

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA EFICIENCIA DE
EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA BIOMASA DE MICROALGAS
CHLORELLA VULGARIS MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA**

**NÉSTOR RAFAEL ATENCIA RAMÍREZ
JAIME ISRAEL SERRANO GARCÍA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA EFICIENCIA DE
EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA BIOMASA DE MICROALGAS
CHLORELLA VULGARIS MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA**

**NÉSTOR RAFAEL ATENCIA RAMÍREZ
JAIME ISRAEL SERRANO GARCÍA**

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

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

**Codirectora
PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	15
1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
1.2. METODOLOGÍA DE LOS EXPERIMENTOS.....	16
1.2.1. Cultivo.....	16
1.2.2. Pretratamiento de la Muestra.....	18
1.2.3. Hidrólisis Ácida.....	18
1.2.4. Cuantificación de Carbohidratos.....	18
1.2.5. Extracción de Lípidos.....	19
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
2.1. EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS	20
2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	23
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS	24
2.4. COMPARACIÓN CON PRUEBA SIN PRETRATAMIENTO TÉRMICO	26
2.5. COMPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA CON OTROS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	27
3. CONCLUSIONES	29
4. RECOMENDACIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño de experimentos del pretratamiento térmico	16
Tabla 2. Composición del medio Bold Basal.....	17
Tabla 3. Eficiencias de extracción de carbohidratos	20

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodología experimental.....	15
Figura 2. Eficiencia de Extracción de Carbohidratos	21
Figura 3. Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos	22
Figura 4. Eficiencia de extracción de lípidos con diferentes métodos.....	23
Figura 5. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos	24
Figura 6. Diagrama de Pareto para la extracción de carbohidratos	25
Figura 7. Eficiencia de extracción de carbohidratos sin pretratamiento térmico vs extracción de carbohidratos con pretratamiento térmico	26
Figura 8. Comparación de la eficiencia de extracción de carbohidratos por diferentes métodos	27

RESUMEN

TITULO: EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA BIOMASA DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA*

AUTORES: NÉSTOR RAFAEL ATENCIA RAMÍREZ, JAIME ISRAEL SERRANO GARCÍA**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, carbohidratos, pretratamiento térmico, biomasa, metabolitos, extracción.

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos capaces de acumular metabolitos de gran interés para las industrias de producción y la biotecnología. Sin embargo, la extracción de los metabolitos requiere de un alto consumo de energía, por lo cual se busca desarrollar alternativas más eficientes y económicas que permitan el uso de la biomasa de microalgas a nivel industrial. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del pretratamiento térmico sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* mediante hidrólisis con ácido clorhídrico. Para lo cual se realizaron nueve (9) pruebas a diferentes condiciones de temperatura-tiempo de acuerdo al diseño experimental de composición central 2² obtenido mediante el software Statística 7.0.

Se encontró que la biomasa pretratada a 75°C durante 9.5 horas obtiene la mejor eficiencia de extracción de carbohidratos del 67%. Usando un sistema Soxhlet con hexano como solvente se midieron los lípidos, como un subproducto de alto valor, solo a esta misma biomasa pretratada a 75°C-9.5h, obteniéndose una eficiencia de extracción de lípidos del 44%.

Mediante un análisis estadístico en el software Statística 7.0, se observó que las variables temperatura y tiempo del pretratamiento térmico no son significativas en la extracción de carbohidratos de la biomasa de microalgas. De este modo, se realizó una prueba utilizando biomasa de *C. vulgaris* sin pretratamiento térmico (solamente concentrada), donde se alcanzó una eficiencia de extracción de carbohidratos del 65%; similar a las mejores obtenidas con pretratamiento térmico.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirectora: Ingeniera Química Paola Andrea Sanguino Barajas.

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF THERMAL PRETREATMENT ON THE EFFICIENCY OF EXTRACTION OF CARBOHYDRATES IN BIOMASS OF MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS BY ACID HYDROLYSIS *

AUTHORS: NÉSTOR RAFAEL ATENCIA RAMÍREZ, JAIME ISRAEL SERRANO GARCÍA**

KEYWORDS: Microalgae, carbohydrates, thermal pre-treatment, biomass, metabolites, extraction.

Microalgae are unicellular photosynthetic microorganisms capable of accumulating metabolites of great interest to industries of production and biotechnology. However, extraction of metabolites requires high energy consumption, so it needs to develop efficient and cheaper alternatives to the use of microalgae biomass in industry. The aim objective of this study is to evaluate the effect of thermal pretreatment on the extraction efficiency of carbohydrates in biomass of microalgae *Chlorella vulgaris* by hydrolysis with hydrochloric acid. For which nine (9) tests were performed at different temperature-time conditions according to the experimental design of core composition 2² obtained by the Statistica 7.0 software.

Found that pretreated biomass at 75°C for 9.5 hours produces the best extraction efficiency of 67% carbohydrate. Using a Soxhlet system with hexane as a solvent the lipids were measured, as a high value by-product, only to this same pretreated biomass at 75°C-9.5h, giving a lipid extraction efficiency of 44%.

By statistical analysis on the Statistica 7.0 software, it was observed that the variables temperature and time of thermal pretreatment are not significant in the carbohydrates extraction from microalgal biomass. Thus, a test was performed using *C. vulgaris* biomass without thermal pretreatment (only concentrated), where was obtained a carbohydrate removal efficiency of 65%; similar to the best ones obtained with thermal pretreatment.

* Graduation project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Chemical Engineer Paola Andrea Sanguino Barajas.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología de microalgas es una alternativa económicamente viable (Munir *et al.*, 2013) que se encuentra actualmente en desarrollo (Chen *et al.*, 2013). Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que pueden ser cultivadas utilizando CO₂ y luz como fuentes de carbono y energía, respectivamente (Chen *et al.*, 2011). Estos microorganismos representan una de las fuentes más prometedoras de nuevos productos y aplicaciones debido a su enorme biodiversidad y a la evolución reciente de la ingeniería genética y metabólica (Harun *et al.*, 2010). De esta forma, la biomasa de microalgas puede ser utilizada como materia prima en la elaboración de productos con alto valor agregado y en aplicaciones industriales (Hadj-Romdhane *et al.*, 2012), como alimentos para animales, productos farmacéuticos, cosméticos y suplementos para la salud (Das *et al.*, 2011), el tratamiento de aguas residuales, la fijación de CO₂ industrial y la producción de biocombustibles (Brennan y Owende, 2010), entre otros.

Además, las microalgas producen diferentes metabolitos (carbohidratos, lípidos y proteínas), cuyo contenido depende de factores como el tipo de cepa, las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes requeridos para su crecimiento (Mata *et al.*, 2010). Los carbohidratos en las microalgas provienen principalmente del almidón en los cloroplastos y de la celulosa/polisacáridos en las paredes celulares (Domozych *et al.*, 2012). Los carbohidratos presentes en las microalgas en forma de almidón y de celulosa (con ausencia de lignina), se convierten más fácil en monosacáridos que otros materiales lignocelulósicos (Ho *et al.*, 2012).

Las microalgas del género *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, y *Tetraselmis* han demostrado acumular una gran cantidad de carbohidratos,

mayor al 40% del peso seco (John *et al.*, 2011), particularmente la especie *Chlorella vulgaris* puede contener carbohidratos entre 37-55% de su peso seco (Dragone *et al.*, 2011).

Entre los métodos aplicados para obtener azúcares fermentables a partir de la biomasa de microalgas se tienen, la hidrólisis enzimática, la hidrólisis alcalina y la hidrólisis ácida (Van de Vyver *et al.*, 2010). La hidrólisis enzimática implica el uso de enzimas específicas para este propósito como las celulasas y xilanasas (Harun *et al.*, 2011). Esta es una alternativa limpia ya que no se generan compuestos tóxicos o subproductos que pueden afectar el proceso fermentativo de la biomasa y se lleva a cabo en condiciones de pH neutro y temperaturas moderadas (Cara *et al.*, 2007). Sin embargo la hidrólisis enzimática resulta ser muy lenta y tener un alto costo de producción y recuperación (Lynd *et al.*, 2002). La hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como la lignina (Sun & Cheng, 2002). Las bases comúnmente usadas en este proceso son la cal y la soda cáustica, sustancias químicas industriales que llevan un mínimo de toxicidad en las concentraciones aplicadas (Chen *et al.*, 2013). Los métodos químicos (hidrólisis alcalina/ácida) son fáciles, rápidos y de bajo costo, generalmente requieren altas temperaturas, lo que ocasiona la degradación de la biomasa lignocelulósica en productos inhibitorios del proceso de fermentación (Mussatto *et al.*, 2010). La hidrólisis ácida es un método muy efectivo en la sacarificación de celulosa de materiales lignocelulósicos con reacciones rápidas y en condiciones de altas temperaturas (Chen *et al.*, 2013). Las variables comúnmente estudiadas en este tipo de hidrólisis son la temperatura, la concentración del ácido y la relación biomasa/solvente (Ballesteros *et al.*, 2008). Los ácidos más usados en esta clase de procesos son H_2SO_4 , HCl y HNO_3 entre 1-5% (Sun & Cheng, 2005).

Estos métodos hasta ahora desarrollados presentan limitaciones debido principalmente a la dificultad de extraer algunas moléculas ligadas y/o inaccesibles

en la biomasa (Serive *et al.*, 2012). De este modo se busca desarrollar estrategias más efectivas y económicas para el proceso de producción de carbohidratos en la biomasa de microalgas (Chen *et al.*, 2013). Algunos investigadores observaron diferencias significativas en la composición bioquímica de algunas especies de microalgas, al realizar variaciones en la temperatura (Renaud *et al.*, 2002), mientras que otros señalaron que la temperatura es potencialmente capaz de cambiar la composición bioquímica de las microalgas (Chen *et al.*, 2013). Por lo tanto, la acumulación de carbohidratos en microalgas parece ser altamente dependiente de la temperatura.

Muchos autores estudian los efectos y la optimización de las variables que influyen en la eficiencia del proceso de pretratamiento de la biomasa y en la obtención de metabolitos a partir de microalgas. Ho *et al.* (2012), reporta la productividad de carbohidratos y el contenido de azúcares en *C. vulgaris* al tratarla en una hidrólisis con H₂SO₄ a diferentes temperaturas y tiempos. En el 2011, Harun *et al.*, investiga la productividad de glucosa en la *T. reesei*, mediante hidrólisis enzimática con celulasa, variando el pH, la temperatura y la cantidad de sustrato. Además, Nguyen *et al.* (2010), reporta el efecto de la temperatura en la extracción de azúcares de la biomasa de microalgas por medio de la hidrólisis ácida. Sin embargo, no se reportan estudios sobre el efecto de las variables temperatura y tiempo en un proceso de pretratamiento realizado antes de la hidrólisis aplicada a la biomasa de microalgas para la obtención de los metabolitos.

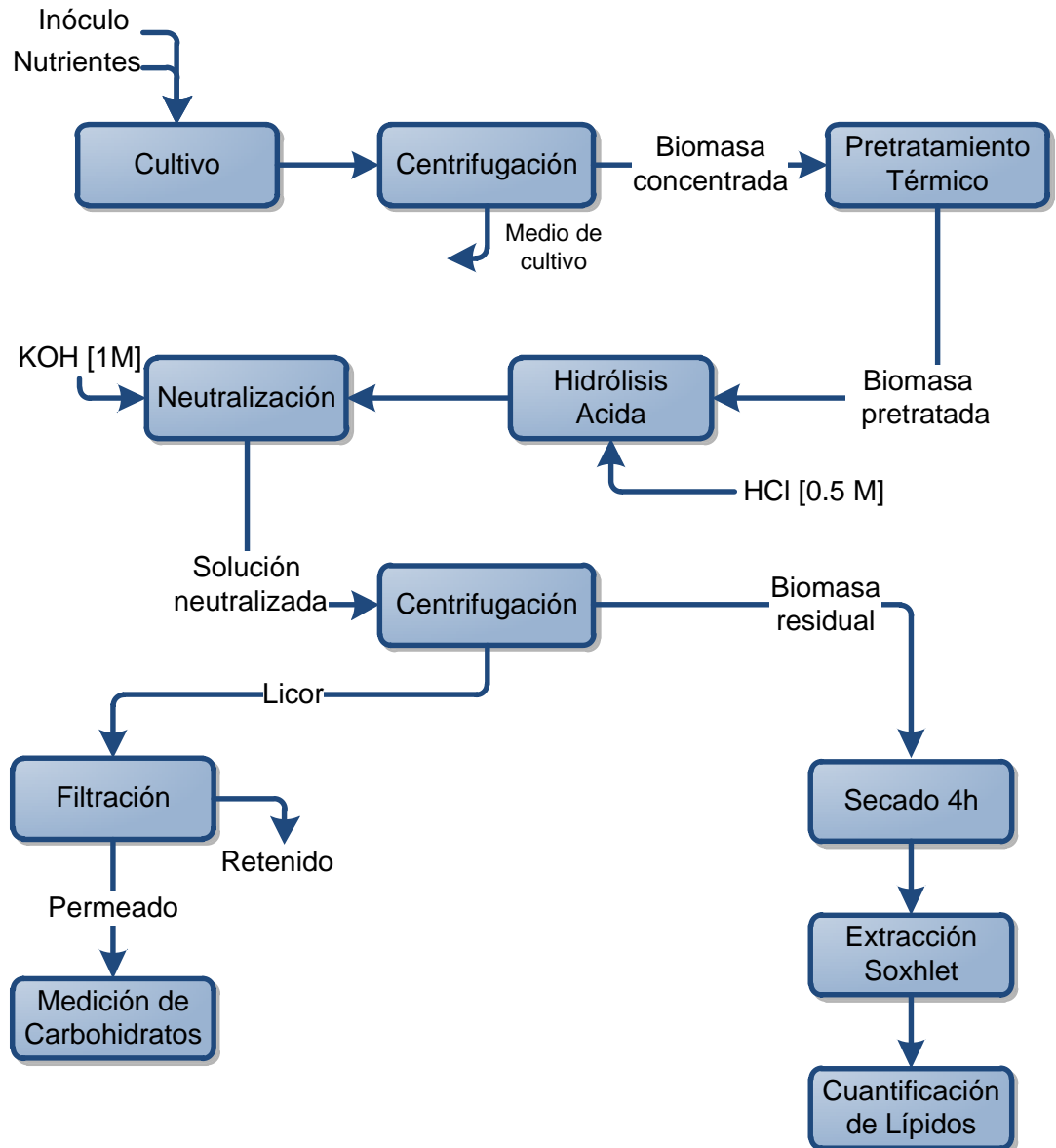
El presente trabajo evalúa el efecto del pretratamiento térmico de la biomasa (antes de la hidrólisis) sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos (cantidad de carbohidratos por gramo de biomasa) mediante hidrólisis ácida utilizando HCl 0.5M. Se realizaron 9 pruebas de acuerdo al diseño experimental de composición central 2² obtenido mediante el software Statistica 7.0. Se estudiaron las variables tiempo y temperatura de secado de la biomasa y se contrastaron los resultados con la eficiencia de extracción obtenida para una biomasa sin pretratamiento

térmico, con el fin de proponer una alternativa de extracción de carbohidratos de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* más eficiente y económica.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

El procedimiento realizado en este trabajo de investigación se resume en la figura 1 presentada a continuación.

Figura 1. Metodología experimental



1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño experimental de composición central 2² utilizando la herramienta STATISTICA 7.0, tomando como valor mínimo de temperatura 45°C y máximo de 105°C. El tiempo mínimo de secado 12 horas y máximo 24 horas. Se obtuvo como resultado nueve (9) experimentos con variación de tiempo y temperatura como se presenta en la tabla 1. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 1. Diseño de experimentos del pretratamiento térmico

Prueba	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	33	18
2	45	12
3	45	24
4	75	9.5
5	75	18
6	75	26.5
7	105	12
8	105	24
9	117	18

1.2. METODOLOGÍA DE LOS EXPERIMENTOS

1.2.1. Cultivo. *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue adquirida de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA). El cultivo se llevó a cabo en reactores rectangulares de vidrio con capacidad de 20 litros en los que se adicionaron 125 ml de inóculo por cada 875 ml de agua destilada y nutrientes para lograr un medio Bold Basal,

según Andersen *et al.*, (2005). La composición del medio Bold Basal se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio Bold Basal

Componente	Solution Stock (g/L H ₂ O)	Cantidad Usada (mL/L de medio)	Concentración en el Medio Final (M)
Macronutrientes			
NaNO ₃	25.00	10	2.94 X 10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10	1.70 X 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	10	3.04 X 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50	10	4.31 X 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50	10	1.29 X 10 ⁻³
NaCl	2.50	10	4.28 X 10 ⁻⁴
Solución Alcalina EDTA			
EDTA	50.00		1.71 X 10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53 X 10 ⁻⁴
Solución Acidificada de Hierro			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		1.79 X 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1	
Solución de Boro			
H ₃ BO ₃	11.42		1.85 X 10 ⁻⁴
Trazas de soluciones Metálicas			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07 X 10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28 X 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 X 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29 X 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68 X 10 ⁻⁶

Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo constante para homogenizar los nutrientes en el medio y se conservaron a condiciones de

temperatura ambiente, pH entre 7 - 8 y ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas durante 15 días.

1.2.2. Pretratamiento de la Muestra. Una vez concluido el tiempo de cultivo, la biomasa fue concentrada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos. De la centrifugación resultaron dos fases, la fase acuosa (medio de cultivo) se descartó y la fase sólida (biomasa concentrada) fue llevada a un horno para realizar el pretratamiento térmico de acuerdo al diseño de experimentos mostrado en la tabla 1. Al salir del horno la biomasa fue triturada para aumentar el área de contacto con la solución de HCl y se inició el proceso de hidrólisis inmediatamente para evitar cambios en la humedad de la misma.

1.2.3. Hidrólisis Ácida. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo adicionando 5 g de muestra de biomasa pretratada y 50 ml de ácido clorhídrico 0.5M mezclando continuamente en una placa de agitación magnética a 500 rpm durante 2 horas (Kafarov *et al.*, 2010). Una vez se terminó el tiempo de reacción se midió el pH de la mezcla obtenida y se neutralizó adicionando gradualmente una solución de KOH 1M. Posteriormente el licor obtenido se centrifugó durante 15 minutos a 3400 rpm. Se obtuvieron dos fases, la fase superior (licor rico en carbohidratos) se sometió a reacción para determinación de la concentración de carbohidratos y la fase sólida (biomasa residual) fue reservada para la posterior extracción de lípidos.

1.2.4. Cuantificación de Carbohidratos. El licor obtenido de la reacción de hidrólisis se filtró al vacío con papel de filtro de tamaño de poro de 1 μm , para retirar impurezas que pudieran afectar la medición. La medición de carbohidratos se realizó siguiendo el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.*, (1956). El método consiste en mezclar en un tubo de ensayo 1 ml de licor con 0.5 ml de fenol al 5% y 2.5 ml de ácido sulfúrico. Se agitó durante 30

segundos en un sistema vortex para homogenizar la solución. Posteriormente se determinó la concentración de los carbohidratos con 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 y comparando con las curvas de calibración previamente realizadas.

1.2.5. Extracción de Lípidos. La extracción de lípidos de la biomasa residual previamente secada en un horno a 105°C durante 4 horas, se llevó a cabo mediante un montaje Soxhlet usando como solvente 250 ml de hexano. La biomasa se depositó en un cartucho poroso y se introdujo en el montaje Soxhlet calentando el solvente a 70°C durante 16 horas. Luego la solución solvente-extracto se llevó a un roto-evaporador para retirar el hexano y pesar el extracto lipídico obtenido.

En el presente trabajo los metabolitos de mayor interés son los carbohidratos. Dado lo anterior, los lípidos fueron considerados como subproductos del aprovechamiento integral de la biomasa. En este sentido no fueron tenidos en cuenta para la elección del mejor tratamiento. Los datos teóricos del porcentaje en peso de estos metabolitos presentes en la biomasa seca, utilizados para los respectivos cálculos fueron tomados de una caracterización realizada por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander (UIS), a la misma especie de microalgas usada en este trabajo.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1. EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

El cálculo de la eficiencia de extracción de carbohidratos de cada experimento se realizó mediante la ecuación 1.

Ecuación 1.

$$EEC = \left(\frac{\text{Carbohidratos extraídos}}{\text{Carbohidratos iniciales}} \right) * 100 = \frac{[C_{ext}]}{[B_{pre}] * (1 - H) * C_{bio}} * 100$$

$[C_{ext}]$ = concentración de carbohidratos extraídos.

$[B_{pre}]$ = concentración de la biomasa inicial en la hidrolisis (peso de la biomasa inicial / volumen HCl adicionado).

H = fracción de humedad de la biomasa inicial.

C_{bio} = fracción de carbohidratos presentes en la biomasa seca inicial.

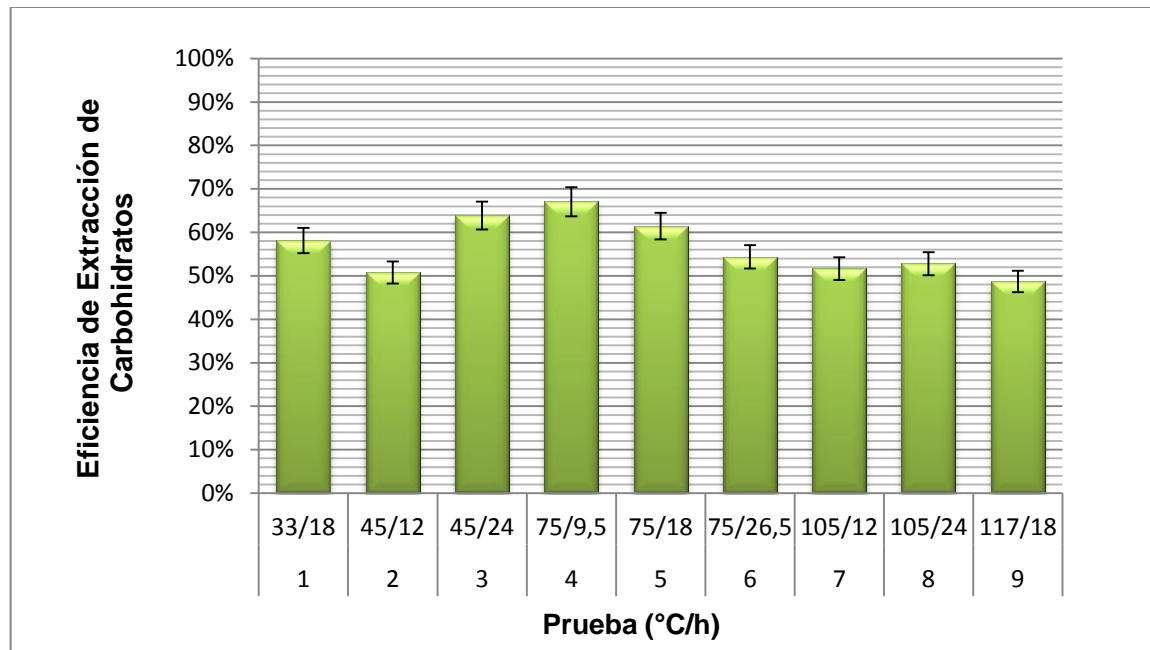
Las eficiencias de extracción obtenidas en cada experimento y los valores necesarios para calcularlas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Eficiencias de extracción de carbohidratos

Prueba	Pre-tratamiento (°C) / (h)	Biomasa inicial (g/L)	Humedad	Biomasa inicial peso seco (g/L)	Carbohidratos en la biomasa (% en peso en la biomasa seca)	Carbohidratos antes de la extracción (g/L)	Carbohidratos extraídos (g/L)	Eficiencia de extracción de carbohidratos
1	33/18	100	66.7%	33.30	35%	11.66	6.77	58%
2	45/12	100	20.7%	79.31	35%	27.76	14.10	51%
3	45/24	100	12.3%	87.70	35%	30.69	19.61	64%
4	75/9.5	100	10.6%	89.43	35%	31.30	20.98	67%
5	75/18	100	8.2%	91.79	35%	32.13	19.74	61%
6	75/26.5	100	6.6%	93.45	35%	32.71	17.78	54%
7	105/12	100	3.3%	96.67	35%	33.83	17.47	52%
8	105/24	100	0.2%	99.80	35%	34.93	18.44	53%
9	117/18	100	0.2%	99.80	35%	34.93	17.01	49%

Los resultados obtenidos para las eficiencias de extracción de carbohidratos de la biomasa *C. vulgaris* con cada uno de los pretratamientos térmicos realizados en este trabajo de acuerdo al diseño experimental mostrado en la tabla 1 se presentan en la figura 2.

Figura 2. Eficiencia de Extracción de Carbohidratos

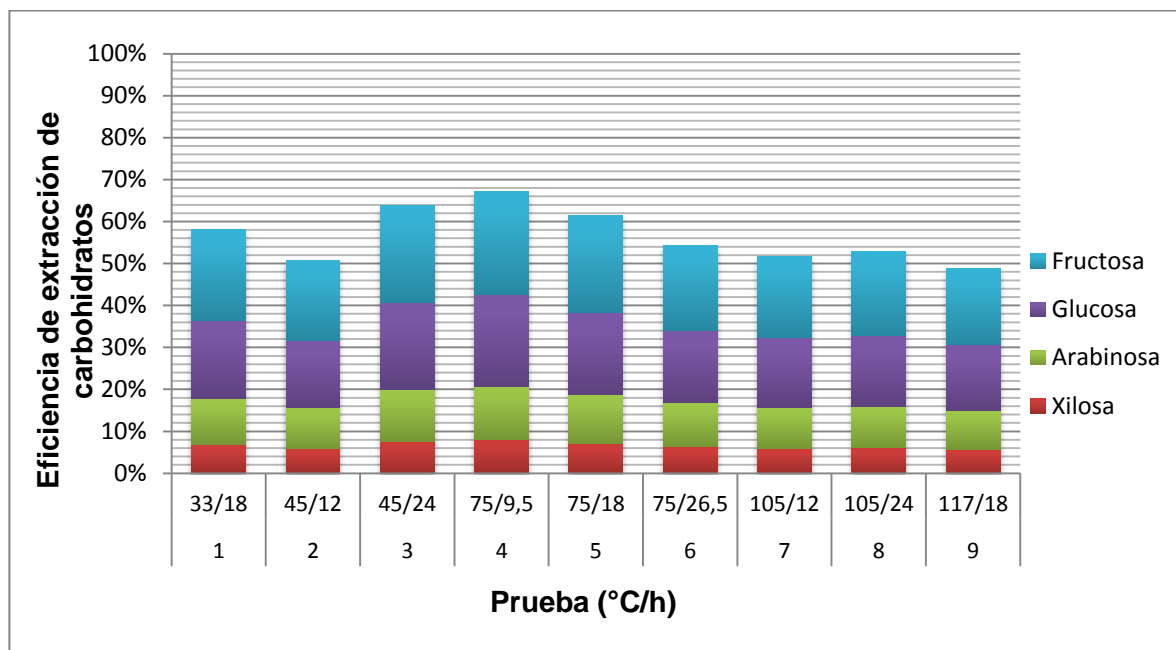


Como se observa en la figura 2 los mejores resultados se obtuvieron en las pruebas número 3, 4 y 5 con valores de eficiencias de extracción de carbohidratos de 64%, 67% y 61% respectivamente. También se observa que las eficiencias de extracción de carbohidratos disminuyen continuamente a partir de la prueba número 4. Vale la pena resaltar que en las pruebas número 1, 2 y 3 la biomasa no fue triturada debido al grado de humedad de las muestras (67%, 21% y 12% respectivamente), y que a partir de la prueba 4 las muestras tienen un grado de humedad menor al 11% lo que permite que la biomasa sea triturada. De este modo, se logra ver como las condiciones de temperatura y tiempo en el pretratamiento térmico tienen una influencia importante en la formación de los cristales de la biomasa. En este sentido, es posible que la temperatura afecte la

eficiencia de extracción de los carbohidratos de la biomasa, como lo reportan Renaud *et al.* (2002) y Chen *et al.* (2013) en sus trabajos. Mussatto *et al.*, (2010), confirman la degradación del material lignocelulósico por exceso de exposición al calor, descomponiendo parte de los carbohidratos presentes en la biomasa. Se observa además, en la figura 2 que la prueba número 1 con mayor grado de humedad presenta un valor de eficiencia de extracción de carbohidratos mayor al 50%, esto indica que es posible extraer una gran cantidad de metabolitos a partir de biomasa con alto contenido de humedad.

Las eficiencias de extracción de carbohidratos para cada uno de los monosacáridos cuantificados durante las diferentes pruebas realizadas en este trabajo se muestran en la figura 3.

Figura 3. Composición de monosacáridos en extracción de carbohidratos

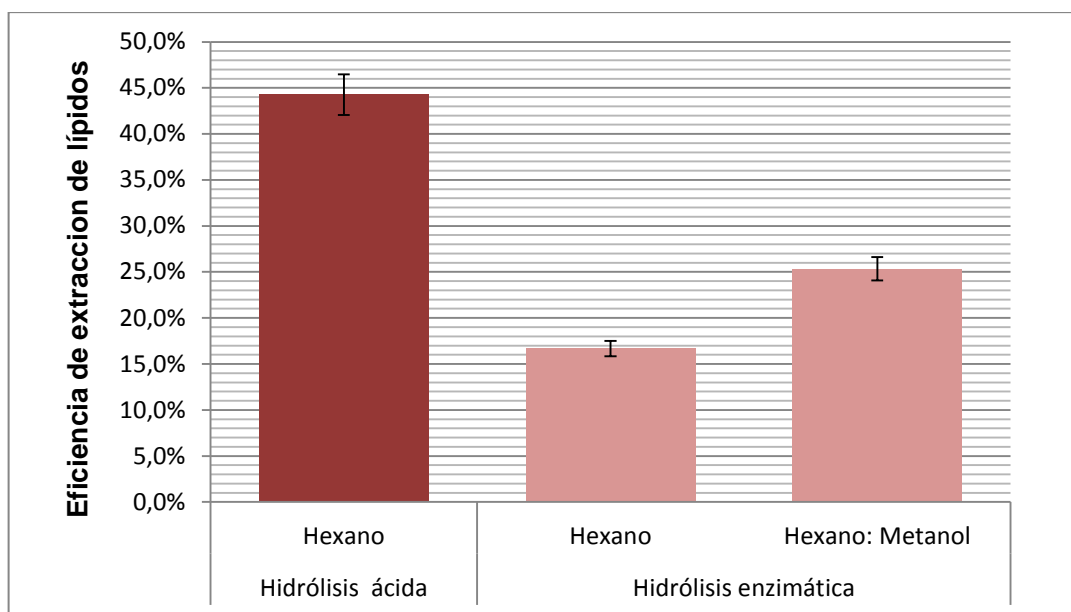


Como se observa en la figura 3 los monosacáridos con mayor presencia en la biomasa de microalgas *C. vulgaris* son la fructosa y la glucosa, alcanzando aproximadamente un 70% del total de los carbohidratos extraídos de la biomasa.

2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

La extracción de lípidos se realizó a la biomasa residual obtenida de la prueba número 4 (prueba en que se alcanzó la mayor eficiencia de extracción de carbohidratos). Se alcanzó una eficiencia de extracción de lípidos del 44% utilizando un sistema Soxhlet con hexano como solvente. Se realizó una comparación de la eficiencia de extracción de lípidos con los resultados reportados por Cho *et al.*, (2013). Los autores sometieron la biomasa a una hidrólisis enzimática y realizaron extracciones utilizando como solventes hexano y una mezcla hexano:metanol. La comparación realizada se presenta en la figura 4.

Figura 4. Eficiencia de extracción de lípidos con diferentes métodos

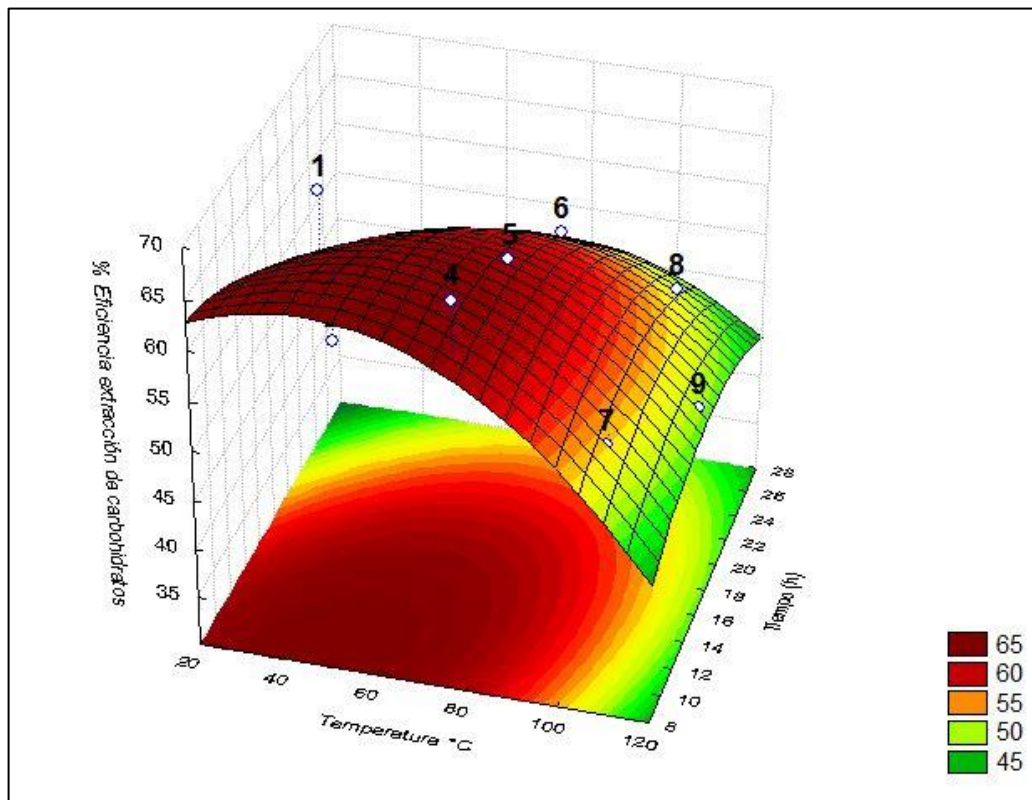


Como se observa en la figura 4 la eficiencia de extracción de lípidos alcanzada para la biomasa pretratada a 75°C durante 9.5 horas e hidrolizada con HCl es del 44%. Este es un resultado importante ya que supera claramente las eficiencias de extracción reportadas por Cho *et al.* (2013) usando *C. vulgaris* hidrolizada de forma enzimática.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas de acuerdo al diseño de experimentos, se analizaron estadísticamente utilizando el software Statistica 7.0. Se generó de esta manera la superficie de respuesta de la extracción de carbohidratos al variar las condiciones de temperatura y tiempo en el pretratamiento térmico de la biomasa de microalgas.

Figura 5. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos

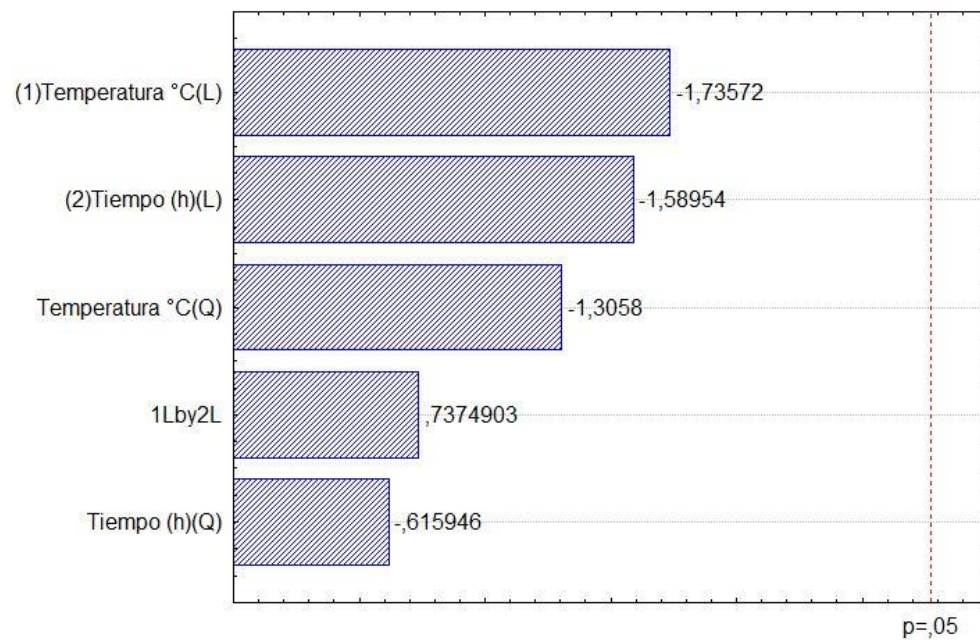


La figura 5 muestra la respuesta generada para la eficiencia de extracción de carbohidratos, por la combinación de los parámetros temperatura y tiempo del diseño experimental de pretratamiento térmico. Se puede apreciar que la extracción de carbohidratos alcanza una mayor eficiencia cuando la biomasa es

pretratada a temperaturas entre 40 y 80°C con periodos de tiempo de 8 a 18 horas.

Con el fin de medir la incidencia de las variables temperatura y tiempo sobre las eficiencias obtenidas en las pruebas realizadas de acuerdo al diseño experimental, se generó con ayuda del software Statistica 7.0 el diagrama de Pareto que se presenta en la figura 6. Determinando la influencia positiva o negativamente de dichas variables en el proceso de extracción de carbohidratos de la biomasa.

Figura 6. Diagrama de Pareto para la extracción de carbohidratos



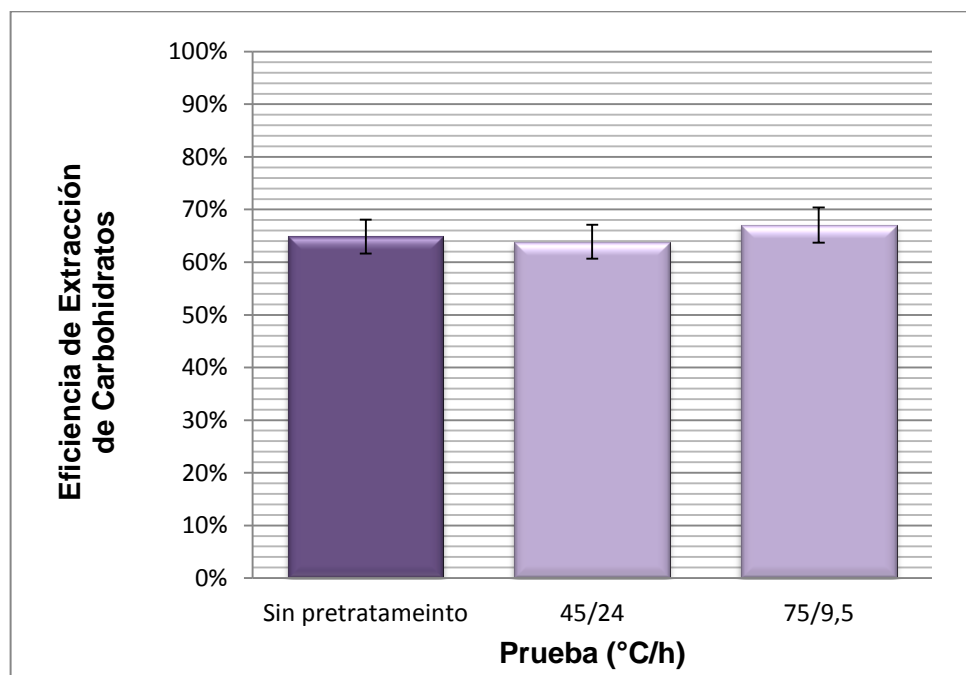
Como se observa en la figura 6 las variables temperatura y tiempo del pretratamiento térmico no son significativas en el proceso de extracción de carbohidratos de la biomasa de microalgas, ya que no sobrepasan el umbral (línea roja punteada). Esto indica que la eficiencia de extracción de carbohidratos de la biomasa de *C. vulgaris* no es altamente influenciada por las condiciones del pretratamiento térmico. Por lo anterior se determinó realizar una prueba de control

utilizando biomasa de *C. vulgaris* concentrada, sin pretratamiento térmico con un contenido de humedad cercano al 73%.

2.4. COMPARACIÓN CON PRUEBA SIN PRETRATAMIENTO TÉRMICO

La comparación de los resultados de la eficiencia de extracción de carbohidratos para las dos mejores pruebas del diseño experimental (tratamientos a 45°C-24h y 75°C-9.5h) versus la extracción de carbohidratos utilizando biomasa sin pretratamiento térmico se presenta en la figura 7.

Figura 7. Eficiencia de extracción de carbohidratos sin pretratamiento térmico vs extracción de carbohidratos con pretratamiento térmico



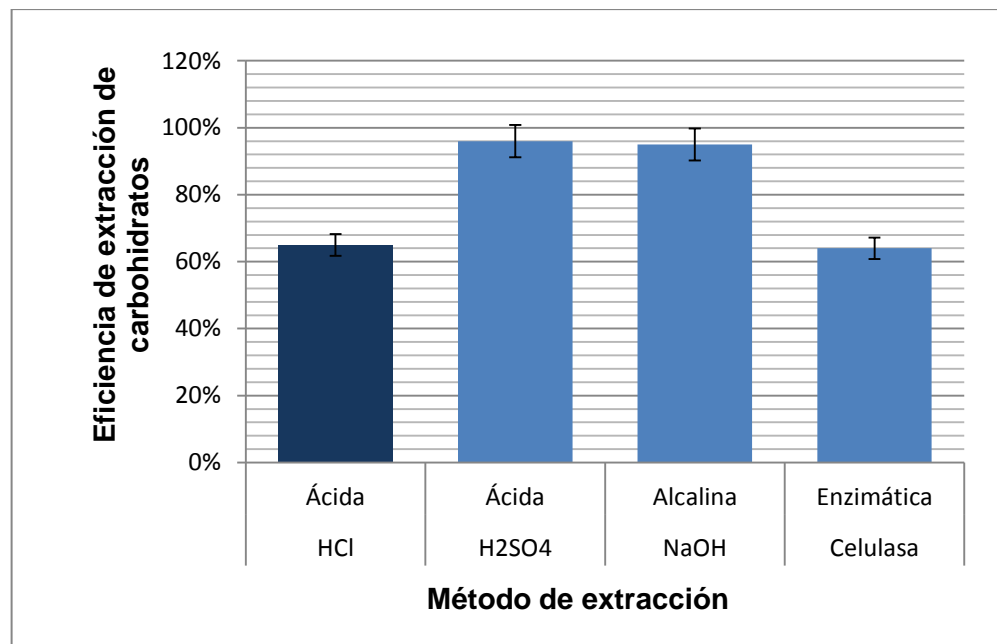
Como se observa en la figura 7 no hay una variación significativa entre los resultados obtenidos para la extracción de carbohidratos de la biomasa pretratada versus la biomasa con 73% de humedad. De esta forma se concluye que es

posible llevar a cabo la extracción de carbohidratos a un menor tiempo de procesamiento y bajos costos económicos, utilizando biomasa de microalgas húmeda. Adicionalmente se puede evitar la degradación de los metabolitos presentes como resultado de los procesos térmicos y mecánicos a los que se somete comúnmente la biomasa. Esto a su vez conduce a la disminución sustancial de los costos del pretratamiento.

2.5. COMPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA CON OTROS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La eficiencia de extracción de carbohidratos obtenida mediante hidrólisis ácida utilizando biomasa húmeda en comparación con los resultados presentados por otros autores usando diversos métodos se presenta en la figura 8.

Figura 8. Comparación de la eficiencia de extracción de carbohidratos por diferentes métodos



Como se observa en la figura 8 se logró alcanzar una eficiencia de extracción del 65% a partir de biomasa húmeda, utilizando HCl 0.5M a 25°C y una relación biomasa/solvente de 27.5 g/l durante 2 horas de reacción. Comparado con la extracción mediante H₂SO₄ en la cual se obtuvo una eficiencia de 96% con una relación solvente/biomasa de 10 g/l, concentración del ácido del 1% llevando a cabo la reacción en un autoclave a 121°C durante 20 minutos (Ho *et al.*, 2012). Por otra parte los resultados obtenidos para la hidrólisis con NaOH muestran eficiencias del 95% realizando dos extracciones a 55°C durante 20 minutos cada una, relación solvente/biomasa de 30 ml/g y concentración de la base de 3.7M (grupo de investigación CIDES). Mientras que la extracción enzimática presenta una eficiencia del 64% con una relación biomasa/solvente de 10 g/l, y 20 mg de celulasa, durante 5 horas de reacción a 40°C (Harun *et al.*, 2011). La eficiencia de extracción de carbohidratos obtenida en el presente estudio es cercana a los resultados reportados para la extracción enzimática y menor que las realizadas con H₂SO₄ y NaOH. Es importante resaltar que la hidrólisis ácida evaluada en este trabajo no requiere altos consumos de energía para la reacción, lo que representa una ventaja significativa en términos de costo frente a otros tratamientos con hidrólisis.

3. CONCLUSIONES

- La aplicación del pretratamiento térmico a la biomasa de *Chlorella vulgaris*, no es necesaria para el mejoramiento de la extracción de carbohidratos de las microalgas mediante hidrólisis ácida. Dado que la extracción sin pretratamiento térmico de la biomasa presenta una eficiencia similar a las mejores obtenidas con pretratamiento térmico.
- La mejor eficiencia de extracción de carbohidratos (67%) se obtuvo con biomasa pretratada a 75°C durante 9.5 horas con humedad del 11%, seguida por la prueba realizada con biomasa sin pretratamiento térmico con humedad del 73% que obtuvo una eficiencia de extracción del 65%. Esta diferencia en la eficiencia no justifica el gasto de energía para el secado de la biomasa.
- La eficiencia de extracción de lípidos en el presente trabajo fue satisfactoria comparada con los resultados exhibidos por Cho *et al.*, (2013) en su trabajo. De esta forma se consideran los lípidos extraídos de la biomasa residual como un subproducto de gran importancia para el aprovechamiento integral de la biomasa de microalgas.

4. RECOMENDACIONES

- Dada la alta eficiencia de extracción de metabolitos de la biomasa húmeda de microalgas, se recomienda estudiar la posibilidad de realizar la extracción directamente en el medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, p.437.

Ayala, E.G. & Reyes, O.J. (2014). Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Manzanares, P.; Negro, M.; Oliva, J.; Sáez, F. (2008). Dilute-Sulfuric acid pretreatment of Cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 84-91.

Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557–577.

Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M.J., Gonzalez, A., Ruiz, E. (2007). Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochem.*, 42, 1003–1009.

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology*, 102, 71–81.

Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1–10.

Cho, H.-S., Oh, Y.-K., Park, S.-C., Lee, J.-W., Park, J.-Y. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 54, 156-160.

Das, P., Aziz, S.S., Obbard, J.P. (2011). Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renewable Energy*, 36, 2524–2528.

Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T. (2012). The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers Plant Sci.*, 3, 82.

Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy*, 88, 3331–3335.

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.

Hadj-Romdhane, F., Jaouen, P., Pruvost, J., Grizeau, D., Van Vooren, G., Bourseau, P. (2012). Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture. *Bioresource Technology*, 123, 366–374.

Harun, R., Danquah, M.K. (2011). Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.*, 168, 1079–1084.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1037-1047.

Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 244–252.

Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.-S. (2012). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, Article in press, 1–8.

John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 102(1), 186–193.

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.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization. *Fundamentals and Biotechnol., Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.

Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.

Munir, N., Sharif, N., Naz, S., Saleem, F., Manzoor, F. (2013). Harvesting and processing of microalgae biomass fractions for biodiesel production (A review). *Sci., Tech. and Dev.*, 32 (3), 235-243.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M.,

Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J.A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, 28, 817–830.

Nguyen, T.-A.D., Kim, K.-R., Kim, M.S., Sim, S.J. (2010). Thermophilic hydrogen fermentation from Korean rice Straw by *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13392–13398.

Rattanaoltee, P., Kaewkannetra, P. (2014). Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixo trophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy xxx*, 1-5.

Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195–214.

Serive, B., Kaas, R., Berard, J.-B., Pasquet, V., Picot, L., Cadoret, J.-P. (2012). Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 124, 311–320.

Sun, Y., Cheng, J.Y. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11.

Sun, Y., Cheng, J.Y. (2005). Dilute acid pretreatment of rye Straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 96, 1599–1606.

Van de Vyver, S., Peng, L., Geboers, J., Schepers, H., de Clippel, F., Gommers, C.J., Goderis, B., Jacobs, P.A., Sels, B.F. (2010). Sulfonated silica/carbon nanocomposites as novel catalysts for hydrolysis of cellulose to glucose. *Green Chem.*, 12, 1560–1563.