

**EFFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS,  
PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* y  
*Nannochloropsis sp***

**CARLOS ALBERTO JAIMES BRAVO  
GIANNINA MASSIEL LÓPEZ GALETH**

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

**2015**

**EFFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS,  
PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* y  
*Nannochloropsis sp***

**CARLOS ALBERTO JAIMES BRAVO  
GIANNINA MASSIEL LÓPEZ GALETH**

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

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

**Codirector  
PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS  
Ingeniera Química**

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

**2015**

## **DEDICATORIA**

*A Dios por escuchar mis plegarias, a mis padres por todos sus esfuerzos y paciencia, a mi compañero guerrero de tesis Carlos, hombre creativo, radical, amigo leal de luchas, de calidez humana y fiel t stigo de mi caminar, infinitas gracias por su paciencia, apoyo y por estar presente en mis momentos difíciles, a mis hermanos por creer en mí, a Carlitos Muñoz, Yurley y Noris por su apoyo y valerosa amistad, a Nicolas por sus consejos y su amor, a Andy Jahn, mi inolvidable gran amigo, por su valioso apoyo para que mi sueño se haga realidad, a todos los profesores de la escuela de ingeniería, gracias por el conocimiento transmitido, a mis estudiantes porque de alguna manera me contagiaron de su alegría y enriquecieron con sus an cdoctas mis ánimos impulsándome fuerzas para seguir detrás de mis sueños.*

*Aquí sigo bajo la tempestad pero con la esperanza de que nuevamente pueda ver el día que tanto esper , será grandioso llegar a esta etapa de culminación, solo espero que al final de cuentas tanto esfuerzo me produzca placer.*

*Giannina Massiel López Galetk*

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por todas sus bendiciones.*

*A mis padres por su apoyo, amor y comprensión durante este largo caminar*

*A Mi querida y amada abuela María Joba por brindarme siempre su amor y apoyo*

*A mi compañera y amiga Giannina López, por su esfuerzo, dedicación y paciencia*

*A los profesores por su gran labor formando profesionales y seres humanos con principios*

*Carlos Alberto Jaimes Bravo*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Los autores agradecen a:*

*Nuestros padres por su comprensión, apoyo y confianza depositada en el logro de nuestros objetivos.*

*Nuestra querida abuela María Joba por brindarnos su amor, apoyo y colaboración con la realización del proyecto.*

*DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por darnos la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CIDES.*

*INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su colaboración durante la realización de las pruebas para la ejecución del presente proyecto.*

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

*A nuestros inolvidables amigos y compañeros de carrera que hicieron parte de este largo recorrido y nos ayudaron en momentos de dificultades: Andy Jhan, Noris, Nestor, Jaime, Carlos y Yurley. Mil gracias*

*La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química que con sus buenas enseñanzas hicieron parte de nuestra formación profesional*

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	15
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	20
1.1 MÉTODOS DE CULTIVO. ....	20
1.2 FLOCULACIÓN .....	21
1.3 CENTRIFUGACIÓN.....	22
1.4 TRATAMIENTOS DE EXTRACCIÓN .....	22
1.4.1 Tratamiento básico .....	22
1.4.2 Tratamiento ácido .....	23
1.5 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS .....	24
1.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	25
1.7 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS .....	25
1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	26
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
2.1 TRATAMIENTO BÁSICO.....	27
2.1.1 Extracción de carbohidratos.....	27
2.1.2 Extracción de proteínas .....	30
2.1.3 Extracción de lípidos.....	32
2.2 TRATAMIENTO ÁCIDO .....	34
2.2.1 Extracción de carbohidratos.....	35
2.2.2 Extracción de lípidos.....	36
2.3 COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS .....	38
3. CONCLUSIONES .....	42
4. RECOMENDACIONES.....	43
REFERENCIAS .....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS.....	53

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas. Tratamiento básico. .....	27
Tabla 2. Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento ácido. ....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología experimental.....	20
Figura 2. Tratamiento básico .....	22
Figura 3. Tratamiento ácido.....	23
Figura 4. Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento básico. ....	28
Figura 5. Eficiencia de extracción de proteínas. Tratamiento básico.....	30
Figura 6. Eficiencia de extracción de lípidos. Tratamiento básico.....	32
Figura 7. Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento ácido. ....	35
Figura 8. Eficiencia de extracción de lípidos. Tratamiento ácido. ....	37
Figura 9. Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	39
Figura 10. Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos. <i>Nannochloropsis</i> sp .....	40

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Algunas imágenes de la etapa experimental. ....	53
--	----

## RESUMEN

**TITULO:** EFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp*\*

**AUTORES:** CARLOS ALBERTO JAIMES BRAVO\*\*

GIANNINA MASSIEL LÓPEZ GALETH

**PALABRAS CLAVES:** Microalgas, floculación, metabolitos, extracción, lípidos, proteínas, carbohidratos.

### DESCRIPCIÓN:

Las microalgas han sido utilizadas como fuente de complementos nutricionales, sin embargo, durante las dos últimas décadas, el interés por estos organismos se ha enfocado en su aprovechamiento como recurso energético. Actualmente, los costos de producción de biodiesel a partir de microalgas son altos y no son competitivos con los combustibles fósiles. Debido a lo anterior, los investigadores están direccionando sus esfuerzos hacia la valoración de otros componentes presentes en las microalgas como son: proteínas, pigmentos, colorantes, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas. El presente trabajo evaluó el efecto de la floculación sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos. El proceso de medición se llevó a cabo utilizando biomasa floculada con cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ). Se utilizaron dos medios como agentes disruptores, uno alcalino y otro ácido, con el objetivo de comparar el efecto del floculante en cada uno de los procesos. Las condiciones del medio alcalino fueron: 30 ml de NaOH por cada gramo de biomasa a una concentración de 3,67M y temperatura de 55°C. En cuanto al medio ácido las condiciones fueron de 50 ml de HCl 0,5 M por cada gramo de biomasa y temperatura ambiente. Para cada uno de los procesos se utilizó biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis*, concentrada por floculación y biomasa centrifugada. Los resultados obtenidos con las dos diferentes biombras fueron contrastados para evaluar el efecto del proceso de floculación sobre la eficiencia de extracción de los metabolitos de interés.

---

\*Trabajo de grado

\*\* Facultad de ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov, Ingeniero Químico, Ph.D. Co-Director: Paola Andrea Sanguino Barajas, Ingeniera Química.

## ABSTRACT

**TITLE:** FLOCCULATION EFFECT IN THE EXTRACTION OF CARBOHYDRATES, PROTEINS AND LIPIDS WITH THE MICROALGAE *Chlorella vulgaris* AND *Nannochloropsis sp.*

**AUTHORS:** CARLOS ALBERTO JAIMES BRAVO  
GIANNINA MASSIEL LÓPEZ GALETH

**KEYWORDS:** Microalgae, flocculation, metabolites, extraction, lípids, proteins, carbohydrates.

### DESCRIPTION:

Microalgae have been used as a source of nutritional supplements, however, during the last two decades, the interest in these organisms has focused on its use as an energy source. Currently, the cost of biodiesel production from microalgae is high and it's not competitive with fossil fuels. Because of this, researchers are directing their efforts toward the evaluation of other components present in microalgae such as proteins, pigments, dyes, carbohydrates, polyunsaturated fatty acids and vitamins. This study evaluated the effect of flocculation on the efficiency of extraction of carbohydrates, proteins and lipids. The measurement process is carried out using flocculated biomass with aluminum chloride ( $AlCl_3$ ). In order to compare the effect of flocculants in each of the processes, two treatments were used as disrupting agents: acid and alkaline. Alkaline conditions were: 30 ml of NaOH per gram of biomass at a concentration of 3,67M and 55 ° C. Acidic conditions were 50 ml of HCl 0,5 M per gram of biomass at room temperature.. The results obtained with two different biomass (*Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis sp*) were compared to assess the effect of flocculation on the efficiency of extraction of the metabolites of interest.

---

\* Graduation project

\*\* Faculty of Physico-chemical engineering. Department of Chemical Engineering. Director: Viatcheslav Kafarov, Chemical Engineer, Ph.D. Co-Director: Paola Andrea Sanguino Barajas, Chemical Engineer.

## INTRODUCCIÓN

Inicialmente, las microalgas se utilizaron como fuente de complementos nutricionales, sin embargo, durante las dos últimas décadas, el interés por estos organismos se ha enfocado en su aprovechamiento como recurso energético [1]. La producción de biocombustibles a partir de microalgas, incentivó numerosas publicaciones [2-4], ignorando el potencial para obtener otros compuestos de alto valor [5]. Actualmente, los costos de producción de biodiesel a partir de microalgas son altos y no son competitivos con los combustibles fósiles [6]. Debido a lo anterior, los investigadores están direccionando sus esfuerzos hacia la valoración de otros componentes presentes en las microalgas como son: proteínas, pigmentos, colorantes, carbohidratos, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas [7].

Las microalgas son un amplio y diverso grupo de microorganismos fotosintéticos, dependiendo de su especie poseen un tamaño que varía entre 2 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, también se caracterizan por tener una pared celular gruesa, esto hace que para romper las células y extraer los metabolitos, se necesiten condiciones extremas como estrés químico, físico y fisicoquímico [8]. Usualmente, estos organismos se utilizan como biorremediadores de efluentes contaminados [9]. Además, los cultivos de microalgas pueden capturar energía solar entre 10 y 50 veces más eficientemente que las plantas terrestres [10]. Cabe decir, que la concentración del medio de cultivo, depende de si crecen en pozos abiertos o fotobiorreactores tubulares, en donde pueden alcanzar concentraciones de 0,5 g/L a 5 g/L en peso seco [10].

Debido a la variada composición de la biomasa de microalgas, estos microorganismos son atractivos para aplicar el concepto de biorrefinería, que

consiste en aprovechar cada componente de la biomasa para producir alimento animal, biodiesel y energía eléctrica, entre otros [11]. No obstante, la obtención de múltiples productos sigue siendo un reto, debido a limitaciones en el escalado de los procesos, al elevado costo de inversión y las bajas eficiencias de extracción [12]. Actualmente, la cosecha constituye entre el 20 y el 30% de los costos totales de la producción de biomasa [13], debido a los altos requerimientos energéticos y los costos de capital involucrados [8]. Los equipos utilizados durante esta etapa son costosos e ineficientes, dado su alto consumo de energía. Adicionalmente, las operaciones de separación pueden llegar a dañar la integridad de las células [14]. Estas consideraciones económicas hacen que la cosecha sea un factor crítico en la factibilidad de un proceso de cultivo de microalgas a gran escala [15]. Lo anterior, conlleva a la búsqueda de un método de cosecha que permita una separación eficiente de las células del medio de cultivo y al mismo tiempo mantenga su bioactividad en la producción de compuestos valiosos [16].

Por definición, la cosecha es una operación unitaria de separación sólido-líquido en la que las células pasan de un medio diluido a un medio concentrado con valores superiores a 200 g/L. La centrifugación a escala de laboratorio, actualmente, es el proceso más utilizado para la concentración de biomasa de suspensiones de microalgas [15]. A nivel industrial, la centrifugación se utiliza en la obtención de compuestos bioactivos de alto costo [17]. Sin embargo, este método de cosecha tiene algunas limitaciones, entre las que se encuentran: el proceso involucra exponer las células a elevados esfuerzos cortantes y altas fuerzas gravitacionales, lo que ocasiona daño en la estructura de la célula [18]. Adicionalmente, la centrifugación de volúmenes grandes de cultivo incrementa los costos de mantenimiento, sobre todo en ambientes salinos [19].

Con el propósito de superar estos inconvenientes en la producción de biomasa, se han desarrollado procesos alternativos de cosecha que son menos dañinos con las

células y tienen un potencial a escala industrial, entre ellos se encuentran: Floculación [20], filtración [21], agregación por ultrasonido, electrofloculación y electrocoagulación [22] y ultrafiltración [21]. Cabe mencionar, que la escogencia del método de cosecha depende del tamaño, la densidad celular, el medio de cultivo, el tipo de producto final y la relación de costo beneficio de la producción [23].

De los métodos de cosecha mencionados, la floculación es uno de los más prometedores. Esto, debido a que la floculación puede ser menos sensible al tamaño y forma de las microalgas [24], permite el manejo de volúmenes grandes de cultivo en forma rápida y con bajo costo energético, comparado con otros métodos como centrifugación y ultrafiltración [25]. Adicionalmente, las células concentradas por floculación mantienen su integridad celular preservando los metabolitos de interés [26].

La floculación se define como la unión de sólidos suspendidos para formar conglomerados compactos de muy baja rigidez [26]. Una alta carga negativa crea una fuerza repulsiva entre las partículas que mantiene las células de microalga en suspensión. Al agregar el floculante, iones cargados positivamente se absorben fuertemente en la superficie de carga negativa de las partículas; como resultado, la repulsión electrostática entre partículas desaparece y las partículas se coagulan o floculan debido a la fuerza gravitacional y a la fuerza de arrastre del fluido [27].

Entre los diversos tipos de floculantes se encuentran los polímeros de poliacrilamida, estos son eficientes en agua dulce pero no floculan eficientemente en agua marina, debido al efecto de la fuerza iónica del medio marino [28]. Además estos polímeros pueden contener trazas de acrilamida y de esta manera contaminan la biomasa de microalgas [29]. Por otro lado los polímeros naturales como el quitosán tienen la ventaja de ser biodegradables, pero al igual que los polímeros de poliacrilamida no son eficientes en agua marina [27]. Según estudios

realizados por Vandamme et al. (2013), el uso a nivel industrial del quitosan está comprometido debido a su costo (15 dólares/Kg). Otra técnica, es la floculación a pH alto, en la que se forman precipitados inorgánicos que se floculan junto con la biomasa, esto puede aumentar la concentración de minerales [30], que deben ser removidos antes de extraer los metabolitos de interés [31].

Otra alternativa, es utilizar sales metálicas como el cloruro de aluminio o cloruro férrico. Este tipo de floculantes, son ampliamente usados en industrias de tratamiento de agua y en la minería. Las sales metálicas proveen un buen sistema para estudiar la interacción entre los floculantes y las células de microalga, debido a que sus propiedades son bien entendidas y su costo en el mercado es atractivo [32]. Además, la salinidad no afecta adversamente la eficiencia de remoción cuando se usa cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) como agente floculante y es posible su uso combinado con biopolímeros en ambientes salinos [30].

A pesar de todas las ventajas de los floculantes para la cosecha de microalgas, hay pocos estudios sobre los posibles efectos de estos elementos en la cantidad y calidad de los metabolitos extraídos en las microalgas [33]. Robert et al. (2006), comparó la cantidad de metabolitos presentes en biomasa floculada y centrifugada, encontrando una disminución en el contenido de metabolitos. Los autores utilizaron NaOH 1M como agente extractor de proteínas y carbohidratos, trabajando a 100°C. En cuanto a la extracción de lípidos, Robert et al. (2006) emplearon una mezcla de cloroformo-metanol. Debe resaltarse que las elevadas condiciones de temperatura en la extracción de carbohidratos y proteínas y el uso de un solvente altamente contaminante para la extracción de lípidos, dificultan utilizar estos resultados a escala industrial [34]

Por otro lado, N-Villarreyes et al. (2011), investigaron la composición de ácidos grasos en *Nannochloropsis* y *Thalassiosira weissflogii*, utilizando poliacrilamida

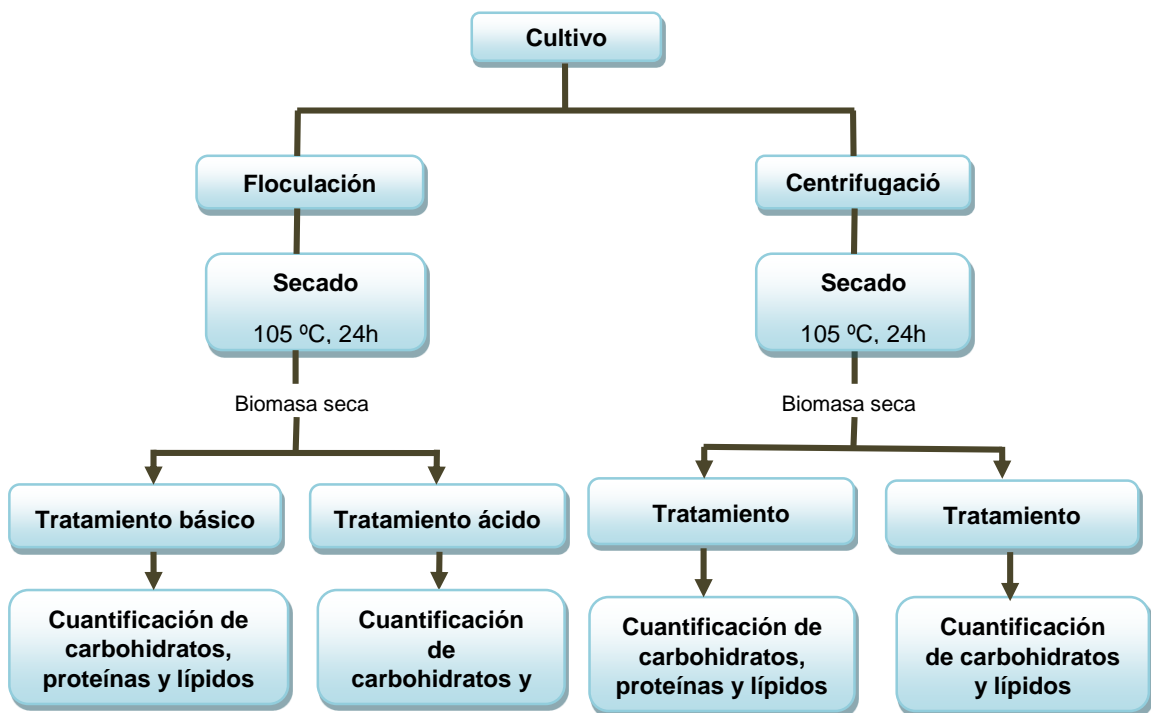
como floculante. Estos autores encontraron diferencias de composición entre la biomasa cosechada sin floculante y la biomasa cosechada con floculante. El estudio de N-Villarreyes et al. (2011), reportó la disminución en el porcentaje de ácidos grasos C16:0, C18:0 para *Thalassiosira weissflogii* y disminución de C16:0 Y C18:0 para *Nannochloropsis*. En cuanto a la cantidad total de lípidos no encontró diferencia entre la biomasa floculada y centrifugada. De igual manera, estos autores sugieren un escenario en el que los floculantes adheridos a las paredes celulares funcionan como una trampa para lípidos complejos y esto ocasiona la diferencia en la composición de ácidos grasos.

El presente trabajo evaluó el efecto de la floculación sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos. El proceso de medición se llevó a cabo utilizando biomasa floculada con cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), a un pH de 7. Se utilizaron dos medios como agentes disruptores, uno alcalino y otro ácido, con el objetivo de comparar el efecto del floculante en cada uno de los procesos. Las condiciones del medio alcalino fueron: 30 ml de NaOH por cada gramo de biomasa a una concentración de 3,67M y temperatura de 55°C. En cuanto al medio ácido las condiciones fueron de 50 ml de HCl 0,5 M por cada gramo de biomasa y temperatura ambiente. Para cada uno de los procesos se utilizó biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis*, concentrada por floculación y biomasa centrifugada. Los resultados obtenidos con las dos diferentes biomosas fueron contrastados para evaluar el efecto del proceso de floculación sobre la eficiencia de extracción de los metabolitos de interés.

## 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la metodología experimental llevado a cabo para el desarrollo del proyecto.

**Figura 1.** Metodología experimental



### 1.1 MÉTODOS DE CULTIVO.

*Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas A&M (Austin, Texas, EE.UU.); *Nannochloropsis sp.*, fue aislada del Golfo de Morrosquillo (Sucre-Córdoba, Colombia). Ambas cepas se cultivaron en medio Bold Basal el cual tiene la composición en mg/L de macronutrientes es:  $\text{NaNO}_3$  (2,94),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $3,04 \times 10^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  ( $4,28 \times 10^{-1}$ ),

$K_2HPO_4$  ( $4,31 \times 10^{-1}$ ),  $KH_2PO_4$  (1,29),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ( $1,70 \times 10^{-1}$ ) y micronutrientes (mg/L)  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $3,07 \times 10^{-2}$ ),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  ( $7,28 \times 10^{-3}$ ),  $MoO_3$  ( $4,93 \times 10^{-3}$ ),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ( $6,29 \times 10^{-3}$ ),  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  ( $1,68 \times 10^{-3}$ ),  $H_3BO_3$  ( $1,85 \times 10^{-1}$ ), EDTA ( $1,71 \times 10^{-1}$ ), KOH ( $5,53 \times 10^{-1}$ ),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $1,79 \times 10^{-2}$ ).

Las microalgas fueron cultivadas en reactores rectangulares de vidrio con capacidad de 20 L. El medio de cultivo se acopló a un sistema de aireación por burbujeo. Se utilizó iluminación artificial con ciclo luz oscuridad 12:12 h y la temperatura se mantuvo en un rango de  $23 \pm 2$  °C. El tiempo de cultivo fue de 15 días con condiciones de crecimiento exponencial [35].

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biomasa adscrito a la Escuela de Ingeniería Química de la universidad Industrial de Santander.

## 1.2 FLOCULACIÓN

Basados en la metodología desarrollada por Mena y Ortegón (2014) del grupo de investigación CIDES, se comparó el efecto de la floculación empleando el siguiente procedimiento: Por cada 100 mL de cultivo de *chlorella vulgaris* o *Nannochloropsis sp* respectivamente se utilizaron 1,25 mL de solución de floculante (40 g/L  $AlCl_3$ ). El pH se ajustó a 7 empleando soluciones de NaOH 1M y HCl 1M. Posteriormente, la biomasa concentrada fue recolectada. Por último, la biomasa fue secada en un horno durante 24 horas a 105 °C.

### 1.3 CENTRIFUGACIÓN

Para llevar a cabo la comparación del efecto de la floculación con diferentes métodos de cosecha, se centrifugó cultivo de biomasa a 3400 rpm durante 15 minutos. Luego, la biomasa concentrada fue secada en un horno durante 24 horas a 105 °C.

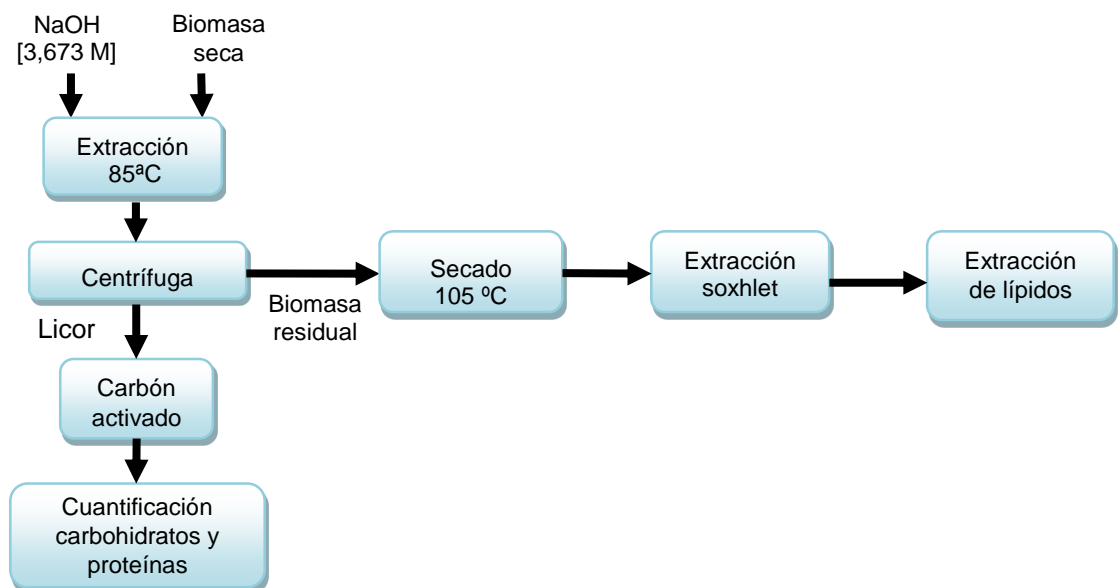
### 1.4 TRATAMIENTOS DE EXTRACCIÓN

Para la extracción de metabolitos se realizaron experimentos por triplicado mediante tratamiento básico y ácido.

#### 1.4.1 Tratamiento básico

La Figura 2 muestra un diagrama que resume el procedimiento realizado en el tratamiento básico.

**Figura 2.** Tratamiento básico

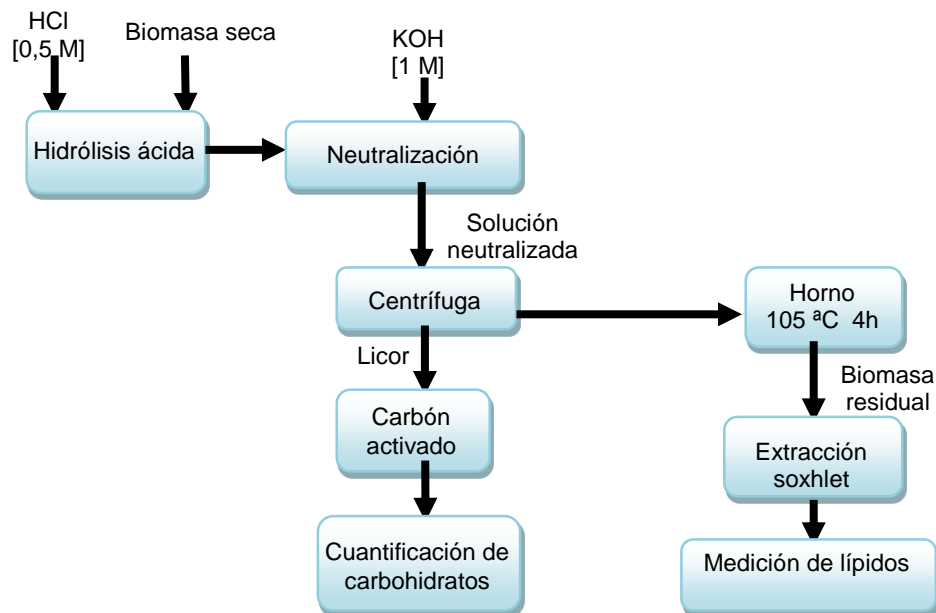


A partir de la biomasa seca se tomaron 5 gramos y se adicionó 150 mL de NaOH 3,673 M en un recipiente de vidrio. La mezcla anterior fue tratada térmicamente en baño de María (Memmert) a 85 °C durante 20 minutos. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron a 3400 rpm durante 15 minutos. El extracto obtenido se utilizó para cuantificar los carbohidratos y proteínas. Por otro lado, la biomasa residual se secó en un horno durante 4 horas y se destinó para la extracción de lípidos.

### 1.4.2 Tratamiento ácido

La Figura 3 muestra un diagrama que resume el procedimiento realizado en el tratamiento ácido.

**Figura 3.** Tratamiento ácido.



A partir de la biomasa seca, se tomaron 5 gramos y se adicionó 50 mL de HCl 0,5 M durante 2 horas con agitación magnética a 500 rpm [36]. La mezcla resultante se

neutralizó con solución de KOH 1 M. La solución neutralizada fue centrifugada a 3400 rpm durante 15 minutos y el licor obtenido se utilizó para determinar carbohidratos. Finalmente, la fase sólida se secó en un horno durante 4 horas a 105 °C y se empleó para la extracción de lípidos.

### 1.5 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

El contenido de carbohidratos totales en la muestra se determinó empleando el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.*, (1956). El método consiste en utilizar un tubo de ensayo para agregar 1 mL de licor y adicionar por separado 0,5 mL de fenol al 5% y 2,5 mL de ácido sulfúrico al 96%. La solución resultante se homogenizó utilizando un agitador vortex. Posteriormente, la concentración de los carbohidratos se determinó en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 Merck) midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 480, 485 y 490nm correspondientes a los monosacáridos xilosa, arabinosa, glucosa y fructosa que se encuentran en la biomasa. La concentración inicial de carbohidratos se obtuvo a través de una revisión bibliográfica [37-41]. En esta revisión, se compararon diferentes resultados de caracterización de carbohidratos para los dos tipos de microalga y bajo condiciones de cultivo similares a las de este estudio.

La eficiencia de extracción de carbohidratos se determinó con la Ecuación 1

#### ***Ecuación 1.***

$$EEC = \left( \frac{\text{Concentración de carbohidratos extraídos}}{\text{Concentración de carbohidratos iniciales}} \right) * 100$$

## 1.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido de proteínas totales en la muestra se determinó mediante el método de cuantificación de proteínas por reacción de Folin (Lowry et al., 1951). El método consiste en inicialmente, agregar 1 mL de muestra a un tubo de ensayo previamente cubierto con aluminio para evitar la entrada de luz. Posteriormente, se adicionó 1,4 mL de solución A-B.C. A continuación, la solución se agitó durante 3 minutos por medio de un sistema vortex (Heidolph REAC Top). Después de 20 minutos de reacción se agregó 0,2 mL de reactivo Folin en solución con agua. La solución resultante se dejó reaccionar por 30 minutos con agitación en vortex durante 5 minutos. Por último, la concentración de proteínas se determinó al medir la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro (Pharo300 Merck). La concentración inicial de proteínas se estimó por medio de una revisión bibliográfica [37,38,40-44], en la cual se compararon diferentes resultados obtenidos a partir de un medio de cultivo de características similares al utilizado en este estudio y en el que las algas se recolectaron en fase de crecimiento exponencial. La eficiencia de extracción de proteínas se calculó con la Ecuación 2.

### *Ecuación 2.*

$$EEP = \left( \frac{\text{Concentración de proteínas extraídas}}{\text{Concentración de proteínas iniciales}} \right) * 100$$

## 1.7 CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La extracción de lípidos fue realizada mediante la técnica de extracción soxhlet [45]. El montaje consta de un matraz, un tubo soxhlet, un condensador y 250 mL de n-Hexano como solvente. La biomasa seca se pesó en un cartucho de papel filtro totalmente sellado que se introdujo en el sistema soxhlet. La temperatura del solvente se mantuvo en 68 °C durante 14 horas. Posteriormente el extracto lipídico se obtuvo separando el solvente utilizando un rotoevaporador. El contenido final del

matraz rotoevaporado es el extracto lipídico libre de solvente n-Hexano. La concentración inicial de lípidos se obtuvo por medio de una revisión bibliográfica [37,38,44] en donde se compararon diferentes resultados obtenidos a partir de un medio de cultivo similar al utilizado en este trabajo. No se tuvo en cuenta caracterizaciones realizadas en condiciones de crecimiento con estrés celular como lo son la limitación de nutrientes, las variaciones en las ciclos de luz oscuridad o la cantidad de luz suministrada. Con la revisión anterior se intentó dar generalidad a los resultados, teniendo en cuenta que las microalgas son seres vivos cuyas composiciones varían según las condiciones de crecimiento. El porcentaje de extracto lipídico en la muestra se define con la Ecuación 3.

**Ecuación 3.**

$$\% \text{Extracto lipídico} = \frac{\text{masa final del matraz} - \text{masa inicial del matraz}}{\text{masa inicial de la muestra}}$$

La Ecuación 4 se utilizó para calcular la eficiencia de extracción de proteínas.

**Ecuación 4**

$$EEP = \left( \frac{\text{porcentaje de extracto lipídico}}{\text{porcentaje de lípidos iniciales}} \right) * 100$$

### **1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las extracciones básica y ácida se hicieron en triplicados. Se empleó la prueba t (n=3) para comparar diferencias estadísticas de los valores medios en las eficiencias de extracción de cada metabolito. Lo anterior, permitió comparar la eficiencia de extracción de metabolitos en biomasa floculada respecto a la biomasa centrifugada. Las medias se consideraron significativamente diferentes cuando  $P \leq 0,05$ . Los cálculos se realizaron con el software Minitab versión 15.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 TRATAMIENTO BÁSICO

Las eficiencias de extracción de carbohidratos y proteínas para el tratamiento básico se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas. Tratamiento básico.

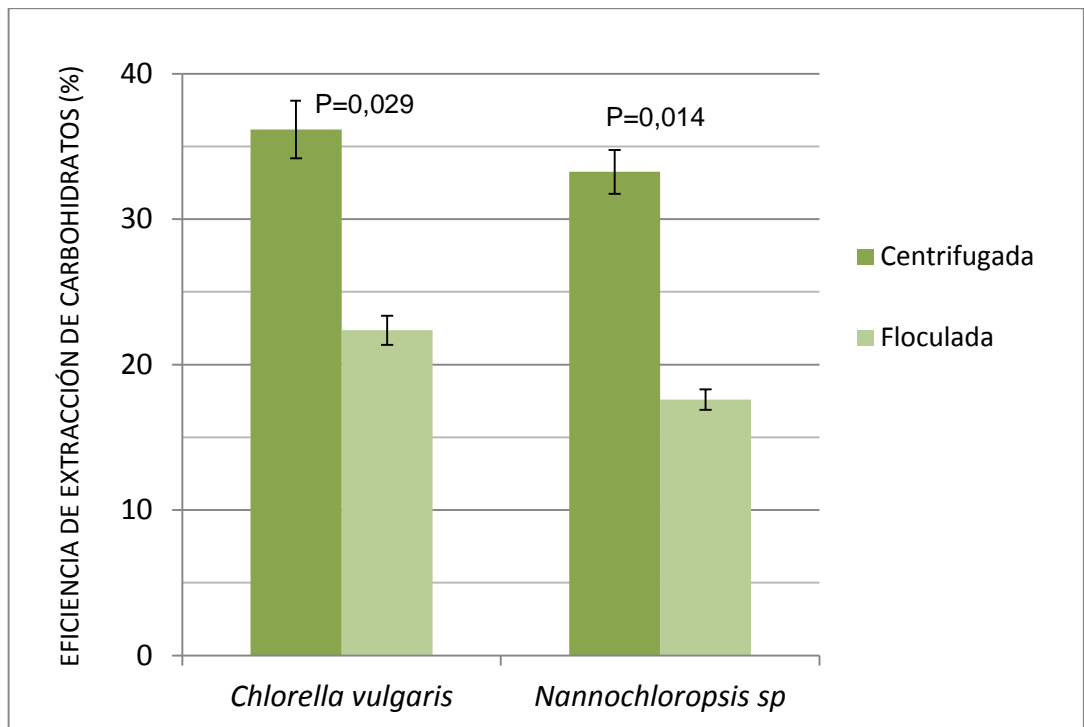
<i>Chlorella vulgaris</i>							
Método de cosecha	Biomasa inicial (g)	Carbohidratos iniciales (g/L)	Carbohidratos extraídos (g/L)	Eficiencia de extracción de carbohidratos (%)	Proteínas iniciales (g/L)	Proteínas extraídas (g/L)	Eficiencia de extracción de proteínas (%)
Centrifugada	5	11,67	4,22	36,16	16,67	8,96	53,75
Floculada	5	11,67	2,61	22,36	16,67	5,38	32,27
<i>Nannochloropsis sp</i>							
Centrifugada	5	12,33	4,10	33,25	10,0	5,54	55,40
Floculada	5	12,33	2,17	17,60	10,0	3,84	38,40

#### 2.1.1 Extracción de carbohidratos.

En la Figura 4 se muestran las eficiencias de extracción de carbohidratos para el Tratamiento básico. Adicionalmente, se reportan los valores P correspondientes a la prueba t, donde se determinó la significancia de los valores medios calculados para la eficiencia de extracción de carbohidratos. Lo anterior, permitió comparar los

resultados obtenidos para la biomasa centrifugada y floculada de las dos microalgas utilizadas.

**Figura 4.** Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento básico.



Según se observa en la Figura 4, la eficiencia en la extracción de carbohidratos para *Chlorella vulgaris* centrifugada es de 36,16%. Este resultado se puede comparar con los obtenidos por Marmolejo y Gutiérrez (2013) en donde la eficiencia de extracción corresponde a 46% trabajando a condiciones de 85 °C, 45 mL de NaOH 3 M, y 1 gramo de *Chlorella vulgaris* centrifugada. De igual manera, estudios realizados por Reyes y Ayala (2014), reportan eficiencias de extracción de carbohidratos correspondientes a 47% trabajando a condiciones de 55°C, 30 mL de NaOH 3,67 M, y 1 gramo de *Chlorella vulgaris* centrifugada, utilizando vinazas como fuente de nutrientes. Cabe señalar, que en el diseño previo a este trabajo se

escogieron los resultados anteriores como referencia para seleccionar las mejores condiciones de extracción de metabolitos. Esta selección permitió obtener eficiencias de extracción del orden del 40%, las que en este tipo de condiciones de extracción se consideran eficiencias altas. Como se puede apreciar, la eficiencia de extracción de carbohidratos registrada tiene un valor inferior a los trabajos ya mencionados, probablemente debido a las diferencias en la fuente de nutrientes, condiciones de extracción y a la cantidad de biomasa inicial de la extracción.

Por otro lado, para *Nannochloropsis* sp centrifugada se obtuvo una eficiencia de extracción de 33,25%, menor a los resultados reportados para *Chlorella vulgaris*. Lo anterior, dado a la resistencia de la pared celular de esta microalga [8] y al tamaño de las células [5].

Como se evidencia en la Figura 4, al comparar la eficiencia de extracción de carbohidratos, se observa que la biomasa floculada de *chlorella vulgaris* tiene una eficiencia de extracción cercana al 22%. Esto muestra una disminución del 21,51%, respecto a la biomasa centrifugada. De igual forma, en *Nannochloropsis* sp floculada se obtuvo una eficiencia de extracción de 17,6 % que es inferior al valor registrado 33,25 % en *Nannochloropsis* sp centrifugada. Se sugiere que la disminución de eficiencia de extracción de carbohidratos es ocasionada por la interacción entre el floculante y los carbohidratos, generando un atrapamiento que impide que estos metabolitos sean extraídos.

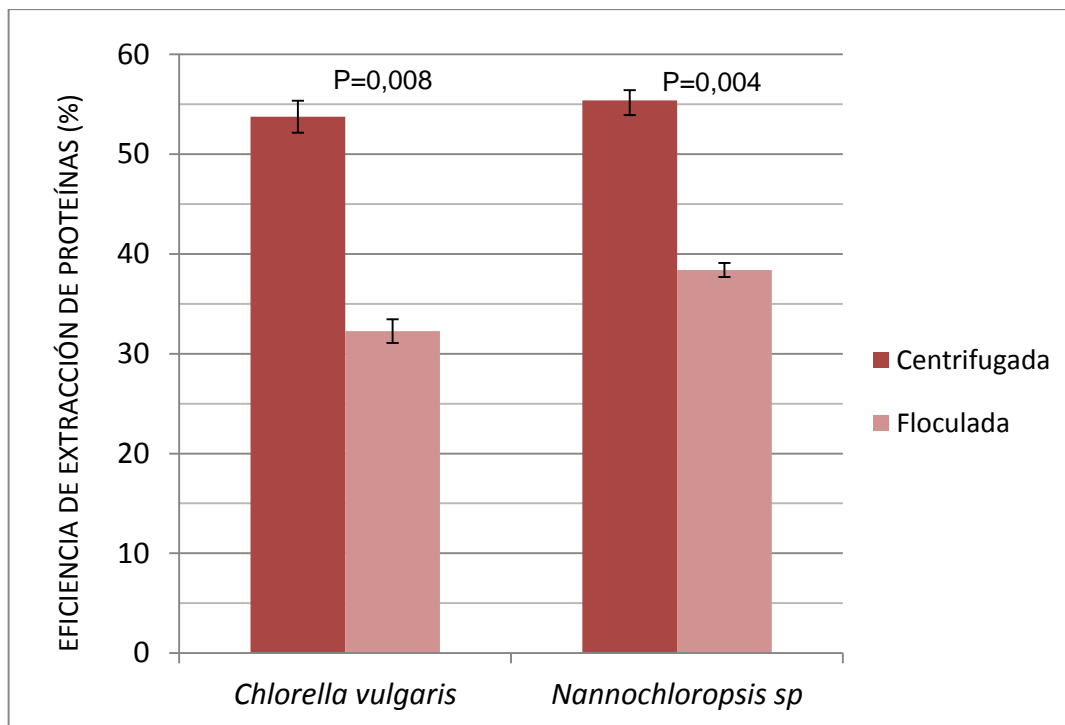
Los resultados en *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp se pueden comparar con los estudios realizados por Robert, et al (2006), en donde la eficiencia de extracción de carbohidratos de biomasa floculada disminuye 23,17 %, al compararla con la eficiencia de extracción de biomasa centrifugada. Estos autores utilizaron la microalga *T.pseudonana*, y cloruro férrico sexta hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) como

agente floculante, NaOH 1M como solvente a una temperatura de 100°C, durante 10 minutos.

### 2.1.2 Extracción de proteínas

En la Figura 5 se presentan las eficiencias de extracción de proteínas para el Tratamiento básico. De igual manera, se reportan los valores P correspondientes a la prueba t, donde se determinó la significancia de los valores medios calculados para la eficiencia de extracción de proteínas. Lo anterior, permitió comparar los resultados obtenidos para la biomasa centrifugada y floculada de las dos microalgas estudiadas.

**Figura 5.** Eficiencia de extracción de proteínas. Tratamiento básico.



Teniendo en cuenta la Figura 5, se infiere que la eficiencia en la extracción de proteínas para *Chlorella vulgaris* centrifugada es de 53,75 %. Este resultado es similar al estudio realizado por Reyes y Ayala (2014), en el cual se reportan eficiencias de extracción de proteínas correspondientes a 46%, trabajando a condiciones de 55°C, 30 mL de NaOH 3,67 M, 1 gramo de *Chlorella vulgaris* centrifugada, utilizando vinazas como fuente de nutrientes.

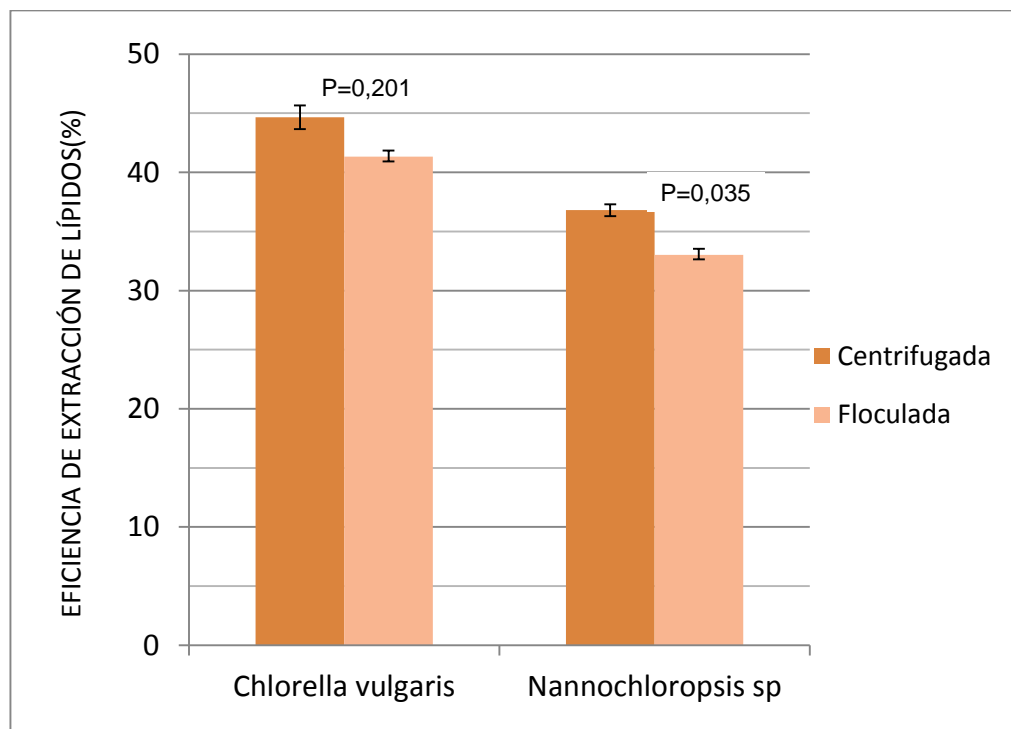
Como se indica en la Figura 5, al comparar la eficiencia de extracción de proteínas, se observa que la biomasa floculada tiene una eficiencia de extracción cercana al 32,27%. Esto muestra una disminución del 21,48 %, respecto a la biomasa centrifugada. De igual forma, en *Nannochloropsis* sp floculada se obtuvo una eficiencia de extracción de 38,4 % que es inferior al valor registrado 55,4 % en *Nannochloropsis* sp centrifugada. Se sugiere que la disminución de eficiencia de extracción de proteínas es ocasionada por la interacción entre el floculante y los carbohidratos, generando un atrapamiento que impide que este metabolito sean extraído.

Los resultados en *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp se pueden comparar con el estudio realizado por Robert, et al (2006), en el cual la eficiencia de extracción de proteínas de biomasa floculada disminuye 29,7 % al compararla con la eficiencia de extracción de biomasa centrifugada. Los autores trabajaron con *T.pseudonana*, utilizando  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como agente floculante, NaOH 1M como agente extractor y temperatura de 100°C, durante 10 minutos para extraer proteínas. Los resultados obtenidos en este estudio son inferiores a los obtenidos por Prasertsan, et al (2015), en donde al flocular *Chlorella* sp utilizando entre otros, sulfato de aluminio y Potasio, se logra una eficiencia de extracción de proteínas de 52,9%.

### 2.1.3 Extracción de lípidos

En la Figura 6 se muestran las eficiencias de extracción de lípidos para el tratamiento básico. Adicionalmente, se reportan los valores P correspondientes a la prueba t, donde se determinó la significancia de los valores medios calculados para la eficiencia de extracción de lípidos. Lo anterior, permitió comparar los resultados obtenidos para la biomasa centrifugada y floculada de las dos microalgas utilizadas.

**Figura 6.** Eficiencia de extracción de lípidos. Tratamiento básico.



Según la polaridad, existen tres tipos de lípidos en las microalgas: Lípidos no polares, polares y anfifáticos (de cabeza polar y cola larga hidrocarbonada no polar). Los lípidos anfifáticos están relacionados con la estructura celular y son los componentes principales de la membrana celular [46]. Numerosos estudios han

encontrado que las microalgas incrementan la fracción total de lípidos al crecer bajo condiciones de estrés celular [47, 48]. Una de las condiciones más efectiva es el crecimiento bajo limitación de Nitrógeno [47,49,50]. Esto permite la acumulación de lípidos neutrales en la forma de triacilglicéridos (TAG) en los llamados cuerpos de aceite [8]. Dicha acumulación ocurre a expensas de la energía utilizada para el crecimiento, lo que lleva a una disminución de la velocidad de crecimiento y en consecuencia a un descenso en la productividad [8]. En este trabajo, los cultivos de microalga se realizaron en condiciones controladas y sin ningún tipo de limitación de nutrientes. Bellou y Aggelis (2012) determinaron la composición y distribución de lípidos para *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* cultivada en condiciones similares a las de este estudio. Los autores encontraron que en *Chlorella vulgaris* los lípidos no polares y Anfifáticos corresponden al 92%, mientras que en *Nannochloropsis* estos lípidos corresponden al 70% del total de lípidos. Por otra parte, los lípidos polares constituyen 8 y 30 % para *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* respectivamente. Como se observa en la Figura 6, la eficiencia de extracción de lípidos en biomasa centrifugada de *Chlorella vulgaris* es de 44,67 %, valor que es superior al reportado para *Nannochloropsis* centrifugada y que corresponde a 36,81%. Esta diferencia se puede explicar si se tiene en cuenta la mayor proporción de lípidos polares en *Nannochloropsis* sp respecto de *Chlorella vulgaris* y el solvente extractor hexano que debido a su naturaleza no polar, se caracteriza por una mayor afinidad hacia lípidos no polares y anfifáticos.

Como se indica en la Figura 6, el valor P para *Chlorella vulgaris* es de 0,201, lo que quiere decir que no hay diferencia estadística entre la eficiencia de extracción de lípidos para biomasa floculada y centrifugada. Esto se puede contrastar con los estudios realizados por N-Villarreyes, et al. (2011), en donde al flocular *Thalassiosira weissflogii*, utilizando el floculante poliacrilamida y medio básico como agente extractor, se encontró que la eficiencia de extracción de lípidos no se ve afectada por el floculante.

Por otro lado, el valor P que compara la eficiencia de extracción de lípidos en *Nannochloropsis* sp centrifugada y floculada es de 0,035. Esto indica que las eficiencias de extracción de lípidos en *Nannochloropsis* centrifugada y floculada son diferentes y corresponden a valores de 36,81 % y 33,03 % respectivamente. Si bien es cierto, que los resultados estadísticos son opuestos en *Chlorella* y *Nannochloropsis*, la diferencia de eficiencia de extracción de lípidos entre biomasa centrifugada y floculada no supera el 3,78%. Los resultados para *Nannochloropsis* y *Chlorella vulgaris* comprueban que los floculantes no disminuyen considerablemente la eficiencia de extracción de lípidos en condiciones de extracción básica puesto que la eficiencia de extracción no disminuye más del 5% respecto de la biomasa centrifugada. Esto es aceptable desde el punto de vista industrial puesto que la centrifugación es un método de cosecha considerablemente más costoso que la floculación [19]. Teniendo en cuenta el trabajo de Davis (2011), los floculantes depositados en la superficie de la microalga tienen un carácter iónico. Por tanto, la interacción entre el solvente hexano y los floculantes no es del mismo tipo que la existente entre el hexano y los lípidos extraídos. Esta diferencia podría explicar la poca disminución en la eficiencia de extracción de lípidos al comparar biomasa floculada y biomasa centrifugada.

## **2.2 TRATAMIENTO ÁCIDO**

Los resultados de extracción de carbohidratos para el tratamiento ácido se presentan en la Tabla 2.

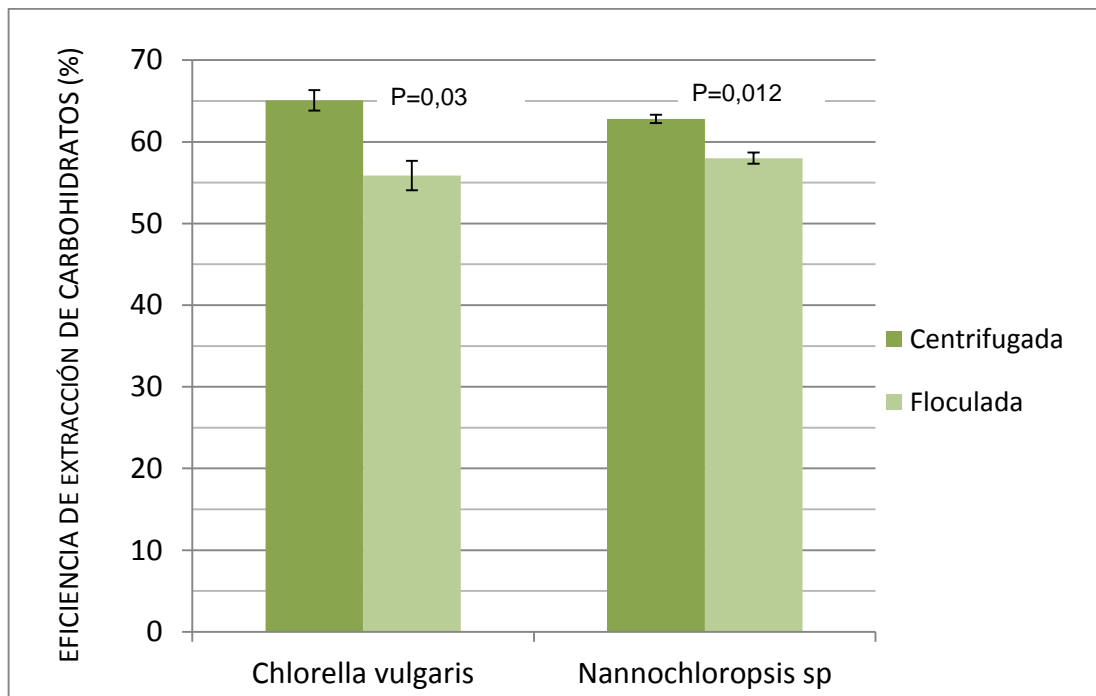
**Tabla 2.** Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento ácido.

<i>Chlorella vulgaris</i>				
	Biomasa inicial (g)	Carbohidratos iniciales (g/L)	Carbohidratos extraídos (g/L)	Eficiencia de extracción de carbohidratos (%)
Centrifugada	5	28,23	18,37	65,07
Floculada	5	28,23	15,77	55,86
<i>Nannochloropsis sp</i>				
Centrifugada	5	29,84	18,74	62,80
Floculada	5	29,84	17,31	58,00

### 2.2.1 Extracción de carbohidratos

En la Figura 7 se muestran las eficiencias de extracción de carbohidratos para el tratamiento ácido.

**Figura 7.** Eficiencia de extracción de carbohidratos. Tratamiento ácido.



Según se observa en la Figura 7, la eficiencia en la extracción de carbohidratos para *Chlorella vulgaris* centrifugada es de 65,16 %. Este resultado supera al valor obtenido en la extracción básica. Por otro lado, para *Nannochloropsis* sp centrifugada se obtuvo una eficiencia de extracción de 62,8%.

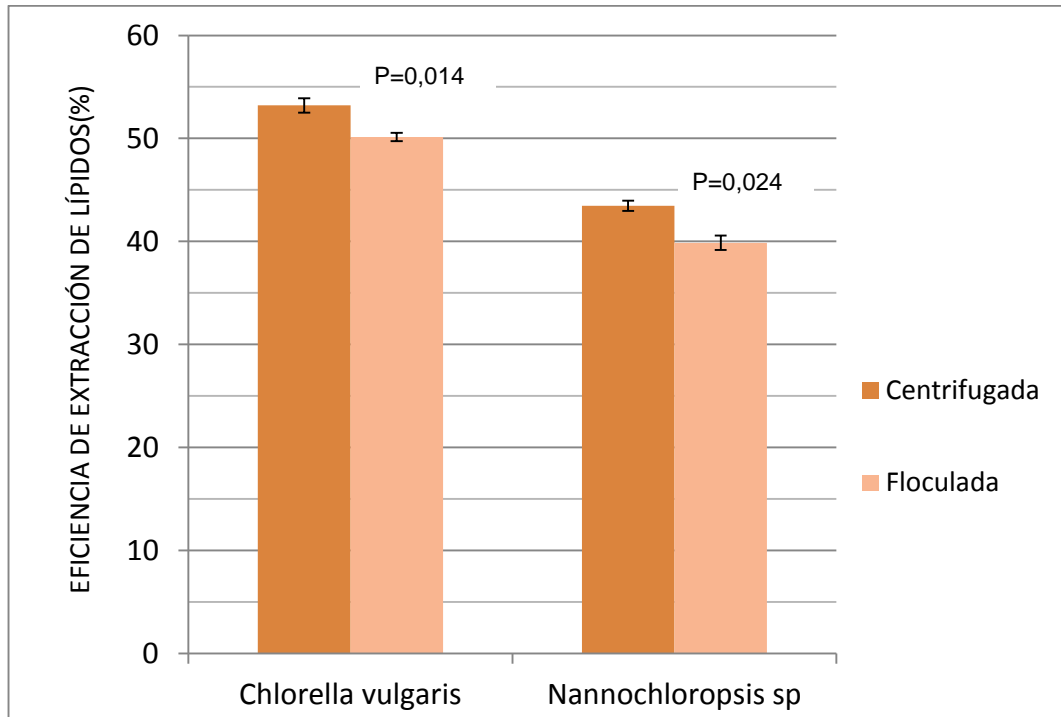
Como se evidencia en la Figura 7, al comparar la eficiencia de extracción de carbohidratos en *Chlorella Vulgaris* floculada, la biomasa tiene una eficiencia de extracción de carbohidratos de 55,86 % que corresponde a una disminución de 9,3 % respecto de la biomasa centrifugada. De igual forma, en *Nannochloropsis* sp floculada se obtuvo una eficiencia de extracción de 58 % que es inferior al valor registrado 62,8 % de *Nannochloropsis* sp centrifugada.

Se evidencia que la extracción ácida presenta mayores eficiencias de extracción de carbohidratos que la extracción básica. Además, el efecto de disminución de eficiencia debido a la adición de floculantes es inferior al obtenido en la extracción básica. Si el interés es la obtención de carbohidratos se recomienda la extracción ácida. Debe mencionarse que la extracción ácida no permite extraer proteínas debido a que en estas condiciones ocurre una degradación proteica [5]. Esta es una desventaja que se debe considerar si se utiliza el tratamiento ácido.

### **2.2.2 Extracción de lípidos**

En la Figura 8 se muestran las eficiencias de extracción de lípidos para el tratamiento ácido.

**Figura 8.** Eficiencia de extracción de lípidos. Tratamiento ácido.



Como se indica en la Figura 8, la eficiencia en la extracción de lípidos para *Chlorella vulgaris* centrifugada es de 54,2%. Este resultado supera al valor obtenido en la extracción básica en cerca de 10%. Por otro lado, para *Nannochloropsis sp* centrifugada se obtuvo una eficiencia de extracción de 43,45% valor que también es cerca de 7% superior al obtenido *Nannochloropsis* centrifugada sometida a tratamiento básico. Estos resultados se pueden comparar con los reportados por Wu, et al. (2012) en donde utilizando hexano como agente extractor de lípidos, se pretrató 1 gramo de *Nannochloropsis salina* con 20 mL de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%, temperatura de 120 °C durante 1 hora. Este autor reportó una eficiencia de extracción de lípidos con un valor del 60%. Adicionalmente, estudios realizados por Reyes y Ayala (2014), encontraron que la temperatura es factor determinante en la

eficiencia de extracción. Lo anterior explicaría la mayor eficiencia obtenida Wu, et al (2012).

Por otro lado, al comparar los resultados de extracción de lípidos en el tratamiento ácido y básico se encuentra que el tratamiento ácido tiene eficiencias entre el 5 y 10% mayores en biomasa floculada y centrifugada para los dos tipos de microalga estudiadas.

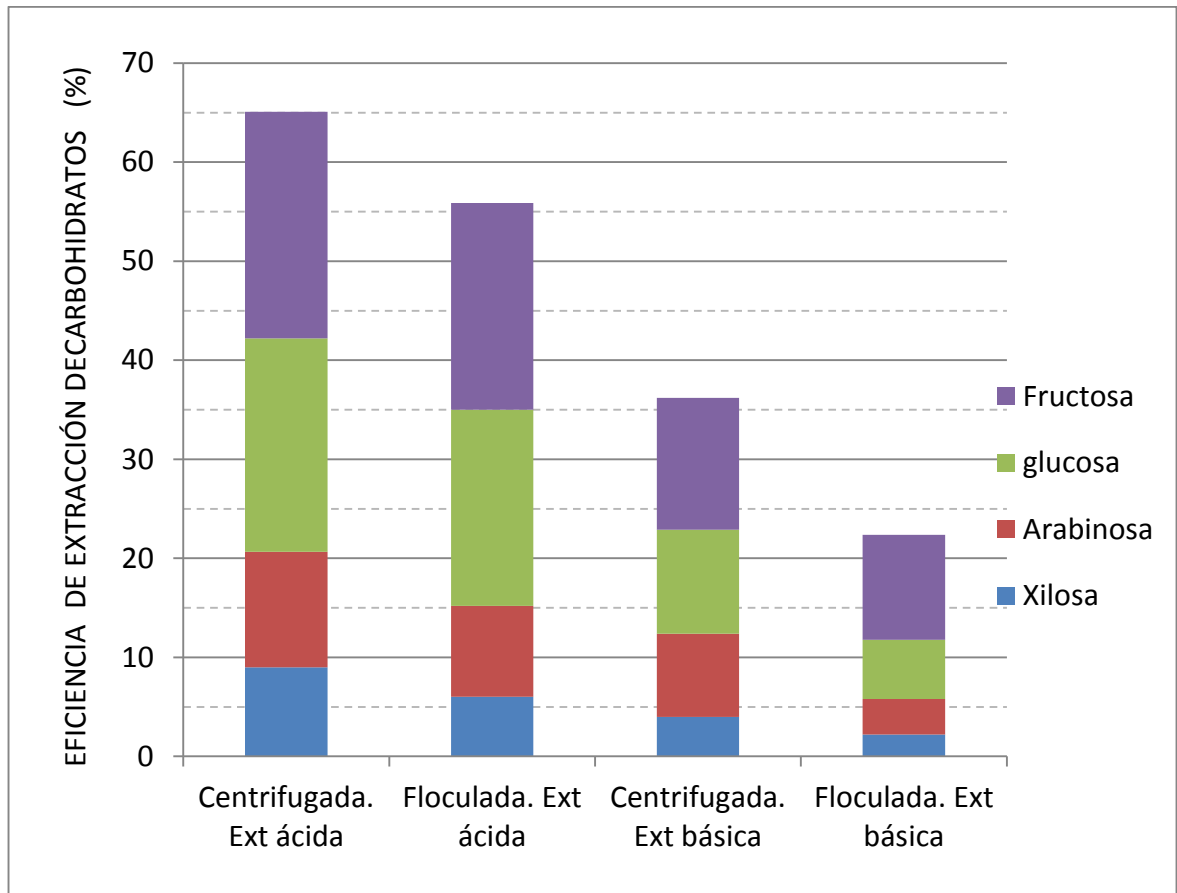
Adicionalmente, en la Figura 8 se encuentra que la eficiencia de extracción de lípidos es 3 % inferior en biomasa floculada para *Chlorella Vulgaris* y 3,6 % para *Nannochloropsis sp.* Cabe decir, que al igual que sucede con en la extracción básica, la eficiencia de extracción de lípidos no disminuye en más del 5 % al comparar la biomasa centrifugada con la floculada.

Por último, vale la pena señalar que en este trabajo no se utilizó biomasa húmeda puesto que la eficiencia de extracción de lípidos se ve seriamente afectada por la presencia de una sustancia polar como el agua. Lo anterior se basó en el estudio realizado por Tys, et al (2014), en el cual, al utilizar biomasa húmeda y hexano como solvente extractor de lípidos, las eficiencias de extracción de lípidos son inferiores al 10%.

### **2.3 COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS**

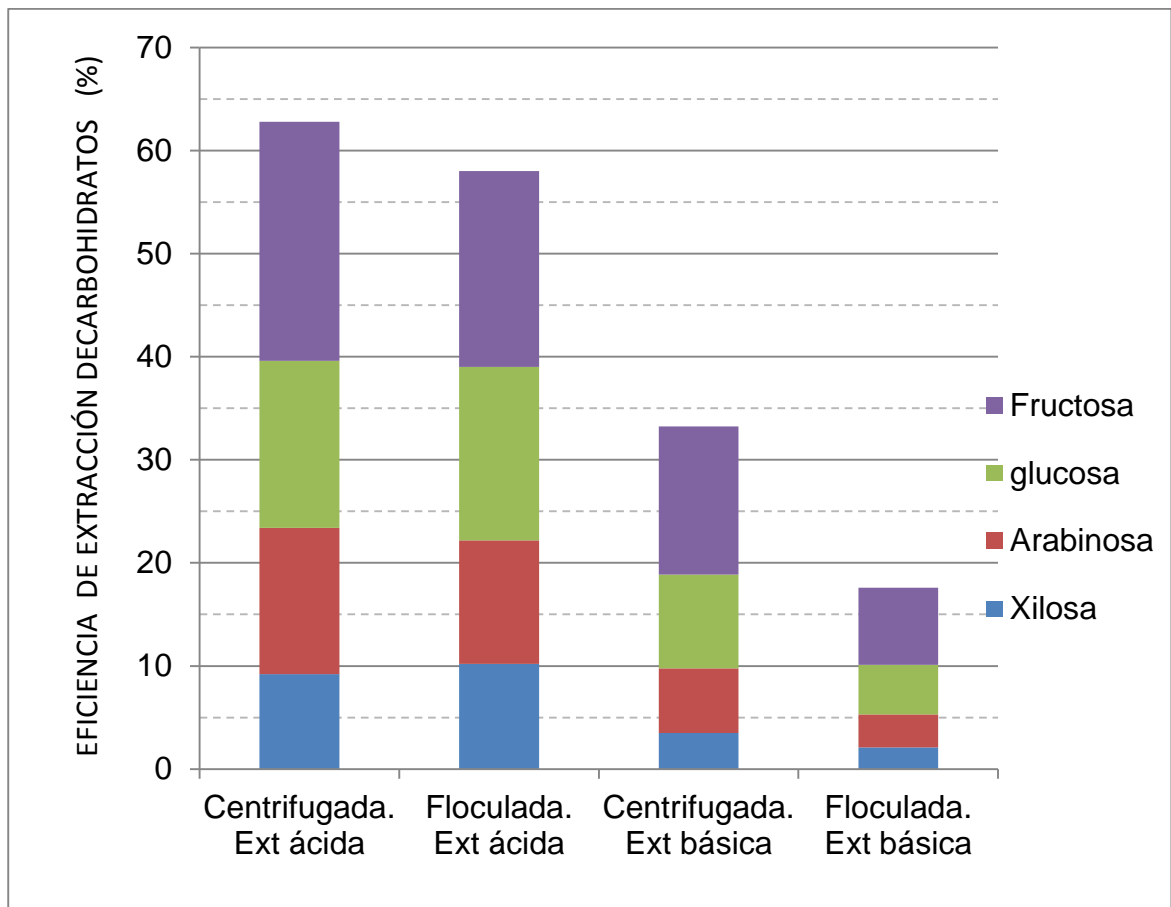
Las eficiencias de extracción de carbohidratos para cada uno de los monosacáridos cuantificados en *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* mediante los tratamientos ácido y básico se muestran en las Figuras 9 y 10.

**Figura 9.** Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos. *Chlorella vulgaris*



Como se observa en la Figura 9 los monosacáridos con mayor presencia en *Chlorella vulgaris* floculada y centrifugada son la fructosa y la glucosa, alcanzando aproximadamente un 70% del total de carbohidratos extraídos en los tratamientos ácido y básico. Cabe resaltar que la distribución de carbohidratos es la misma en biomasa floculada y en biomasa centrifugada, independiente del tipo de tratamiento utilizado (ácido y básico).

**Figura 10.** Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos. *Nannochloropsis* sp



En el caso de *Nannochloropsis*, la Figura 10 muestra que los monosacáridos con mayor presencia en *Nannochloropsis* floculada y centrifugada son la fructosa y la glucosa, alcanzando aproximadamente un 70% del total de carbohidratos extraídos en los tratamientos ácido y básico. Cabe resaltar que la distribución de carbohidratos es la misma en biomasa floculada y en biomasa centrifugada, independiente del tipo de tratamiento utilizado (ácido y básico). Además, la distribución de monosacáridos es independiente del valor de la eficiencia obtenida.

Estos resultados deben contrastarse con los obtenidos por Prasertsan, et al (2015), en donde al medir la concentración de monosacáridos en *Chlorella sp* floclada con Sulfato de aluminio y Potasio hidratado  $[Al_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O]$ , se encontró que el principal monosacárido obtenido es la glucosa. Además, en estudios realizados por Synytsya, et al (2013), utilizando *Dunaliella salina* floclada con poliacrilamida, se encontró que la distribución de monosacaridos fueron Xilosa y Glucosa. Se encuentra que si bien en las dos cepas estudiadas la distribución de monosacáridos no varió, al observar lo que reportan otros autores se recomiendan las cepas *Nannochloropsis sp* y *Chlorella vulgaris* la utilización de el monosacárido Glucosa en procesos de aprovechamiento energético.

### 3. CONCLUSIONES

Las eficiencias de extracción de carbohidratos obtenidas mediante tratamiento básico, disminuyen en 21% al comparar *Chlorella vulgaris* centrifugada y floculada, mientras que en el caso de *Nannochloropsis* la eficiencia de extracción de carbohidratos disminuye en 15%.

En los dos tipos de microalgas, las eficiencias de extracción de carbohidratos obtenidas mediante tratamiento ácido, presentan una disminución inferior a 10% comparando la biomasa centrifugada respecto a la Floculada.

En los dos tipos de microalgas, las eficiencias de extracción de proteínas obtenidas mediante tratamiento básico, presentan una disminución inferior a 22% comparando la biomasa centrifugada respecto a la Floculada.

Los resultados para *Nannochloropsis* y *Chlorella vulgaris* comprueban que el floculante cloruro de aluminio no disminuye considerablemente la eficiencia de extracción de lípidos en condiciones de extracción básica y ácida debido a que la eficiencia de extracción no disminuye más del 5% respecto de la biomasa centrifugada

En ambos tipos de microalga estudiados, los monosacáridos extraídos mediante los tratamientos ácido y básico son la fructosa y la Glucosa, los cuales corresponden al 70% del total de carbohidratos extraídos

La hidrólisis ácida presenta mejores eficiencias de extracción de carbohidratos y lípidos, tanto en biomasa floculada como en biomasa centrifugada.

#### **4. RECOMENDACIONES**

Realizar un estudio del efecto de la floculación en biomasa cultivada bajo limitación de Nitrógeno para determinar la influencia del solvente hexano en la extracción de lípidos neutrales.

## REFERENCIAS

- [1] Beach E., Foley P. M., Zimmermana J.B. (2011). Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. *Green Chemistry*, 1399-1405.
- [2] Sivaloganathan, B., Obbard, J-P., Doan, T-T-Y. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass & Bioenergy*, 35, 2534-2544.
- [3] Sanchez, E., Ojeda, K., Kafarov V., El-Halwagi M., (2011). Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pinch analysis of heat integration. *Chemical Engineering Journal*, 211-216.
- [4] Huang G., et al. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 38-46
- [5] Zebiba, B., Vaca-Garcia, C., Ursu, A-V., Safi, C., Pontalier, P., Merah, O., y Laroche, C. (2013). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. . *Algal research*, 1-5
- [6] Zittelli, G-C., Tredici, M-R., Rodolfi, L., Padovani, G., Bonini, G., Biondi, N., y Niccoló, B. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- [7] Zhu, L. (2015). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1376-1384.

- [8]** Wijffels, R-H., y Barbosa, M-J. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, 239, 796-799.
- [9]** Shields, R-J., Lovitt, R-W., Laurens, L-M-L., Greenwell, H-C., y Flynn, K-J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society*, 703-726.
- [10]** Lam, M-K., y Lee, K-T. (2012). Microalgae biofuels: a critical review of tissues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 673-690.
- [11]** Chisti, Y. (2007). Research review paper: Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 294-306.
- [12]** Young, G., Nagle, N., y Cooney, M. (2009). Extraction of bio-oils from microalgae. *Separation and Purification Reviews*, 38, 291–325.
- [13]** Martins, A-A., Mata, T-M., y Caetano, N-S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- [14]** Thomsen, L., Rwehumbiza, V-M., y Harrison, R. (2012). Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. *Chemical Engineering Journal*, 168-175.
- [15]** Molina Grima, E., Granados, M-R., Gómez, c., Fernández-Sevilla, J-M., y Acien, F-G. (2012). Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102-110.

- [16] Yusoff, F-M., Shariff, M., Harith, Z-T., Din, M., y Ariff, A-B. (2009). Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. . *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5971-5978.
- [17] Ramírez, J., Quiroga, M-F., Pereira, A-C., Leets, I., y García-Casal, M-N. (2009). Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 101, 79–85.
- [18] Knuckey, R.M., 1998. Australian microalgae and microalgal concentrates for use as aquaculture feeds. Ph.D. Thesis. University of Tasmania, 254.
- [19] Robles, M., Molina Grima, E., Fernandes, F., Christi, Y. y Belarbi, E-H. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491 – 515.
- [20] Poelman, E., Jeurissen, B y De Pauw, N. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. (1997). *Resources, Conservation and Recycling*, 19, 1-10.
- [21] Vandanjon, L., Quéme'neur, F., Rossingol, N., y Jaouen, P. ( 1999). Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquacultural Engineering*, 20, 191–208.
- [22] Uduman, N., Hoadley, A-F-A., Danquah M-K., y Bourniquel,V. (2011). A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodieselproduction. *Chemical Engineering Journal*, 174, 249-257.

- [23]** N-Villarreyes, M., Montes D'Oca, M-G., Borges, L. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass & Bioenergy*, 35, 4449-4454.
- [24]** Davis, R-T. (2011). Characterizing microalgae (*Nannochloris oculata*) harvesting by aluminum flocculation. Master of science thesis. Texas A&M University.
- [25]** Yoon, J-H., Yoon, B-D., Park, M-H., Oh, H-M., Lee, S., Kim, H-S., Kim, Kwon, G-S. (2001). Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnology Letters*, 23, 1229–1234.
- [26]** Robert, R., Knuckey, R-M., Frampton, D-M-F., y Brown, M-R. (2006) Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds, *Aquacultural Engineering*. 35, 300–313.
- [27]** Vandamme, D., Koenraad, M., y Foubert, I. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31(4). 233-239.
- [28]** Sukenik, A., Shelef, G., y Bilanovic, D. (1988). Flocculation of microalgae with cationic polymers – effects of medium salinity, *Biomass* 17, 65–76.
- [29]** Bratby, J. (2006) *Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment*, IWA Publishing, 1-450.
- [30]** Ying, Q., Uduman, N., Michael, K., Hoadley, A., y Gareth M-F. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 1-15.

- [31]** Show, K-Y., Lee, D-J., y Chang, J-S. (2013) Algal biomass dehydration. *Bioresource Technology*, 135, 720-729.
- [32]** Zhang, x., Sommerfeld, M., Hu, Q., Hewson, J-C., y Amendola, P. (2012). Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, 116, 477-484.
- [33]** Zhao, X-Q., Wan, c., Guo, S-L., y Bai, F-W. (2012). Asraful Alam, M-D. Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. *Bioresource Technology*, 1-6.
- [34]** Wu, J-C., Talukder, M-R., Das, P. (2012). Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 109– 113.
- [35]** Otero, A., Maseda, A., Fábregas, J., Domínguez, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 31-35.
- [36]** Kafarov V, Sarmiento R, Amaya A, González A. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas empleando disrupción celular térmica y química. *Memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química*; 2010 Sep. 27-Oct 01; Cartagena, Colombia, p.100.
- [37]** Melao, M-G., Lombardi, A-T., y Chia, M-A. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 85(4), 1427-1438.

- [38]** Zurinah, W, et al. (2011). Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(62), 13536-13542.
- [39]** Gomes-Aranda, D-A., da Silva-Gorgônio<sup>1</sup>, C-M., y Couri, S. (2013). Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. *Natural Science*, 5(7), 783-791.
- [40]** Zakaria, N-H, et al. (2014). Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95,11-18.
- [41]** Harun, R., y Danquah, M-K. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46, 304-309.
- [42]** BRADFORD M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 243-254.
- [43]** Sialvea, B., Bernard, O., y Berneta, N. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409-416.
- [44]** Poonsuk, P., Mankid, Y-I., Cherislip, B., y Boonsawang, P. (2015). Optimization of Flocculation Efficiency of Lipid-rich Marine *Chlorella* sp. Biomass and Evaluation of Its Composition in Different Cultivation Modes. *Bioresource Technology*.

**[45]** Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. Dinglers Polytechnisches Journal, 232, 461-465.

**[46]** Harwood J-L., y Guschina I-A. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Progress in Lipid Research, 45(2), 160-186.

**[47]** Romero-Ogawa, A., et al. (2014). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microbial Biotechnology, 1-20.

**[48]**. Van Wagenen, J., Miller, T-W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., y Huesemann, M. (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in nanochloropsis salina. Energies, 5, 731–740.

**[49]** Bravo-Carvajal, F-A. (2014). Efecto de la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo en la obtención de carbohidratos, proteínas, clorofilas y lípidos a partir de cultivos autotróficos de chlorella vulgaris UTEX 1803 (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

**[50]** Wijffels, R-H., Draaisma, R-B., Martens, D-E., Lamers, P-P., y Breuer, G. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. Bioresource Technology ,124, 217– 226.

## BIBLIOGRAFÍA

Bellou, S., y Aggelis, G. (2012). Biochemical activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. *Journal of Biotechnology*, 164, 318-329.

Davis, R. (2011). Characterizing microalgae (*nannochloris oculata*) harvesting by aluminum flocculation (Tesis de maestría). Texas A&M University, Texas, Estados Unidos.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N-J., N.J., Fair, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.*, 193, 265-275.

Marmolejo-Chaparro, C-C., y Gutiérrez-Lozano, D-A. (2013). Diseño de un sistema de dos etapas para la extracción de proteínas de microalgas (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

N-Villarreyes, M., Montes D'Oca, M-G., Borges, L. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass & Bioenergy*, 35, 4449-4454.

Ortegón, M-A., y Mena, N-O. (2014). Efecto de la floculación en la extracción de lípidos en biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis* sp. Grupo de Investigación CIDES (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Prasertsan, P., et al. (2015). Optimization of flocculation efficiency of lipid-rich marine *Chlorella* sp. biomass and evaluation of its composition in different cultivation modes. *Bioresource Technology*, 182,89-97.

Reyes-Gómez, O-J., y Ayala-Torres, E-G. (2014). Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *chlorella vulgaris* UTEX 1803 (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Robert, R., Knuckey, R-M., Frampton, D-M-F., y Brown, M-R. (2006) Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds, *Aquacultural Engineering*. 35, 300–313.

Synytsya, A., Seong, Park, Y-I., D-H., Park, J-K., Lee, C-G., Goo, B-G., y Baek, G. (2013). Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 129, 343–350.

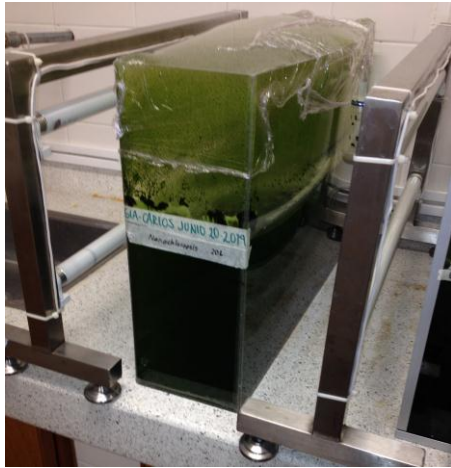
Tys, J., Piasecka, A., y Krzeminska, I. (2014). Physical methods of microalgal biomass pretreatment. *International Agrophysics*, 28, 321-348.

Vandamme, D., Koenraad, M., y Foubert, I. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31(4). 233-239.

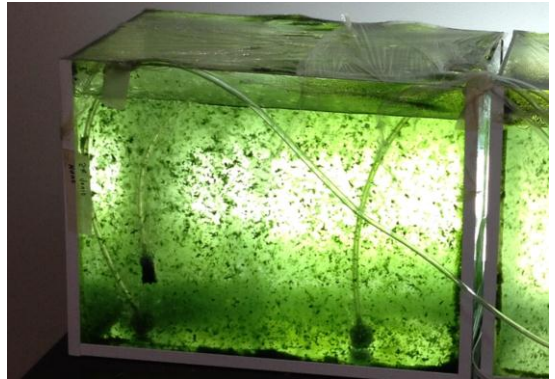
## ANEXOS

### ANEXO A. Algunas imágenes de la etapa experimental.

A) Cultivo de *Chlorella vulgaris*



B) Cultivo de *Nannochloropsis* sp.



C) Montaje soxhlet



D) *Nannochloropsis* floculada seca



E) *Chlorella vulgaris* centrifugada



F) Licor para prueba de carbohidratos y proteínas



G) Columnas para medición de carbohidratos



H) Medición de carbohidratos

