

**SELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN SELECTIVA
DE METABOLITOS CON POTENCIAL DE VALOR A PARTIR DE BIOMASA DE
MICROALGAS**

PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**SELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN SELECTIVA
DE METABOLITOS CON POTENCIAL DE VALOR A PARTIR DE BIOMASA DE
MICROALGAS**

PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Magister en Ingeniería Química**

Director:

Ph. D. VIATCHESLAV KAFAROV

Codirector:

MSc. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

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

2016

RECONOCIMIENTO

La presente investigación se desarrolló en el marco del proyecto “Creación y fortalecimiento de una red de transferencia de conocimiento y tecnología entre Estados Unidos y Colombia mediante el desarrollo de procesos de biorefinería para la obtención de biocombustibles y productos de alto valor a partir de biomasa de microalgas”, bajo la dirección de Dr. Viatcheslav Kafarov¹. El proyecto fue financiado por Colciencias, a través del Programa de la Diáspora Científica de Alto Reconocimiento, gracias a la operación de crédito del Banco Mundial. Este Programa tiene como objetivo generar vínculos estratégicos entre la diáspora Colombiana (actores de desarrollo científico y tecnológico, a nivel mundial) e investigadores, innovadores residentes en Colombia, instituciones y proyectos de investigación.

¹ Director del Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES).

. RESUMEN

TÍTULO: SELECCIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN SELECTIVA DE METABOLITOS CON POTENCIAL DE VALOR A PARTIR DE BIOMASA DE MICROALGAS².

AUTOR: PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS³

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Extracción, Carbohidratos, Proteínas, Lípidos, Humedad, Temperatura, Solvente, Floculación.

DESCRIPCIÓN: Las dificultades en la obtención de biocombustibles y productos de alto valor a partir de microalgas, promueven el estudio de métodos eficientes y económicamente viables para la recuperación de los metabolitos. Dado este escenario, la presente investigación se fundamentó en la evaluación de métodos experimentales para la obtención de carbohidratos, proteínas y lípidos, mediante el estudio de las variables: concentración de solvente, temperatura del proceso, relación (biomasa/ solvente) y contenido de humedad de la biomasa, teniendo en cuenta el efecto de la floculación, sobre el porcentaje de recuperación de los metabolitos.

El estudio demostró que al utilizar biomasa sin pre-tratamiento térmico, con un contenido de humedad promedio de 73%, es posible recuperar 41,96% de los carbohidratos de *C. vulgaris*, mediante hidrólisis ácida (HCl 0,5M). El tratamiento alcalino (NaOH 3,67M, a 55 °C) evaluado, permitió recuperar el 71% de las proteínas y 49,77% de carbohidratos, a partir de *C. vulgaris* con un contenido de humedad promedio de (71%). Lo que representa una disminución del consumo energético de hasta 1,6 kilovatios por hora, a nivel de laboratorio.

Los resultados indicaron que utilizando 290,33 mg de biomasa y 5 ml de hexano a 42,5°C, es posible recuperar 18,22% de los lípidos en *C. vulgaris*, con un contenido de humedad de 74%. En el caso de *Nannochloropsis Sp*, al utilizar una relación (biomasa/hexano) de 64,40g/L a 60°C se recuperó el 42,19% del contenido de lípidos. Mediante la mezcla de metanol:cloroformo:agua (106:851:43 ml) y una relación (biomasa/solvente) de 5g/L, se recuperó 97% del extracto lipídico, a partir de *C. vulgaris* con un contenido de humedad de 71%.

Finalmente, el estudio señaló al utilizar biomasa de microalgas (*C. vulgaris* y *Nannochloropsis Sp*) deshidratada a 105°C por 17 horas, el floculante disminuye el porcentaje de recuperación de carbohidratos, proteínas y lípidos.

² Tesis de Maestría

³ Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Química. Director. Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirector. MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira.

ABSTRACT

TITLE: SELECTION OF A METHODOLOGY FOR THE SELECTIVE EXTRACTION OF METABOLITES WITH VALUE POTENTIAL FROM MICROALGAS BIOMASS⁴.

AUTHOR: PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS⁵

KEYWORDS: Microalgae, Extraction, Carbohydrates, Proteins, Lipids, moisture, Temperature, Solvent, Flocculation.

DESCRIPTION: difficulties in obtaining biofuels and high value products from microalgae proposes the study of efficient and economically viable methods for the recovery of metabolites. For that the present investigation was based on the evaluation of experimental methods to obtain carbohydrates, proteins and lipids, by studying the variables involved in these processes: solvent concentration, temperature, ratio (biomass / solvent) and moisture content. This study evaluated the effect of flocculation on the recovery (%) of metabolites.

The study showed that using biomass without pre-heat treatment, with an average moisture content of 73%, it is possible to recover 41.96% of *C. vulgaris* carbohydrates by acid hydrolysis (0.5M HCl). The alkaline treatment (NaOH 3.67 M at 55 ° C) allowed to recover 71% of the proteins and 49.77% of carbohydrates, from *C. vulgaris* with an average moisture content of (71%). It means a reduction in energy consumption of up to 1.6 kilowatts/hour at the laboratory level.

The results indicated that using 290.33 mg of biomass and 5 ml of hexane at 42.5 ° C, it is possible to recover 18.22% of the lipids in *C. vulgaris*, with a moisture content of 74%. In the case of *Nannochloropsis Sp*, when using a ratio (biomass / hexane) of 64.40g / L at 60 ° C, it was possible to recover 42.19% of the lipid content. By mixing methanol: chloroform: water (106: 851: 43 ml) and a ratio (biomass / solvent) of 5 g / L, it was possible to recover 97% of the lipid extract from *C. vulgaris* with a moisture content of 71%.

Finally, the study indicated that using microalgae (*C. vulgaris* y *Nannochloropsis Sp*) dehydrated biomass at 105 ° C for 17 hours, the flocculant decreases the rate of recovery of carbohydrates, proteins and lipids.

⁴ Research projec

⁵ Physical-Chemical Engineering college. Chemical Engineering Department. Advisors. Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. And MSc. Crisóstomo Barajas Ferre ira.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA BIOMASA DE MICROALGAS <i>CHLORELLA VULGARIS</i> UTEX 1803, SOBRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE CARBOHIDRATOS, MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA	23
4.1 INTRODUCCIÓN	23
4.2 METODOLOGÍA	25
4.2.1 Diseño experimental	25
4.2.2 Medio de cultivo	25
4.2.3 Pre-tratamiento térmico de la biomasa	26
4.2.4 Determinación del contenido de humedad	26
4.2.5 Hidrólisis ácida	26
4.2.6 Cuantificación de carbohidratos	27
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.3.1 Extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida]	28
4.3.2 Análisis estadístico [hidrólisis ácida]	30
5. EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA BIOMASA DE MICROALGAS <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803, SOBRE EL	

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS, MEDIANTE TRATAMIENTO ALCALINO	33
5.1 INTRODUCCIÓN	33
5.2 METODOLOGÍA	35
5.2.1 Diseño experimental	35
5.2.2 Medio de cultivo	35
5.2.3 Pre-tratamiento térmico de la biomasa	36
5.2.4 Determinación del contenido de humedad	36
5.2.5 Tratamiento alcalino	36
5.2.6 Cuantificación de carbohidratos	36
5.2.7 Cuantificación de proteínas	37
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.3.1 Extracción de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino]	39
5.3.2 Análisis estadístico [tratamiento alcalino]	41
6. RECUPERACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE LA COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN BIOMASA HÚMEDA Y SECA DE <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803 Y <i>Nannochloropsis sp.</i>	46
6.1 INTRODUCCIÓN	46
6.2 METODOLOGÍA	49
6.2.1 Diseño experimental	49
6.2.2 Medio de cultivo	51
6.2.2 Extracción de lípidos	51
6.2.3 Determinación del contenido de humedad	52
6.2.4 Cuantificación de lípidos	53
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.3.1 Extracción de lípidos [hexano sathis & sims, 2012]	54
6.3.2 Extracción de lípidos [metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959]	59
7. EFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS, PROTEÍNAS Y LÍPIDOS EN BIOMASA DE <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Nannochloropsis sp.</i>	64

7.1	INTRODUCCIÓN	64
7.2	METODOLOGÍA	67
7.2.1	Medio de cultivo	67
7.2.2	Cosecha de la biomasa	67
7.2.3	Hidrólisis ácida [HCL]	67
7.2.4	Tratamiento básico [NaOH]	68
7.2.5	Cuantificación de carbohidratos	68
7.2.6	Cuantificación de proteínas	68
7.2.7	Cuantificación de lípidos	69
7.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
7.3.1	Extracción de carbohidratos	71
7.3.2	Extracción de proteínas	73
7.3.3	Extracción de lípidos	75
8.	CONCLUSIONES	78
9.	RECOMENDACIONES	80
	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño de experimentos para el pre-tratamiento térmico de la biomasa [hidrólisis ácida].	25
Tabla 2. Resultados extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].	28
Tabla 3. Diseño de experimentos para el pre-tratamiento térmico de la biomasa [tratamiento alcalino].	35
Tabla 4. Resultados extracción de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino].	39
Tabla 5. Diseño de experimental de la extracción con hexano.	49
Tabla 6. Diseño de experimental de la extracción con metanol-cloroformo.	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Recuperación de carbohidratos [hidrólisis ácida].	28
Figura 2. Superficie de respuesta extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].	30
Figura 3. Diagrama de Pareto extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].	31
Figura 4. Recuperación de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino].	40
Figura 5. Superficie de respuesta extracción de proteínas [Tratamiento alcalino].	42
Figura 6. Diagrama de Pareto extracción de proteínas [Tratamiento alcalino].	43
Figura 7. Superficie de respuesta extracción de carbohidratos [Tratamiento alcalino].	44
Figura 8. Diagrama de Pareto extracción de carbohidratos [Tratamiento alcalino].	45
Figura 9. Recuperación de Lípidos [Hexano Sathis & Sims 2012].	54
Figura 10. Diagrama de Pareto, resultados <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda [Hexano Sathis & Sims 2012].	55
Figura 11. Superficie de respuesta extracción de lípidos [Hexano Sathis & Sims 2012].	56
Figura 12. Recuperación de Lípidos en biomasa húmeda [Hexano Sathis & Sims, 2012].	57
Figura 13. Recuperación de Lípidos [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].	59
Figura 14. Diagrama de Pareto, <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].	60

Figura 15. Superficie de respuesta, <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].	62
Figura 16. Recuperación de Lípidos en biomasa húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].	62
Figura 17. Recuperación de carbohidratos [hidrólisis ácida HCl].	71
Figura 18. Recuperación de carbohidratos [tratamiento básico NaOH].	73
Figura 19. Recuperación de proteínas [tratamiento básico NaOH].	74
Figura 20. Recuperación de lípidos [Biomasa hidrolizada mediante tratamiento ácido HCl].	75
Figura 21. Recuperación de lípidos [Biomasa hidrolizada mediante tratamiento básico NaOH].	76

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Principales productos obtenidos durante el desarrollo del proyecto	93
Anexo B. Principales contribuciones e impactos del proyecto desarrollado	95

INTRODUCCIÓN

Las microalgas han sido reconocidas como una alternativa prometedora en la obtención de lípidos y metabolitos de valor agregado como colorantes, proteínas y otros (Bernal *et al.*, 2011). Desde hace varios años se utilizan como materia prima en una amplia variedad de productos como: alimentos, suplementos dietarios, medicamentos, polímeros y enzimas (Perez *et al.*, 2011). La extracción de aceite y metabolitos a partir de biomasa de microalgas es un tema que atrae la atención de los investigadores a nivel mundial (Bai *et al.*, 2011). Lo anterior, debido a la complejidad de los procesos de separación y a sus efectos sobre la calidad de los metabolitos obtenidos (U.S. DOE, 2010). Adicionalmente, los costos de transformación de la biomasa siguen siendo demasiado altos para que los métodos hasta ahora estudiados puedan ser rentables (Serive *et al.*, 2012). Las dificultades actuales de la producción de biocombustibles y productos de alto valor a partir de microalgas promueven el estudio de métodos eficientes y económicamente viables para la recuperación de metabolitos (Halim *et al.*, 2011). Diversas entidades públicas y privadas han desarrollado investigaciones con miras a obtener productos de valor agregado y biocombustibles a partir de microalgas (Bioprospección de microalgas Colombianas para la producción de biodiesel, 2011). Sin embargo, existe una gran cantidad de retos por superar antes de implementar procesos de producción a escalas superiores del nivel laboratorio. Dado este escenario, el presente trabajo de investigación, se fundamentó en la evaluación de métodos experimentales para la obtención de metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos) mediante el estudio de las variables: concentración de solvente, temperatura del proceso, relación (biomasa/ solvente) y contenido de humedad de la biomasa, teniendo en cuenta el efecto de la floculación (cosecha de la biomasa), sobre el porcentaje de recuperación de metabolitos. Todo esto con el objetivo de seleccionar una metodología de

extracción selectiva, que permita aprovechar la biomasa de microalgas en la obtención de productos con potencial de valor.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace varios años las microalgas vienen siendo objeto de investigación a nivel mundial (Chisti, 2007). Frecuentemente se utilizan en la producción de alimentos, suplementos dietarios, medicamentos, polímeros y enzimas (Nobre *et al.*, 2013). También se puede resaltar su importancia en la acuicultura como base nutricional, en el tratamiento de aguas residuales, en la producción de oxígeno y en el consumo de compuestos nitrogenados (Lourenço, 2006). Las microalgas pueden crecer casi en cualquier tipo de agua, desde salada hasta residual y básicamente requieren una fuente de luz, nutrientes y una fuente de carbono (Aslan & Kapdan, 2006). El aprovechamiento de su mecanismo fotosintético para la obtención de materiales valiosos y extractos lipídicos no es un concepto nuevo (Carvalho *et al.*, 2013). Cabe mencionar que el contenido de metabolitos y el tipo de ácidos grasos son específicos para cada microalga (Renaud *et al.*, 1999). Dichas características también están vinculadas a ciertas variables durante el cultivo, tales como: intensidad de la luz, pH, salinidad del medio, temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes (Gouveia & Oliveira, 2009).

La extracción de metabolitos a partir de biomasa de microalgas es un tema que atrae la atención de los investigadores a nivel mundial (Bai *et al.*, 2011). Lo anterior, debido a los retos que plantea la complejidad de los procesos y a sus efectos sobre la calidad de los metabolitos obtenidos (U.S. DOE, 2010). El conjunto de técnicas empleadas en la extracción de productos incluye: ruptura de la pared celular por medios mecánicos (Cravotto *et al.*, 2008), extracción mediante solventes químicos (Fajardo *et al.*, 2007), fluidos en condiciones supercríticas (Herrero *et al.*, 2006), utilización de agua en condiciones subcríticas (a temperaturas entre 100 y 374°C y altas presiones para mantener el estado líquido) (Ayala & Luquede, 2001), (Eikani *et al.*, 2007) y otras combinaciones. Los métodos tradicionales de extracción mediante solventes químicos, han sido empleados para

la obtención de sustancias oleosas a partir de materiales biológicos, incluyendo microalgas (Lee *et al.*, 2010). Pese a los buenos resultados obtenidos con el uso de solventes químicos, estos sistemas presentan desventajas debido a su toxicidad y contaminación (Manirakiza *et al.*, 2001). El objetivo de las investigaciones debe estar orientado hacia el remplazo progresivo de los solventes químicos (por otros sistemas menos tóxicos) y hacia la implementación de sistemas más rentables en términos económicos. Los diferentes métodos de extracción requieren varias etapas previas, que incluyen secado de la biomasa y evaporación de solventes a altas temperaturas (Mata *et al.*, 2010). Lardon *et al.* (2009) demostraron mediante el análisis del ciclo de vida, que tanto el secado de la biomasa como la extracción de los lípidos representan cerca del 90% de la energía total del proceso de producción de biocombustibles a partir de microalgas, siendo hasta ahora la principal barrera tecnológica para la producción a escalas superiores (Serive *et al.*, 2012). Las dificultades en la obtención de biocombustibles y productos de alto valor a partir de microalgas, promueven el estudio de métodos eficientes y económicamente viables para la recuperación de los metabolitos (Scott *et al.*, 2010).

Una alternativa para la solución de estos problemas es incrementar la selectividad de los procesos utilizando métodos que permitan separar los lípidos de los demás metabolitos presentes en la biomasa y encontrar un alto valor para estos subproductos. Dada la importancia en la reducción del gasto energético durante el pre-tratamiento y aumentar la recuperación de los metabolitos de interés es necesario tener en cuenta los siguientes factores: a) evaluar tanto el efecto del contenido de humedad, b) el tiempo de contacto con el agente extractivo y c) la temperatura del proceso.

Otra alternativa es la implementación de métodos de extracción en húmedo, lo que reduciría drásticamente la cantidad de energía necesaria en el secado de la biomasa y en la eliminación del solvente (Kanda *et al.*, 2013). Según Kanda *et al.*

(2012) la extracción empleando biomasa sin procesos de secado (en base húmeda) podría alcanzar hasta un 97% de rendimiento en comparación con otros métodos. Los autores obtuvieron un rendimiento de 40,1% en la extracción de lípidos a partir de microalgas (especies mixtas), un valor similar comparado con los resultados del método Bligh-Dyer (1959) (metanol-cloroformo 2:1) a partir de biomasa seca. A pesar de los resultados, aún no se ha confirmado la validez de la extracción en húmedo para diferentes tipos de lípidos y diferentes géneros de microalgas (Kanda *et al.*, 2013).

Otro de los factores a considerar en la producción de microalgas es el sistema de concentración y/o cosecha de la biomasa. Esta etapa puede llegar a constituir entre 20-30% de los costos totales de la producción de biomasa (Mata *et al.*, 2010). Los equipos utilizados para concentrar la biomasa de microalgas (separar las células del medio de cultivo) son costosos e ineficientes, dado su alto consumo de energía. Adicionalmente, las operaciones de separación pueden afectar la integridad de las células (Rwehumbiza *et al.*, 2012). Dichas consideraciones hacen que sea importante evaluar los efectos de los sistemas de cosecha sobre el porcentaje de recuperación y la calidad de los metabolitos de interés. Entre los métodos de cosecha la floculación es uno de los más prometedores, debido a que es menos sensible frente al tamaño y forma de las microalgas (Davis., 2011). Adicionalmente, permite el manejo de volúmenes grandes de cultivo en forma rápida y con bajo costo energético, comparado con otros métodos como centrifugación y ultrafiltración (Mandik *et al.*, 2015). A pesar de las ventajas que presentan los floculantes, hay pocos estudios sobre los posibles efectos de estos compuestos en la cantidad y calidad de los metabolitos extraídos a partir de biomasa de microalgas (Gerde *et al.*, 2014).

Bajo este escenario una amplia variedad de métodos y tecnologías están siendo adaptados en el aprovechamiento de la biomasa de microalgas, con miras a la obtención de productos de alto valor. Para que esto tenga éxito, se requiere que

dichas tecnologías sean eficientes teniendo en cuenta los aspectos técnicos, económicos, ambientales y energéticos.

2. HIPÓTESIS

A partir de la evaluación de métodos experimentales para la obtención de metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos), mediante el estudio de las variables: concentración de solvente, temperatura del proceso, relación (biomasa/solvente) y contenido de humedad de la biomasa, teniendo en cuenta el efecto de la floculación (cosecha), sobre el porcentaje de recuperación de metabolitos, es posible seleccionar una metodología de extracción selectiva, que permita aprovechar la biomasa de microalgas en la obtención de productos con potencial de valor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar una metodología para la extracción selectiva de metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos) a partir de biomasa de microalgas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del contenido de humedad de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, sobre el porcentaje de recuperación de carbohidratos, mediante hidrólisis ácida con HCl.
- Evaluar el efecto del contenido de humedad de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, sobre el porcentaje de recuperación de proteínas y carbohidratos, mediante tratamiento alcalino con NaOH.
- Evaluar el porcentaje de recuperación de lípidos mediante la comparación de dos métodos de extracción en biomasa húmeda y seca de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp.*
- Estudiar el efecto de la floculación (durante la etapa de cosecha de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp.*) sobre el porcentaje de recuperación de metabolitos (carbohidratos, proteínas y lípidos).
- Elaborar recomendaciones para el mejoramiento de los procesos y su aplicación en el desarrollo de proyectos futuros.

4. EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA BIOMASA DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, SOBRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE CARBOHIDRATOS, MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA

4.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas producen diferentes metabolitos (carbohidratos, lípidos y proteínas), su contenido depende de factores como la especie, la cepa, las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes requeridos para su crecimiento (Pérez *et al.*, 2011). Los carbohidratos en las microalgas provienen principalmente del almidón almacenado en forma de pirenoides en los cloroplastos y de la celulosa/polisacáridos en las paredes celulares (Domozych *et al.*, 2012). Los carbohidratos obtenibles a partir de microalgas poseen ventajas sobre otros materiales vegetales debido a su que son fácilmente hidrolizados en monosacáridos para la obtención de diferentes productos como edulcorantes, saborizantes y últimamente etanol (Ho *et al.*, 2012). Algunas especies del género *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, y *Tetraselmis* han demostrado gran capacidad para acumular carbohidratos en concentraciones superiores al 40% de su peso seco (John *et al.*, 2011); particularmente, *Chlorella vulgaris* donde la concentración puede alcanzar un 37% de su peso seco (Dragone *et al.*, 2011).

Entre los métodos más aplicados para extraer azúcares fermentables de la biomasa de microalgas se reconocen la hidrólisis enzimática, la hidrólisis alcalina y la hidrólisis ácida (Girio *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010). La hidrólisis enzimática es una alternativa limpia ya que no se generan compuestos tóxicos o subproductos que puedan afectar el proceso fermentativo de la biomasa (Ho *et al.*, 2013). No obstante, el alto costo de las enzimas y los tiempos de reacción (2-3 días) limitan su aplicación (Lynd *et al.*, 2002; Kumar & Wyman, 2009). Por su parte, la hidrólisis

ácida es un método muy efectivo en la sacarificación a partir de materiales lignocelulósicos. Los ácidos más usados en esta clase de procesos son H_2SO_4 , HCl y HNO_3 (Sun & Cheng, 2005). 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). Ho *et al* (2013) reportaron el contenido de azúcares en *C. vulgaris* al tratar la biomasa mediante hidrólisis con H_2SO_4 a diferentes tiempos y temperaturas. En 2009, Nguyen *et al.*, analizaron el efecto de la temperatura en la extracción de azúcares utilizando hidrólisis ácida. Kafarov *et al.*, (2010) compararon diferentes métodos térmicos y químicos de disrupción celular para obtener metabolitos a partir de biomasa de microalgas, entre ellos la hidrólisis ácida. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto que tiene la humedad de la biomasa en el pre-tratamiento mediante hidrólisis ácida y por consiguiente en la obtención de azúcares fermentables a partir de *C. vulgaris*.

Dado lo anterior, el presente capítulo evalúa el efecto de la humedad, teniendo en cuenta las variables tiempo y temperatura durante el secado de la biomasa (antes de la hidrólisis), sobre la recuperación de carbohidratos (cantidad de carbohidratos por gramo de biomasa tratada) mediante hidrólisis ácida utilizando HCl 0.5M. Para ello, se realizaron nueve (9) pruebas de acuerdo al diseño experimental de composición central 2^2 utilizando el software Statistica 7.0.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Diseño experimental. Para evaluar el efecto de la humedad de la biomasa sobre la recuperación de carbohidratos mediante hidrólisis ácida se realizaron nueve pruebas (9), modificando las variables tiempo y temperatura de secado. El diseño experimental de composición central 2^2 (dos variables a dos niveles) se obtuvo mediante la herramienta STATISTICA 7.0. Los valores de temperatura ingresados al software fueron 45°C y 105°C y los valores de tiempo 12 y 24 horas.

Tabla 1. Diseño de experimentos para el pre-tratamiento térmico de la biomasa [hidrólisis ácida].

Prueba No.	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

4.2.2 Medio de cultivo. El inóculo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirido de la colección de cepas de la Universidad de Texas (UTEX, Austin, Texas, USA). La cepa se cultivó en medio Bold Basal estéril (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963), cuya composición en mg/L de macronutrientes es: NaNO₃ (2,94), MgSO₄·7H₂O (3,04 X 10⁻¹), NaCl (4,28 X 10⁻¹), K₂HPO₄ (4,31 X 10⁻¹), KH₂PO₄ (1,29), CaCl₂·2H₂O (1,70 X 10⁻¹) y micronutrientes: (mg/L) ZnSO₄·7H₂O (3,07 X 10⁻²), MnCl₂·4H₂O (7,28 X 10⁻³), MoO₃ (4,93 X 10⁻³), CuSO₄·5H₂O (6,29 X 10⁻³), Co

$(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-3}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-1}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-1}$), KOH ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$). El cultivo se desarrolló en recipientes rectangulares de vidrio con capacidad de 20 litros, previamente desinfectados. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo constante para homogenizar los nutrientes en el medio y se aislaron para evitar la contaminación cruzada. El pH se midió diariamente asegurando valores en el rango 7-8, como un mecanismo de control, debido a que la presencia de otros microorganismos puede modificar este parámetro. La biomasa creció durante 15 días con ciclos de luz y oscuridad 12:12 horas, respectivamente.

4.2.3 Pre-tratamiento térmico de la biomasa. Una vez concluido el tiempo de cultivo la biomasa fue concentrada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos. La fase sólida obtenida (biomasa concentrada) fue pre-tratada térmicamente de acuerdo con el diseño de experimentos descrito en la tabla 1. Una vez terminado este proceso la biomasa fue sometida a hidrólisis ácida (HCl) de forma inmediata para evitar cambios de humedad y de características fisicoquímicas.

4.2.4 Determinación del contenido de humedad. El contenido de humedad se determinó por gravimetría, tomando una muestra representativa de la biomasa obtenida a partir del pre-tratamiento térmico. La muestra se sometió a una temperatura de 105°C durante 17 horas. El ensayo se realizó por triplicado y se tomó el valor promedio de las tres mediciones como referencia para la determinación del porcentaje de recuperación de carbohidratos en base seca.

4.2.5 Hidrólisis ácida. El proceso de hidrólisis ácida se llevó a cabo adicionando 5 gramos de biomasa pre-tratada térmicamente y 50 mililitros de ácido clorhídrico de concentración 0,5 molar. La mezcla se agitó continuamente a 500 rpm durante 2 horas (Kafarov *et al.*, 2010). Una vez concluido el tiempo de reacción se adicionó gradualmente solución de KOH de concentración 1,0 molar,

hasta neutralizar la mezcla. Posteriormente, se realizó la separación y filtración del licor (rico en carbohidratos) y la biomasa hidrolizada.

4.2.6 Cuantificación de carbohidratos. Para determinar el contenido de carbohidratos, como concentración de glucosa, en el licor producto de la hidrólisis ácida, se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). El procedimiento consistió en mezclar 1 mililitro de la muestra con 0,5 mililitros de fenol al 5% y 2,5 mililitros de ácido sulfúrico al 95%. Una vez revelado el color de la solución se realizó la medición de la absorbancia a 485 nm (longitud de onda), utilizando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). La concentración de glucosa en el extracto se cuantificó mediante la curva de concentración estandarizada a partir del reactivo grado analítico: D(+) Glucosa (Merck, CAS: 14431-43-7).

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas la especie *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, utilizada en el presente estudio como fuente de biomasa, puede acumular en promedio hasta un 35% de carbohidratos, valor tomado como referencia para calcular la recuperación del metabolito. El cálculo del porcentaje de recuperación de carbohidratos se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

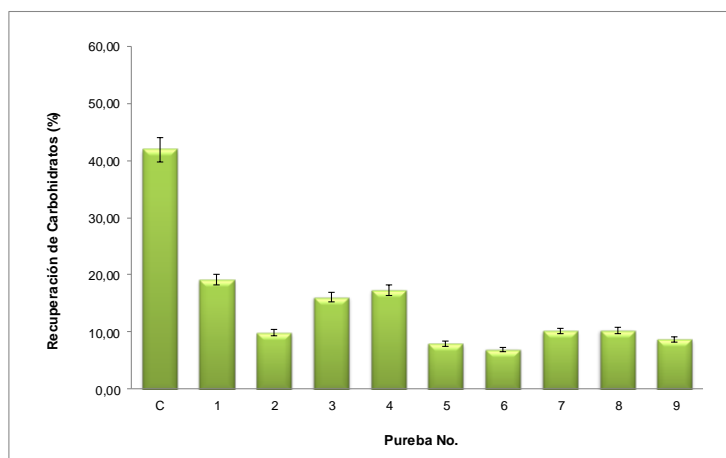
4.3.1 Extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida]. Como resultado de las pruebas de pre-tratamiento térmico se obtuvo una biomasa con determinado contenido de humedad. Adicionalmente, se realizó una prueba de control con biomasa sin pre- tratamiento. En la tabla 2 se presentan los valores de humedad obtenidos para cada experimento y el porcentaje de recuperación de carbohidratos. El cálculo del porcentaje de recuperación de carbohidratos se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

Tabla 2. Resultados extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].

Prueba No.	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Condiciones [T (°C) / t (h)]	N.A	33/18	45/12	45/24	75/9,5	75/18	75/26,5	105/12	105/24	117/18
Humedad (%)	72,55	66,70	20,69	12,30	10,57	8,21	6,55	3,33	0,20	0,50
Rec. de Carbohidratos (%)	41,96	19,14	9,85	16,07	17,32	7,93	6,94	10,18	10,26	8,68

Los resultados correspondientes a la recuperación de carbohidratos a partir de biomasa (*C. vulgaris*) sometida a pre-tratamiento térmico, bajo las condiciones de T (°C) y t (h) del diseño experimental, se presentan en la figura 1.

Figura 1. Recuperación de carbohidratos [hidrólisis ácida].



Como se observa en la figura 1 utilizando biomasa con alto contenido de humedad (72,55%), obtenida bajo la prueba de control (sin pre-tratamiento térmico), fue posible recuperar un 41,96% del contenido de carbohidratos medido como concentración de glucosa a partir de la curva de estandarizada para el método de cuantificación implementado. Esto indica, que no se requieren grandes inversiones durante el secado para lograr extraer la mayor cantidad de azúcares fermentables. Lo que eventualmente se reflejaría en la reducción de costos y por consiguiente en la posibilidad de escalar la metodología a nivel de planta piloto.

La cantidad de carbohidratos extraídos (8,68%) fue inferior en la biomasa pre-tratada a mayor temperatura durante tiempos más largos (117°C/18h), con respecto al rendimiento de la prueba realizada con biomasa húmeda (41,96%). De acuerdo con Mussatto *et al* (2010) el exceso de temperatura puede degradar los materiales lignocelulósicos, descomponiendo parte de los carbohidratos presentes.

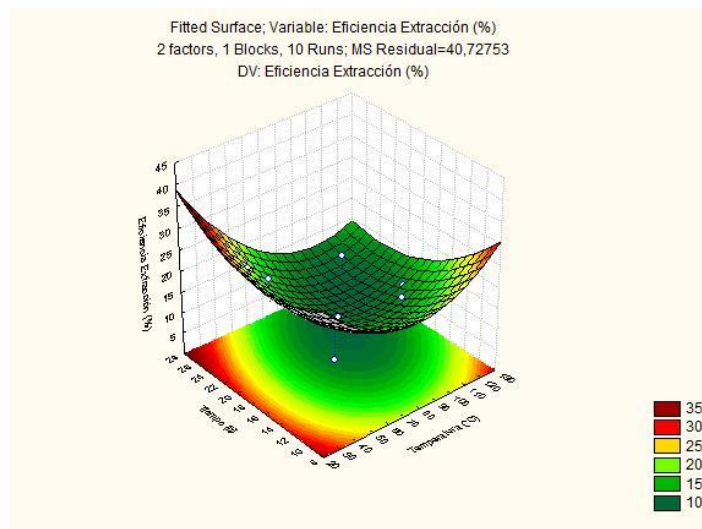
Magota *et al.*, (2012), encontraron que el contenido de agua disminuye la acción del hexano en la extracción de hidrocarburos de *Botryococcus braunii*, debido a la polaridad del solvente. En este sentido, si el solvente utilizado es inmiscible en la fase acuosa de la muestra, la humedad de la biomasa puede inhibir el proceso de hidrólisis y/o extracción de los metabolitos de interés. Dados los resultados de la extracción de carbohidratos en función del contenido de humedad, es posible inferir que la presencia de agua favorece la naturaleza miscible del agente extractor (HCl), e incrementa la eficiencia del proceso.

Es importante señalar, que bajo las condiciones de hidrólisis ácida (HCl) descritas en el numeral 4.2.4 del presente capítulo, no fue posible recuperar otros metabolitos de interés como es el caso de las proteínas. Lo anterior, debido a la degradación que sufre el sustrato, destruyendo gran parte de los aminoácidos cuantificables. La recuperación de proteínas mediante hidrólisis ácida,

generalmente requiere que el las reacciones sean controladas por acción enzimática y que otras variables de influencia como el pH y la temperatura se ajusten sistemáticamente a medida que el proceso transcurre. Esto hace que el costo de los insumos y los equipos se incremente. En este sentido y teniendo en cuenta la viabilidad económica del proceso, la extracción de metabolitos mediante hidrólisis ácida (HCl) se limita a la obtención de azúcares fermentables.

4.3.2 Análisis estadístico [hidrólisis ácida]. La influencia del pre-tratamiento térmico (y por consiguiente del contenido de humedad de la biomasa) en la recuperación de carbohidratos a partir de *C. vulgaris*, se analizó mediante el software Statistica 7.0. En la figura 2 se presenta la superficie de respuesta obtenida para la eficiencia del proceso en función de las variables temperatura y tiempo de cada prueba.

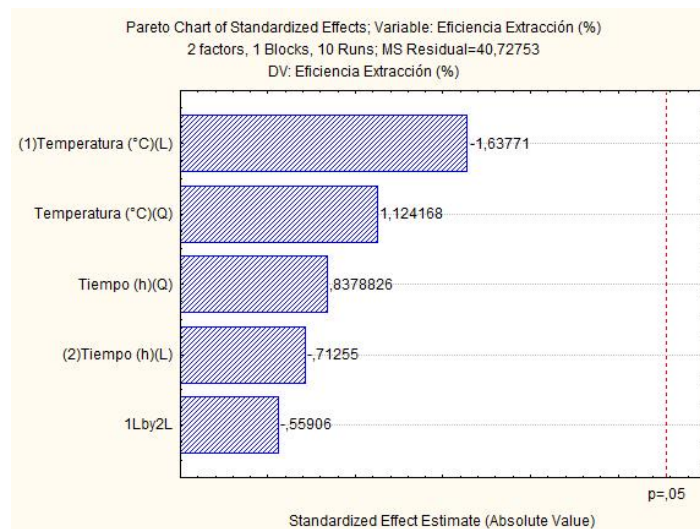
Figura 2. Superficie de respuesta extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].



En la figura 2 es posible apreciar que el proceso de recuperación de carbohidratos es más eficiente cuando la biomasa no ha sido expuesta a un proceso de secado bajo temperaturas elevadas. Las zonas de color rojo intenso ubican los valores de recuperación más altos y el tono verde intenso los valores de recuperación más

bajos, ambos en el rango de cada variable de acuerdo con relación lineal o cuadrática entre los parámetros de entrada (tiempo y temperatura) y la variable de respuesta (eficiencia de extracción). Dados los resultados de la figura 2, se infiere que el porcentaje de recuperación incrementa cuando la temperatura de secado es menor o igual a 20°C, con periodos de tiempo entre 0-24 horas. Para verificar la influencia de cada variable se generó el diagrama de Pareto (ver figura 3), donde se muestra el valor absoluto de los efectos con respecto a la línea de referencia o nivel de significancia ($P = 0,05$). Los efectos o interacciones que sobrepasan este valor se considerarán significativos. El comportamiento de la variable respuesta se analiza mediante la relación lineal (L) y/o cuadrática (Q) de los datos de entrada.

Figura 3. Diagrama de Pareto extracción de carbohidratos [hidrólisis ácida].



En la figura 3 se evidencia que las variables temperatura y tiempo del pre-tratamiento térmico al que fue sometida la biomasa, no influyen de manera significativa sobre el porcentaje de recuperación de carbohidratos mediante hidrólisis ácida. Lo anterior, teniendo en cuenta que las relaciones establecidas y la interacción de las variables no sobrepasan el umbral (línea punteada). El análisis estadístico de los datos obtenidos permitió demostrar que la obtención de azúcares fermentables a partir de *C. vulgaris* no es altamente dependiente de las

condiciones de secado de la biomasa y por consiguiente de su contenido de humedad. Esto indica que utilizando biomasa sin pre-tratamiento térmico, con un contenido de humedad promedio de 73%, es posible recuperar hasta un 40% de los carbohidratos de *C. vulgaris*, mediante hidrólisis ácida (HCl).

5. EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LA BIOMASA DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, SOBRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS, MEDIANTE TRATAMIENTO ALCALINO

5.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas pueden acumular cantidades importantes de metabolitos primarios y secundarios (Halim *et al.*, 2013). Klein & Buchholz (2013) señalaron los beneficios que tiene la ingesta de productos alimenticios a base de microalgas. Además de las ventajas nutricionales, esta biomasa pueden ser materia prima en la obtención de productos farmacológicos, cosméticos, agroindustriales, entre otros (Safi *et al.*, 2014). Algunas especies del género *Chlorella* han demostrado un alto contenido de carbohidratos (12%–55% de su peso seco) (Choix *et al.*, 2012; Branyikova *et al.*, 2011) y proteínas (30%–60% de su peso seco) (García-Cuadra *et al.*, 2012). Lo anterior, ha motivado la exploración de técnicas y procedimientos que permitan elevar los niveles de producción (Harun *et al.*, 2010).

Las metodologías de extracción actualmente utilizadas integran sistemas mecánicos (molienda, prensado, homogeneización), ultrasonido, autoclave, liofilización y microondas (Mecer & Armenta, 2011). Estas operaciones pueden ser aplicadas para el tratamiento de diversos tipos de biomasa, incluyendo varias especies de microalgas. Sin embargo, dichas metodologías no son selectivas y se consideran más un pre-tratamiento, lo anterior se traduce en la necesidad de implementar etapas adicionales de extracción con solventes químicos (Prabakaran & Ravindran, 2011).

El uso de solventes químicos es menos costoso comparado con las técnicas mecánicas, sin embargo su principal desventaja radica en la posibilidad de

contaminación del sustrato o producto final (Lee *et al.*, 2012). Harun *et al* (2010) exponen que la exposición de la biomasa a un ambiente ácido puede conducir a la descomposición de los azúcares e inhibir el proceso fermentativo. Por su parte, la hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes como la lignina (Sun & Cheng, 2002). Las bases comúnmente utilizadas en este proceso son la cal y la soda cáustica, sustancias menos tóxicas que otros solventes a las concentraciones aplicadas (Chen *et al.*, 2013). Harun *et al.*, (2011) evaluaron la extracción de carbohidratos en biomasa de microalgas mediante tratamiento alcalino con NaOH (0,75%) a 120 °C por 30 min. Los autores reportaron una eficiencia de 74%, el sistema mostró un comportamiento favorable proporcionando un menor costo de producción con respecto a otros métodos analizados.

Generalmente, la biomasa sometida a hidrólisis y/o extracción con solventes es previamente deshidratada (Lam & Lee, 2012), pero cabe recordar que el pre-tratamiento térmico consume casi el 69% de la energía total del proceso (Sander & Murthy, 2010). Los estudios de investigación realizados por CIDES, en torno al aprovechamiento de la biomasa de microalgas, demostraron que es posible extraer carbohidratos y proteínas a partir de *C. vulgaris* deshidratada empleando una solución de NaOH 3,67M, en una relación 30 ml/g (solvente/biomasa), a 55°C, bajo un tiempo de reacción de 20 minutos. No obstante, a los resultados satisfactorios frente a la recuperación de los metabolitos y dada la importancia en la reducción del gasto energético durante el pre-tratamiento (secado) de la biomasa, el presente capítulo evaluó el efecto del contenido de humedad en la eficiencia de extracción de proteínas y carbohidratos de *Chlorella vulgaris*, mediante hidrólisis alcalina (NaOH). Para lograr dicho objetivo, se realizaron nueve (9) pruebas de acuerdo al diseño experimental de composición central 2² utilizando el software STATISTICA 7.0.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Diseño experimental. Para evaluar el efecto de la humedad de la biomasa sobre la recuperación de carbohidratos mediante hidrólisis ácida se realizaron nueve pruebas (9), modificando las variables tiempo y temperatura de secado. El diseño experimental de composición central 2^2 (dos variables a dos niveles) se obtuvo mediante la herramienta STATISTICA 7.0. Los valores de temperatura ingresados al sistema fueron 45°C y 105°C y los valores de tiempo fueron 12 y 24 horas.

Tabla 3. Diseño de experimentos para el pre-tratamiento térmico de la biomasa [tratamiento alcalino].

Prueba No.	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	33	18
2	45	12
3	45	24
4	75	10
5	75	18
6	75	26
7	105	12
8	105	24
9	117	18

5.2.2 Medio de cultivo. El cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 se desarrolló en recipientes rectangulares de vidrio, con capacidad de 20 litros, previamente desinfectados, acoplados a un sistema de aireación por burbujeo constante. El sistema se aisló para evitar la contaminación cruzada. El pH se midió diariamente asegurando valores en el rango 7-8, como un mecanismo de control, debido a que la presencia de otros microorganismos puede modificar este parámetro. La biomasa creció durante 15 días con ciclos de luz y oscuridad 12:12 horas, respectivamente. La composición Bold Basal (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963) del medio estéril, se describió previamente en el numeral 4.2.2.

5.2.3 Pre-tratamiento térmico de la biomasa. La biomasa obtenida después de 15 días de crecimiento, fue concentrada mediante centrifugación a 3400 rpm, durante 15 min. La fase sólida obtenida (biomasa concentrada) fue pre-tratada térmicamente de acuerdo con el diseño de experimentos descrito en la tabla 3. Una vez concluido este proceso la biomasa fue sometida al tratamiento de extracción alcalina (NaOH) de forma inmediata para evitar cambios de humedad y características fisicoquímicas.

5.2.4 Determinación del contenido de humedad. El contenido de humedad se determinó por gravimetría, tomando una muestra representativa de la biomasa obtenida a partir del pre-tratamiento térmico. La muestra se sometió a una temperatura de 105°C durante 17 horas. El ensayo se realizó por triplicado y se tomó el valor promedio de las tres mediciones como referencia para la determinación del porcentaje de recuperación de proteínas y carbohidratos en base seca.

5.2.5 Tratamiento alcalino. La reacción de hidrólisis básica se llevó a cabo agregando 5 gramos de biomasa pre-tratada térmicamente y 30 mililitros de NaOH de concentración 3,67 molar, por cada gramo de biomasa. La mezcla se calentó durante 20 minutos utilizando un baño termostataado a 55 °C (Ayala Torres & Reyes Gómez, 2014). Una vez concluido el tiempo de reacción se ajustó el pH (7,5 – 8,5) de la mezcla, se realizó la separación y filtración del licor (rico en carbohidratos y proteínas) y la biomasa hidrolizada (pellet).

5.2.6 Cuantificación de carbohidratos. Para determinar el contenido de carbohidratos, como concentración de glucosa, en el licor producto de la hidrólisis ácida, se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). El procedimiento consistió en mezclar 1 mililitro de la muestra con 0,5 mililitros de fenol al 5% y 2,5 mililitros de ácido sulfúrico al 95%. Una vez revelado el color de la solución se realizó la medición de la absorbancia a 485 nm (longitud de onda),

utilizando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). La concentración de glucosa en el extracto se cuantificó mediante la curva de concentración estandarizada a partir del reactivo grado analítico: D (+) Glucosa (Merck, CAS: 14431-43-7).

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas la especie *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, utilizada en el presente estudio como fuente de biomasa, puede acumular en promedio hasta un 35% de carbohidratos, valor tomado como referencia para la cuantificación del metabolito. El cálculo del porcentaje de recuperación de carbohidratos se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

5.2.7 Cuantificación de proteínas. El contenido de proteínas en el extracto obtenido se determinó utilizando el método descrito por Lowry et al., (1951). El procedimiento consistió en mezclar 1 mililitro de la muestra con 1,4 mililitros de solución Lowry. La solución se homogenizó durante 5 minutos y se mantuvo en reposo por 15 minutos adicionales, concluida esta etapa, se añadió 0,2 mililitros de solución Folin-agua y se dejó reaccionar hasta la revelación del color (30 minutos). Posteriormente, se determinó el contenido de proteínas mediante la curva de calibración, previamente estandarizada a partir del reactivo de albúmina grado analítico. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 750 nanómetros utilizando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas la especie *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, utilizada en el presente

estudio como fuente de biomasa, puede acumular en promedio hasta un 50% de proteínas, valor tomado como referencia para la cuantificación del metabolito. El cálculo del porcentaje de recuperación de proteínas se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Extracción de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino]. Como resultado de las pruebas de pre-tratamiento térmico se obtuvo una biomasa con determinado contenido de humedad. Adicionalmente, se realizó una prueba de control con biomasa sin pre-tratamiento. En la tabla 4 se presentan los valores de humedad obtenidos para cada experimento y el porcentaje de recuperación de proteínas y carbohidratos. El cálculo del porcentaje de recuperación de los metabolitos se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

Tabla 4. Resultados extracción de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino].

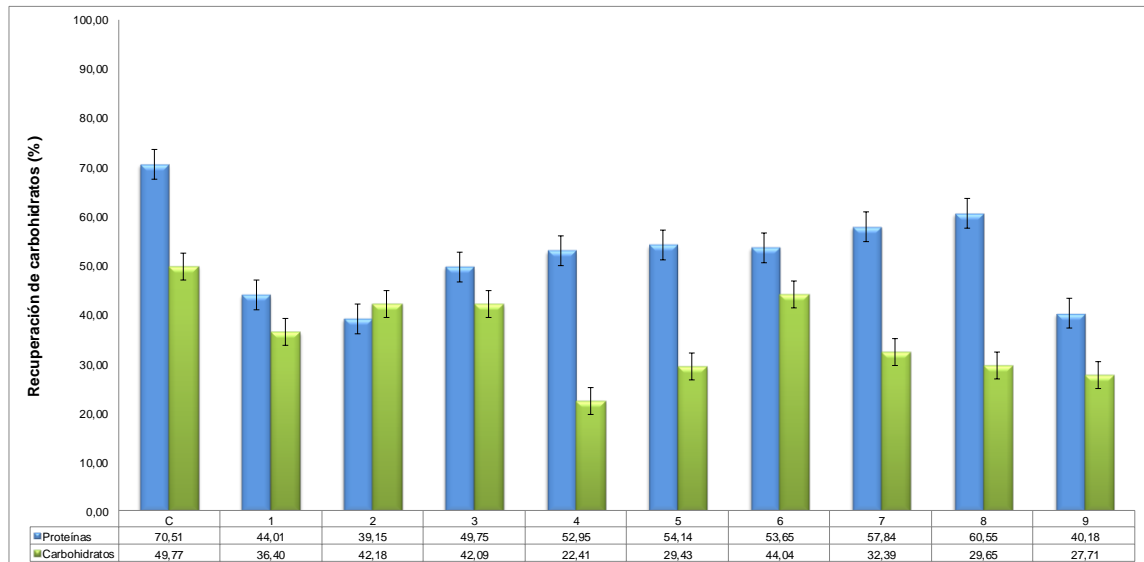
Prueba No.	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Condiciones [T (°C) / t (h)]	N.A	33/18	45/12	45/24	75/10	75/18	75/26	105/12	105/24	117/18
Humedad (%)	71,05	11,11	8,06	8,21	4,07	2,23	1,60	1,32	0,50	0,14
Rec. de Carbohidratos (%)	49,77	36,40	42,18	42,09	22,41	29,43	44,04	32,39	29,65	27,71
Rec. de Proteínas (%)	70,51	44,01	39,15	49,75	52,95	54,14	53,65	57,84	60,55	40,18

Los resultados correspondientes a la extracción de proteínas y carbohidratos a partir de biomasa (*C. vulgaris*) sometida a pre-tratamiento térmico, bajo las condiciones de T (°C) y t (h) del diseño experimental, se presentan en la figura 4.

Según se observa en la figura 4 al utilizar biomasa con un porcentaje de humedad de 71% (sin pre-tratamiento térmico), es posible recuperar el 71,51% de su contenido en proteínas y 49,77% de carbohidratos. No obstante, algunos autores aseguran que deshidratar la biomasa a alta temperatura facilita el rompimiento de la pared celular (Lam & Lee, 2012). Contrariamente, otras investigaciones indican que secar la biomasa puede causar deterioro significativo de las moléculas termolábiles y disminuir la eficiencia en la extracción de los metabolitos de interés (Brennan & Owende, 2010). Kanda *et al.*, (2013), Proponen trabajar con biomasa

húmeda para reducir el costo generado por la etapa de pre-tratamiento térmico. Teniendo en cuenta que a la escala del laboratorio, deshidratar la biomasa representa un consumo energético de hasta 1,6 kilovatios por hora, utilizar biomasa con alto contenido de humedad es una alternativa viable frente a su aprovechamiento para la obtención de productos con potencial de valor. De acuerdo con los resultados presentados en la figura 4, es válido señalar que la biomasa (*Chlorella vulgaris*) no requiere ser sometida a pre-tratamiento térmico (prueba de control) para lograr eficiencias superiores al 50% en la extracción de Proteínas.

Figura 4. Recuperación de proteínas y carbohidratos [tratamiento alcalino].



En contraste a los resultados obtenidos (ver figura 4), Harun *et al.*, (2011), lograron recuperar hasta 74,2% de los carbohidratos a partir de biomasa (*Chlorococcum infusionum*) deshidratada, utilizando una solución alcalina (NaOH) 0,75% (p/v) a 120°C por 30 minutos de reacción. Harun & Danquah, (2011b) afirmaron que al utilizar biomasa (*Chlorococcum humícola*) pre-tratada térmicamente a 60°C e hidrolizada en condiciones ácidas (H₂SO₄), se alcanza un 52% de rendimiento en la fermentación de carbohidratos, cuando la reacción se

desarrolla a una temperatura de 160°C. Así mismo, en el capítulo anterior (numeral 4.3.1), se indicó que mediante hidrólisis ácida (HCl) con agitación a temperatura ambiente, es posible recuperar 41,96% de los carbohidratos de *Chlorella vulgaris* con una humedad promedio de (73%).

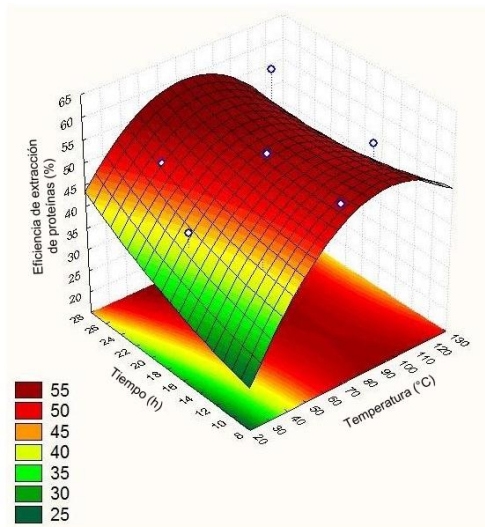
En términos de proteínas, la hidrólisis alcalina (NaOH) a 40 °C estudiada por Safi *et al.*, (2014b) consiguió recuperar menos del 20% en *Chlorella vulgaris*, al comparar dicho método con diferentes tratamientos de disrupción celular como: alta presión, ultrasonido y sistemas mecánicos. Vale la pena resaltar que las nueve (9) pruebas realizadas evidenciaron una mayor recuperación de proteínas bajo las condiciones de hidrólisis alcalina descritas en el numeral (5.2.5). Bajo este escenario, si el objetivo es obtener un extracto rico en proteínas, el tratamiento alcalino evaluado en el presente capítulo (numeral 5.2.4), exhibe resultados satisfactorios frente al aprovechamiento de biomasa húmeda (*C. vulgaris*). Lo anterior, teniendo en cuenta la reducción del consumo energético que se lograría al eliminar la etapa de secado. Adicionalmente, el tratamiento alcalino ofrece la posibilidad de recuperar el contenido de carbohidratos presente en el licor.

5.3.2 Análisis estadístico [tratamiento alcalino].

- **Extracción de Proteínas**

La influencia del pre-tratamiento térmico (y por consiguiente del contenido de humedad de la biomasa) en la recuperación de metabolitos (Proteínas y carbohidratos) a partir de *C. vulgaris*, se analizó mediante el software Statistica 7.0. En la figura 5 se presenta la superficie de respuesta obtenida al relacionar la extracción de proteínas con las variables temperatura y tiempo del diseño experimental.

Figura 5. Superficie de respuesta extracción de proteínas [Tratamiento alcalino].

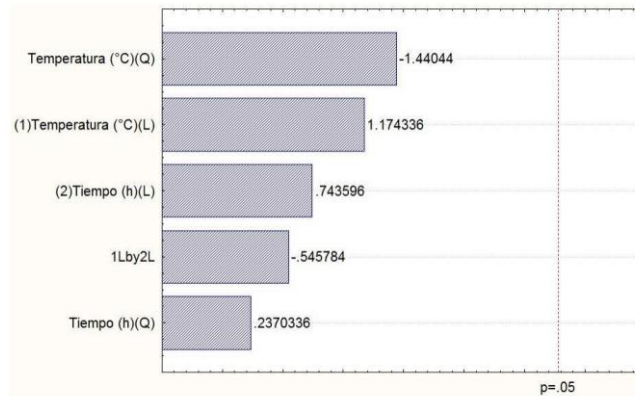


La superficie de respuesta de la figura 5 [donde las zonas de color rojo intenso ubican los valores de recuperación más altos y el tono verde intenso los valores de recuperación más bajos, ambos en el rango de cada variable de acuerdo con relación lineal o cuadrática entre los parámetros de entrada (tiempo y temperatura) y la variable de respuesta (eficiencia de extracción)], indicó que la recuperación de proteínas alcanza un 55% cuando el secado de la biomasa se realiza a temperaturas entre 80 °C y 100 °C, para cualquier periodo de tiempo. De acuerdo con el comportamiento de los datos, la temperatura del pre-tratamiento térmico incide sobre el porcentaje de recuperación de las proteínas a partir de *C. vulgaris*. Lam & Lee, (2012) reportaron que la temperatura elevada durante el pre-tratamiento de la biomasa facilita el rompimiento de la pared celular mejorando el proceso de extracción de los metabolitos. Otros autores mencionan que la calidad de los metabolitos puede verse afectada por el incremento de la temperatura durante el secado de la biomasa (Brennan & Owende, 2010).

Para verificar la influencia de cada variable sobre la extracción de proteínas se generó el diagrama de Pareto (ver figura 6), donde se muestra el valor absoluto de los efectos con respecto al nivel de significancia ($P = 0,05$). Los efectos o

interacciones que sobrepasan este valor se considerarán significativos. El comportamiento de la variable respuesta se analiza mediante la relación lineal (L) y/o cuadrática (Q) de los datos de entrada.

Figura 6. Diagrama de Pareto extracción de proteínas [Tratamiento alcalino].

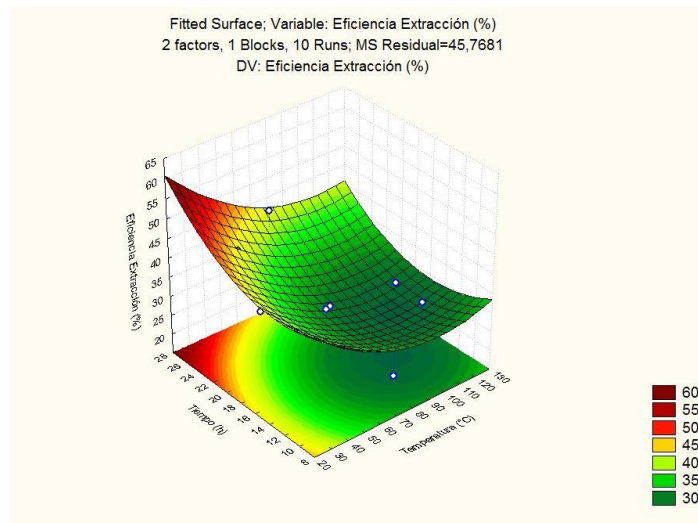


En la figura 6 se evidencia que las variables temperatura y tiempo del pre-tratamiento térmico al que fue sometida la biomasa, no influyen de manera significativa sobre la extracción de proteínas mediante tratamiento alcalino (NaOH). Lo anterior, teniendo en cuenta que las relaciones establecidas y la interacción de las variables no sobrepasan el umbral de conformidad (línea punteada). Dados los resultados del análisis estadístico se infiere que la obtención de proteínas a partir de *C. vulgaris* no es altamente dependiente de las condiciones de secado de la biomasa y por consiguiente de su contenido de humedad. Kanda *et al.*, (2013), proponen utilizar biomasa húmeda para disminuir el gasto energético durante la etapa de secado, sabiendo que esta última puede llegar a consumir hasta un 69 % de la energía total del proceso (Lam & Lee, 2012).

- **Extracción de Carbohidratos**

En la figura 7 se presenta la superficie de respuesta obtenida al relacionar la extracción de carbohidratos con las variables temperatura y tiempo del diseño experimental.

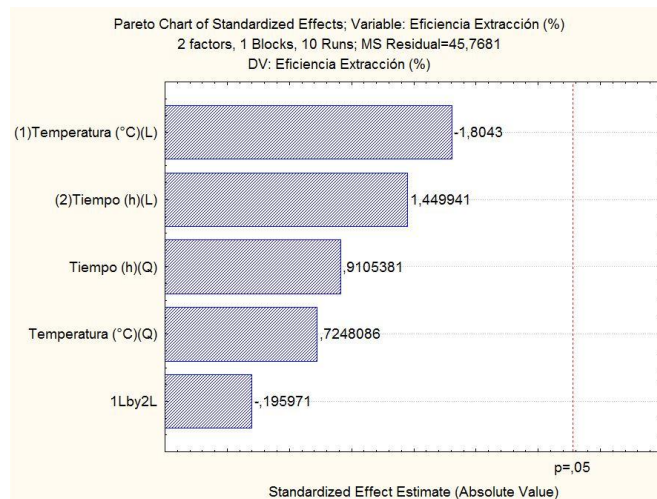
Figura 7. Superficie de respuesta extracción de carbohidratos [Tratamiento alcalino].



Según se observa en la superficie de respuesta (ver figura 7) [donde las zonas de color rojo intenso ubican los valores de recuperación más altos y el tono verde intenso los valores de recuperación más bajos, ambos en el rango de cada variable de acuerdo con relación lineal o cuadrática entre los parámetros de entrada (tiempo y temperatura) y la variable de respuesta (eficiencia de extracción)] la eficiencia de extracción mejora cuando la biomasa se expone a temperatura ambiente (20°C – 30°C) durante periodos de tiempo superiores a 24 horas. Para verificar este comportamiento se generó el diagrama de Pareto (ver figura 8), donde los efectos o interacciones que sobrepasan el valor $P = 0,05$ se considerarán significativos.

El diagrama de Pareto de la figura 8 demostró que las variables tiempo y temperatura del pre-tratamiento térmico no tienen influencia sobre la recuperación de carbohidratos. El comportamiento estadístico de los datos evidenció que la biomasa no requiere ser sometida a procesos de deshidratación que involucren un alto consumo energético. Por lo que se propone utilizar biomasa húmeda hidrolizada bajo condiciones alcalinas como una alternativa frente a la reducción de costos, sin afectar significativamente la recuperación de los metabolitos de interés.

Figura 8. Diagrama de Pareto extracción de carbohidratos [Tratamiento alcalino].



6. RECUPERACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE LA COMPRACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN BIOMASA HÚMEDA Y SECA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis sp.*

6.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas son una alternativa interesante para la obtención de lípidos, gracias a su rápido crecimiento, gran tolerancia al medio de cultivo y facilidad de acumular cantidades importantes de metabolitos (MacDougall *et al.*, 2011). Recientemente, se ha empleado varias cepas de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (entre otras especies) como materia prima, ya que pueden llegar a contener hasta 50% de su peso seco en extractos lipídicos (Chisti, 2007; Mercer & Armenta 2011; Mata *et al.*, 2010).

A nivel de laboratorio se han utilizado métodos de extracción que combinan técnicas de ruptura mecánica con solventes químicos, pasando por métodos más tecnificados como el uso de fluidos supercríticos y extracción asistida con microondas (Lee *et al.*, 2010). La extracción mediante solventes se ha caracterizado por ser un método rápido, eficiente y con buenos resultados en la recuperación de lípidos (98%) (Cheng *et al.*, 2011). Los solventes orgánicos tiene alta selectividad y pueden ser usados en diferentes tipos de biomasa (Ranjan *et al.*, 2010). La eficiencia de los solventes y sus mezclas depende significativamente de la calidad de los lípidos a extraer y del tipo de biomasa. Su principal desventaja está dada por la toxicidad de las sustancias, lo que representa un riesgo tanto para la salud de quien las manipula como para el medio ambiente (Lam & Lee, 2012).

Entre los solventes más utilizados se encuentran el hexano y el etanol; algunos estudios reportan rendimientos superiores al 90% en la extracción de lípidos

utilizando diferentes mezclas de dichas sustancias (Halim *et al.*, 2012). Ciertos autores han llegado a demostrar que la extracción con hexano permite recuperar hasta el 79% de los lípidos trans-esterificables de *Chlorella* y *Scenedesmus sp* (Sathish & Sims, 2012). Otras metodologías basadas en la combinación de solventes teniendo en cuenta su polaridad, como es el caso de la mezcla metanol-cloroformo (Bligh & Dyer, 1959), han sido ampliamente evaluadas para algunos tipos de biomasa (González *et al.*, 2009).

En los procesos de extracción con solvente químico comúnmente se utiliza biomasa deshidratada, debido a que la cristalinidad de las células permite obtener rendimientos de hasta un 85% en la recuperación de los lípidos (Renil, 2010); no obstante y como se había mencionado anteriormente, la etapa de secado representa más del 50% del consumo total de energía en el aprovechamiento de la biomasa. De acuerdo con el estudio de Kanda *et al* (2012) es posible conseguir rendimientos de hasta 40% en la recuperación de los metabolitos. Pese a los resultados, aún no se ha confirmado la validez de la extracción en húmedo para diferentes tipos de lípidos y diferentes géneros de microalgas (Kanda *et al.*, 2013).

Algunos investigadores han comparado las rutas de obtención de metabolitos utilizando biomasa seca y húmeda, encontrando que el contenido de agua logra afectar la ruptura de la pared celular (Kim *et al.*, 2013). Sin embargo, los autores señalan que esta variable aún no ha sido estandarizada, por lo que es preciso considerar las ventajas económicas que tendría eliminar la etapa de secado, especialmente a escala industrial. En este sentido, nace la necesidad de seguir estudiando alternativas para la extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda, teniendo en cuenta la influencia de otras variables en el rendimiento de los procesos. Es por ello, que el presente capítulo analiza la implementación de las metodologías propuestas por Sathish & Sims, (2012) y Bligh & Dyer, (1959), para la extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp*,

utilizando biomasa seca y húmeda. Lo anterior mediante, la ejecución de los diseños experimentales obtenidos para cada una de las metodologías evaluadas.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Diseño experimental. Para determinar el porcentaje de recuperación de lípidos utilizando biomasa húmeda y seca de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.*, se compararon dos metodologías de extracción, la primera propuesta por Sathis & Sims, (2012), donde se emplea hexano como solvente y la segunda, propuesta por Bligh & Dyer (1959), donde el agente extractor corresponde a la mezcla metanol-cloroformo.

- **Método Hexano (Sathis & Sims, 2012)**

La extracción de lípidos mediante el método descrito por Sathis & Sims (2012) se desarrolló siguiendo el diseño experimental de composición central 3³ (tres variables a tres niveles) obtenido a través de la herramienta STATISTICA 7.0 donde se modificaron las variables: masa de la muestra (biomasa), volumen de solvente (hexano) y temperatura del proceso. El software arrojó un total de diecisiete (17) pruebas (ver tabla 5), que fueron ejecutadas por duplicado.

Tabla 5. Diseño de experimental de la extracción con hexano.

Prueba	Biomasa (mg)	Temperatura (°C)	Volumen del solvente (ml)
A	290,33	42,50	5
B	625	42,50	5
C	625	42,50	5
D	625	42,50	5
E	959,66	42,50	5
F	625	42,50	7,67
G	625	42,50	2,32
H	825	60	6,60
I	425	60	3,40
J	425	60	6,60
K	825	60	3,40
L	825	25	3,40
M	825	25	6,60
N	425	25	6,60

Prueba	Biomasa (mg)	Temperatura (°C)	Volumen del solvente (ml)
O	425	25	3,40
P	625	71,78	5
Q	625	13,21	5

- **Método metanol-cloroformo (Bligh & Dyer, 1959)**

La extracción de lípidos mediante el método descrito por Bligh & Dyer (1959), se desarrolló siguiendo el diseño experimental de composición central 4^3 (cuatro variables a tres niveles) obtenido a través de la herramienta STATISTICA 7.0 donde se consideraron las variables: volumen de metanol, volumen de cloroformo, volumen de agua y relación masa de la muestra (biomasa)/volumen de la solución extractora (mezcla: metanol-cloroformo-agua). El software arrojó un total de veintitrés (23) pruebas (ver tabla 6), que fueron ejecutadas por duplicado.

Tabla 6. Diseño de experimental de la extracción con metanol-cloroformo.

Prueba	Biomasa/Solvente (g/L)	Metanol (ml)	Cloroformo (ml)	H ₂ O (ml)
A	5	947	30	23
B	15	947	30	23
C	5	699	22	279
D	15	699	22	279
E	5	526	263	211
F	15	526	263	211
G	5	127	63	810
H	15	127	63	810
I	20	526	263	211
J	10	526	263	211
K	5	526	263	211
L	15	526	263	211
M	5	65	519	416
N	15	65	519	416
O	5	656	328	16
P	15	656	328	16

Prueba	Biomasa/Solvente (g/L)	Metanol (ml)	Cloroformo (ml)	H ₂ O (ml)
Q	5	106	851	43
R	15	106	851	43
S	10	841	88	71
T	10	0	556	444
U	10	667	333	0
V	10	294	147	559
W	10	265	629	106

6.2.2 Medio de cultivo. Los cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis* sp se desarrollaron en recipientes rectangulares de vidrio, con capacidad de 2,5 litros, previamente desinfectados, acoplados a un sistema de aireación por burbujeo constante. El sistema se aisló para evitar la contaminación cruzada. El pH se midió diariamente asegurando valores en el rango 7-8, como un mecanismo de control, debido a que la presencia de otros microorganismos puede modificar este parámetro. La biomasa creció durante 15 días con ciclos de luz y oscuridad 12:12 horas, respectivamente. La composición Bold Basal (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963) del medio estéril, se describió previamente en el numeral 4.2.2.

6.2.2 Extracción de lípidos. La biomasa obtenida después de 15 días de crecimiento, fue concentrada mediante centrifugación a 3400 rpm, durante 15 min. Parte de la biomasa concentrada fue deshidratada mediante pre-tratamiento térmico por 17 horas a 105°C. La porción restante (biomasa húmeda) fue procesada mediante los métodos de extracción comparados, de acuerdo con los diseños experimentales descritos en las tablas 5 y 6.

- **Método Hexano (Sathis & Sims, 2012)**

A un tubo falcón de 25 ml se adicionó la cantidad de biomasa de microalgas, correspondiente a cada una de las pruebas del diseño experimental (ver tabla 5).

Posteriormente, se añadió 1 ml de H₂SO₄ 1M. La mezcla se calentó a 90 °C durante 30 minutos. Seguidamente, se le adicionó 1 ml de NaOH 5M y se calentó a 90 °C durante 30 minutos. Concluida esta etapa, la mezcla se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. El extracto obtenido se reservó con el nombre corriente 1, mientras que la fase sólida se mezcló con 1 ml de agua desionizada y se centrifugó a nuevamente a 3400 rpm por 15 minutos. La fase acuosa producto de esta etapa se mezcló con la corriente 1 y 3 ml de H₂SO₄ 5M. Dicha solución se centrifugó a 3400 rpm por 15 minutos. El precipitado obtenido en la etapa anterior se mezcló con el volumen de hexano correspondiente a cada ensayo del diseño experimental. La muestra se calentó por 15 minutos a la temperatura señalada para cada prueba.

- **Método metanol-cloroformo (Bligh & Dyer, 1959)**

A un tubo falcón de 50 ml se adicionó la cantidad de biomasa de microalgas, correspondiente a cada una de las pruebas del diseño experimental (ver tabla 6). Seguidamente, se añadió 5,7 ml de solución Bligh & Dyer a la concentración de cada ensayo. La mezcla se homogenizó en un vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. El extracto obtenido se reservó con el nombre corriente 1, mientras que la fase obtenida se mezcló nuevamente con 5,7 ml de solución Bligh and Dyer, repitiendo el proceso de homogenización y centrifugación descritos anteriormente. El extracto producto de esta etapa (corriente 2) se mezcló con corriente 1, 3 ml de agua destilada y 3 ml de cloroformo. La solución se homogenizó nuevamente por 3 minutos.

6.2.3 Determinación del contenido de humedad. El contenido de humedad se determinó por gravimetría, tomando una muestra representativa de la biomasa concentrada por centrifugación. La muestra se sometió a una temperatura de 105°C durante 17 horas. El ensayo se realizó por triplicado y se tomó el valor

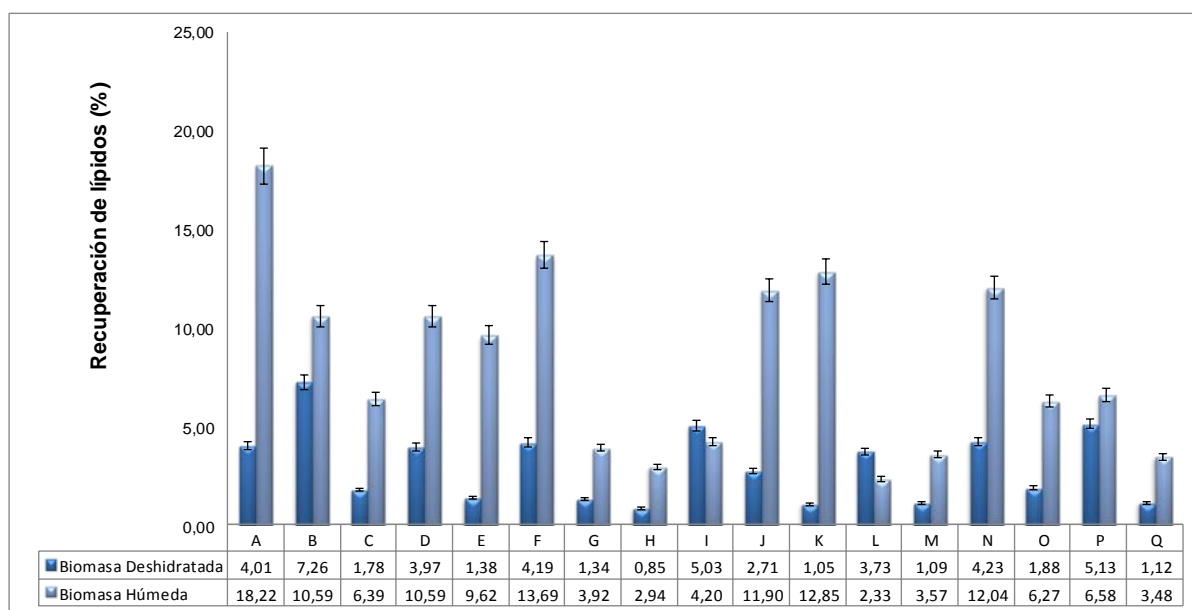
promedio de las tres mediciones como referencia para la determinación del porcentaje de recuperación de lípidos en base seca.

6.2.4 Cuantificación de lípidos. Los extractos lipídicos obtenidos se cuantificaron por gravimetría una vez separados de la fase solvente .A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas las especies *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp*, utilizadas en el presente estudio como fuente de biomasa, pueden acumular en promedio 15% y 23% de lípidos, respectivamente. Estos valores se tomaron como referencia para la cuantificación del metabolito. El cálculo del porcentaje de recuperación de lípidos se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Extracción de lípidos [hexano sathis & sims, 2012]. Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos en *C. vulgaris* (seca y húmeda), mediante la metodología propuesta por Sathis & Sims, 2012, se presentan en la figura 9. El cálculo del porcentaje de recuperación de lípidos se realizó en base seca teniendo en cuenta que el contenido de humedad de la biomasa determinado por gravimetría fue de 73,56%.

Figura 9. Recuperación de Lípidos [Hexano Sathis & Sims 2012].

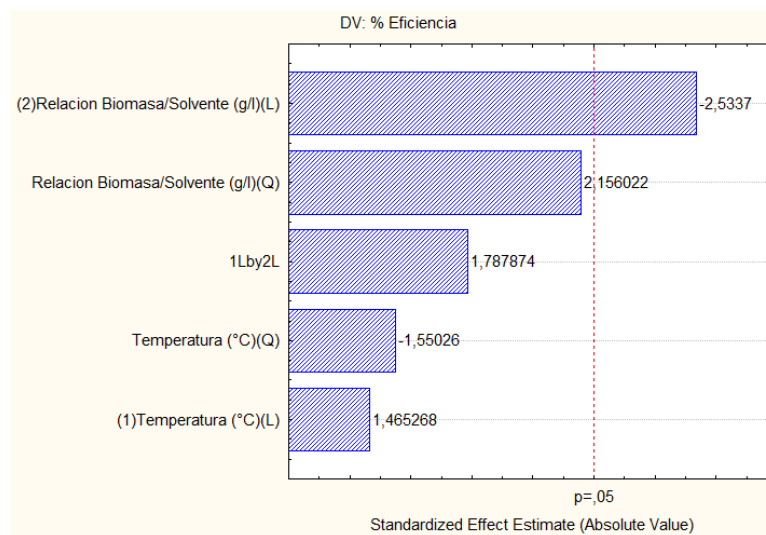


De acuerdo con los resultados presentados en la figura 9, bajo las condiciones del experimento A (290,33 mg de biomasa, 5 ml de solvente y 42,5°C) se recuperó 18,22% del contenido de lípidos, siendo esta la eficiencia más alta de los ensayos ejecutados. Vale la pena resaltar, que la eficiencia del proceso no fue mayor al 20% en ninguno de los experimentos, siguiendo la metodología propuesta por Sathis & Sims, (2012). Los autores reportaron una recuperación del 79%, para cultivos mixtos de *Chlorella* y *Scenedesmus sp*, utilizando biomasa con una

humedad promedio de 84%. Otros estudios aseguran poder duplicar la eficiencia de la extracción de lípidos en *Chlorella salina*, empleando solventes alternativos al hexano como 2-etoxi etanol (2-EE) (Jones *et al*, 2012).

A partir de los datos obtenidos (figura 9) con biomasa húmeda se realizó el análisis estadístico de la influencia que tienen las variables del diseño experimental sobre el porcentaje de recuperación de lípidos, utilizando la metodología propuesta por Sathis & Sims, (2012). Los resultados de esta evaluación se presentan en el diagrama de Pareto de la figura 10, donde se muestra el valor absoluto de los efectos con respecto al nivel de significancia ($P = 0,05$). Los efectos o interacciones que sobrepasan este valor se considerarán significativos. El comportamiento de la variable respuesta se analiza mediante la relación lineal (L) y/o cuadrática (Q) de los datos de entrada.

Figura 10. Diagrama de Pareto, resultados *Chlorella vulgaris* húmeda [Hexano Sathis & Sims 2012].

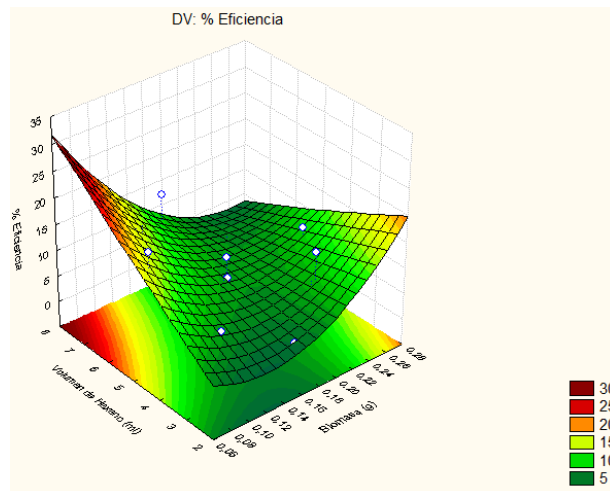


El análisis estadístico evidenció que la relación (g/L) entre la biomasa y el solvente representa la variable con mayor influencia en la eficiencia de la extracción a partir de *Chlorella vulgaris* húmeda, utilizando la metodología propuesta por Sathis &

Sims, (2012). Lo anterior, teniendo en cuenta que dicha relación sobrepasa el umbral de significancia de $P = 0,05$, en la correlación lineal de los datos. Por su parte, la temperatura no muestra una influencia significativa en la eficiencia del proceso analizado. No obstante, algunos autores aseguran que a temperaturas superiores al punto de ebullición de los solventes se consigue recuperar una mayor cantidad de lípidos a partir de biomasa de microalgas (*Scenedesmus acutus*) bajo condiciones de alta presión (Shin *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta el análisis estadístico de los datos, en la figura 11 se presenta la superficie de respuesta, donde las zonas de color rojo intenso ubican los valores de recuperación más altos y el tono verde intenso los valores de recuperación más bajos, ambos en el rango de cada variable de acuerdo con relación lineal o cuadrática entre los parámetros de entrada (cantidad de biomasa y volumen de solvente) y la variable de respuesta (eficiencia de extracción), de acuerdo con el diseño de experimentos de la metodología Hexano Sathis & Sims (2012).

Figura 11. Superficie de respuesta extracción de lípidos [Hexano Sathis & Sims 2012].

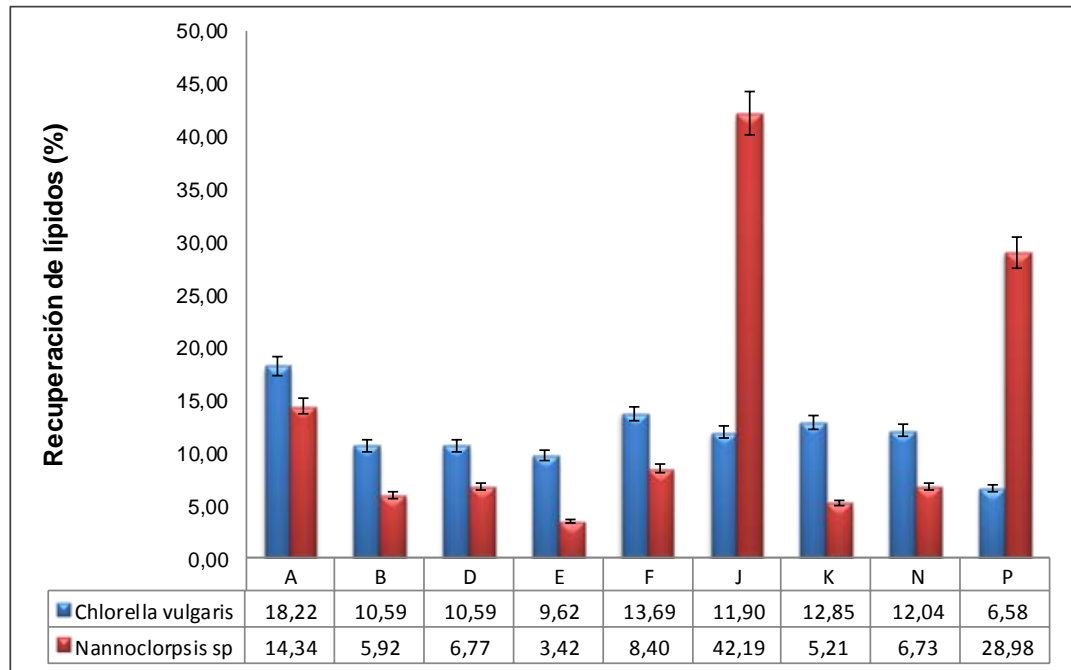


El comportamiento de las variables analizadas (ver figura 11) demostró que la extracción de lípidos a partir de *C. vulgaris* húmeda utilizando la metodología propuesta por Sathis & Sims (2012), está directamente influenciada por el volumen

de solvente (hexano). Dado lo anterior, es válido afirmar que la eficiencia del proceso incrementa cuando la relación biomasa/solvente es disminuye.

Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos en *Nannochloropsis Sp* húmeda, siguiendo la metodología propuesta por Sathis & Sims, (2012), se presentan en la figura 12, donde también se comparan las eficiencias obtenidas con *C. vulgaris* húmeda. El cálculo del porcentaje de recuperación de lípidos se realizó en base seca teniendo en cuenta que el contenido de humedad de la biomasa determinado por gravimetría fue de 73,56%.

Figura 12. Recuperación de Lípidos en biomasa húmeda [Hexano Sathis & Sims, 2012].

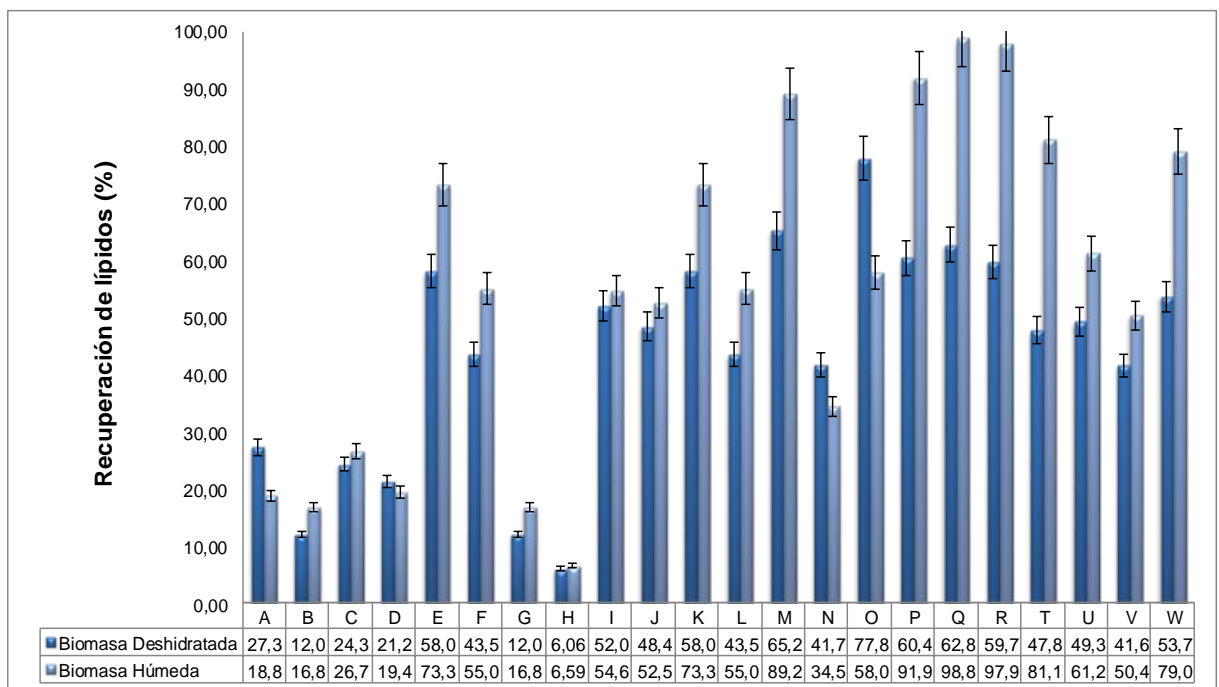


Como se observa en la figura 12 las condiciones de los experimentos J (425 mg de biomasa, 6,60 ml de solvente a 60°C) y P (625 mg de biomasa, 5 ml de solvente a 13,21°C), permitieron recuperar 42,19% y 28,98% del extracto lipídico, respectivamente, a partir de *Nannochloropsis Sp* húmeda. Superando incluso los resultados obtenidos para los mejores experimentos de *Chlorella vulgaris* húmeda.

Es posible que el incremento en la eficiencia del proceso este determinada tanto por la relación biomasa/solvente como por la temperatura de las pruebas, tal y como lo señalan Shin *et al.*, (2014) en su estudio.

6.3.2 Extracción de lípidos [metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959]. Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos en *C. vulgaris* (seca y húmeda), mediante la metodología propuesta por Bligh & Dyer, 1959, se presentan en la figura 13. El cálculo del porcentaje de recuperación de lípidos se realizó en base seca teniendo en cuenta que el contenido de humedad de la biomasa determinado por gravimetría fue de 71,48%.

Figura 13. Recuperación de Lípidos [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].

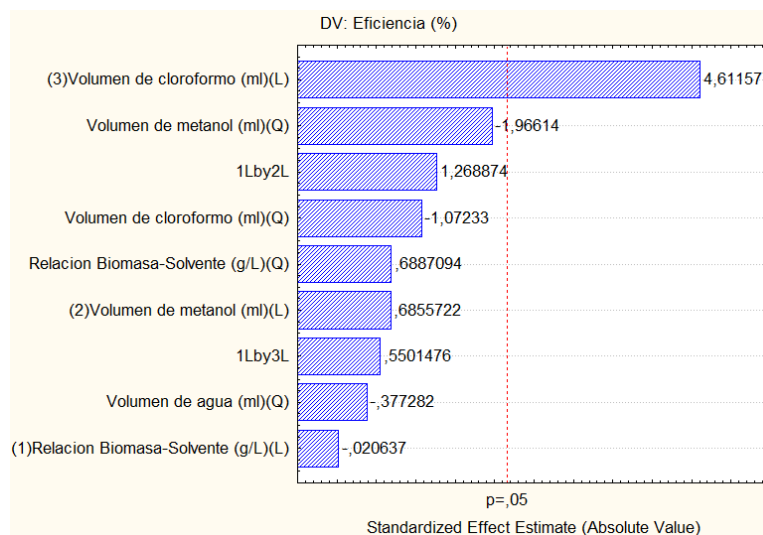


De acuerdo con los resultados de la figura 13, es válido señalar que para la mayoría de los experimentos realizados, la extracción con biomasa húmeda (*C. vulgaris*) reportó una recuperación de lípidos superior a 30%, utilizando la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959). Es importante mencionar que bajo las condiciones de la prueba Q (relación biomasa/solvente de 5g/L, 106 ml de metanol, 851 ml de cloroformo y 43 ml de agua), se recuperó 97% del el extracto lipídico. Ciertos estudios comparan la eficiencia del método con otros solventes. Kanda *et al.*, (2012), por ejemplo, reportan una eficiencia del 97% en la

recuperación de lípidos a partir de cultivos mixtos de 5 especies de microalgas, utilizando di-metil éter y biomasa con un contenido de humedad de 85%.

A partir de los datos obtenidos (figura 13) con biomasa húmeda (*C. vulgaris*), se realizó el análisis estadístico de la influencia que tienen las variables del diseño experimental sobre el porcentaje de recuperación de lípidos, utilizando la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959). Los resultados de esta evaluación se presentan en el diagrama de Pareto de la figura 14, donde se muestra el valor absoluto de los efectos con respecto al nivel de significancia ($P = 0,05$). Los efectos o interacciones que sobrepasan este valor se considerarán significativos. El comportamiento de la variable respuesta se analiza mediante la relación lineal (L) y/o cuadrática (Q) de los datos de entrada

Figura 14. Diagrama de Pareto, *Chlorella vulgaris* húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].



El análisis estadístico (ver figura 14) evidenció que el volumen de cloroformo (ml) corresponde a la variable con mayor influencia en la recuperación de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* húmeda, utilizando la metodología propuesta por Bligh

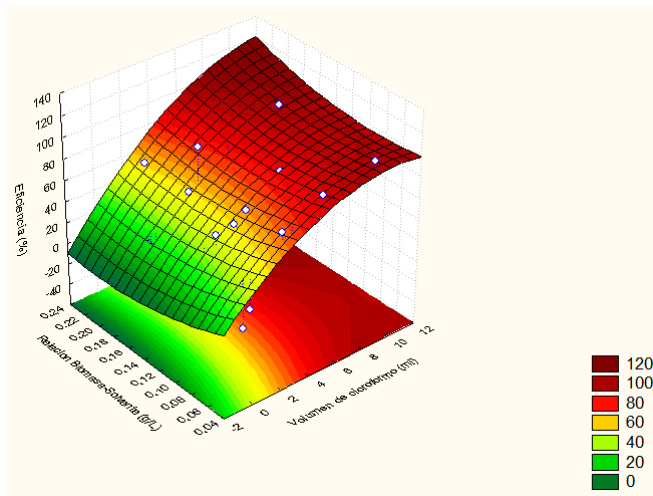
& Dyer, (1959). Lo anterior, teniendo en cuenta que dicha variable sobrepasa el umbral de significancia de $P = 0,05$, en la correlación lineal de los datos.

Los resultados del diagrama (ver figura 14) indicaron que al incrementar el volumen de cloroformo en la relación de concentración del solvente, aumenta el porcentaje de recuperación del extracto lipídico. Un estudio de dos Santos et al., (2015), indicó que al variar la concentración del cloroformo en la relación ya conocida del método (Bligh & Dyer, 1959), aumenta la eficiencia del proceso, frente a la extracción de lípidos a partir de *C. vulgaris* liofilizada. Yao et al., (2012) señalaron que a mayor concentración de alcohol isopropílico (agente extractor), se obtenían mejores resultados en la recuperación de lípidos a partir de *Nannochloropsis sp.*

Teniendo en cuenta el análisis estadístico de los datos, en la figura 15 se presenta la superficie de respuesta, donde las zonas de color rojo intenso ubican los valores de recuperación más altos y el tono verde intenso los valores de recuperación más bajos, ambos en el rango de cada variable de acuerdo con relación lineal o cuadrática entre los parámetros de entrada (relación biomasa/solvente y volumen de solvente) y la variable de respuesta (eficiencia de extracción), de acuerdo con el diseño de experimentos de la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959).

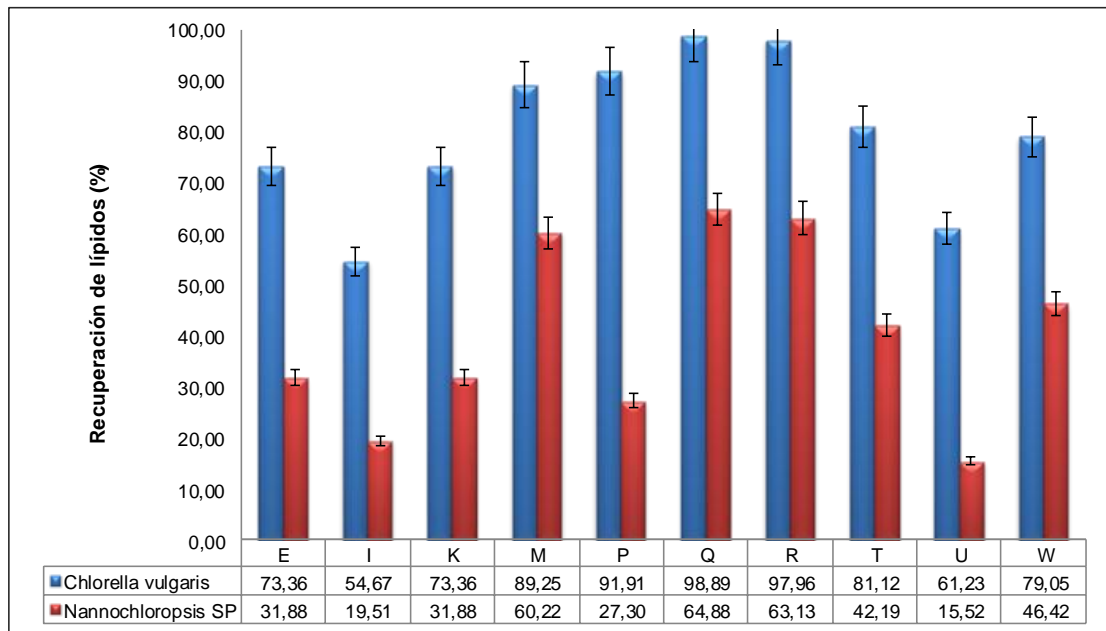
El comportamiento de las variables analizadas (ver figura 15) evidenció que la extracción de lípidos a partir de *C. vulgaris* húmeda, utilizando la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959), está directamente influenciada por el volumen de cloroformo en la relación de mezcla (solvente). Así mismo, es válido señalar que la eficiencia del proceso mejora cuando la relación biomasa/solvente disminuye.

Figura 15. Superficie de respuesta, *Chlorella vulgaris* húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].



Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos en *Nannochloropsis sp* húmeda, siguiendo la metodología propuesta por Bligh & Dyer (1959), se presentan en la figura 17, donde también se compraran las eficiencias obtenidas con *C. vulgaris* húmeda.

Figura 16. Recuperación de Lípidos en biomasa húmeda [Metanol-cloroformo Bligh & Dyer, 1959].



Los resultados de la figura 17, demuestran que siguiendo la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959), se obtienen mejores resultados en la recuperación de lípidos a partir de biomasa húmeda de *Chlorella vulgaris*. Así mismo, bajo las condiciones del experimento Q (relación biomasa/solvente de 5g/L, 106 ml de metanol, 851 ml de cloroformo y 43 ml de agua), es posible recuperar hasta el 64,88% del extracto lipídico de *Nannochloropsis sp.* Pese a los buenos resultados obtenidos con la mezcla método metanol-cloroformo, es válido señalar que la solución extractora utilizada es poco selectiva comparada con otros solventes. Dos Santos *et al.*, (2015), plantean la posibilidad de sobreestimar la cantidad de lípidos debido a la presencia de impurezas como: clorofilas, carotenoides, hidrocarburos, aldehídos, fosfolípidos y glicolípidos. Lo anterior, podría incrementar el costo del proceso, dada la necesidad de purificar el extracto obtenido para separar las fases de interés.

Los resultados obtenidos evidencian la viabilidad de aplicación de los métodos comparados utilizando biomasa de microalgas con un porcentaje de humedad promedio de 74%. Esto representa una disminución considerable del consumo energético, dada la eliminación de la etapa de secado en el proceso de pre-tratamiento. Por otra parte y conociendo el grado de toxicidad de los solventes, se recomienda estudiar la posibilidad de recuperar las corrientes de extracción para incrementar el grado de confiabilidad de los procedimientos y disminuir su impacto tanto a la salud como al medio ambiente.

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

7.1 INTRODUCCIÓN

La cosecha biomasa constituye entre el 20 y el 30% de los costos totales de la producción de biomasa a partir de microalgas (Mata *et al.*, 2010). 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 (Rwehumbiza *et al.*, 2012). Estas consideraciones hacen que la cosecha sea un factor crítico en el escalado de los procesos (Molina Grima *et al.*, 2012). 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 (Villareyes *et al.*, 2011). Lo anterior conlleva a la búsqueda de un método de cosecha que permita la separación eficiente de las células del medio de cultivo, manteniendo su integridad (Yusoff *et al.*, 2009). Uno de los métodos más utilizados para concentrar la biomasa de microalgas a nivel de laboratorio, es la centrifugación (Molina Grima *et al.*, 2012). En escalas industriales, la centrifugación se utiliza en la obtención de compuestos bio-activos de alto costo (Ramírez *et al.*, 2009). Sin embargo, este método de cosecha tiene algunas limitaciones, debido a que las células son expuestas a esfuerzos cortantes y altas fuerzas gravitacionales, que pueden ocasionar daño en su estructura (Knuckey, 1998). Adicionalmente, la centrifugación de volúmenes grandes de cultivo incrementa los costos de mantenimiento, sobre todo en ambientes salinos (Robles *et al.*, 2003).

Entre los procesos de cosecha estudiados se plantea la floculación como una alternativa más económica y amigable en términos de consumo energético

(Poleman *et al.*, 1997). La floculación puede ser menos sensible al tamaño y forma de las microalgas (Davis, 2011), permite el manejo de volúmenes grandes de cultivo en forma rápida y con bajo costo energético (Yoon *et al.*, 2001). Adicionalmente, las células concentradas por floculación mantienen su estructura preservando los metabolitos de interés (Robert *et al.*, 2006). La floculación se define como la unión de sólidos suspendidos para formar conglomerados compactos de muy baja rigidez (Robert *et al.*, 2006). Al agregar el floculante sobre el medio de cultivo, los iones solubles invierten la carga de las partículas en suspensión, eliminando la repulsión electrostática y haciendo que se formen partículas más grandes que precipitan por acción de la gravedad (Vandamme *et al.*, 2013).

Existen diversos tipos de floculantes, los polímeros de poliacrilamida, por ejemplo, son eficientes en agua dulce pero no funcionan en corrientes marinas debido a la concentración de sal (Sukenik *et al.*, 1998). 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 (Vandamme *et al.*, 2013). Otra alternativa es la basificación del medio de cultivo alterando su pH, la desventaja de esta técnica es la precipitación de compuestos orgánicos y metales junto con la biomasa (Yin *et al.*, 2010). Por su parte las sales metálicas como el cloruro de aluminio o cloruro férrico son compuestos ampliamente utilizadas en el tratamiento de agua y en la industria minera. El uso de estas sustancias se perfila como una opción interesante frente a la recuperación de la biomasa de microalgas (Zhang *et al.*, 2012). Además, la salinidad del medio no afecta la eficiencia de remoción y es posible implementar su uso combinado con biopolímeros (Yin *et al.*, 2010). A pesar de dichas ventajas, existen pocos estudios sobre los posibles efectos de estos elementos en la cantidad y calidad de los metabolitos extraídos a partir de microalgas (Zhao *et al.*, 2013). Robert *et al.*, (2006), encontraron una disminución en la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos en biomasa floculada, utilizando un medio básico como agente extractor a 100°C y la mezcla metanol-

cloroformo. Villarreyes *et al*, (2011), encontraron diferencias en la composición de ácidos grasos en *Nannochloropsis* y *Thalassiosira weissflogii* floculada, utilizando poliacrilamida como aglomerante. Los autores aseguran que los floculantes actúan como una trampa para lípidos complejos. Bajo este escenario, el presente capítulo evalúa el efecto de la floculación sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos, utilizando cloruro de aluminio ($AlCl_3$) como agente coagulante, a un pH neutro, sobre cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.*

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 Medio de cultivo. Los cultivos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis* sp se desarrollaron en recipientes rectangulares de vidrio, con capacidad de 2,5 litros, previamente desinfectados, acoplados a un sistema de aireación por burbujeo constante. El sistema se aisló para evitar la contaminación cruzada. El pH se midió diariamente asegurando valores en el rango 7-8, como un mecanismo de control, debido a que la presencia de otros microorganismos puede modificar este parámetro. La biomasa creció durante 15 días con ciclos de luz y oscuridad 12:12 horas, respectivamente. La composición Bold Basal (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963) del medio estéril, se describió previamente en el numeral 4.2.2.

7.2.2 Cosecha de la biomasa. Con base en la metodologías desarrolladas por el CIDES, parte de la biomasa producida se concentró siguiendo el procedimiento descrito por Mena & Ortegón, (2014), donde se utiliza cloruro de aluminio a una concentración de 40g/L, adicionando 1,25 ml de la solución por cada 100 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se ajustó el pH en 7,00 para que el proceso de floculación se pudiera llevar a cabo. La porción de biomasa restante se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. Finalmente, tanto la biomasa floculada, como la concentrada mediante centrifugación, se sometieron a un proceso de deshidratación a una temperatura de 105°C por 17 horas.

7.2.3 Hidrólisis ácida [HCL]. El proceso de hidrólisis ácida se llevó a cabo adicionando 5 gramos de biomasa y 50 mililitros de ácido clorhídrico de concentración 0,5 molar. La mezcla se agitó continuamente a 500 rpm durante 2 horas (Kafarov et al., 2010). Una vez concluido el tiempo de reacción se adicionó gradualmente solución de KOH de concentración 1,0 molar, hasta neutralizar la mezcla. Posteriormente, se realizó la separación y filtrado del licor (rico en carbohidratos) y la biomasa hidrolizada.

7.2.4 Tratamiento básico [NaOH]. La reacción de hidrólisis básica se llevó a cabo agregando 5 gramos de biomasa y 30 mililitros de NaOH de concentración 3,67 molar, por cada gramo de biomasa. La mezcla se calentó durante 20 minutos utilizando un baño termostataado a 55 °C (Ayala Torres & Reyes Gómez, 2014). Una vez concluido el tiempo de reacción, se realizó la separación y filtrado del licor (rico en carbohidratos y proteínas) y la biomasa hidrolizada (pellet).

7.2.5 Cuantificación de carbohidratos. Para determinar el contenido de carbohidratos, como concentración de glucosa, en el licor producto de la hidrólisis ácida, se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). El procedimiento consistió en mezclar 1 mililitro de la muestra con 0,5 mililitros de fenol al 5% y 2,5 mililitros de ácido sulfúrico al 95%. Una vez revelado el color de la solución se realizó la medición de la absorbancia a 485 nm (longitud de onda), utilizando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). La concentración de glucosa en el extracto se cuantificó mediante la curva de concentración estandarizada a partir del reactivo grado analítico: D(+) Glucosa (Merck, CAS: 14431-43-7).

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas las especies *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp*, utilizadas en el presente estudio como fuente de biomasa, pueden acumular en promedio 35% y 37% de carbohidratos, respectivamente. Estos valores se tomaron como referencia para la cuantificación del metabolito.

7.2.6 Cuantificación de proteínas. El contenido de proteínas en el extracto obtenido se determinó utilizando el método descrito por Lowry et al., (1951). El procedimiento consistió en mezclar 1 mililitro de la muestra con 1,4 mililitros de solución Lowry. La solución se homogenizó durante 5 minutos y se mantuvo en

reposo por 15 minutos adicionales, concluida esta etapa, se añadió 0,2 mililitros de solución Folin-agua y se dejó reaccionar hasta la revelación del color (30 minutos). Posteriormente, se determinó el contenido de proteínas mediante la curva de calibración, previamente estandarizada a partir del reactivo de albúmina grado analítico. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 750 nanómetros utilizando un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck). El cálculo del porcentaje de recuperación de proteínas se realizó en base seca teniendo en cuenta el contenido de humedad determinado por gravimetría para cada muestra.

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas las especies *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp*, utilizadas en el presente estudio como fuente de biomasa, pueden acumular en promedio 50% y 30% de proteínas, respectivamente. Estos valores se tomaron como referencia para la cuantificación del metabolito.

7.2.7 Cuantificación de lípidos. La cuantificación de lípidos se realizó por gravimetría, después de someter la biomasa hidrolizada mediante los tratamientos ácido y alcalino, a un proceso de extracción soxhlet. El montaje consta de matraz, un tubo soxhlet, un condensador y una manta de calentamiento con control de temperatura. Se utilizaron 250 mililitros de hexano como solvente. El extracto lipídico obtenido se separó del solvente en un roto-evaporador, seguidamente se realizó el procedimiento de pesaje para determinar la recuperación de lípidos.

A partir de resultados de caracterización obtenidos previamente en trabajos realizados por el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES), se encontró que bajo las condiciones de cultivo implementadas las especies *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp*,

utilizadas en el presente estudio como fuente de biomasa, pueden acumular en promedio 15% y 23% de lípidos, respectivamente.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

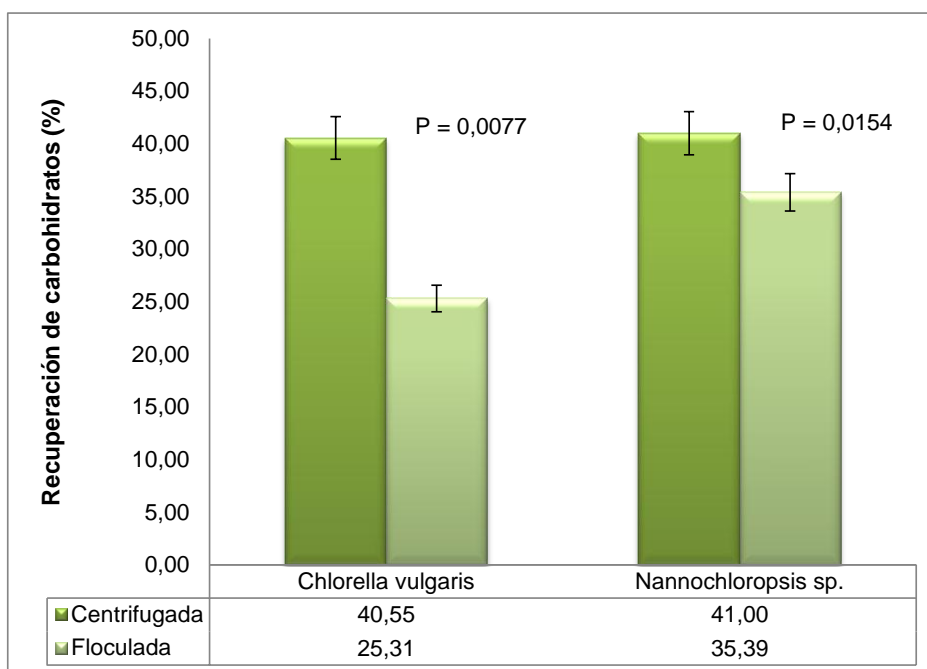
Los experimentos de extracción de metabolitos entre los dos tipos de biomasa analizados (centrifugada y floculada) se ejecutaron por triplicado. El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante la prueba T ($n = 3$), donde las medias de los datos se consideran significativamente diferentes cuando el valor P determinado es menor o igual a 0,05.

7.3.1 Extracción de carbohidratos.

- **Tratamiento ácido (HCl)**

Los resultados correspondientes a la extracción de carbohidratos, mediante hidrólisis ácida (HCl) a partir de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (floculada y centrifugada) se presentan en la figura 17.

Figura 17. Recuperación de carbohidratos [hidrólisis ácida HCl].



Según se observa en la figura 17 se recuperó un 40,55% del contenido de carbohidratos en biomasa centrifugada y 25,31% en biomasa floculada, de *C. vulgaris* bajo condiciones de extracción ácida. En el caso de *Nannochloropsis sp*, la eficiencia del proceso fue de 62,80% en biomasa centrifugada y 58%, biomasa floculada. El análisis de los datos mediante la prueba T indicó que la diferencia entre las medias de los valores obtenidos es significativa. Lo anterior, debido a que el valor P es menor a 0,05. Los resultados obtenidos evidencian que el floculante afecta el rendimiento de la hidrólisis ácida en la extracción de carbohidratos a partir de biomasa de microalgas. Es importante tener en cuenta que la biomasa fue previamente deshidratada a 105°C por 17 horas. De acuerdo con las consideraciones expuestas en los numerales 4.3.1 y 5.3.2, se recomienda evaluar el efecto del floculante utilizando biomasa húmeda, para determinar la influencia de la temperatura (del pre-tratamiento térmico) sobre el rendimiento del proceso.

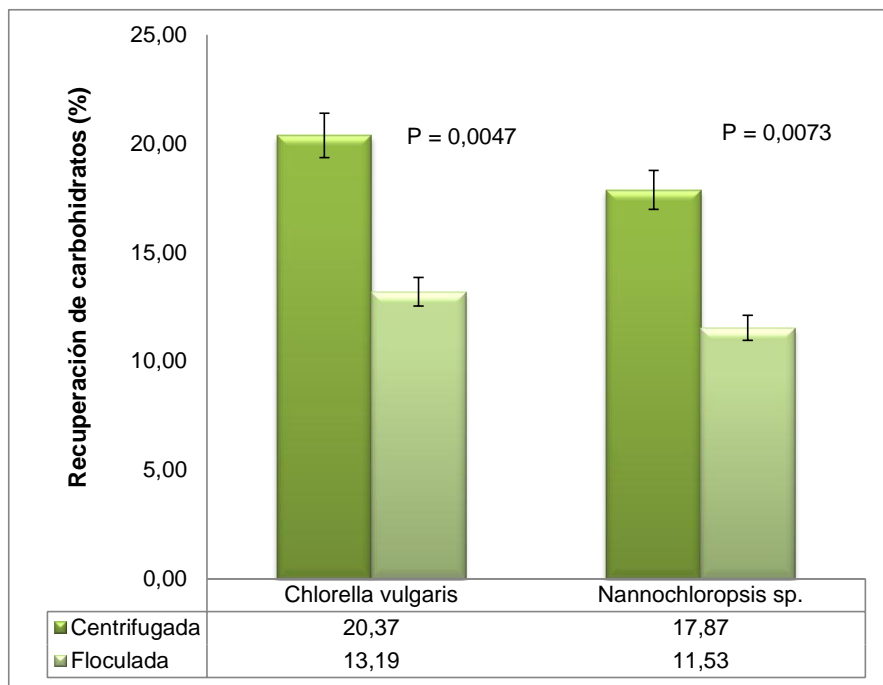
- **Tratamiento alcalino (NaOH)**

Los resultados correspondientes a la extracción de carbohidratos, mediante tratamiento básico (NaOH) a partir de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (floculada y centrifugada) se presentan en la figura 18.

Los resultados obtenidos en *C. vulgaris* (ver figura 18) señalan un rendimiento de 20,37% y 13,19% en la recuperación de carbohidratos a partir de biomasa centrifugada y floculada, respectivamente. En el caso de *Nannochloropsis sp*, fue posible extraer 17,87% de los carbohidratos en biomasa centrifugada y 11,53% en biomasa floculada, siguiendo la ruta de hidrólisis alcalina. Notablemente la eficiencia del proceso disminuyó al utilizar floculante en el medio de cultivo. La prueba T indicó que la diferencia entre las medias de los valores obtenidos es significativa. Lo anterior, debido a que el valor P es menor a 0,05. El comportamiento estadístico de los datos confirmó la desviación del valor esperado, señalando el efecto negativo del floculante en la reacción de hidrólisis

con NaOH. Teniendo en cuenta que la biomasa es previamente deshidratada a 105°C por 17 horas, vale la pena determinar la influencia de la temperatura durante el pre-tratamiento térmico, sobre el rendimiento de la extracción a partir de biomasa cosechada por floculación.

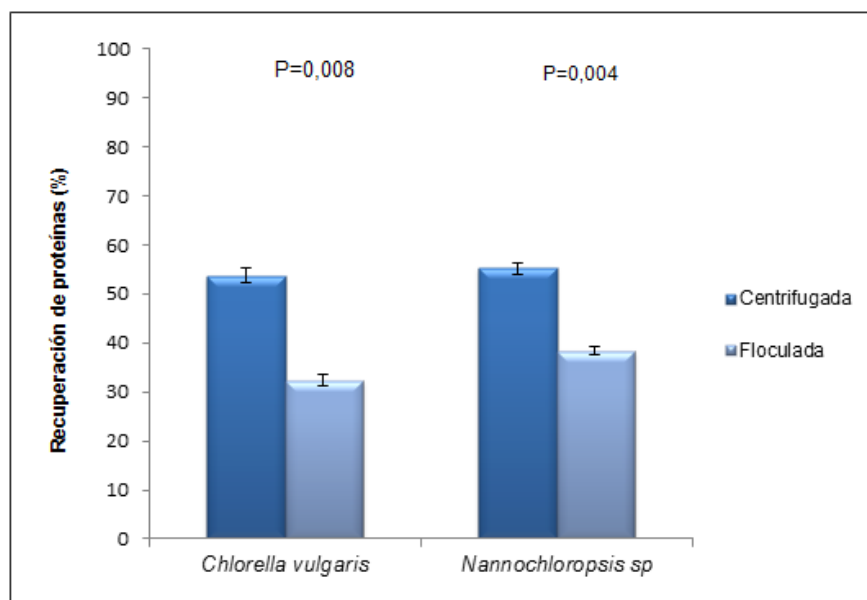
Figura 18. Recuperación de carbohidratos [tratamiento básico NaOH].



En comparación con los resultados obtenidos mediante hidrólisis ácida, el tratamiento alcalino, tuvo una menor eficiencia frente a la recuperación de carbohidratos. Robert *et al.*, (2006) señalaron que el rendimiento de la extracción puede disminuir hasta un 23,17%, para *T.Pseudonana* floculada, utilizando un tratamiento alcalino (NaOH 1M, a 100°C por 10 minutos).

7.3.2 Extracción de proteínas. Los resultados correspondientes a la extracción de proteínas, mediante tratamiento básico (NaOH) a partir de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (floculada y centrifugada) se presentan en la figura 19.

Figura 19. Recuperación de proteínas [tratamiento básico NaOH].



Los resultados obtenidos en *C. vulgaris* (ver figura 19) indican una eficiencia de 53,75% en la recuperación de proteínas a partir de biomasa centrifugada y 32,27% en biomasa floculada. Para el caso de *Nannochloropsis sp.*, el rendimiento del proceso alcanzó un 55,48% en biomasa centrifugada y 38,40% en biomasa floculada, siguiendo la ruta de extracción alcalina. Los valores reportados señalan que el uso de floculante en el medio de cultivo, tiene un efecto negativo sobre la recuperación de las proteínas. Esta hipótesis se valida mediante el análisis estadístico de los datos, donde la diferencia entre las medias se considera significativa, debido a que $p < 0,05$. Ciertos autores confirman el efecto inhibitor de los floculantes en la extracción de proteínas mediante hidrólisis alcalina (NaOH 1M a 100°C). Según Robert *et al.*, (2006) la eficiencia del proceso puede disminuir casi un 30% al utilizar cloruro férrico para concentrar *T. pseudonana*. Contrariamente, Prasertsan *et al.*, (2015) aseguran poder recuperar hasta un 52,9% del contenido de proteínas en *Chlorella sp.*, utilizando sulfato de aluminio y potasio en el medio de cultivo. Como se mencionó anteriormente (ver numeral 4.3.1), la hidrólisis ácida (HCl) puede degradar gran parte de los aminoácidos

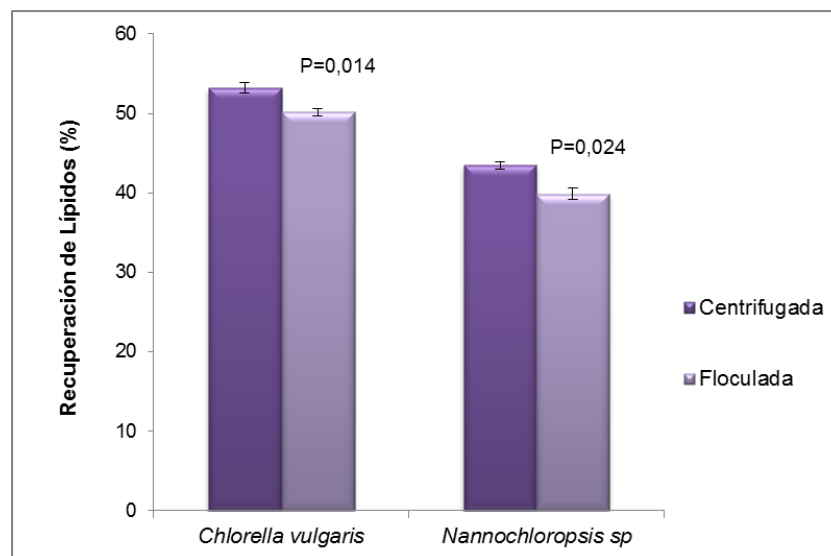
presentes en la biomasa. Por esta razón no se cuantificó la extracción de proteínas mediante dicha ruta.

7.3.3 Extracción de lípidos.

- **Tratamiento ácido (HCl)**

Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos, a partir de biomasa hidrolizada mediante tratamiento ácido (HCl) de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (floculada y centrifugada) se presentan en la figura 20.

Figura 20. Recuperación de lípidos [Biomasa hidrolizada mediante tratamiento ácido HCl].



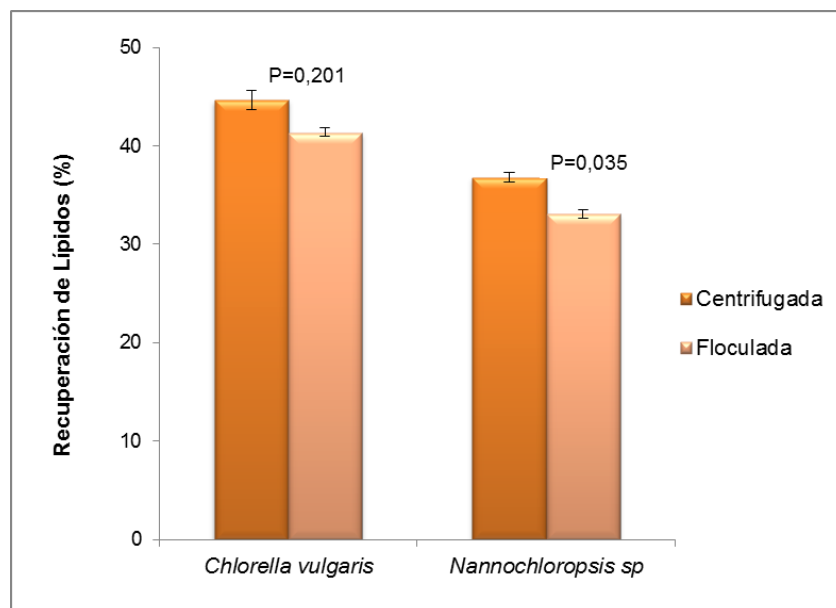
En la figura 20 se observa que al utilizar *C. vulgaris* hidrolizada mediante tratamiento ácido, se logra recuperar un 54,2% del extracto lipídico en biomasa centrifugada y 51% en biomasa floculada. El resultado de la prueba T para el tratamiento estadístico de los datos presentó una diferencia significativa entre las medias de las muestras analizadas, donde $P < 0,05$. Lo anterior, indica que la presencia de floculante disminuye el rendimiento de la extracción. En el caso de *Nannochloropsis sp* la eficiencia del proceso alcanzó un 43,45% en biomasa

centrifugada y 39,85 en biomasa floculada. El valor P calculado (0,024) señaló una diferencia significativa en el comportamiento de los datos, al utilizar floculante como medio de concentración de la biomasa. En contraste a los resultados obtenidos, algunos estudios reportan rendimientos de hasta 60% en la recuperación del contenido lipídico partir de *Nannochloropsis salina* siguiendo la ruta ácida (5% de H₂SO₄) y utilizando hexano como agente extractor (Talukder *et al.*, 2012). En este sentido, se recomienda evaluar el efecto del floculante en biomasa producida bajo diferentes condiciones de cultivo y considerar otras rutas de hidrólisis durante la etapa de pre-tratamiento.

- **Tratamiento alcalino (NaOH)**

Los resultados correspondientes a la extracción de lípidos, a partir de biomasa hidrolizada mediante tratamiento básico (NaOH) de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp* (floculada y centrifugada) se presentan en la figura 21.

Figura 21. Recuperación de lípidos [Biomasa hidrolizada mediante tratamiento básico NaOH].



En la figura 21 se observa que al utilizar *C. vulgaris* hidrolizada mediante tratamiento básico, es posible recuperar hasta un 44,67% de lípidos en biomasa centrifugada y 40,89% en biomasa floculada. El resultado de la prueba T, correspondiente al análisis estadístico de los datos, indicó que la diferencia entre las medias no es significativa, debido a que $P > 0,05$, por lo que se infiere que el floculante utilizado en el medio de cultivo no afecta el rendimiento del proceso. En contraste, para *Nannochloropsis sp* la eficiencia del proceso fue ligeramente inferior (36,81% en biomasa centrifugada y 33,03% en biomasa floculada). El valor P calculado ($< 0,05$) señaló una diferencia significativa entre los dos tipos de muestra. Es válido mencionar que el rendimiento de la extracción también depende de la selectividad y la naturaleza del solvente. El hexano es una sustancia no polar, esta característica le permite tener una mayor afinidad hacia lípidos no polares y anfipáticos. De acuerdo con Bellou & Aggelis (2013) *C. vulgaris* acumula hasta un 92% de lípidos no polares, mientras que *Nannochloropsis* un 70%. Es importante tener en cuenta que las condiciones de cultivo (luz, disponibilidad de nutrientes, fuentes de carbono, entre otras) pueden modificar la actividad metabólica de las células y por consiguiente la acumulación de ciertos metabolitos (Cuellar-Bermudes *et al.*, 2014).

8. CONCLUSIONES

- El análisis estadístico de los datos obtenidos permitió demostrar que las variables $T(^{\circ}\text{C})$ y $t(\text{h})$ del pre-tratamiento térmico no influyen de manera significativa sobre la eficiencia del proceso de extracción. Esto indica que utilizando biomasa sin pre-tratamiento térmico, con un contenido de humedad promedio de 73%, es posible recuperar 41,96% de los carbohidratos de *C. vulgaris*, mediante hidrólisis ácida (HCl 0,5M).
- El tratamiento alcalino (NaOH 3,67M, a 55 °C) evaluado, permitió recuperar el 71% de las proteínas y 49,77% de carbohidratos, a partir de *Chlorella vulgaris* con un contenido de humedad promedio de (71%). Lo que representa una disminución del consumo energético de hasta 1,6 kilovatios por hora, a nivel de laboratorio.
- Dados los resultados del análisis estadístico se infiere que la obtención de proteínas a partir de *C. vulgaris*, no es altamente dependiente de las condiciones de secado de la biomasa y por consiguiente de su contenido de humedad. Por lo que se propone utilizar biomasa húmeda en condiciones alcalinas como una alternativa frente a la reducción del gasto energético, sin afectar significativamente la recuperación de los metabolitos de interés.
- Bajo las condiciones del experimento A (290,33 mg de biomasa, 5 ml de solvente y 42,5°C), se recuperó el 18,22% de los lípidos en *Chlorella vulgaris*, con un contenido de humedad promedio de 74%, utilizando hexano como agente extractor. El comportamiento estadístico de las variables analizadas, demostró que la extracción de lípidos está directamente influenciada por el volumen de solvente (hexano).

- Bajo las condiciones del experimento J (60°C y 64,40g/L de biomasa/solvente), utilizando Hexano como agente extractor, se recuperó el 42,19% del contenido de lípidos en *Nannochloropsis Sp*, con una humedad promedio de 74%.
- Utilizando una mezcla de metanol:cloroformo:agua (106:851:43 ml) y una relación 5g/L (biomasa/solvente), es posible recuperar 97% del extracto lipídico, a partir de *Chlorella vulgaris* con un contenido de humedad promedio de 71%. El análisis estadístico de las variables evaluadas, demostró que la extracción de lípidos a partir de *C. vulgaris* húmeda, utilizando la metodología propuesta por Bligh & Dyer, (1959), está directamente influenciada por el volumen de cloroformo.
- El floculante tiene un efecto negativo sobre la recuperación de los carbohidratos, proteínas y lípidos, disminuyendo considerablemente la eficiencia del proceso. Teniendo en cuenta que la biomasa es previamente deshidratada a 105°C por 17 horas, vale la pena determinar la influencia de la temperatura durante el pre-tratamiento térmico, sobre el rendimiento de la extracción a partir de biomasa cosechada por floculación.

9. RECOMENDACIONES

- A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se recomienda integrar el estudio económico, el análisis de ciclo de vida y el análisis exergético, en el escalamiento de los procesos de extracción, mediante herramientas computacionales de simulación.
- Considerando que la producción de microalgas en agua dulce es un sistema insostenible, dada la disponibilidad del recurso y la importancia de su conservación, se recomienda evaluar las condiciones de extracción, utilizando corrientes residuales con alto contenido de materia orgánica, como sustrato o medio de cultivo. En el escenario nacional, las vinazas (residuo de la fermentación de los jugos de caña en la producción de bioetanol) y el glicerol (residuo de la producción de biodiesel de frutos oleaginosos), pueden convertirse en una buena fuente de carbono y otros nutrientes. Paralelamente, al implementar sistemas que incluyan dichas corrientes residuales, se lograría mitigar el impacto ambiental que tiene actualmente la producción de biocombustibles.
- Reconociendo el grado de toxicidad de algunos solventes utilizados, se recomienda estudiar la posibilidad de recuperar las corrientes de extracción para incrementar el grado de confiabilidad de los procedimientos y disminuir su impacto tanto a la salud como al medio ambiente.
- Se recomienda evaluar el efecto del floculante en la recuperación de lípidos a partir de biomasa producida bajo diferentes condiciones de cultivo y considerar otras rutas de hidrólisis durante la etapa de pre-tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- ASLAN, S. & Kapdan, I. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological and Engineering*, (28), 1, 64-70.
- AYALA, R. & Luquede, M. (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75, 109-113.
- AYALA-TORRES, E.G & Reyes-Gómez, O.J. (2014). Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Trabajo de grado (ingeniería química). Grupo de investigación CIDES. Universidad industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.
- BAI, M., Cheng, C., Wan, H. & Lin, Y. (2011). Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 783-786.
- 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.
- BELLOU, S. & Aggelis, G. (2013). 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.
- BERNAL, J., Mendiola., Ibáñez, E. & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 758-774.
- BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS COLOMBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL. (2011). Universidad Industrial de Santander., Corporación Instituto Morrosquillo., Instituto Colombiano del Petróleo, Unidad de Investigación, Ecopetrol S. A.
- BLIGH, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

- BOLD (1949), BISCHOFF & BOLD. (1963). Algal culturing techniques, 473.
- BORGES, L., Moro, Morón-Villarreyes, J.A., Montes D'Oca, M. & Abreu, P.C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and bioenergy*, 35, 4449-4454.
- BRANYIKOVA, I., Marsalkova, B., Doucha, J., Branyik, T., Bisova, K. & Zachleder, V. (2011). Microalgae – novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 766-776.
- 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, 2, 557-577.
- CARVALHO, J.C.M., Bezerra, R.P., Matsudo, M.C. & Sato, S. (2013) Chapter 33, Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by Fed-Batch Process. *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer Science, 781-805.
- 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.
- CHENG, C-H., Dub, Tz-B., Pi, H-C., Jang, S-M., Lin, Y-H. & Lee, H-T. (2011). Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource Technology*, 102, 10151-10153.
- CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- CHOIX, F.J., De-Bashan, L.E. & Bashan, Y. (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella spp.* induced by *Azospirillum brasilense*: Autotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 51, 300-309.
- CRAVOTTO, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M. & Cintas P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 898-902.

- CUELLAR-BERMUDEZ, S., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. & Parra-Saldivar R. (2014). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8, 190-209.
- DAVIS, R.T. (2011). Characterizing microalgae (*Nannochloris oculata*) harvesting by aluminum flocculation. Master of science thesis. Texas A&M University.
- 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 in Plant Science*, 3, 82.
- DOS SANTOS, R.R., Mendonça-Moreira, D., Norie-Kunigami, C., Gomes-Aranda, D.A. & Lapa-Teixeira, C.M. (2015). Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 95-99.
- 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. *Applied 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.
- EIKANI, M., Golmohammad, F. & Rowshanzamir, S. (2007). Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds *Coriandrum sativum*. *Journal of Food Engineering*, 80 (2), 735-740.
- FAJARDO, A.et al. (2007). Lipid extraction from the microalgae *Phaeodacty lumtricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (2), 120-126.
- GARCÍA-CUADRA, F., Jawiarczyk, N., González-López, C.V., Fernández-Sevilla, J.M. & Acién Fernández, F.G. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3, 2, 147-161.

- GERDE, J.A., Yao, L., Lio, J., Wen, Z. & Wang, T. (2014). Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. *Algal Research* 3, 30-35.
- GIRIO, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101, 13, 4775-4800.
- GONÇALVES, A.L., Pires J.C.M. & Simões M. (2013). Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4-14.
- GONZÁLES, A., Kafarov, V. & Guzmán, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect*, 7, 2, 53-60.
- GONZÁLEZ, A., Peñaranda, L., Sepúlveda, K. & Kafarov. V. (2011). Evaluación de rutas de obtención de lípidos y monosacáridos de biomasa de microalgas bajo el concepto de biorefinería. *Revista Ion*, 2, 13-22.
- GOUVEIA, L. & Oliveira, A. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 269-274.
- HALIM, R., Danquah, M. & Webley, P. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30, 709-732.
- HALIM, R., Gladman, B., Danquah, M. & Webley, P. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102, 178-185.
- HALIM, R., Harun, R., Webley, P. & Danquah, M. (2013). Bioprocess Engineering Aspects of Biodiesel and Bioethanol Production from Microalgae. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 601-628.
- HARUN, R. & DANQUAH, M.K. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46, 1, 304-309.
- HARUN, R., Danquah, M.K. & Forde, G.M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 2, 199-203.

- HARUN, R., Jason, W., Cherrington, T. & Danquah, M. (2011). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, 88, 3464-3467.
- HARUN, R., Singh, M., Forde, G. & Danquah, M. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1037-1047.
- HERRERO, M., Cifuentes, A. & Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chemistry*, 98 (1), 136-148.
- 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*, 113, 244-252.
- HO, S-H., Huang, S-W., Chen C-Y., Hasunuma, T., Kondo, A. & Chang, J-S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191-198.
- JOHN, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186-193.
- JONES, J., Manning, S., Montoya, M., Keller, K. & Poenie, M. (2012). Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 8,1371-1381.
- KAFAROV V, Sarmiento R, Amaya A, González A. (2010). Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas empleando disrupción celular térmica y química. *Memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química*, 100.
- KANDA, H., Li, P., Ikehara, T. & Yasumoto, M. (2012). Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: extraction yield and properties. *Fuel*, 95, 88-92.

- KANDA, H., Li, P., Yoshimura, T. & Okada, S. (2013). Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane. *Fuel*, 105, 535-539.
- KIM, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C-W., Park, M. & Yang, J-W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31, 862-876.
- KLEIN, B. & BUCHHOLZ, R. (2013) Microalgae as sources of food ingredients and nutraceuticals. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, 559-566.
- KNUCKEY, R., Brown, M., Robert, R. & Frampton, D. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, (35), 3, 300-313.
- KNUCKEY, R.M. (1998). Australian microalgae and microalgal concentrates for use as aquaculture feeds. Ph.D. Thesis. University of Tasmania, 254.
- KUMAR, R. & WYMAN, C.E. (2009). Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 2, 457-467.
- LAM, M.K. & LEE, K.T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30, 3, 673-690.
- LARDON, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J. & Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Search Results. Environmental Science & Technology*, 43, 6475-6481.
- LEE, A.K., Lewis, D.M. & Ashman, P.J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89-101.
- LEE, J., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C. & Oh, H. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, 75-77.

- LOURENÇO, S. (2006). Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. Editora Rima, São Carlos Brazil.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- LYND, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 3, 66. 506-577.
- MACDOUGALL, K.M., McNichol, J., McGinn, P.J., O'Leary, S. & Melanson, J.E. (2011). Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 401, 8, 2609-2616.
- MAGOTA, A., Saga, K., Okada, S., Atobe, S. & Imou, K. (2012). Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 123, 195-198.
- MANDIK, Y.I., Cheirsilp, B., Boonsawang, P. & Prasertsan, P., (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.
- MANIRAKIZA, P., Covaci, A. & Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis*, 14, 93-100.
- MATA, M., Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1, 217-232.
- MERCER, P. & Armenta, R.E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 5, 539-547.

- MOLINA GRIMA, E., Granados, M., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J.M. & Ación, F-G. (2012). Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102-110.
- 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. *Biotechnology Advances*, 28, 817-830.
- NATIONAL RENEWABLE ENERGY Lab/Department of Energy. (1998). Golden (CO)/Washington (USA). NREL/TP-580-24190, p. 294.
- NGUYEN, M., Choi, S., Lee, J. & Sim, S. (2009). Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 161-166.
- NOBRE, B., Villalobos, F., Barragán, B., Oliveira, A., Batista, A., Marques, P., Mendes, R., Sovová, H., Palabra, A. & Gouveia, L. (2013). A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. Microalga-Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource Technology*, 135, 128-136.
- ORTEGÓN, M.A. & 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 (trabajo de pregrado). Universidad Industrial de Santander.
- PEREZ, O., Escalante, F., De-Bashan, L & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45, 11-36.
- POELMAN, E., Jeurissen, B. & De Pauw, N. (1997). Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources, Conservation and Recycling*, 19, 1-10.
- PRABAKARAN, P. & RAVINDRAN, A. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 2, 150-154.

- RAMÍREZ, J., Quiroga, M.F., Pereira, A.C., Leets, I. & 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.
- RANJAN, A., Patil, C. & Moholkar, S. (2010). Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 2979-2985.
- RENAUD, S., Thinh, L. & Parry, D. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170, 147-59.
- Renil, A. (2010). Solvent extraction of lipids from microalgae. Master of Science (MS), Ohio University, Mechanical Engineering (Engineering and Technology).
- 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.
- ROBLES, M., Molina Grima, E., Fernandes, F., Christi, Y. & Belarbi, E.H. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491-515.
- RWEHUMBIZA, V.M., Harrison, R. & Thomsen, L. (2012). Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. *Chemical Engineering Journal*, 168-175.
- SAFI, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B, Merah, O., Pontalier, P-Yves. & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61-65.
- SAFI, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P-Y. & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- SANDER, K. & MURTHY, G.S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *Life Cycle Assess*, 15, 704-714.

- SATHISH, A. & SIMS, C.R. (2012). Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresource Technology*, 18, 643-647.
- SCHWENZFEIER, A., Wierenga, P.A. & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* *Bioresource Technology*, 102, 19, 9121-9127.
- SCOTT, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J. & Smith AG. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 3, 277-286.
- SERIVE, B., Kaas, R., Bérard, J., Pasquet, V., Picot, L. & Cadoret, J. (2012). Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 124, 311-320.
- SHIN, H-Y., Ryu Jae-Hun., Bae, Seong-Youl., Crofcheck, Czarena. & Crocker, Mark. (2014). Lipid extraction from *Scenedesmus sp.* microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel*, 130, 66-69.
- SHOW, K.Y., Lee, DJ. & Chang, J.S. (2013). Algal biomass dehydration. *Bioresource Technology*, 135, 720-729.
- SLOCOMBE, S., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S. & Stanley, M. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51-57.
- SUKENIK, A., Shelef, G. & Bilanovic, D. (1988). Flocculation of microalgae with cationic polymers – effects of medium salinity. *Biomass*, 17, 65-76.
- 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.
- TALUKDER, M.R., Das, P. & Wu, J. C. (2012). Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 109-113.
- U.S. DEPARTMENT OF ENERGY. (2010). National Algal Biofuels Technology Roadmap. Biomass program.

- VANDAMME, D., Koenraad, M. & Foubert, I. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31,4, 233-239.
- 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.
- YAO, L., Gerde, J.A. & Wang, T. (2012). Oil extraction from microalga *Nannochloropsis* sp. with isopropyl. Alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 2279-2287.
- YING, Q., Uduman, N., Michael, K., Hoadley, A. & Gareth, M.F. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 1-15
- 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.
- YUSOFF, F.M., Shariff, M., Harith, Z.T., Din, M. & 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.
- ZHANG, X., Sommerfeld, M., Hu, Q., Hewson, J.C. & Amendola, P. (2012). Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, 116, 477-484
- ZHAO, X.Q., Wan, C., Guo, S.L. & Bai, F.W. (2013). Asrafal Alam, M-D. Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. *Bioresource Technology*, 135, 207-212.

ANEXOS

Anexo A. Principales productos obtenidos durante el desarrollo del proyecto

Participación en eventos académicos internacionales.

VI Congreso internacional de ciencia y tecnología de los biocombustibles, CIBSCOL 2014. Marzo 19-21 de 2014, Cartagena, Colombia.

- Diseño de un sistema de extracción de proteínas en dos etapas a partir de biomasa de microalgas. Sanguino, P. A., Gutiérrez, D., Marmolejo, C., Barajas, A. F., Kafarov, V.
- Monosacaridos de microalgas mediante hidrólisis organosolv. Sanguino, P. A., Guerrero, G., Rojas, Y., Barajas, A. F., Kafarov, V.

II Congreso Internacional de Energía Sostenible. Octubre 1-3 de 2014, Bogotá, Colombia.

- Evaluación de una metodología de cosecha de microalgas para la obtención de metabolitos con potencial de valor. Autores: Ardila, A. M., Sanguino, P. A., Mena, N. O., Ortegón, M. A., Barajas. A. F., Kafarov, V.

4th Latin-American Congress of Photocatalysis, Photoelectrochemistry and Photobiology. Noviembre 9-14 de 2015, Santander, Colombia.

- A Colombian Perspective of Biofuels Production Systems from Photosynthetic Microalgae. Barajas, A. F., Sanguino, P. A., García, J. B., Ardila, A. M., Barajas, C, Guzmán, A., Viatcheslav, K.

Coodirección de cuatro (4) proyectos de pregrado, en la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

- Efecto del contenido de humedad en la extracción de carbohidratos y proteínas mediante hidrólisis alcalina de biomasa microalgal. Gonzalez Perez, Liyen Lucia., Uribe Mora, Christian Camilo. Noviembre de 2014, Bucaramanga, Santander.

- Evaluación de una metodología para la extracción de lípidos en biomasa húmeda a partir de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp.* Montoya Torres, Nathaly Andrea., Akimushkin Valencia, Lucia. Noviembre de 2014, Bucaramanga, Santander.

- Efecto del pretratamiento térmico sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos de la biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris* mediante hidrólisis ácida. Atencia Ramírez, Néstor Rafael., Serrano García, Jaime Israel. Noviembre de 2014, Bucaramanga, Santander.

- Efecto de la floculación en la extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos en biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.* López Galeth, Giannina Massiel., Jaimes Bravo, Carlos Alberto. Marzo de 2015, Bucaramanga, Santander.

Anexo B. Principales contribuciones e impactos del proyecto desarrollado

La presente investigación se desarrolló en el marco del proyecto “Creación y fortalecimiento de una red de transferencia de conocimiento y tecnología entre Estados Unidos y Colombia mediante el desarrollo de procesos de biorefinería para la obtención de biocombustibles y productos de alto valor agregado a partir de biomasa de microalgas”, bajo la dirección de Dr. Viatcheslav Kafarov⁶. El proyecto fue financiado por Colciencias, a través del Programa de la Diáspora Científica de Alto Reconocimiento, gracias a la operación de crédito del Banco Mundial. Este Programa tiene como objetivo generar vínculos estratégicos entre la diáspora Colombiana (actores de desarrollo científico y tecnológico, a nivel mundial) e investigadores, innovadores residentes en Colombia, instituciones y proyectos de investigación.

La participación de la diáspora colombiana en el estudio de biocombustibles y obtención de co-productos a partir de fuentes alternativas de biomasa ha generado impactos importantes en el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten la transferencia del conocimiento entre los diferentes actores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación SNCTI (grupos de investigación de diferentes universidades colombianas, centros de investigación de gremios, asociaciones y empresas del sector industrial y agrícola).

Durante el desarrollo del proyecto se fortaleció la cooperación entre la Universidad Industrial de Santander, Texas A&M University y Dow Chemical Company, lo que permitió crear una Red de transferencia de conocimiento y tecnología entre Estados Unidos y Colombia, mediante el estudio de las etapas de crecimiento, cosecha, rompimiento de la pared celular y extracción de metabolitos, aplicando los conceptos de biorefinería, síntesis de procesos y análisis económico. La

⁶ Director del Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES).

conformación de la red permitió intercambiar conocimiento e información entre Estados Unidos y Colombia, generando un impacto positivo en la formación de profesionales de Ingeniería Química y biología, con capacidades específicas en el desarrollo y aplicación de metodologías de cultivo, cosecha y aprovechamiento de la biomasa a partir de microalgas.

El mejoramiento de las técnicas de extracción implica la reducción de los costos globales en el aprovechamiento integral de la biomasa. Los procesos aplicados y los resultados obtenidos presentan la alternativa de utilizar biomasa húmeda en la obtención de metabolitos de interés (proteínas, carbohidratos y lípidos). Lo anterior, constituye un impacto positivo, debido a la reducción del consumo energético durante las etapas de pre-tratamiento.