

**PLANTEAMIENTO DE UNA RUTA PARA LA OBTENCIÓN DE DISTINTOS
METABOLITOS DE LA MICROALGA *Amphiprora Sp.* CON MIRAS A SU
APROVECHAMIENTO INTEGRAL BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA**

**PAOLA ANDREA ARIZA URIBE
EDINSSON ANDRES CASTRO VESGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**PLANTEAMIENTO DE UNA RUTA PARA LA OBTENCIÓN DE DISTINTOS
METABOLITOS DE LA MICROALGA *Amphiprora Sp.* CON MIRAS A SU
APROVECHAMIENTO INTEGRAL BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA**

**PAOLA ANDREA ARIZA URIBE
EDINSSON ANDRES CASTRO VESGA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

**Director
VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

**Codirector
ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**ÁNGEL DARIO GONZÁLEZ DELGADO
Ingeniero Químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIAS

A Dios primero que todo por guiarme en cada momento de mi vida y por permitirme ser mejor persona cada día.

A mis padres Gonzalo y Luz Stella, por darme la oportunidad de ser profesional y de salir adelante, por ese gran apoyo y comprensión, culminando así este camino que con sus altibajos y éxitos siempre a pesar de todo estuvieron ahí conmigo, este triunfo es también de ustedes los quiero con todo mi corazón.

A mi hijo Emmanuel, que aunque no ha nacido ya te amo con todo mi corazón, y esto te lo dedico con todo el amor del mundo bebe porque este logro es el comienzo que me ayuda a brindarte un mejor futuro a ti. Todo esto es por ti bebe, eres el motor de mi vida.

A mis hermanos, Jhon, Mauricio y Gonzalito, que estuvieron presentes a lo largo de este proceso. Los quiero hermanitos.

A Jorge Trouchon, que ha sido una persona muy importante y especial, siempre acompañándome y apoyándome en este camino, gracias por tu comprensión, amor, cariño, paciencia, en si por todo lo que brindas en mi vida, sobre todo ahora que tenemos un gran motivo para seguir adelante.

A mis dos grandes amigas, confidentes y hermanas que las quiero con todo mi corazón, Laura y Constanza, que con cada uno de sus consejos y palabras he salido adelante, brindándome así la fortaleza que he necesitado.

A mi grupo de amigos de universidad, Yhitzak, Marce, Liz y Libais, que los quiero y adoro mucho. De cada uno de ustedes me llevo recuerdos inolvidables.

A mis compañeritos y amigos durante toda la carrera, Javier Sánchez, Didier Gutiérrez, Camilo Marmolejo, Nórída Gómez, que a lo largo de este camino hemos reído, sufrido y salido adelante con cada uno de los obstáculos presentes.

A mi compañero de tesis, Edinsson, por ser parte de este triunfo, aunque a veces hubo inconvenientes, debido a que los dos somos muy tercos se nos hacía difícil ponernos de acuerdo, pero bueno lo importante es que se logró llegar a la meta y le deseo que tenga muchos éxitos en esta nueva etapa de su vida como profesional.

Finalmente, agradezco al grupo de investigación de Biomasa, por dejarnos pertenecer a él, brindándonos y poniendo a disposición sus conocimientos para que este proyecto pudiera salir mejor.

Paola Ariza Uribe

Este es un importante triunfo en mi vida, pero no lo he realizado solo, ya que se culminó con éxito debido a un conjunto de esfuerzos. Agradezco a todos aquellos que me apoyaron y estuvieron presentes para ayudarme e indicarme el camino hacia el éxito, y por supuesto a Dios todas mis gracias, porque sin él no hubiese tomado las mejores decisiones de mi vida.

A mis padres que son el motor de mi vida, por hacer el esfuerzo y brindarme la oportunidad de ser profesional.

A mis amigos de escuela, Kathe Lizcano, Claudia Romero, Yoelis Amaya, Evelyn Arias, Norida Gomez y a mi gran Amiga Adriana Guerra, que siempre se preocuparon por mí, y me brindaron su apoyo incondicional.

A los compañeros de laboratorio, Javier Sánchez, Camilo Marmolejo, Didier Gutiérrez y Victor Velasco, quiénes estuvieron presentes en la elaboración de este gran proyecto, y que de alguna u otra manera contribuyeron con sus inquietudes a la mejora de este.

A mi hermano menor quien es la persona que más quiero en mi vida, ya que yo debo ser su ejemplo. Espero por parte de él la mejora de todos mis logros y que me llene de alegría como yo lo hago ahora con toda mi familia.

A Francia del Pilar que siempre me brindó su apoyo y me comprendió, y a pesar de mis ánimos y de mis sentimientos me impulso a seguir adelante.

A Paola Andrea Ariza Uribe quien fue mi compañera de tesis, pues a través de nuestros debates pudimos salir adelante con este reto, a pesar de que se presentaron situaciones difíciles.

Y por último, agradecer al personal profesional del grupo de Biomasa y CIDES por su tiempo y conocimiento, especialmente por aceptarnos y creer en nosotros.

EDINSSON ANDRÉS CASTRO VESGA

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

La Corporación Instituto Morrosquillo por suministrar la materia prima con la cual se desarrolló el proyecto.

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como director del proyecto.

INGENIERO ÁNGEL DARÍO GONZÁLEZ DELGADO, por todos sus valiosos aportes y constante apoyo.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente trabajo.

INGENIERA NATALIA, por su ayuda, disposición y comprensión, al prestarnos equipos durante la ejecución de las etapas del proyecto.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su enseñanza, ayuda y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química y todas aquellas personas que hicieron parte de nuestra formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	22
1.1 Extracción de pigmentos.....	25
1.1.1 Cuantificación de pigmentos	25
1.2 Extracción de carbohidratos	27
1.2.1 Degradación de la glucosa.....	28
1.2.2 Cuantificación de carbohidratos	28
1.3 Extracción de lípidos.....	29
1.3.1 Caracterización del extracto lipídico.....	30
1.4 Cuantificación de proteínas	31
1.5 Cenizas.....	32
2 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	33
2.1 Degradación de la glucosa	33
2.2 Extracción de pigmentos.....	33
2.3 Eficiencias de los métodos de extracción de carbohidratos y lípidos ..	34
2.3.1 Carbohidratos.....	34
2.3.2 Lípidos.....	35
2.4 Caracterización másica de cada uno de los componentes de la biomasa	35
2.5 Caracterización del extracto lipídico	37
2.6 Elección de la ruta del proceso.....	39

CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios de selección para deducir si el aceite es apto para el uso de biocombustible, según Moser y Vaugh	31
Tabla 2. Porcentaje de degradación de la glucosa	33
Tabla 3. Porcentajes de eficiencia del método de extracción de pigmentos.....	34
Tabla 4. Composición másica de las corrientes obtenidas durante el proceso.	36
Tabla 5. Porcentaje en peso de metabolitos microalgales extraídos en cada etapa.....	37
Tabla 6. Perfil de ácidos grasos del aceite extraído de la microalga <i>Amphiprora sp.</i>	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación de diferentes alternativas tecnológicas de aprovechamiento de biomasa de microalgas.....	18
Figura 2. Pirámide de valorización de biomasa de microalgas	20
Figura 3. Metodología experimental.....	23
Figura 4. Posibles rutas para aprovechar al máximo los metabolitos presentes en la microalga <i>Amphiprora Sp.</i>	24
Figura 5. Metodología de extracción de pigmentos	27
Figura 6. Metodología de extracción de carbohidratos	28
Figura 7. Metodología de Extracción de Lípidos	30
Figura 8. Metodología de la cuantificación de proteínas.....	32
Figura 9. Porcentaje de eficiencia del método de Organosolv	35
Figura 10. Ilustración gráfica de las etapas del proceso y corrientes para la cuantificación de cada uno de los metabolitos.....	36
Figura 11. Diagrama de la ruta de aprovechamiento de biomasa de la microalga <i>Amphiprora Sp.</i> planteada	40

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO SOXHLET.....	46

RESUMEN

TÍTULO: PLANTEAMIENTO DE UNA RUTA PARA LA OBTENCIÓN DE DISTINTOS METABOLITOS DE LA MICROALGA *Amphipora Sp.* CON MIRAS A SU APROVECHAMIENTO INTEGRAL BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA*

AUTORES: PAOLA ANDREA ARIZA URIBE, EDINSSON ANDRÉS CASTRO VESGA**

PALABRAS CLAVES: microalgas, biorefinería, extracción de metabolitos, diagrama de proceso.

Las microalgas son microorganismos promisorios para el desarrollo de biorefinerías debido a la variedad de metabolitos que contienen (carbohidratos, proteínas, triglicéridos, etc.), los cuales se separan mediante una amplia gama de tecnologías maduras y emergentes, y posteriormente pueden ser transformados en productos con alto valor agregado y biocombustibles. Sin embargo estas tecnologías se han aplicado por separado para metabolitos específicos y no se ha hecho un desarrollo experimental profundo que busque el establecimiento de una topología de aprovechamiento total de la biomasa.

En este trabajo se plantearon 3 alternativas para la extracción y cuantificación de diferentes metabolitos microalgales (clorofilas, ficobiliproteínas, carbohidratos, lípidos y proteínas) presentes en la microalga *Amphipora sp.*, buscando el mayor rendimiento en la extracción de un metabolito específico mediante la ubicación de las otras etapas dentro de la topología. Para la cuantificación de pigmentos se utilizó espectrometría UV-Visible, en la extracción de carbohidratos se utilizó el método Organosolv a las concentraciones de 32 [% $V_{\text{soliuto}}/V_{\text{solución}}$] de metanol en el licor y 0.6 [M] de ácido sulfúrico en la solución y se cuantificó con el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico, para la extracción de lípidos se usa el método soxhlet, el contenido de proteínas totales se determinó espectrofotométricamente utilizando el método de Biuret y la cantidad de cenizas fueron cuantificadas según la norma NREL/TP-510-42622.

Los resultados mostraron que la cadena de aprovechamiento de biomasa de la cepa *Amphipora sp.*, es extracción de clorofilas y ficobiliproteínas en húmedo - extracción de carbohidratos - extracción de lípidos y separación de proteínas, obteniendo en ese orden las mayores eficiencias de extracción. El balance de masa muestra que las corrientes de proceso obtenidas presentan altas concentraciones de metabolitos específicos y una baja degradación de productos.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirectores: Biólogo Andrés Barajas y el Ing. Ángel González.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT TO A TOPOLOGY FOR OBTAINING DIFFERENT METABOLITES FROM *Amphipora Sp.* MICROALGAE, FOR TOTAL BIOMASS USE UNDER THE BIOREFINERY CONCEPT *

AUTHORS: PAOLA ANDREA ARIZA URIBE, EDINSSON ANDRÉS CASTRO VESGA**

Key words: microalgae, biorefinery, metabolites extraction, process diagram.

Microalgae are promissory microorganisms for the development of biorefineries due to their diversity of metabolites (carbohydrates, proteins, triglycerides, etc), which are separated using a wide variety of existing and emerging technologies, for further purification and transformation in high value products and advanced biofuels. However, these technologies have been applied in a separated way for specific metabolites and there is not an experimental development focused on the establishment of a topology for total use of biomass.

In this work, three different microalgae processing configurations were brought up in order to extract and quantify the different microalgal metabolites (chlorophylls, phycobilins, carbohydrates, lipids and proteins) from the *Amphipora sp.* strain taking as selection criteria the yield improvement of one specific metabolite through the location of the others stages into the topology. Spectrometry of UV-Vis was used for quantification of pigments, organosolv method was used for carbohydrates separation and quantification was made by phenol-sulfuric acid method; CSE method was employed for lipid extraction, total proteins were determined using Biuret method and ash were quantified according to the NREL/TP-510-42622 standards, after that, mass balance was performed and streams were characterized.

It was shown that process configuration for total use of *Amphipora sp* strain biomass is: chlorophylls and phycobiliproteins wet extraction- carbohydrates extraction- lipid extraction and proteins separation, in this order for obtaining a higher efficiency extraction. The mass balance showed that obtained process streams presents high concentration of specific metabolites and a low product degradation.

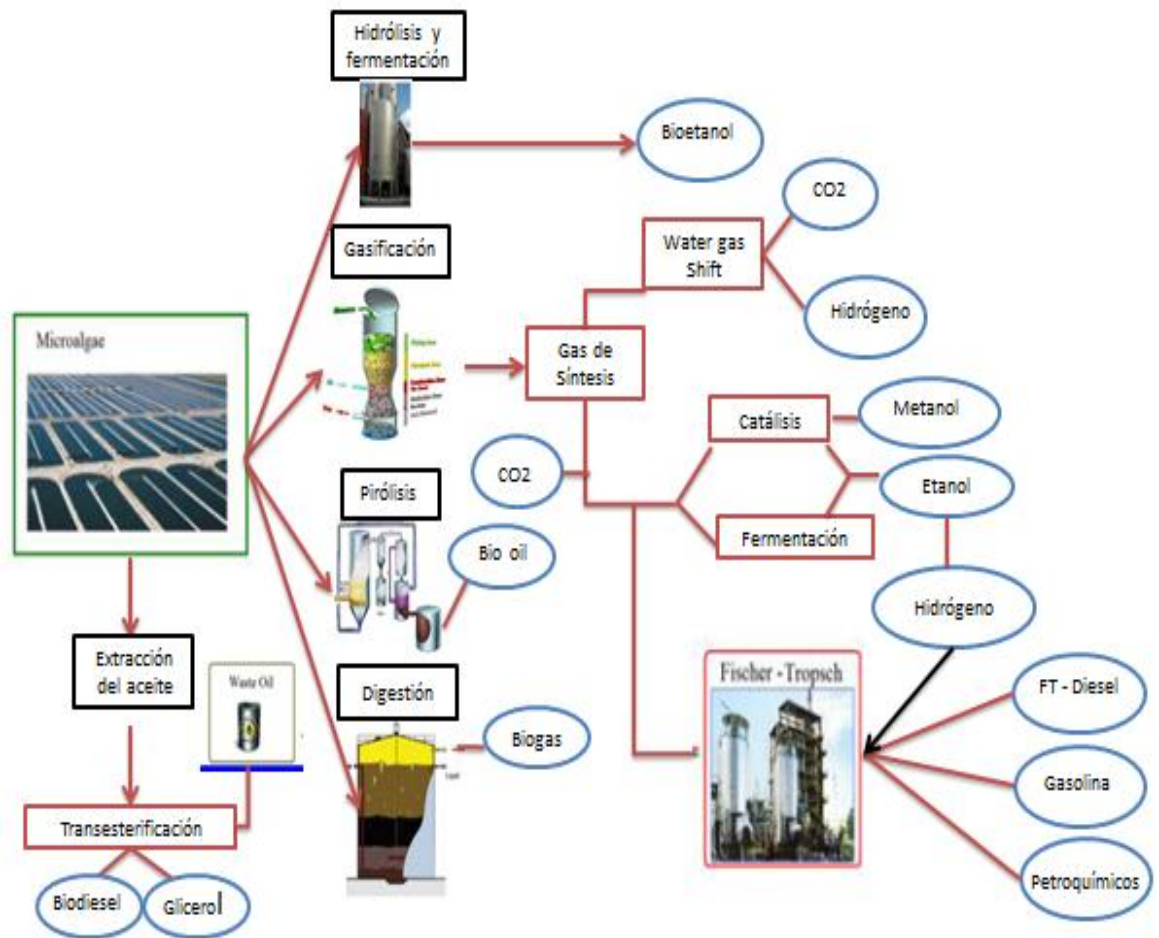
* Graduation Project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Bio. Andrés Barajas and Eng. Ángel González.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años los biocombustibles han adquirido gran importancia debido al agotamiento rápido de las reservas de petróleo y al deterioro de los ecosistemas. Dentro de los organismos propuestos para la producción de biodiesel, las microalgas toman un posicionamiento muy importante como alternativa viable, ya que algunas especies poseen altos contenidos de lípidos transesterificables [10], su crecimiento es extremadamente rápido en comparación con las plantas terrestres, y la biomasa puede ser duplicada dentro de 24 h, no compiten con la producción de alimentos ya que tienen la capacidad de crecer en condiciones que no son adecuadas para cultivos convencionales y son acuáticas, por tanto no necesitan de grandes extensiones de tierras, además pueden convertir el CO₂ en biomasa, y puede reducir la concentración de CO₂ en la atmósfera [22]. Los biocombustibles producidos a partir de microalgas no contienen azufre, no son tóxicos, son altamente biodegradables y genera menos contaminantes gaseosos que los combustibles fósiles convencionales; además, la quema de estos últimos está asociada al calentamiento global, en la Figura 1 se representan las diferentes alternativas tecnológicas de aprovechamiento de biomasa de microalgas. También el uso de cultivos de microalgas se considera como una posible manera de superar nuestra dependencia actual de los combustibles fósiles, ya que contiene ciertas ventajas como: la velocidad de crecimiento de la microalga en comparación con otros cultivos, altos contenidos de aceite en algunas cepas, las bajas tasas de consumo de agua, y la posibilidad de producir microalgas en tierras infértiles.

Figura 1. Representación de diferentes alternativas tecnológicas de aprovechamiento de biomasa de microalgas



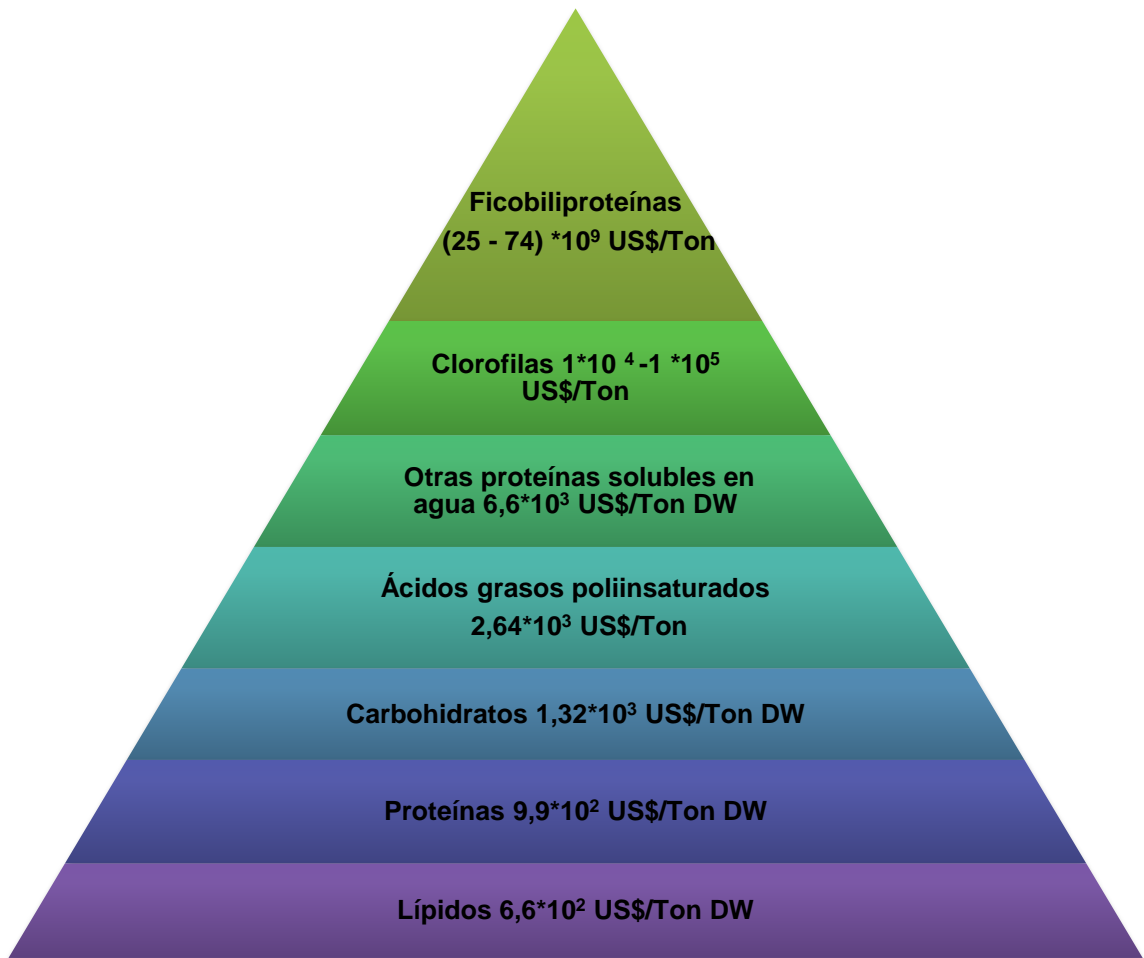
Fuente: [17]

La idea de emplear microalgas para la producción de combustible no es reciente [16], pero en la actualidad ha tomado mayor relevancia debido al precio del petróleo, a la inestabilidad política de los países productores, impactos ambientales debido a las emisiones de CO₂, y más significativamente por la crisis emergente debido al calentamiento global, el cual está asociado con la quema de combustible fósiles [12].

Aunque se proyecten como una solución a esta problemática mundial, trabajamos como el de González y Kafarov [13], Wijffels y Barbosa [23] y Norsker et al. [19], evidencian que la producción de microalgas orientada únicamente a la producción de biodiesel tiene un alto costo, por lo cual es necesario utilizar integralmente los diferentes metabolitos (proteínas, carbohidratos, triglicéridos, entre otros) que consecutivamente pueden ser transformados en productos de alto valor agregado y biocombustibles por medio de la aplicación de otros procesos y nuevas tecnologías.

El concepto de biorefinería implica la evaluación y el uso de una amplia gama de tecnologías para separar la biomasa en sus componentes principales (carbohidratos, proteínas, triglicéridos, etc.), que posteriormente pueden ser transformados en productos con valor agregado y los biocombustibles a través de la aplicación de otros procesos [13]. Por esto las microalgas son una buena opción para ser aplicada en procesos de biorefinería debido a su variedad de componentes y su alto potencial energético buscando el aprovechamiento total de su biomasa, adquiriendo así no sólo un extracto lipídico para la producción de biodiesel, sino también subproductos valiosos, como: los carbohidratos para la obtención de bioetanol, y las proteínas y pigmentos que se usan en la industria farmacéutica para el tratamiento de enfermedades, los cuales al tener un gran valor comercial pueden ayudar a la viabilidad de la cadena de producción de biocombustibles a partir de microalgas. En la Figura 2 se presenta la valorización de los productos obtenibles de la biomasa microalgal.

Figura 2. Pirámide de valorización de biomasa de microalgas



Fuente: [1], [9], [20], [24].

Generalmente las microalgas están constituidas por un porcentaje de lípidos y otros metabolitos de bajo peso residual como: 10-20% de proteínas y 40-70% de carbohidratos, que también pueden ser una buena alternativa en otros procesos de obtención de productos valiosos. [4]

Uno de los componentes importantes de las microalgas son los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que se caracterizan por tener un valor agregado medio según la jerarquía de la Figura 2. Los lípidos normalmente representan el 30-50% de su contenido en peso, bajo varias condiciones específicas, como la alta tasa C / N [25]. Los lípidos de microalgas se clasifican de acuerdo con el número de carbonos en dos tipos, que son: los ácidos grasos con 14-20 átomos de carbono, y ácidos grasos poliinsaturados

los cuales contienen tres o más dobles enlaces con una cadena de ácido graso esquelético que tiene 18 o más átomos de carbono, los cuales son viables para utilizar en la industria de alimentos [25]. Dos parámetros son generalmente considerados para la evaluación de la acumulación de lípidos para la producción de biocarburantes: uno es el contenido de lípidos (% lípidos × peso seco de biomasa), y el otro es la productividad de lípidos (cantidad de lípidos producida/litro de volumen) [25]. Tanto el contenido de lípidos y la tasa de producción de biomasa se debe considerar simultáneamente para asegurar la producción eficiente de lípidos de microalgas. Para identificar si el extracto lipídico es viable para la producción biodiesel, se utilizan los criterios de Moser & Vaughn, que son: porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MFA), ácidos grasos trienoicos (MFA) y los ácidos grasos de cadena larga (VLCFAs), esto se representa en la Tabla 1 que aparece en la pág. 31. [18]

Otro metabolito de gran importancia son los carbohidratos que son una de las más importantes fuentes de energía y nutrientes biológicos. Cabe destacar que los trabajos que se han venido publicando en cuanto a la extracción de carbohidratos ha sido en macroalgas y en especial las de la familia Phaeophyta debido a que el 60% de la biomasa seca de las algas marrones está constituida por carbohidratos, un 50% de los cuales son alginatos. Sin embargo, para microalgas marinas, se ha encontrado que entre un 20-30% de la biomasa se constituye de celulosa o almidón, además de contener varios monosacáridos como glucosa, xilosa, galactosa y otros [5]. De éstos, el almidón y la glucosa se utilizan convencionalmente para la producción de biocombustibles, sobre todo para el bioetanol [21] y el hidrógeno [6], mientras que los polisacáridos tienen diferentes funciones biológicas importantes en las células de las microalgas, principalmente como almacenamiento, protección y estructura molecular [2]. Sin embargo, estos componentes no son explotados en las cadenas de producción de biocombustibles a partir de microalgas, además los métodos que se utilizan en los procesos de ruptura de la pared celular y extracción de lípidos para la producción de biodiesel a escala laboratorio los extraen en mezcla con los diferentes productos de interés.

En la actualidad no se han reportado estudios experimentales con una ruta de aprovechamiento integral teniendo en cuenta la mejor configuración de proceso que permita obtener un componente específico sin intervenir en la eficiencia de la obtención de otros componentes de la microalga, solo se han buscado las mejores condiciones de operación para un metabolito específico (celulosa, aceite, etc.) sin abordarlo desde el punto de vista de un proceso integral.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el objetivo principal de esta investigación es evaluar a escala de laboratorio varias alternativas de separación de distintos metabolitos presentes en la microalga *Amphiprora sp.*, caracterizar las corrientes obtenidas después de cada proceso y hacer un balance de masa como primera aproximación a una configuración de biorefinería para la obtención de biocombustibles, co-productos de alto valor y energía.

1 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

La microalga *Amphiprora sp.*, utilizada para el desarrollo de este proyecto fue suministrada por la Corporación Instituto de Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia), su cultivo se realizó en estanques abiertos utilizando un medio de cultivo F/2, se cosecharon por floculación con FeCl_3 a 50 ppm, fueron secadas al sol y refrigeradas hasta su utilización.

El desarrollo de la metodología experimental consta principalmente del planteamiento de las diferentes rutas del proceso, como se ilustra en la Figura 4, donde se realiza diferentes etapas de extracción y cuantificación de los distintos componentes de la biomasa, como lo son: pigmentos, carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas. Finalmente se realiza un análisis detallado para los resultados obtenidos por medio de un balance de masa y se presentan las respectivas conclusiones; tal como se ilustra en la Figura 3.

Figura 3. Metodología experimental

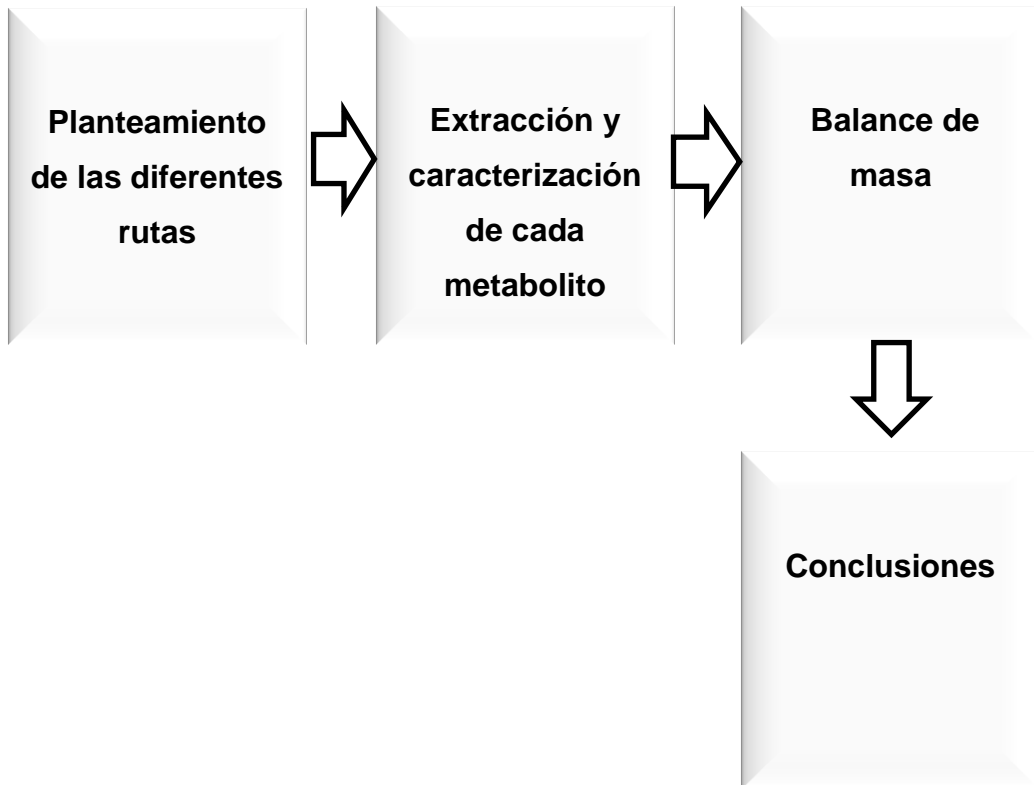
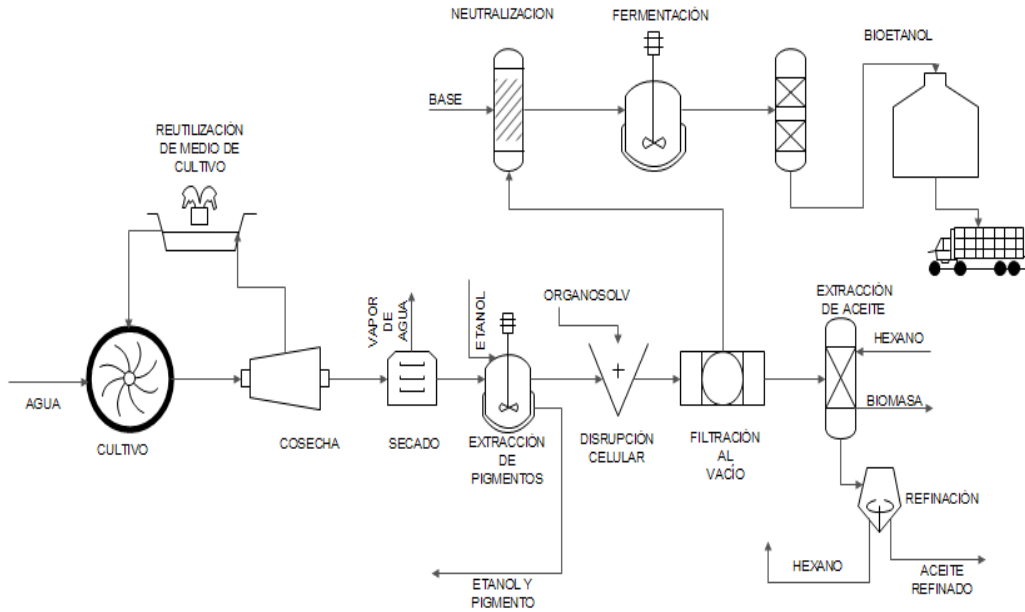
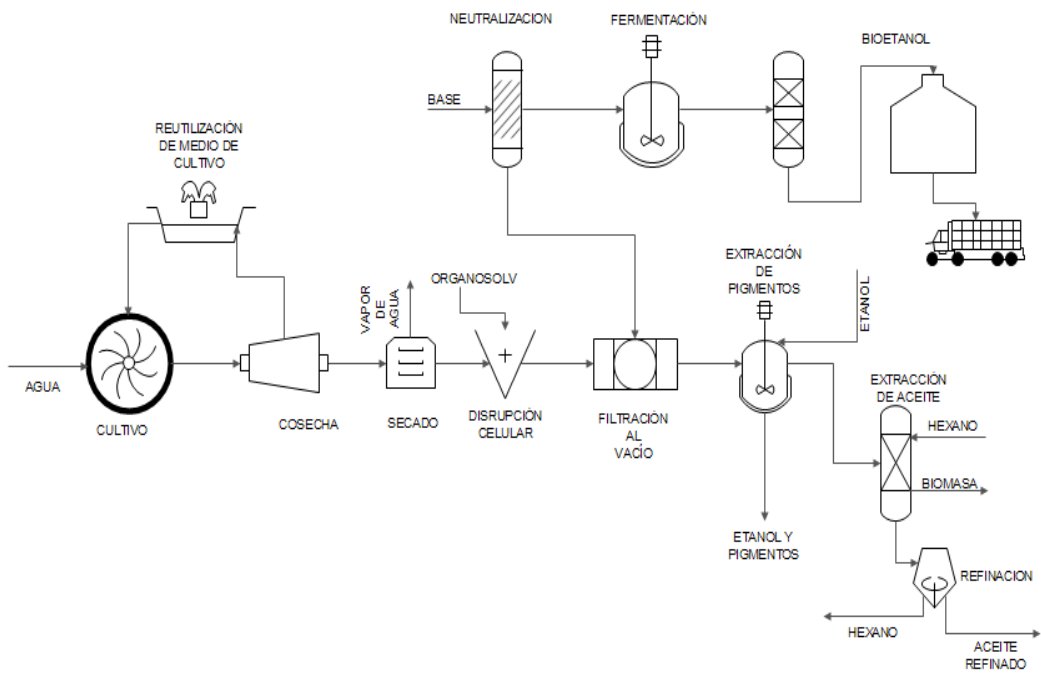


Figura 4. Posibles rutas para aprovechar al máximo los metabolitos presentes en la microalga *Amphiprora Sp.*

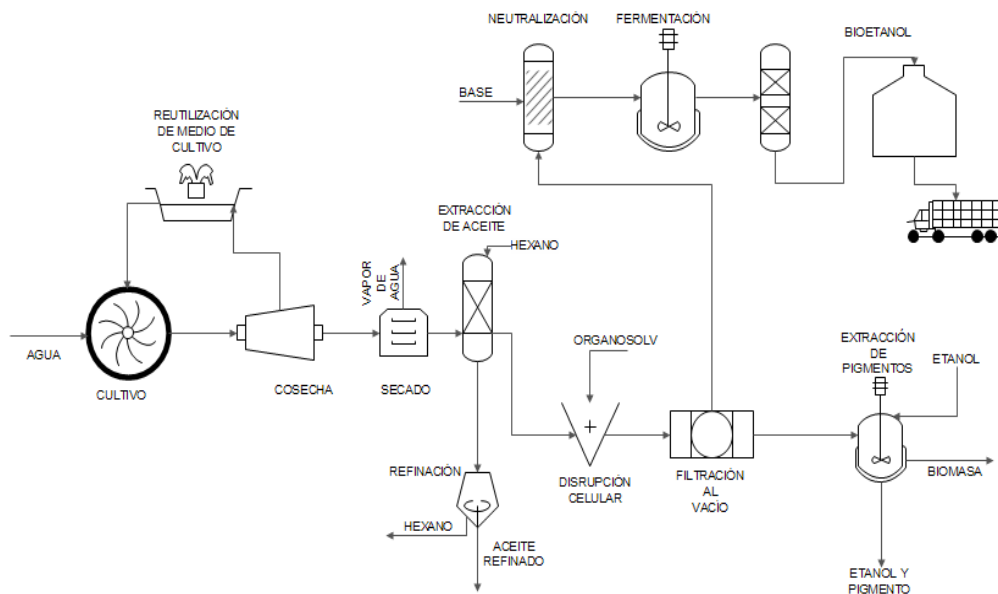
a) Ruta 1:



b) Ruta 2:



c) Ruta 3:



1.1 Extracción de pigmentos

A la biomasa utilizada para este proceso se le realiza una maceración previa con el fin de que esta se homogenice, seguidamente se agregó el solvente que es etanol en una relación biomasa/solvente de 1:10 g/mL, luego la mezcla de biomasa-etanol fue sometida a condiciones óptimas de agitación magnética a 350 rpm y temperatura de 45 °C durante 4 horas; seguidamente se realizó filtración al vacío a la mezcla donde se cuantificaron los pigmentos en la fase líquida, este proceso se representa en la Figura 5. [1]

1.1.1 Cuantificación de pigmentos

La cuantificación de pigmentos se realizó midiendo el espectro de absorción (absorbancia A) de los extractos de la fase hidroalcohólica después de la filtración al vacío en un espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant Pharo 300 Merck) a 665, 650 y 620 nanómetros (nm). Utilizando las *Ecuaciones 1-4* se calculan los pigmentos fotosintéticos de la microalga. Los datos obtenidos de clorofilas y ficobiliproteínas fueron normalizados con el fin de descartar

resultados erróneos por dilución de los componentes en un mayor volumen de solvente. [1]

$$\text{Chl a [mg/L]} = (16,5 * A_{665}) - (8,3 * A_{650}) \quad (1)$$

$$\text{Chl b [mg/L]} = (33,8 * A_{650}) - (12,5 * A_{665}) \quad (2)$$

$$\text{PC [mg/L]} = \frac{A_{650} - 0,7 * A_{665}}{7,38} \quad (3)$$

$$\text{APC [mg/L]} = \frac{A_{650} - 0,19 * A_{620}}{5,65} \quad (4)$$

Dónde:

Chl-a: concentración de clorofila a en mg/L.

Chl-b: concentración de clorofila b en mg/L.

PC: concentración de ficocianina en mg/L.

APC: concentración de aloficocianina en mg/L.

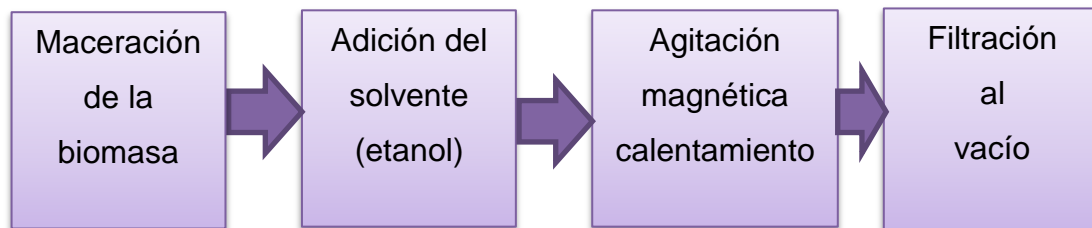
A₆₆₅: absorbancia a la longitud de onda de 665 nm.

A₆₅₀: absorbancia a la longitud de onda de 650 nm.

A₆₂₀: absorbancia a la longitud de onda de 620 nm.

Fuente: [3]

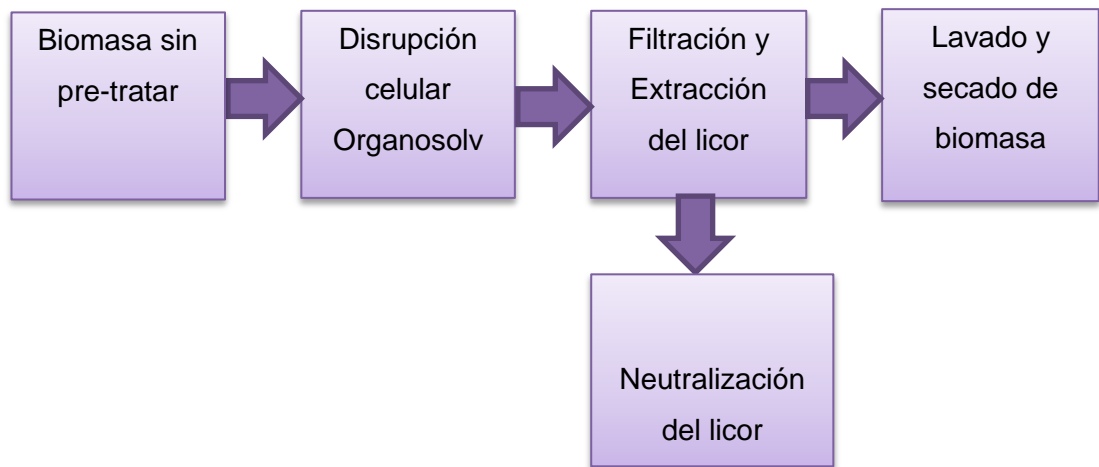
Figura 5. Metodología de extracción de pigmentos



1.2 Extracción de carbohidratos

Es un proceso de hidrólisis de los materiales celulósicos presentes en la biomasa de la microalga que emplea solventes orgánicos como etanol, metanol y acetona [15]. Adicional al uso del solvente, el método Organosolv requiere el empleo de un catalizador que puede ser, una base, un ácido orgánico o inorgánico para romper los enlaces de la celulosa. El método consiste en preparar 200 ml de licor (metanol + agua) usando ácido sulfúrico como catalizador, con una relación biomasa solvente de 1:10 g/ml a las concentraciones de 32 [% $V_{\text{soluta}}/V_{\text{solución}}$] de metanol en el licor y 0.6 [M] de ácido sulfúrico en la solución. Posteriormente se pesa 20 g de biomasa que se adicionaron al licor para cada ensayo, esto se lleva a cabo en una autoclave a 15 psi durante un tiempo de reacción de 4 horas. Después de la cocción se hace una filtración al vacío, donde la biomasa separada es lavada con agua destilada. El licor obtenido después de la filtración al vacío, se neutraliza con una cantidad de carbonato de calcio de 2,88 g. Por medio de la norma NREL/TP-510-42621 es secada, la cual consiste en llevar la biomasa pretratada a un horno a condiciones de temperatura de 105 °C durante un tiempo de 12 horas, este procedimiento se ilustra en la Figura 6. [11]

Figura 6. Metodología de extracción de carbohidratos



1.2.1 Degradación de la glucosa

Se lleva a cabo el mismo proceso nombrado anteriormente pero aplicado solo a la glucosa para observar su degradación por el efecto de este mismo. Además se hace una comparación con el método NREL/TP-510-42618, el cual consiste en utilizar una relación biomasa/ácido sulfúrico al 72% p/p de 1:10 g/ml. A esta solución del 72% de pureza se le agrega agua destilada para obtener ácido sulfúrico al 4%. Esta mezcla es llevada al autoclave a condiciones de temperatura de 121 °C, 15 psi de presión y un tiempo de reacción de una hora. Para estos dos métodos se realizaron pruebas con glucosa pura y glucosa diluida en agua al 25% p/p.

1.2.2 Cuantificación de carbohidratos

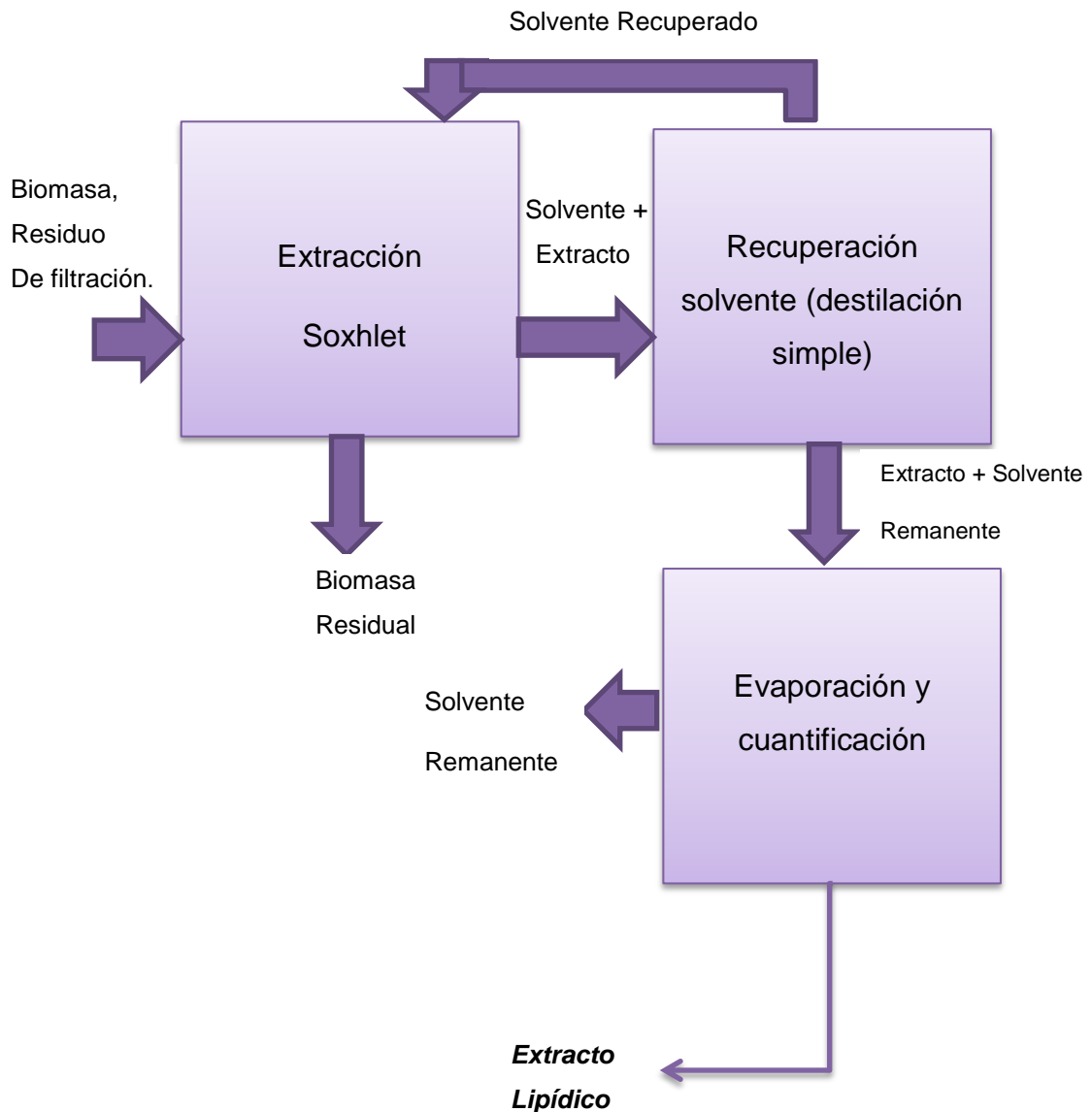
Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico [8], el cual permite diferenciar diferentes tipos de monosacáridos presentes en la muestra, además de ser más sensible que métodos como el de DNS (determinación de azúcares reductores). Por tanto, se tomó una muestra de 1mL de cada cultivo y se centrifugó por 20 min a 3400 rpm, separando la biomasa de la fase líquida. Para evitar una posible interferencia generada por la clorofila presente, se extrajo este pigmento mediante la adición de 10 mL de etanol, posteriormente

se calentó durante 10 minutos a baño maría a 25°C y se centrifugó nuevamente por 20 min a 3400 rpm. Luego de centrifugar se obtienen dos fases, la fase líquida correspondiente al extracto con pigmentos y el precipitado correspondiente a la biomasa libre de pigmentos. Para evitar que el color de los pigmentos altere la medición, se le adicionó 0,3 g de carbón activado a la fase líquida, seguidamente se agitó por unos segundos y luego se filtró. Posteriormente, a cada fase se les adicionó 1 mL de fenol al 5 % $V_{\text{soluta}}/V_{\text{solución}}$ y 5 mL de ácido sulfúrico al 95.5 %p/p. Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 480nm para la identificación de pentosas y 490nm para hexosas, en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). Para la cuantificación en el licor se modifica la lectura en el espectrofotómetro, ya que si este no suministra una lectura idónea entre 0 - 1 en la absorbancia, se procede hacer diluciones seriadas de la muestra para reducir la concentración, seguidamente se toman muestras de las diluciones como se mencionó, aplicando los reactivos para la cuantificación hasta obtener las lecturas deseadas.

1.3 Extracción de lípidos

La extracción se realizó siguiendo el protocolo Soxhlet con hexano modificado por González-Delgado y Kafarov [13], el cual consiste en secar 10 g de biomasa a 105°C durante 12 h y se homogeniza usando un mortero. Finalmente, la biomasa es llevada al tubo Soxhlet, el cual se ubica sobre un balón aforado al que se le agrega el solvente hexano y por calentamiento se extraen los lípidos de la biomasa, este procedimiento tarda 24 horas, quedando el extracto lipídico en el balón aforado junto con parte del solvente apolar, el cual es recuperado por destilación simple, y el extracto lipídico se obtiene por volatilización del solvente restante en el balón. El proceso general se ilustra en la Figura 7.

Figura 7. Metodología de Extracción de Lípidos



Fuente: [1]

1.3.1 Caracterización del extracto lipídico

Los extractos lipídicos de la especie *Amphiprora Sp.*, fueron caracterizados empleando el Análisis FAMES (*FattyAcidMethylEsters*) y un cromatógrafo Agilent 7890 con detector FID y una columna DB 5-Ht de 15m, para compararlo con la tabla de criterios de Moser y Vaugh que se representan en la Tabla 1.

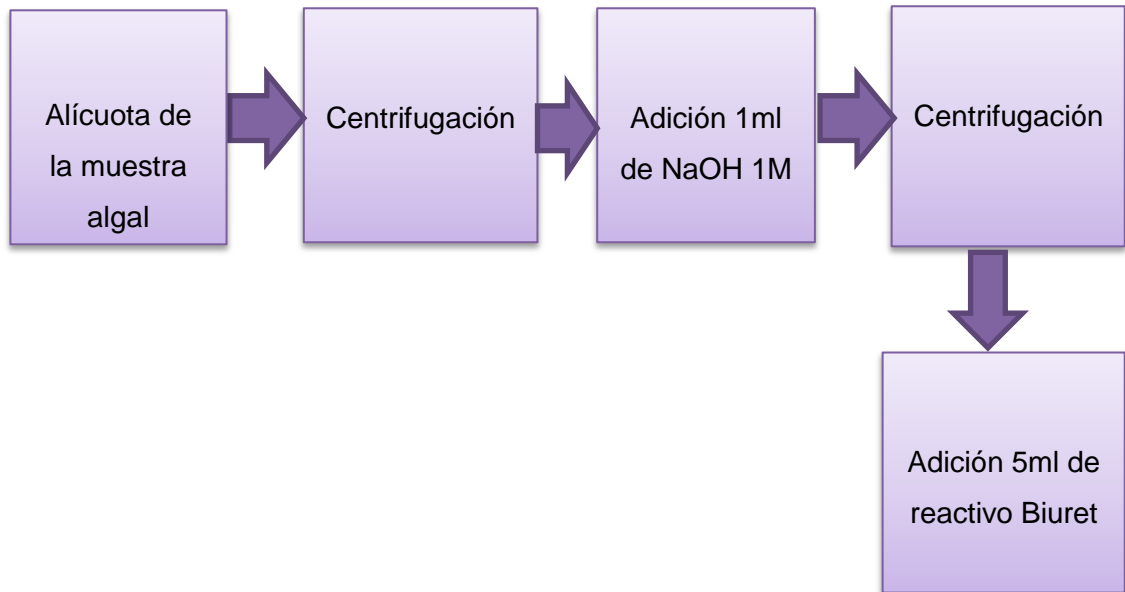
Tabla 1. Criterios de selección para deducir si el aceite es apto para el uso de biocombustible, según Moser y Vaughn [18]

Ácido graso	Criterio (Moser & Vaughn)
SFA (Ácidos grasos saturados)	<15% p/p
MFA (Ácidos grasos monoinsaturados)	>62% p/p
TFA (Ácidos grasos trienoicos)	<7% p/p
VLCFAs (Ácidos grasos de cadena larga)	<1% p/p

1.4 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales fueron extraídas siguiendo el procedimiento de Illman *et al.* [14], el cual consiste en tomar 10ml de muestra algal, centrifugar a 3400 rpm durante 20 minutos, luego se re-suspendió el pellet en 1ml de NaOH 1M. La mezcla del NaOH 1M y el pellet de nuevo es centrifugado a 3400 rpm durante 20 minutos. Finalmente, el contenido de proteínas totales es determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Biuret, empleado por Dorey & Draves [7]. El proceso se representa en la Figura 8.

Figura 8. Metodología de la cuantificación de proteínas



1.5 Cenizas

La cantidad de cenizas fueron realizadas según la norma NREL/TP-510-42622, la cual consiste en utilizar un horno mufla equipado con un programa de rampa, que funciona con un programa de temperatura así:

Se mantiene a 105 ° C durante 12 minutos. Luego, se eleva la temperatura a 250 ° C a 10 ° C / minuto, para mantener a 250 ° C durante 30 minutos. Después, la temperatura se incrementa a 575 ° C a 20 ° C / minuto, durante un tiempo de 180 minutos. Y por último, se permite que la temperatura descienda a 105 ° C, donde se mantiene a 105 ° C hasta que se retiran las muestras.

Los porcentajes conseguidos de cada uno de los componentes de la biomasa fueron calculados utilizando la ecuación 5.

$$\text{Porcentaje extraído} = \frac{\text{g de componente}}{\text{g de biomasa}} * 100\% \quad (5)$$

2 RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 Degradación de la glucosa

Las pruebas realizadas para la glucosa donde se compara el método NREL con el método Organosolv, se pudo obtener un porcentaje de degradación de la glucosa de 23%, estos resultados se representan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de degradación de la glucosa

Porcentaje de degradación de la glucosa por el Método NREL (%p/p)	Porcentaje de degradación de la glucosa Método Organosolv (%p/p)	Promedio de porcentaje de degradación de la glucosa (%p/p)
23	22,5	≈ 23

2.2 Extracción de pigmentos

Al evidenciar los bajos porcentajes de clorofilas y ficocianinas obtenidos al utilizar biomasa de microalgas proveniente de la etapa de secado se decidió realizar las pruebas de extracción con las mejores condiciones de operación obtenidas al final de la etapa de cosecha de microalgas y después de la etapa de disrupción celular con el fin de comparar los porcentajes de metabolitos obtenidos, la Tabla 3 muestra las tres alternativas de ubicación de la etapa de extracción de clorofilas y ficobiliproteínas con sus respectivas eficiencias de extracción.

Tabla 3. Porcentajes de eficiencia del método de extracción de pigmentos

Pigmento/etapa	Antes de secado	Antes de hidrólisis	Antes de extracción de lípidos
% Clorofila a	1,59 E 0	0,68 E -2	5,90 E -3
% Clorofila b	3,41 E 0	0,12 E -1	1,41 E -2
% Ficocianina	6,50 E -1	0,26 E -4	2,75 E -5
% Aloficocianina	1,90 E 0	0,10 E -3	1,00 E -4

Los resultados muestran que al incluir el proceso de extracción de clorofilas antes de la etapa de extracción de lípidos no sería viable, ya que este no genera ningún aumento en las cantidades extraídas de clorofilas y ficocianinas, descartando así la segunda ruta planteada en la pág. 18. Además se demuestra que se obtienen mayores eficiencias de extracción de estos metabolitos al utilizar la biomasa húmeda proveniente de la etapa de cosecha, lo que indica que tanto la floculación de biomasa como el secado afectan el contenido y la extractabilidad de estos componentes, ya que la temperatura de secado de la biomasa es 105 °C, la cual es mayor que la temperatura de degradación de las clorofilas y ficobiliproteínas, por esto a la primera hipótesis planteada en la pág. 18 se modifica la ubicación de extracción de pigmentos antes de hidrólisis para antes del proceso de secado.

2.3 Eficiencias de los métodos de extracción de carbohidratos y lípidos

2.3.1 Carbohidratos

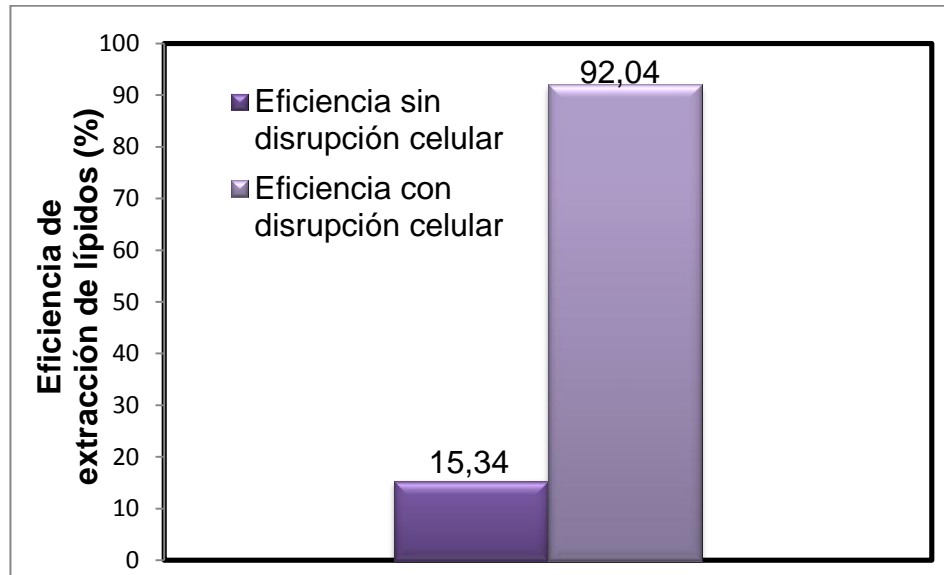
$$\begin{aligned} & \% \text{ Eficiencia} \\ & = \left| \frac{\text{cantidad de azúcares teórico (g)} - \text{cantidad de azúcares real (g)}}{\text{cantidad de azúcares teórico (g)}} \right| \\ & \times 100\% \end{aligned}$$

$$\% \text{ Carbohidratos} = \left| \frac{4,3 \text{ g} - 6,64 \text{ g}}{4,3 \text{ g}} \right| \times 100\% = 54,42\% \text{ p/p}$$

La eficiencia de extracción de los carbohidratos es 54,42 %p/p lo que hace muy selectivo por este metabolito el método Organosolv.

2.3.2 Lípidos

Figura 9. Porcentaje de eficiencia del método de Organosolv

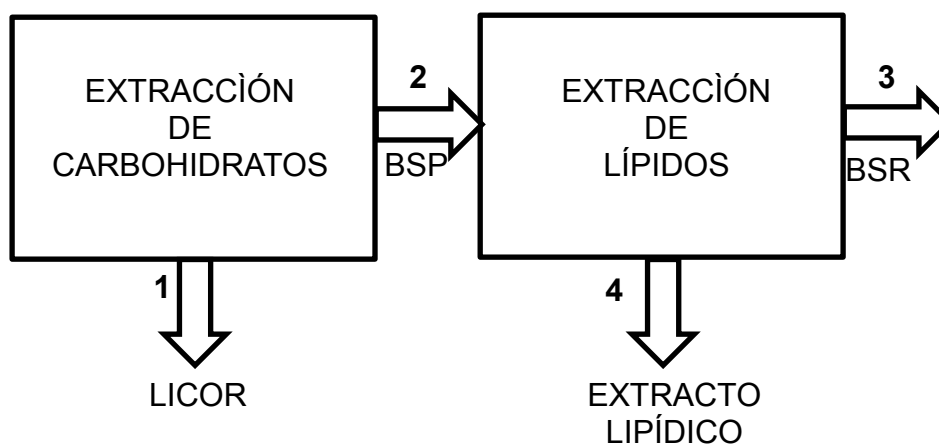


Como se puede observar en la Figura 9, el método de Organosolv es muy eficiente ya que al darse el rompimiento de la pared celular aumenta hasta 6 veces la extracción de lípidos contenidos en la biomasa, por lo tanto este método ayuda a la liberación de los diferentes metabolitos y se descarta la tercera ruta planteada en la pág. 19.

2.4 Caracterización másica de cada uno de los componentes de la biomasa

Para identificar la ruta de aprovechamiento de biomasa más conveniente se aplica un balance de masa para carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas. Los resultados obtenidos se representan tanto en composición másica como en porcentaje en las Tablas 4 y 5. En la Figura 10 se muestra las etapas del proceso y corrientes para la cuantificación de cada uno de los metabolitos.

Figura 10. Ilustración gráfica de las etapas del proceso y corrientes para la cuantificación de cada uno de los metabolitos



BSP: BIOMASA SECA PRETRATADA.

BSR: BIOMASA SECA RESIDUAL.

Tabla 4. Composición másica de las corrientes obtenidas durante el proceso

METABOLITOS CORRIENTES	CARBOHIDRATOS	PROTEINAS	LÍPIDOS	CENIZAS
	(g)	(g)	(g)	(g)
1	3,19	0,00	0,00	1,39
2	1,58	2,50	0,00	0,35
3	0,15	1,38	0,00	0,02
4	0,00	0,00	6,08	0,00
DEGRADADO O NO CUANTIFICADO	1,47	1,13	0,53	0,23
TOTAL	6,39	5,01	6,61	1,99

Tabla 5. Porcentaje en peso de metabolitos microalgales extraídos en cada etapa

METABOLITOS CORRIENTES	CARBOHIDRATOS (%)	PROTEÍNAS (%)	LÍPIDOS (%)	CENIZAS (%)
	1	49,84	0,00	0,00
2	24,70	50,00	0,00	17,73
3	2,44	27,50	0,00	1,12
4	0,00	0,00	92,05	0,00
DEGRADADO O NO CUANTIFICADO	23,00	22,50	7,95	11,37

2.5 Caracterización del extracto lipídico

Se analiza el aceite extraído de *Amphiprora* sp., por medio de la caracterización que se obtuvo por cromatografía de gases con un cromatógrafo Agilent 7890 con detector FID y una columna DB 5-Ht de 15m, de lo cual se puede decir que su contenido de ácidos grasos saturados corresponde al 19,7 % p/p y de ácidos grasos poliinsaturados el 59,9 % p/p, los cuales están representados en la Tabla 6.

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos del aceite extraído de la microalga *Amphiprora sp.*

Ácidos grasos	% Ácidos grasos (p/p)
C14:0	9
C16:0	5,5
C18:1	5,9
C18:2n9,12t	31,7
C18:2	15,2
C6:0	1,8
C8:0	0,5
C11:0	0,1
C12:0	0,4
C13:0	1
C15:0	1,4
C18:1n9t	3,3
C18:3	4,6
C20:2n11,14c	3,7
C20:4	0,8
C22:0	0,8
C22:2	3,9
C23:0	0,4
SFA (Ácidos grasos saturados)	19,7
MFA (Ácidos grasos monoinsaturados)	9,2
(Ácidos grasos poliinsaturados)	59,9
TFA (Ácidos grasos trienoicos)	4,6
VLCFAs (Ácidos grasos saturados de cadena larga)	1,2

Comparando la Tabla 1 (pág. 25) y 6 se evidencia que el aceite extraído no cumple con los criterios planteados por Moser y Vaughn para obtener un biodiesel de buena calidad, ya que presenta mayores porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados y de cadena muy larga, y menores porcentajes de ácidos grasos trienoicos. Por otra parte, el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que contiene lo hacen recomendable para ser utilizado en la industria alimenticia. [25]

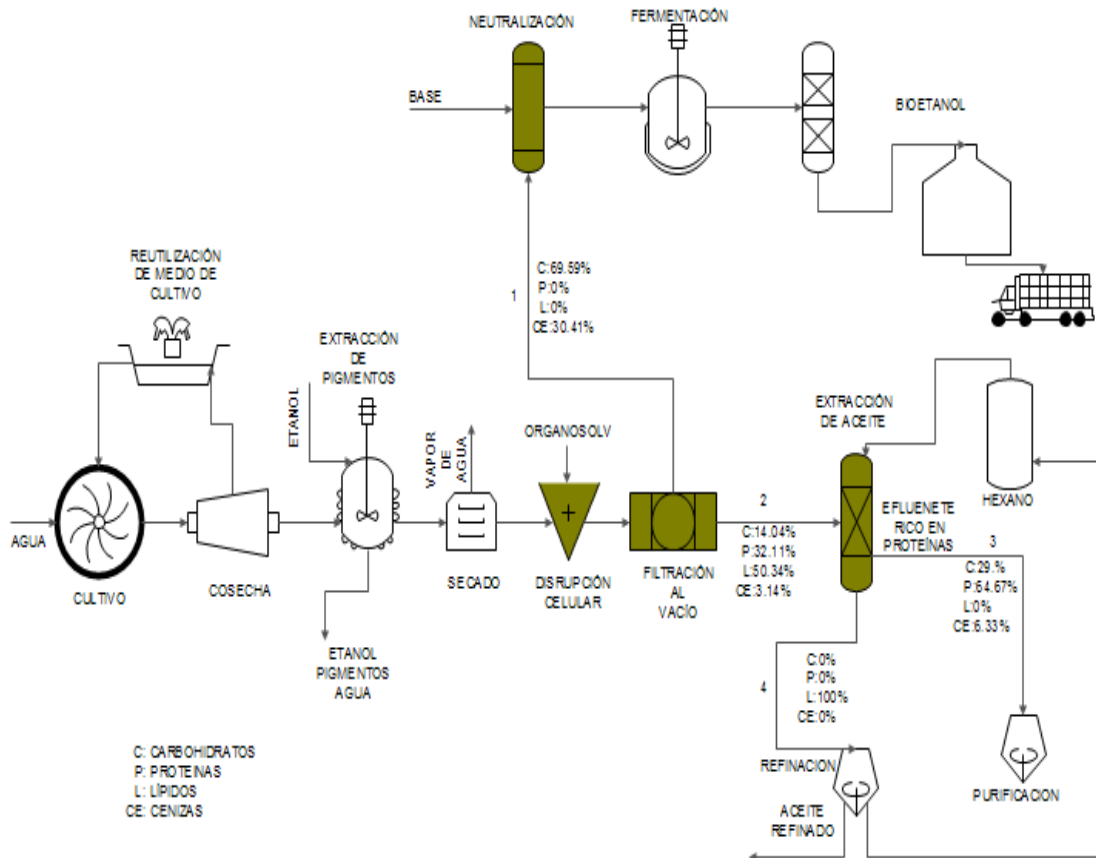
2.6 Elección de la ruta del proceso

Con base a los resultados obtenidos en la experimentación, se plantea la siguiente ruta de aprovechamiento de biomasa de la microalga *Amphiprora Sp.*:

- a) **Extracción de pigmentos:** se hace necesario extraer estos metabolitos en primer lugar, debido a que los demás procesos no generan aumento en la eficiencia de su extracción, por el contrario la reduce. Por esto, esta etapa se plantea antes de secado que es cuando se obtuvo las eficiencias más altas de estos metabolitos.
- b) **Extracción de carbohidratos:** donde se comprueba la selectividad del método Organosolv por este tipo de metabolito haciendo que se extraiga su mayor cantidad que equivale al 49,84% de los carbohidratos que contiene la biomasa, además que arrastra la mayor cantidad de cenizas (69,80%) limpiando así la biomasa para los procesos posteriores.
- c) **Extracción de lípidos:** es necesaria la disrupción celular antes para que se extraiga la mayor cantidad de ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, que se encuentran dentro de la pared celular.
- d) **Cuantificación de proteínas:** debido a la aplicación de los anteriores procesos se logra que la biomasa saliente de la extracción de lípidos sea un efluente rico en proteínas el cual corresponde al 64,67%, como se muestra en la corriente 3 de la Figura 11.

La Figura 11 muestra la composición de las corrientes a lo largo del proceso, en la cual no se incluye los solventes adicionados en cada etapa del proceso.

Figura 11. Diagrama de la ruta de aprovechamiento de biomasa de la microalga *Amphiprora Sp.* planteada



CONCLUSIONES

1. Se planteó una ruta de obtención de distintos metabolitos de la microalga *Amphiprora Sp.* con miras a su aprovechamiento integral, consistente en las etapas de extracción de pigmentos y ficobiliproteínas, disrupción celular mediante hidrólisis del material celulósico de la cepa, extracción de lípidos y obtención de biomasa residual rica en proteínas. El orden encontrado permite obtener un componente sin disminuir la eficiencia de extracción de otros componentes de la microalga.
2. El método de Organosolv para la disrupción celular incrementa la eficiencia de la extracción de lípidos, en este estudio con el rompimiento de la pared celular aumenta hasta 6 veces la extracción de este metabolito contenido en la biomasa.
3. El método Organosolv tiene una alta selectividad por los carbohidratos, en el licor se detectó un porcentaje considerable de este metabolito (49,84%). Otra ventaja de este proceso es la capacidad de limpiar la biomasa de las cenizas, hasta el 69,80%, lo que resulta ser beneficioso, debido a que la presencia de las cenizas dificulta mediciones, balances y análisis del proceso.
4. El análisis del perfil de ácidos grasos del aceite extraído muestra que es más viable para la industria alimenticia que para la producción de biodiesel, ya que tiene un 59,9% de ácidos grasos poliinsaturados, y no cumple con los parámetros definidos por Moser & Vaughn para un aceite utilizable en la obtención de biocombustibles.

RECOMENDACIONES

1. Se debe realizar un estudio detallado al uso de floculantes y el método de floculación para la extracción de biomasa (relación biomasa/floculante), tipos de floculantes y sus consecuencias sobre componentes de la biomasa como lo es el contenido de cenizas.
2. Es de gran importancia aplicar estos resultados en la simulación de procesos industriales para contrastar y tomar decisiones sobre la viabilidad de este proceso a escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Amaya E. y García L., «Aprovechamiento de biomasa de la microalga *Amphiprora* Sp. para la obtención de pigmentos, ficobiliproteínas y lípidos bajo el concepto de biorefinería,» p. 45, 2012.
- [2] Arad S. y Levy-Ontman O., «Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects,» *Current Opinion Biotechnology*, vol. 21, nº 3, pp. 358-364, 2010.
- [3] Becker E., «Biotechnology and Microbiology,» *Cambridge*, 2008.
- [4] Brennan L. y Owende P., «Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 557-577, 2009.
- [5] Carlsson A., Van Beilen J., Möller R. y Clayton D., «Micro-and macroalgae: Utility for industrial applications,» *CPL Press*, pp. 1-82, 2007.
- [6] Chochois V., Dauvillee D., Beyly A., Tolleter D., Cuine S., Timpano H., Ball S., Cournac L. y Peltier G., «Hydrogen Production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-Dependent and -Independent Pathways Differ in Their Requirement for Starch Metabolism,» *Plant Physiol*, vol. 151, pp. 631-640, 2009.
- [7] Dorey F. y Draves G., «Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded by the National Science Foundation,» *University of Central Arkansas*, nº 1-3.
- [8] Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. y Smith F., «Colorimetric method for determination of sugars and related substances,» *Division of Biochemistry*.

- [9] [En línea]. Available: <http://stores.intuitwebsites.com/columbiabiosciences/-strse-Phycobiliproteins/Categories.bok>. [Último acceso: 20 Enero 2013].
- [10] Estévez L., Barajas A. y Kafarov V., «Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate under carbon/nitrogen ratio,» *CT&F – Ciencia, tecnología y futuro*, vol. In press.
- [11] Garzón L. L., «Estudio del pretratamiento metanol - ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores,» p. 56, 2010.
- [12] Gavrilescu M. y Chisti Y., «Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry,» *Biotechnology Advances*, vol. 23, pp. 471-499, 2005.
- [13] González A. y Kafarov V., «Microalgae based biorefinery: issues to consider,» *CT&F - Ciencia, tecnología y futuro*, vol. 4, nº 4, pp. 5-22, 2011.
- [14] Illman A. M., Scragg A.H. y Shales S.W., «Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 27, pp. 631-635, 2000.
- [15] Jaramillo M. y Mantilla N., «Estudio del método de pretratamiento químico Etanol-NaOH para la obtención de azúcares reductores a partir de microalgas, como vía a la producción de bioetanol,» p. 58, 2010.
- [16] Jerez S., Rueda L., Alfonso L., Barajas A., Barajas C. y Kafarov V., «Improvement of lab-scale production of microalgal carbohydrates for biofuel production,» *CT&F - Ciencia, tecnología y futuro*, vol. 5, nº 1, pp. 103-116, 2012.
- [17] Martín M. y Grossmann I., «On the Systematic Synthesis of Sustainable Biorefineries,» *Industrial & engineering chemistry research*, 2012.
- [18] Moser B. y Vaughn S., «Efficacy of fatty acid profile as a tool for screening feedstocks for biodiesel production,» *Biomass and Bioenergy*, vol. 37, pp.

31-41, 2012.

- [19] Norsker N. H., Vermue M., Barbosa M. y Wiffels R., «Microalgal production — A close look at the economics,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 24-27, 2011.
- [20] Ramírez L. y Olvera R., «Uso Tradicional y Actual de Spirulina SP. (Arthrospira SP.),» *Interciencia*, vol. 31, nº 009, pp. 657-663, 2006.
- [21] Rojan J., Anisha G., Nampoothiri M. y Pandey A., «Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 186-193, 2011.
- [22] Um B. H. y Kim Y. S., «Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology,» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 15, pp. 1-7, 2009.
- [23] Wijffels R. y Barbosa M., «An Outlook on Microalgal Biofuels,» *Science*, vol. 329, nº 5993, pp. 796-799, 2010.
- [24] Wijffels R. y Barbosa M., «Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels,» *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 4, pp. 287-295, 2010.
- [25] Yen H. W., Hu C., Chen C. Y., Ho C., Lee D. J. y Chang J. S., «Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products,» *Bioresource Technology*, vol. In press.

ANEXOS

ANEXO A. EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO SOXHLET.

Materiales y reactivos:

- Manta de calentamiento.
- Equipo de extracción Soxhlet (matraz, tubo Soxhlet, condensador).
- Papel de filtro.
- Soporte universal.
- Espátula.
- Mortero.
- Embudo.
- Balanza analítica.
- Hexano.
- Cámara de extracción de vapores.

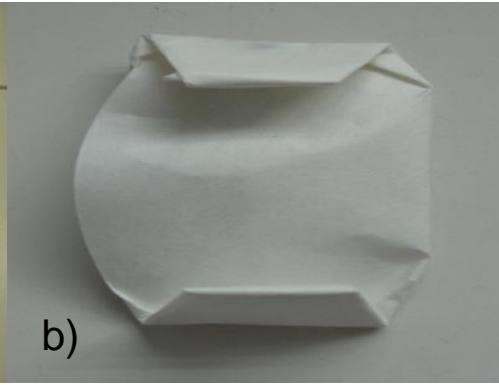
PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

1. Pesar 10g de biomasa pretratada, que ya se encuentra secada a 105 °C y homogenizada.
2. Introducir la biomasa en el papel filtro y formar el cartucho.
3. En el matraz agregar 220 ml de hexano.
4. Hacer montaje Soxhlet.
5. Recuperación del solvente por medio de destilación simple.
6. Dejar volatilizar el extracto y la biomasa residual en una cámara extracto hasta obtener peso constante.
7. Cuantificación del extracto por diferencia de masa.



a)

a) Biomasa macerada.



b)

b) Cartucho con biomasa.



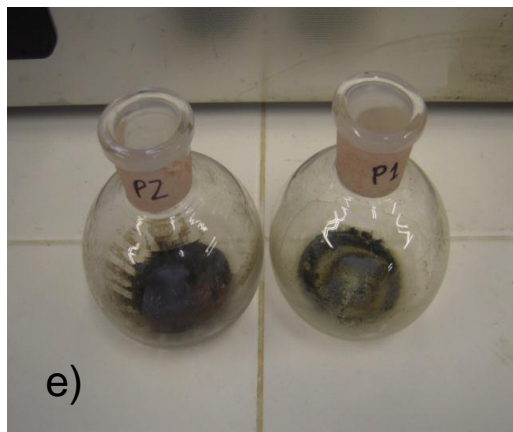
c)

c) Montaje Soxhlet.



d)

d) Solvente remanente



e)

e) Extracto lipídico.