar com a condicions fixes per al disseny experimental:

- Aplicació d'un pre-tractament químic amb NaOH
- Una hidròlisi amb la β -glucanasa Viscozyme
- Una relació mostra:aigua de 1:10

4.2 Disseny experimental

A) Plantejament experimental per al trencament de la paret cel·lular

Les condicions del disseny es van establir en base a la interpretació dels resultats del screening descrit anteriorment.

Els hidrolitzats del disseny experimental per a la disrupció de la paret cel·lular es poden observar en la *Figura 20*. Es poden apreciar diferents tonalitats en els colors dels hidrolitzats, això té relació amb les diferents condicions de tractament. A mesura que la concentració del NaOH és més elevada, els colors dels tubs són més foscos, cosa que indica que les extraccions realitzades han actuat de forma diferent.



Figura 20. Hidrolitzats obtinguts del disseny experimental per la disrupció cel·lular.

En la Figura 21 s'observa un gràfic amb els rendiments de l'extracció de proteïnes obtinguts del disseny, ordenats segons la concentració de NaOH present a les mostres. La Taula 8 de l'Annex I conté informació complementària corresponent a la determinació de nitrogen que es va utilitzar per realitzar els càlculs dels rendiments.

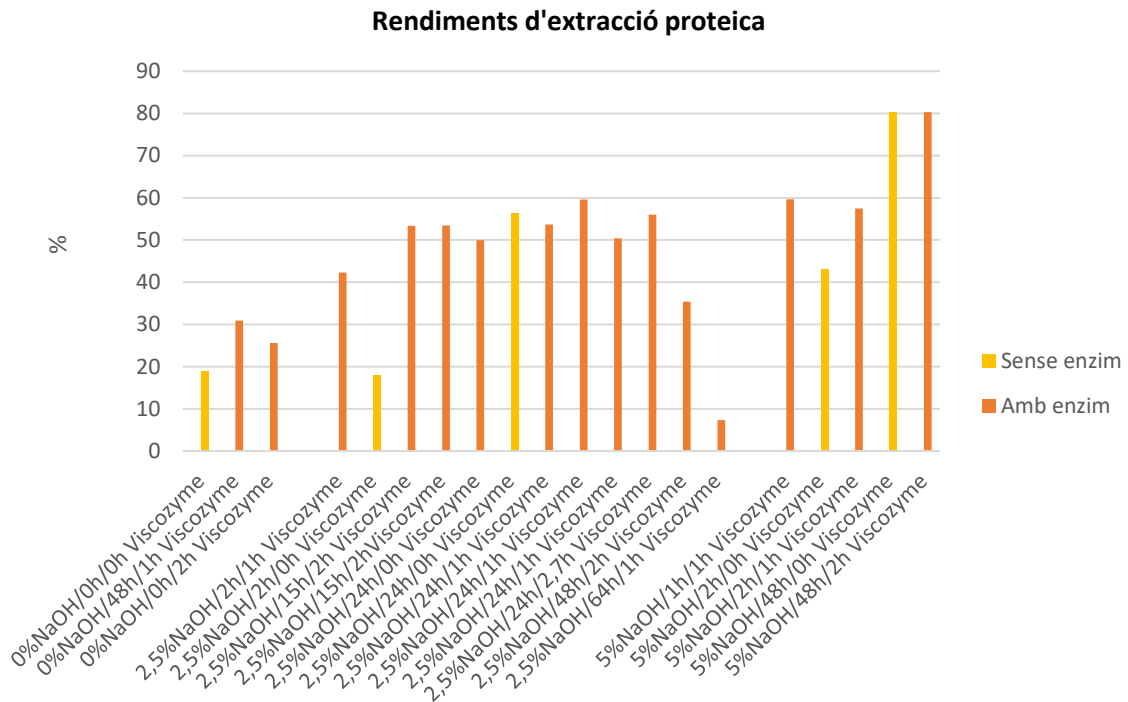


Figura 21. Rendiments obtinguts en el disseny experimental per optimitzar el procés de trencament de la paret cel·lular, expressats spf. Cada barra correspon a les mostres del disseny i sota es descriuen les condicions del tractament per cada hidrolitzat. Es descriuen les concentracions i el temps de la pre-tractament químic, i el temps d'hidròlisi enzimàtica amb Viscozyme. Expressats spf.

Es poden observar rendiments d'extracció entre <10% i fins al 80%, depenent de les condicions de reacció. Les mostres amb rendiments més elevats són les mostres amb una concentració al 5% de NaOH.

En relació als aminoàcids lliures s'obtenen els valors que es poden observar a la Figura 22, ordenats tal i com apareixen en la Taula 5 de l'apartat 3.4

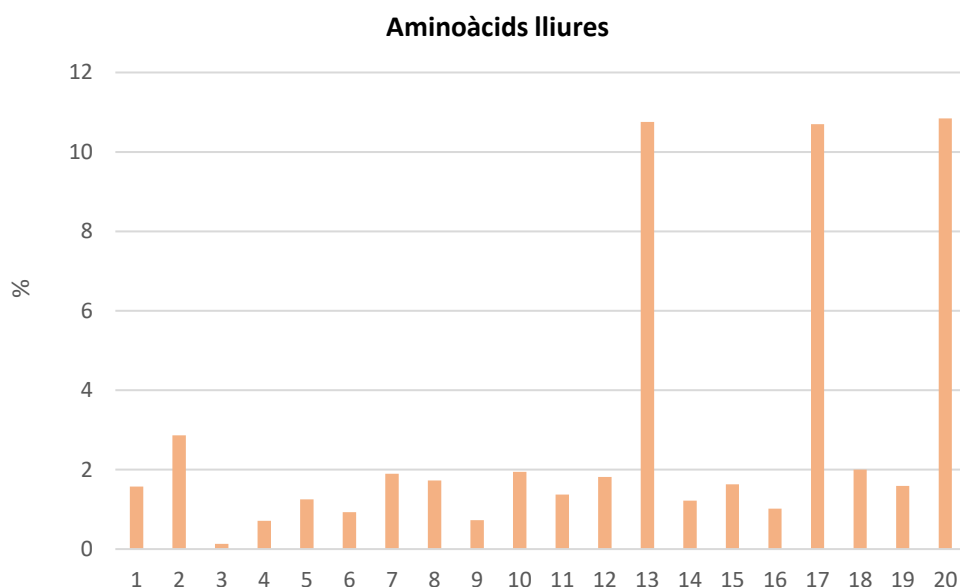


Figura 22. Percentatge d'aminoàcids lliures expressat sps per cada hidrolitzat sota les condicions del disseny experimental.

A la Figura 22 es poden observar percentatges d'aminoàcids lliures més baixos per als hidrolitzats amb una concentració al 5% de NaOH. La concentració d'aminoàcids més elevada s'observa en hidrolitzats amb concentracions més baixes de NaOH (2,5%). Per últim, els hidrolitzats amb una concentració d'aminoàcids significativament més elevada s'observa en condicions sense NaOH. A la Taula 10 de l'Annex I es pot trobar informació complementària corresponent a la caracterització d'aminoàcids.

Design Expert proporciona un **model 3D de superfície de resposta (RSM)** que permet interpretar i analitzar els resultats dels rendiments obtinguts en les mostres segons les condicions del disseny.

La Figura 23 mostra un model RSM obtingut amb la **mínima concentració de Viscozyme**. Per una banda, s'observa com a mesura que augmenta la concentració de NaOH els rendiments d'extracció proteica són més elevats. Per una altra banda, el temps de NaOH afecta positivament al rendiment d'extracció, tot i que quan arriba a les 48h el rendiment comença a disminuir progressivament degut al fet que les proteïnes es degraden.

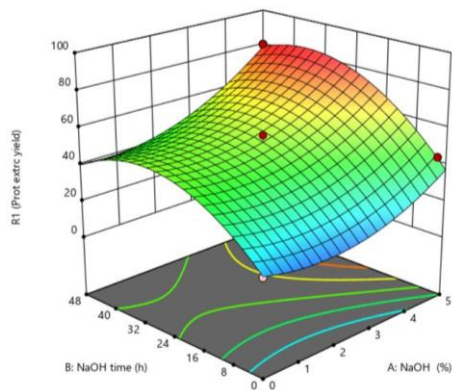


Figura 23. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert pel tractament de disrupció cel·lular, amb la màxima concentració de Viscozyme.

La Figura 24 mostra un model RSM obtingut amb la **màxima concentració de Viscozyme**. En aquest cas, de manera similar a la resposta obtinguda en la Figura 23, s'obté un augment en els rendiments d'extracció quan augmenta el temps de pre-tractament químic, però comença a disminuir lleugerament passades 24h.

Per una altra banda, el rendiment augmenta significativament a mesura que augmenta la concentració de NaOH.

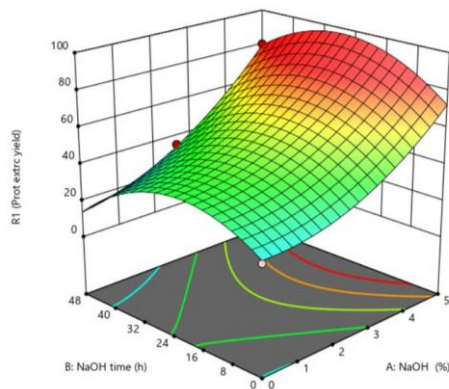


Figura 24. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert pel tractament de disrupció cel·lular, amb la màxima mínima concentració de Viscozyme .

Els resultats del **model quadràtic ANOVA** demostren que el model és significatiu (Fig. 25). Existeixen diferències significatives en la concentració de NaOH i el temps del NaOH ($p\text{-value} < 0.05$). No s'obtenen diferències significatives en el temps d'hidròlisi de Viscozyme ($p\text{-value} > 0.05$).

Response 1: R1

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	6841,88	9	760,21	35,21	< 0.0001	significant
A-NaOH	2895,73	1	2895,73	134,11	< 0.0001	
B-NaOH time	466,07	1	466,07	21,59	0,0009	
C-Viscozyme time	46,23	1	46,23	2,14	0,1741	
AB	129,81	1	129,81	6,01	0,0341	
AC	109,81	1	109,81	5,09	0,0478	
BC	227,09	1	227,09	10,52	0,0088	
A ²	539,35	1	539,35	24,98	0,0005	
B ²	2194,93	1	2194,93	101,66	< 0.0001	
C ²	15,73	1	15,73	0,7287	0,4133	
Residual	215,92	10	21,59			
Lack of Fit	151,85	6	25,31	1,58	0,3425	not significant
Pure Error	64,06	4	16,02			
Cor Total	7057,79	19				

Figura 25. Model quadràtic ANOVA del disseny experimental per l'optimització del tractament de disrupció cel·lular.

Finalment, amb els rendiments d'extracció obtinguts de l'anàlisi dels hidrolitzats sota les condicions del disseny, Design Expert calcula la condició òptima del procés per obtenir una resposta, en aquest cas el rendiment, elevada (Fig. 26). Es descriu la concentració de NaOH, el temps d'hidròlisi del NaOH i el temps d'hidròlisi de la β -glucanasa, també calcula el rendiment aproximat que hauria de donar l'assaig experimental sota aquestes condicions.

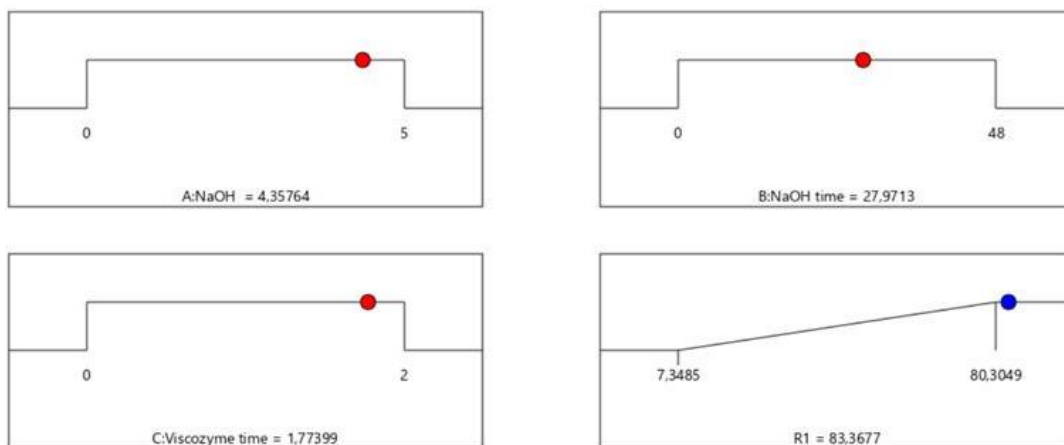


Figura 26. Model òptim segons Design expert pel tractament de trencament de la paret cel·lular.

Tot i que les condicions òptimes segons el programa siguin les que s'observen a la Figura 26, en l'escalat no s'afegirà Viscozyme a la reacció, degut al fet de que no existeixen diferències significatives segons el model d'ANOVA i la hidròlisi amb NaOH demostra ser prou efectiva.

Conclusions parcials:

Després de realitzar el disseny experimental per al trencament de la paret, s'obté un model d'optimització del procés. Els rendiments d'extracció de proteïnes és alt, mentre que els aminoàcids en la majoria d'extractes és baix.

Dels resultats obtinguts es pot concloure:

- El tractament amb NaOH és un bon mètode de disrupció cel·lular
- El tractament amb NaOH no és un bon mètode per obtenir una quantitat elevada d'aminoàcids lliures

- L'escalat es realitzarà amb les condicions obtingudes del model òptim, tot i que no s'afegirà Viscozyme

B) Plantejament experimental de la hidròlisi enzimàtica

S'obtenen els hidrolitzats proteics del disseny experimental B segons les condicions establertes en l'apartat 3.3B.

Es pot observar en la *Figura 27* com les tonalitats dels hidrolitzats són molt semblants en tots els casos. En el cas dels hidrolitzats del disseny experimental A s'observaven tonalitats més variables, per tant, això pot ser un indicador del fet que les mostres han reaccionat de manera similar en diferents condicions de tractament.



Figura 27. Hidrolitzats obtinguts del disseny experimental de la hidròlisi enzimàtica.

Es va analitzar el nitrogen dels diferents hidrolitzats i es va calcular els rendiments de solubilització proteica.

En la *Figura 28* s'observa un gràfic amb els rendiments de l'extracció de proteïnes obtinguts del disseny, ordenats segons els temps de la hidròlisi enzimàtica. La *Taula 9* de l'Annex I conté informació complementària corresponent a la caracterització de nitrogen que es va utilitzar per realitzar els càlculs dels rendiments.

Rendiments d'extracció proteica

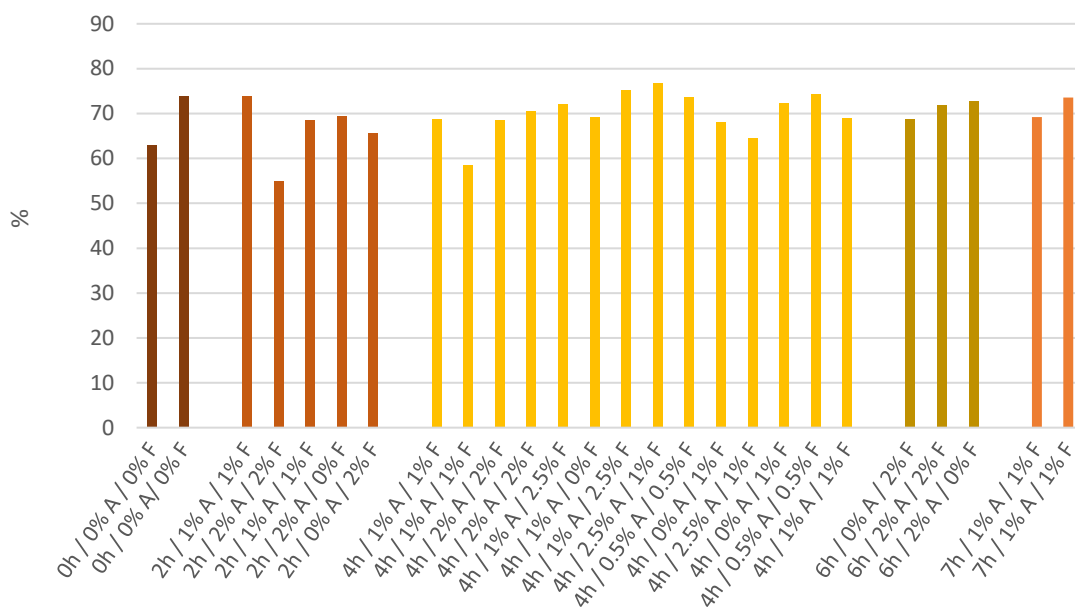


Figura 28. Rendiments obtinguts en el disseny experimental per optimitzar el procés d'hidròlisi proteica. Cada barra correspon a les mostres del disseny i sota es descriuen les condicions del tractament per cada extracte. Es descriuen els temps d'hidròlisi per les proteases Alcalase (A) i Flavourzyme (F), i la concentració de cada enzim. Expressats spf.

Es poden observar rendiments d'extracció entre un 50-70%, depenent dels extractes. En general s'obtenen els mateixos rendiments sota les diferents condicions de reacció, no s'aprecia una variabilitat significativa. A la Taula 11 de l'Annex es troba informació complementària de la caracterització d'aminoàcids.

En relació als aminoàcids lliures s'obtenen els valors que es poden observar a la Figura 29, ordenats tal i com apareixen en la Taula 5 de l'apartat 3.4B.

Aminoàcids lliures

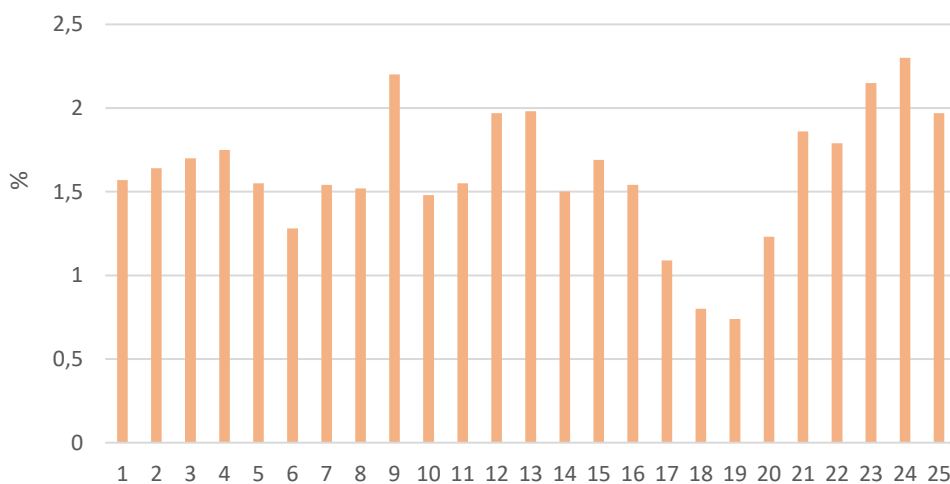


Figura 29. Percentatge d'aminoàcids lliures expressat sps per cada hidrolitzat sota les condicions del disseny experimental.

Design Expert proporciona un **model 3D de superfície de resposta (RSM)** que permet interpretar i analitzar els resultats dels rendiments obtinguts en les mostres segons les condicions del disseny.

La *Figura 30* mostra un model RSM obtingut amb la **màxima concentració de Flavourzyme**. Per una banda, l'augment en la concentració de l'Alcalase és positiu encara que no s'observen gaires diferències amb la seva acció i sense. Per una altra banda, el temps d'hidròlisi sembla tenir més repercussió en el rendiment d'extracció i a mesura que el temps augmenta, el rendiment també ho fa.

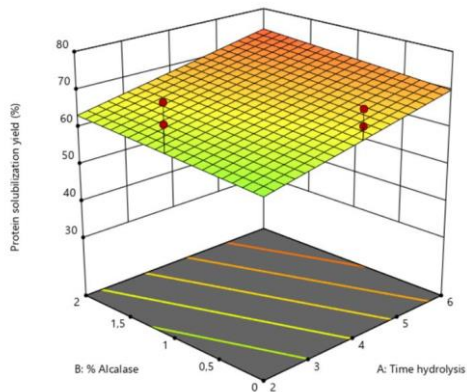


Figura 30. Model 3D de superfície de resposta obtingut amb Design Expert per l'optimització del tractament d'hidròlisi enzimàtica de proteïnes, amb la màxima concentració de Flavourzyme.

Finalment, amb els rendiments d'extracció obtinguts de l'anàlisi dels hidrolitzats sota les condicions del disseny, Design Expert calcula la condició òptima del procés per obtenir una resposta, en aquest cas el rendiment, elevada (*Fig. 31*). Es descriu el temps d'hidròlisi per les proteases, el percentatge d'endoproteasa i exopeptidasa, i també calcula el rendiment aproximat que hauria de donar l'assaig experimental sota aquestes condicions.

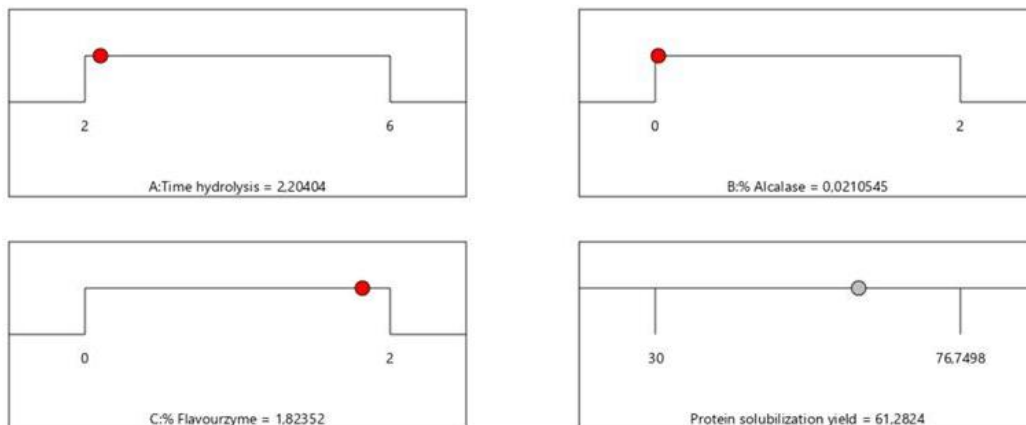


Figura 31. Model òptim segons Design Expert pel tractament d'hidròlisi enzimàtica de proteïnes.

Conclusions parcials:

Després de realitzar el disseny experimental de la hidròlisi de proteïnes, s'obté un model d'optimització del procés. Els rendiments d'extracció de proteïnes és alt, mentre que els aminoàcids en tots els extractes és baix. No s'observen gaires diferències entre els extractes.

Dels resultats obtinguts es pot concloure:

- El pre-tractament amb NaOH hidrolitza la paret i part de les proteïnes en l'interior de la cèl·lula
- L'alcalasa no és efectiva després de realitzar el pre-tractament
- L'escalat es realitzarà amb les condicions obtingudes del model òptim

4.3 Escalat

Les condicions per realitzar l'escalat es van obtenir del resultat del model òptim obtingut en ambdós dissenys experimentals i en base als rendiments d'extracció de proteïnes.

Per a la disrupció cel·lular, segons el programa, les condicions òptimes són amb 4,35% de NaOH, durant 28 hores, i posteriorment afegint un 2% de Viscozyme, a pH 4 i 50°C, durant 2 hores (Fig. 26).

Per a la hidròlisi enzimàtica, segons el programa, les condicions òptimes són de 1,8% de Flavourzyme, durant 2 hores, a pH 6 i 65°C (Fig. 31).

Amb el criteri de Design Expert i la interpretació personal dels resultats obtinguts de la metodologia experimental, es consideren unes condicions finals per realitzar l'escalat, que no inclouen Viscozyme perquè no mostra efectes significatius al model experimental, i tampoc fa augmentar el rendiment de la reacció sota les condicions del pre-tractament químic.

Es va caracteritzar el contingut de nitrogen i els aminoàcids, i es van obtenir rendiments d'extracció proteica <90% i una concentració d'aminoàcids lliures del 1,4% sps.

Com que la concentració d'aminoàcids lliures és menor del 6%, el producte final s'ha de concentrar mitjançant un rota-vapor o evaporació (50/60°C). Vegeu la Fig. 32.



Figura 32. Escalat del procés en un fermentador biològic Braun Biotech Biostat B de 2L.

5 Discussió

5.1 Discussió dels resultats de l'screening

Prèviament al desenvolupament del disseny, es van realitzar proves experimentals, screenings, tractades en diferents condicions per trobar un mètode de disrupció cel·lular i d'extracció i solubilització de les proteïnes intracel·lulars. Les mostres analitzades van permetre determinar les condicions fixes i variables en el posterior disseny experimental.

Del primer screening no es van obtenir rendiments elevats, però es va observar un rendiment d'extracció més elevat amb una relació 1:10 de biomassa:permeat.

Es va estudiar en una segona prova experimental com afectava el temps d'hidròlisi de les proteases. Es van poder observar rendiments més elevats, i es va concloure que un temps més elevat d'acció proteolítica fa que es solubilitzi més proteïna.

Tal i com descriu (Zhang et al., 2018), la microalga *Scenedesmus sp.* es caracteritza per tenir una de les parets cel·lulars més resistents, per tant, en el tercer screening es va afegir un pre-tractament químic amb NaOH al 5%, tal i com havia fet (Mahdy et al., 2014) en el seu estudi, per observar si els rendiments augmentaven en comparació als screenings previs. A més, es van voler comparar diferents β -glucanases per identificar l'enzim més efectiu en la disrupció cel·lular. Per una banda, es va observar un augment en els rendiments d'extracció proteica, i per l'altra es van descartar Pectinex i Ultraflo XL, ja que mostraven els rendiments més baixos.

En el quart screening també es va afegir el pre-tractament químic, ja que s'havia observat en l'screening anterior una millora en els rendiments d'extracció. Posteriorment, es van afegir Viscozyme i Celluclast 1.5L, les β -glucanases seleccionades del tercer screening. Es va seleccionar finalment Viscozyme, per coneixements interns previs en altres processos i perquè en el total dels screenings realitzats va mostrar els rendiments més elevats.

5.2 Discussió dels resultats del disseny experimental

En primer lloc, segons els **rendiments d'extracció proteica del procés de disrupció cel·lular** (Fig. 21), es va considerar que la concentració de NaOH és un factor molt important per la disrupció cel·lular. Les mostres sense el pre-tractament presentaven rendiments baixos de solubilització proteica, a mesura que augmentava la concentració (0-5%), també augmentaven els rendiments (10-80%). Per altra banda, un temps de pre-tractament molt elevat va influir negativament en el disseny. Es conclou que la hidròlisi amb NaOH és un mètode efectiu per degradar la paret cel·lular però el temps pot acabar degradant proteïnes intracel·lulars, entre altres parts importants de la cèl·lula.

També es va poder observar com en els hidrolitzats amb i sense Viscozyme, passades 48h de pretractament químic (últimes dues barres del diagrama, Fig. 21), s'obtenien els mateixos rendiments d'extracció (80%). Es conclou que quan el temps del pre-tractament químic és de 48h, es degrada tant la paret cel·lular que l'efecte del Viscozyme no és significatiu. En canvi, en un temps inferior, per exemple a les 2h, l'efecte del Viscozyme és positiu i fa augmentar el rendiment de solubilització proteica, tot i que no es van obtenir rendiments molt elevats (<60%).

En segon lloc, segons els **rendiments de la hidròlisi enzimàtica** (Fig. 28), no es va poder concloure que un temps més elevat d'hidròlisi augmentés l'extracció de proteïnes. Els resultats van mostrar rendiments elevats en tots els hidrolitzats, superiors al 50%, i eren semblants entre ells. El disseny experimental per la hidròlisi enzimàtica es va realitzar en paral·lel al disseny per la disrupció cel·lular. Així, les condicions fixes del disseny experimental es van determinar en base als resultats del quart screening, a les proves prèvies, on s'utilitzava la màxima concentració de Viscozyme (5% w/w) durant 48h. Junt amb els resultats de l'optimització de la disrupció cel·lular, es va concloure que el pre-tractament com a condició fixe del disseny era el que comportava rendiments elevats i bastant similars en tots els hidrolitzats.

En relació a la **caracterització d'aminoàcids de la disrupció cel·lular**, es van observar percentatges d'aminoàcids lliures baixos, tot i que els rendiments fossin elevats. Per tant, no es va poder afirmar que un rendiment d'extracció proteica elevat estigués relacionat amb una quantitat elevada d'aminoàcids lliures funcionals. Es va suposar que el pre-tractament químic alterava d'alguna manera l'estructura de les proteïnes, pèptids i aminoàcids en isòmers D que no van ser determinats per l'espectrofotòmetre de l'HPLC. Com mencionava (Romero García et al., 2012) en el seu estudi, el mètode d'hidròlisi enzimàtica per a l'obtenció de pèptids i aminoàcids proporciona un producte de major qualitat en comparació als mètodes químics. Això va poder explicar perquè les mostres amb NaOH presentaven rendiments d'extracció proteica elevats però contenien menors quantitats d'aminoàcids lliures. Contràriament, les mostres sense NaOH van presentar rendiments baixos però presentaven majors quantitats d'aminoàcids lliures, fins a un 10%.

Per una altra banda, a la **caracterització d'aminoàcids de la hidròlisi enzimàtica** (Fig. 29), es van obtenir percentatges d'aminoàcids molt baixos (<2%). Que els rendiments fossin elevats i el contingut d'aminoàcids baix generava controvèrsia, ja que inicialment es va pensar que si els rendiments d'extracció eren elevats el contingut d'aminoàcids, després del tractament amb proteases, seria elevat. Per tant, en base a aquests resultats i als resultats del disseny per la disrupció cel·lular, es va concloure que el pre-tractament generava rendiments elevats, però no un contingut d'aminoàcids superior al 6%, necessari per formular el bioestimulant.

El **model RSM sota la mínima concentració de Viscozyme** (Fig. 23), va mostrar un augment del rendiment a mesura que augmentava la concentració de NaOH. Com el model es trobava sota la mínima concentració de Viscozyme, un temps elevat de pre-tractament afectava positivament al rendiment d'extracció, tot i així, si el temps s'excedia de 48h, el rendiment disminuïa progressivament.

El **model RSM sota la màxima concentració de Viscozyme** (Fig. 24) va mostrar un augment del rendiment a mesura que augmentava la concentració de NaOH. En aquest cas, com que el model es trobava sota la màxima concentració de Viscozyme, el rendiment de la reacció disminuïa passades 24h d'hidròlisi.

D'altre banda, el **model RSM sota la màxima concentració de Flavourzyme**, no va presentar efectes significatius, ni per la concentració de l'Alcalase ni per al temps d'hidròlisi. Tot i que l'Alcalase és un enzim efectiu en l'obtenció de pèptids, sota les condicions de pre-tractament químic no semblava tenir cap efecte en el procés.

Finalment, els resultats del **model quadràtic ANOVA** va demostrar que el model del disseny per la disrupció cel·lular era significatiu (Fig. 25). Es van obtenir diferències significatives en la concentració de NaOH i el temps del NaOH, però no es van observar diferències significatives en el temps d'hidròlisi de Viscozyme.

Per últim, els rendiments que es van obtenir en el disseny experimental es van introduir al Design Expert i aquest va calcular dos **models de tractament òptim** (Fig. 26 i 31). Primer, les condicions òptimes del procés per trencar la paret cel·lular van ser: afegir el pre-tractament químic 4,35% de NaOH a 50°C durant 28 hores, i pel pre-tractament enzimàtic, un 2% spf de Viscozyme, a pH 4 i a 50°C durant 2 hores. Segon, per l'obtenció de pèptids i aminoàcids lliures: 0% Alcalase i 1,8% de Flavourzyme, a pH 6 durant 2 hores i 15 min.

Els resultats que es van obtenir del model òptim va proporcionar les dades necessàries per optimitzar el procés d'escalat. Com que Viscozyme no presentava diferències significatives a

l'ANOVA, i després d'observar els mateixos rendiments amb l'enzim i sense l'enzim al disseny experimental, es va considerar que aquest reactiu no és necessari per trencar la paret cel·lular de la microalga en l'escalat del procés.

6 Conclusions

S'ha optimitzat un procés pel desenvolupament d'un bioestimulant proteic sostenible basat en aminoàcids lliures, a partir de la microalga *Scenedesmus*. El procés inclou un disseny experimental per a la disrupció cel·lular mitjançant un pre-tractament químic i una hidròlisi enzimàtica per a l'obtenció de pèptids i aminoàcids lliures.

Per realitzar ambdós dissenys experimentals, s'ha utilitzat un disseny d'anàlisi de superfície de resposta, mitjançant el software Design Expert 11.1.2.0. Els resultats dels rendiments d'extracció en els dos casos han arribat fins un 80%, però el contingut d'aminoàcids lliures ha estat baix en les mostres que contenien NaOH.

De les mostres analitzades, el pre-tractament tèrmic durant 48h a 50°C i Viscozyme al 2% a 50°C, pH 4, durant 1 - 2h, ha resultat ser el procés més efectiu per l'obtenció d'un bioestimulant basat en aminoàcids lliures sense alterar l'estructura molecular i de millor qualitat. S'ha conclòs que el pre-tractament amb NaOH és un bon mètode de disrupció cel·lular i extracció de proteïnes, però no és un bon mètode per obtenir una quantitat elevada d'aminoàcids lliures.

No obstant, segons els resultats del disseny experimental, el model òptim obtingut seria amb una concentració al 4,35% de NaOH durant 28 hores, seguit d'una hidròlisi amb Viscozyme al 2%, pH 4 i 50°C durant 2 hores. Per últim, s'afegiria Flavourzyme al 2%, pH 6 i 65°C, durant 2 hores i 15 min. Tot i així, s'ha considerat que no és necessari afegir Viscozyme degut al fet que el pre-tractament químic ja hidrolitza la major part de la paret cel·lular. A més, s'hauria d'ajustar el pH a nivells molt baixos i s'obtidria un producte de pitjor qualitat.

En conclusió, per al desenvolupament del bioestimulant proteic amb un 6% d'aminoàcids lliures, s'haurà de concentrar el producte final o només dur a terme un tractament tèrmic i enzimàtic amb la β -glucanasa Viscozyme, i les proteases Alcalase i Flavourzyme, a partir d'un nou disseny experimental.

7 Limitacions i recomanacions a realitzar en projectes futurs

En relació a les limitacions personals, el treball realitzat em va costar inicialment degut al fet que el meu àmbit d'estudi no s'enfoca en la química analítica. Tot i així, durant el meu recorregut del grau en biotecnologia, he pogut conèixer la biologia des de un punt de vista molecular que m'ha permès entendre molts àmbits d'aquest treball, tot i que els procediments dels protocols i les preparacions dels reactius van ser un repte al principi. Per exemple, el mètode Kjeldahl per a la caracterització de proteïna de la microalga incloïa moltes reaccions químiques no gaire fàcils d'entendre, però a mesura que vaig anar avançant en el treball va ser més fàcil d'entendre-ho tot en conjunt.

En quant a les limitacions del projecte, una va ser haver de col·locar els tubs d'assaig al bany tèrmic durant 48h hores per dur a terme el pre-tractament de disrupció cel·lular. Primer, perquè els tubs d'assaig al ser de plàstic i escalfar-se a 50-65°C, es dilataven i perdien contingut. Això afecta a la caracterització de nitrogen, i per tant, també als resultats dels

rendiments. Segon, perquè es malgastaven dos dies laborals i si es deixava el tractament durant el cap de setmana, s'arribava a 72h en comptes de 48h. El que vam fer va ser preparar molts tubs i congelar-los per utilitzar en altres moments i no haver de preparar-los cada cop que es realitzaven proves experimentals.

Després del pre-tractament havíem d'afegir els enzims i aquests treballen a pH baixos, això afectava als hidrolitzats ja que el pH després del pre-tractament amb NaOH era molt alcalí i la solució amb la qual s'ajustava el pH era amb un 20% d'àcid clorhídric. El fet d'utilitzar àcid clorhídric de concentració tan elevada afecta negativament la mostra.

També, vam tenir problemes per realitzar l'escalat ja que AlgaEnergy, l'empresa on es cultiva la microalga, va tenir contaminacions microbiològiques que van malmetre tot el cultiu i no vam poder rebre l'alga fresca en el termini acordat inicialment. Vam poder realitzar una prova de l'escalat però amb biomassa comercial de l'alga liofilitzada.

Una altra limitació va ser no poder realitzar la caracterització dels aminoàcids lliures en els screenings degut a un mal funcionament de la columna del HPLC. També, els anàlisis es realitzaven en un altre departament de Leitat i va ser costós d'obtenir la determinació d'aminoàcids del disseny experimental a temps abans de realitzar l'escalat. Per tant, el disseny experimental i l'escalat es van realitzar en base als rendiments d'extracció com a resposta d'anàlisi. Més tard, la caracterització dels aminoàcids del disseny va demostrar que el pre-tractament químic no era el millor mètode per obtenir aminoàcids lliures. L'escalat es va realitzar sota les condicions òptimes calculades pel programa Design Expert, que es basava en el mètode químic de disrupció cel·lular, i d'una interpretació personal dels resultats. En el futur, l'escalat s'ha de concentrar per poder obtenir un percentatge d'aminoàcids lliures al 6%, o bé realitzar un nou disseny experimental, amb mètodes tèrmics i enzimàtics.

Per obtenir una concentració elevada d'aminoàcids lliures recomano realitzar un nou disseny experimental afegint com a condicions variables un tractament tèrmic (0-48h) i la β -glucanasa Viscozyme (0-3%). Sense incloure NaOH a la reacció.

Actualment, s'està realitzant un nou estudi experimental on s'han ajustat noves condicions de tractament, i que posteriorment s'optimitzarà per posar a punt el procés en un reactor de 100L de la planta pilot de Leitat. Amb aquest equipament s'obtindran grans quantitats del bioestimulant (Fig. 33).



Figura 33. Reactor de 100 L a la planta pilot de Leitat, Vilanova del Camí.

8 Bibliografía

- AlgaEnergy*. (2021). Recollit de <https://www.algaenergy.es/>
- Balachandran S., Hurry V.M., Kelley S.E., Osmond C. B., Robinson S. A., Rohozinski J., Seaton G. G. R., Sims D. A., (2006). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. A *Physiologia Plantarum* (p. 203-213).
- Becker, E. W. (2007). *Micro-algae as a source of protein*. 72076 Tübingen, Germany: Elsevier.
- Blecker C., Barka A. (2016). Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. *BASE [En ligne], Volume 20 (2016), Numéro 3, 427-436*.
- Certis* (6 / 4 / 2021). Recollit de <https://www.certiseurope.es/noticias/detalle/news/que-es-un-bioestimulante-como-puede-mejorar-la-calidad-de-tu-cosecha/>
- FERTIMANURE* (2021). Recollit de <https://www.fertimanure.eu/es/publication>
- García, S. (2017). Función de los aminoácidos como bioestimulantes. *Intagri*, Serie Nutrición Vegetal núm 93.
- García J. (2021). Recollit de http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/practica_1.pdf.
- González López C. V., Cerón García M. C., Acien Fernández F. G., Segovia Bustos C., Chisti Y., Fernández Sevilla J. M. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. A *Bioresour. Technol.*, 101 (p. 7587-7591).
- Horticultura (23 / 2 / 2021). *Interempresas*. Recollit de <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/326572-Naturamin-WSP-C-por-ciento-de-aminoacidos-libres-para-una-mayor-productividad-del-cultivo.html>
- Mahdy A., Mendez L., Ballesteros M., González-Fernández C. (2014). Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy* 78, 48–52.
- Maria Solé-Bundó, H. C. (2017). Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline. *Algal Research* 24, 199-206.
- Miranda J. R., Passarinho P. C., Gouveia L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga. *Elsevier*, 342-348.
- Novozymes* (2020). Recollit de <https://www.novozymes.com/es/biology>
- Quevedo C., Morales P. S., Acosta C. A. (2008). CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* sp EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA MICROALGAL. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica*, 25-31.
- Romero García J.M., Acien Fernández F.G., Fernández Sevilla J. M. (2012). Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 164-170.
- Sembralia*. (8 / 7 / 2020). Recollit de <https://sebralia.com/aminoacidos/>

- Suárez, J. L. (2014). *Producción de biogás a partir de biomasa de la microalga Scenedesmus sp procedente de diferentes procesos*. Madrid: Universidad politécnica de madrid.
- Yust M. M., Pedroche J., Girón Calle J., Vioque J., Millan F., Alaiz M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry* 85 (2), 317-320.
- Zhang Yi., Kong X., Wang Z., Sun Y., Zhu S., Li L., Lv P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae Scenedesmus sp. *Renewable Energy*, vol. 125,, 1049-1057.

Annex I: Caracteritzacions

Taula 8. Caracterització de nitrogen per cada extracte en el disseny experimental per l'optimització del tractament de disrupció cel·lular, *spfr*.

Extracto	mg N/L	Dilució	Concentració real (ppm)	%N	%Prot	Promig proteïna	grs sobrenadant recuperat	Proteïna en extracte (gr)	grs mostra	Proteïna teòrica	Rendiment segons valor de proteïna en extracte
1	50,5	25	1262,5	0,12625	0,789063	0,796094	25,9761	0,206794	2,4833	0,258	80,14814
	51,4	25	1285	0,1285	0,803125						
2	35,9	10	359	0,0359	0,224375	0,235	20,8392	0,049	2,513	0,261	18,7560
	39,3	10	393	0,0393	0,245625						
3	31,7	25	792,5	0,07925	0,495313	0,50625	29,3635	0,149	2,49	0,259	57,4590
	33,1	25	827,5	0,08275	0,517188						
4	34,2	25	855	0,0855	0,534375	0,550781	25,4797	0,140	2,5289	0,263	53,4105
	36,3	25	907,5	0,09075	0,567188						
5	4,97	25	124,25	0,012425	0,077656	0,08125	23,6636	0,019	2,5182	0,262	7,3485
	5,43	25	135,75	0,013575	0,084844						
6	33,6	25	840	0,084	0,525	0,528125	29,5297	0,156	2,5147	0,261	59,6890
	34	25	850	0,085	0,53125						
7	41,3	25	1032,5	0,10325	0,645313	0,630469	23,5021	0,148	2,5297	0,263	56,3749
	39,4	25	985	0,0985	0,615625						
8	27,5	25	687,5	0,06875	0,429688	0,43125	25,504	0,110	2,5021	0,260	42,3075
	27,7	25	692,5	0,06925	0,432813						
9	35,2	25	880	0,088	0,55	0,551563	25,4939	0,141	2,5362	0,264	53,3620
	35,4	25	885	0,0885	0,553125						
10	34,4	25	860	0,086	0,5375	0,535156	26,0617	0,139	2,4999	0,260	53,6964
	34,1	25	852,5	0,08525	0,532813						
11	29,8	25	745	0,0745	0,465625	0,457813	32,0126	0,147	2,5191	0,262	55,9948
	28,8	25	720	0,072	0,45						

12	36	25	900	0,09	0,5625	0,571875	27,353	0,156	2,5279	0,263	59,5567
	37,2	25	930	0,093	0,58125						
13	23,6	25	590	0,059	0,36875	0,392188	20,7901	0,082	2,5373	0,264	30,9288
	26,6	25	665	0,0665	0,415625						
14	50,8	25	1270	0,127	0,79375	0,798438	26,1689	0,209	2,5042	0,260	80,3049
	51,4	25	1285	0,1285	0,803125						
15	24,3	25	607,5	0,06075	0,379688	0,189844	24,7108	0,047	2,5314	0,263	17,8364
		25	0	0	0						
16	26	25	650	0,065	0,40625	0,39375	29,3848	0,116	2,5925	0,269	42,9545
	24,4	25	610	0,061	0,38125						
17	27,2	25	680	0,068	0,425	0,435156	21,4265	0,093	2,5352	0,263	35,3972
	28,5	25	712,5	0,07125	0,445313						
18	38,6	25	965	0,0965	0,603125	0,589063	22,2811	0,131	2,5076	0,261	50,3761
	36,8	25	920	0,092	0,575						
19	35,8	25	895	0,0895	0,559375	0,567188	23,0307	0,131	2,5186	0,262	49,9182
	36,8	25	920	0,092	0,575						
20	47,1	10	471	0,0471	0,294375	0,293125	22,7591	0,066713	2,5094	0,261	25,58718
	46,7	10	467	0,0467	0,291875						
21 (òptim)	41,2	25	1030	0,103	0,64375	0,650781	27,6339	0,179836	2,519	0,262	68,71214
	42,1	25	1052,5	0,10525	0,657813						

Taula 9. Caracterització de nitrogen per cada extracte en el disseny experimental per l'optimització del tractament d'hidròlisi enzimàtica, spf.

Extracte	mg N/L	Dilució	Concentració real (ppm)	%N	%Prot	Promig proteïna	grs sobrenadant recuperat	Proteïna en extracte (gr)	grs mostra	Proteïna teòrica	Rendiment segons valor de proteïna en extracte
1	90,7	10	907	0,0907	0,566875	0,608125	30,2771	0,184	2,5276	0,268	68,78644
	97,7	10	977	0,0977	0,610625						
2	20,2	50	1010	0,101	0,63125	0,63125	29,065	0,183	2,5206	0,267	68,7340
3	90,3	10	903	0,0903	0,564375	0,564375	27,5898	0,156	2,518	0,267	58,3935
4	20,1	50	1005	0,1005	0,628125	0,628125	29,3896	0,185	2,5455	0,270	68,4811
5	20,6	50	1030	0,103	0,64375	0,64375	29,4952	0,190	2,5436	0,269	70,4894
6	21	50	1050	0,105	0,65625	0,65625	29,5022	0,194	2,5327	0,268	72,1845
7	20,4	50	1020	0,102	0,6375	0,6375	28,9631	0,185	2,5211	0,267	69,1575
8	21,7	50	1085	0,1085	0,678125	0,678125	29,699	0,201	2,5281	0,268	75,2249
9	20,7	50	1035	0,1035	0,646875	0,646875	29,0589	0,188	2,5605	0,271	69,3232
10	21,7	50	1085	0,1085	0,678125	0,678125	25,7223	0,174	2,5129	0,266	65,5463
11	21,1	50	1055	0,1055	0,659375	0,659375	29,0303	0,191	2,5129	0,266	71,9305
12	91,5	10	915	0,0915	0,571875	0,571875	29,1043	0,166	2,5	0,265	62,8669
13	20,2	50	1010	0,101	0,63125	0,63125	29,2367	0,185	2,5443	0,269	68,4960
14	22,7	50	1135	0,1135	0,709375	0,709375	29,3317	0,208	2,56	0,271	76,7498
15	19,1	50	955	0,0955	0,596875	0,596875	30,9089	0,184	2,5178	0,267	69,1910
16	20,5	50	1025	0,1025	0,640625	0,640625	22,9277	0,147	2,5232	0,267	54,9689
17	21,3	50	1065	0,1065	0,665625	0,665625	29,6642	0,197	2,529	0,268	73,7255
18	25,2	50	1260	0,126	0,7875	0,7875	22,9277	0,181	2,5051	0,265	68,0597

19	20,3	50	1015	0,1015	0,634375	0,634375	27,1742	0,172	2,5205	0,267	64,5833
20	105	10	1050	0,105	0,65625	0,65625	29,7692	0,195	2,5075	0,265544	73,5698
	21	50	1050	0,105	0,65625						
21	20,7	50	1035	0,1035	0,646875	0,646875	30,4888	0,197	2,5187	0,267	73,9415
22	21,1	50	1055	0,1055	0,659375	0,659375	29,3027	0,193	2,5219	0,267	72,3463
23	21,2	50	1060	0,106	0,6625	0,6625	29,8819	0,198	2,5169	0,267	74,2732
24	20,6	50	1030	0,103	0,64375	0,64375	30,2557	0,195	2,5264	0,268	72,7992
25	92,1	10	921	0,0921	0,575625	0,633125	28,7798	0,182	2,496	0,264326	68,93451
	22,1	50	1105	0,1105	0,690625						
26	93,1	10	931	0,0931	0,581875	0,58875	34,5687	0,204	2,6	0,27534	73,91706
	95,3	10	953	0,0953	0,595625						

Taula 10. Condicions i resultats dels extractes del disseny experimental per la disrupció cel·lular. A la taula es mostren, entre altres, els resultats dels rendiments per cada extracte i els aminoàcids lliures, sobre pes sec.

Extracte	% NaOH	Temps NaOH	Temps Viscozyme 2%	Temperatura	Relació	pH	Mitjana % Humitat	Proteïna en extracte spf	Aminoàcids (%) sps	Rendiment segons valor de proteïna en extracte (%)
1	5	48	0	50	10	4	92,66495632	0,206794109	1,571531457	56,08540846
2	0	0	0	50	10	4	99,22102662	0,04897212	2,867764079	18,75602785
3	5	2	1	50	10	4	93,10432543	0,148652719	0,129157965	57,45898657
4	2,5	15	2	50	10	4	95,52973683	0,14033741	0,713321744	53,41045204
5	2,5	64	1	50	10	4	95,85676037	0,019226675	1,25416588	7,348495255
6	5	1	1	50	10	4	92,98557821	0,155953728	0,932100207	59,68896273
7	2,5	24	0	50	10	4	95,43988069	0,148173396	1,895662549	56,37488469
8	2,5	2	1	50	10	4	95,65260373	0,109986	1,725012062	42,30748385
9	2,5	15	2	50	10	4	95,36989325	0,140614792	0,726396673	53,36198342
10	2,5	24	1	50	10	4	95,45427993	0,139470816	1,941261656	53,69639864
11	2,5	24	2,7	50	10	4	95,23455066	0,146557684	1,373568913	55,99479242
12	2,5	24	1	50	10	4	95,21442896	0,156424969	1,818560826	59,55670188
13	0	48	1	50	10	4	99,03425982	0,081536173	10,75755386	30,92879206
14	5	48	2	50	10	4	92,60357192	0,208942311	1,22274339	66,92918673
15	2,5	2	0	50	10	4	95,43471272	0,046911909	1,627852474	17,83638288
16	5	2	0	50	10	4	93,07944192	0,11570265	1,019806038	42,95453217
17	0	48	1	50	10	4	99,04967573	0,093238754	10,69761484	35,39718185
18	2,5	24	1	50	10	4	95,4639107	0,131249605	2,000847997	50,37605974
19	2,5	24	0	50	10	4	95,51708965	0,130627252	1,588475767	49,91821448
20	0	48	2	50	10	4	99,21210053	0,066712612	10,84209681	25,58718463
21 (òptim)	4,35	27,97	1,774	50	10	4	93,39830089	0,17983624	--	68,71214376

Taula 11. Condicions i resultats dels extractes del disseny experimental per la hidròlisi enzimàtica. A la taula es mostren, entre altres, els resultats dels rendiments per cada extracte i els aminoàcids lliures.

Extracto	NaOH 5% (ml)	Temps NaOH	% Viscozyme	temps d'hidròlisi proteases	Alcalase %	Flavourzyme %	temperatura	relació	pH	Mitjana % Humitat	Proteïna en extracte spf	Aminoàcids (%) sps	Rendiment segons valor de proteïna en extracte (%)
1	25	48	2	6	0	2	65	10	6	91,945869	0,1841226	1,57	68,786439
2	25	48	2	4	1	1	65	10	6	92,015958	0,1834728	1,64	68,734033
3	25	48	2	4	1	1	65	10	6	92,056697	0,1557099	1,7	58,393517
4	25	48	2	4	2	2	65	10	6	91,852033	0,1846034	1,75	68,481095
5	25	48	2	4	2	2	65	10	6	92,037951	0,1898754	1,55	70,4894
6	25	48	2	4	1	2,5	65	10	6	89,223513	0,1936082	1,28	72,184509
7	25	48	2	4	1	0	65	10	6	90,729714	0,1846398	1,54	69,157486
8	25	48	2	4	1	2,5	65	10	6	90,21891	0,2013963	1,52	75,224857
9	25	48	2	2	2	0	65	10	6	92,177032	0,1879748	2,2	69,323231
10	25	48	2	2	0	0	65	10	6	89,55614	0,1744293	1,48	65,546331
11	25	48	2	6	2	2	65	10	6	90,867609	0,1914185	1,55	71,930459
12	25	48	2	6	0	0	65	10	6	92,632787	0,1664402	1,97	62,866937
13	25	48	2	2	1	0	65	10	6	92,64429	0,1845567	1,98	68,49604
14	25	48	2	4	2,5	1	65	10	6	91,014758	0,2080717	1,5	76,749789
15	25	48	2	7	1	1	65	10	6	93,029819	0,1844875	1,69	69,191023
16	25	48	2	2	2	0	65	10	6	91,082273	0,1468806	1,54	54,968861
17	25	48	2	4	0,5	0,5	65	10	6	88,740232	0,1974523	1,09	73,725457
18	25	48	2	4	0	1	65	10	6	84,690051	0,1805556	0,8	68,059699
19	25	48	2	4	2,5	1	65	10	6	87,214513	0,1723863	0,74	64,58329
20	25	48	2	7	1	1	65	10	6	91,417379	0,1953604	1,23	73,569801
21	25	48	2	7	1	1	65	10	6	92,246171	0,1972244	1,86	73,941507
22	25	48	2	4	0	1	65	10	6	92,312016	0,1932147	1,79	72,346295
23	25	48	2	4	0,5	0,5	65	10	6	93,258718	0,1979676	2,15	74,273206

24	25	48	2	6	2	0	65	10	6	93,213463	0,1947711	2,3	72,799161
25	25	48	2	4	1	0	65	10	6	93,225731	0,1822121	1,97	68,93451
26	25	48	2	4	0	0	65	10	6	92,278784	0,2035232	-	73,917056