

**EFFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA EXTRACCIÓN
DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS MEDIANTE HIDRÓLISIS
ALCALINA DE BIOMASA MICROALGAL**

**LIYEN LUCIA GONZÁLEZ PÉREZ
CHRISTIAN CAMILO URIBE MORA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**EFEECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA EXTRACCIÓN
DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS MEDIANTE HIDRÓLISIS
ALCALINA DE BIOMASA MICROALGAL**

**LIYEN LUCIA GONZÁLEZ PÉREZ
CHRISTIAN CAMILO URIBE MORA**

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

Director

Prof. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

Co-Directores

**Ing. Química. PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS
Biólogo. ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

A DIOS por guiar mi camino, darme la fortaleza de seguir luchando por mis metas y sueños, por regalarme la sabiduría y el entendimiento a la hora de cumplir mis compromisos estudiantiles, por la fuerza de levantarme cada vez que tropezaba y por haber puesto en mi camino personas con aportes positivos y negativos, vitales para mi formación profesional y como ser humano.

A mis padres EDUARDO JOSE GONZALEZ RUIZ Y BERLIDEZ PEREZ PORTO, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas, especialmente a ti padre que me diste la mejor educación del mundo, inculcándome amor al estudio, confianza en mis capacidades y en las cosas que me propongo. Este logro te lo dedico con todo el amor del mundo, porque tú siempre creíste ciegamente en mí, por el amor que me brindaste cuando vivías y aunque mi sueño era compartir este momento a tu lado, sé que desde el cielo estarás muy orgulloso y feliz.

A mis hermanos CESAR EDUARDO GONZALEZ PEREZ Y LILIANA GONZALEZ PEREZ especialmente a mi hermano por su voto de confianza, por su infinidad de consejos constructivos, por guiarme en cada paso que doy, por ser el mejor modelo a seguir y por darme el mejor regalo que alguien le puede dar a una persona, el estudio.

A mis amigos REINALDO CALDERÓN, EYLEEN VANESSA FERNÁNDEZ, MARÍA DUARTE, CRISTIAN BUITRAGO, por sus años de amistad, por hacerme sentir que tengo otra familia, por estar presentes en cada tropiezo, en cada logro, en cada lagrima y cada momento de felicidad.

A la familia CHAMORRO PEREZ por su amor, especialmente a LISETH CHAMARRO Y KARINA CHAMORRO mis grandes amigas, confidentes y hermanas.

A CHRISTIAN CAMILO URIBE MORA mi compañero de lucha y gran apoyo, por su paciencia, amor por hacerme crecer como persona, por su compañía incondicional y por abrir un espacio en su corazón en su vida y en su familia.

Liyen Lucia Gonzalez Perez

DEDICATORIA

Primero que todo darle gracias a Dios por darme la salud y la sabiduría para seguir adelante en cada momento. Gracias a mis padres, Hernando Uribe y Gloria Mora por su apoyo incondicional y por sus oraciones, porque a pesar de la distancia siempre han estado ahí cuando más los he necesitado. Mis hermanos Laura Valentina y Juan Sebastian, son el motivo de seguir a delante y ser un ejemplo para ellos.

Mis amigos Eyleen Vanessa Fernandez, María Duarte y Cristian Buitrago, que siempre estuvieron ahí para compartir momentos únicos y darme su amistad desinteresada, se les quiere un montón.

Mi gran amigo, mi hermano Reinaldo Calderón, que estuvo en los momentos más difíciles con una voz de aliento, por ser mi maestro y enseñarme muchas cosas que me han ayudado para mi formación como persona y como profesional, se le quiere “perrito”.

Liyen Lucia Gonzalez mi amiga, mi compañera de lucha que me ha demostrado su amor, su paciencia y que siempre estuvo para cuidarme de cualquier resfriado, la amo mucho mi china.

Ustedes han sido mi segunda familia, sin ustedes esto no hubiera sido posible, que el “Poder Químico” siga unido por muchos años más.

“Lo ideal es llegar a la meta, pero quien dijo que no se puede disfrutar del camino?”.

Christian Camilo Uribe Mora

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

INGENIERA PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS, por su orientación y comprensión, por brindarnos un espacio en su vida, aportando enseñanzas positivas como ser humano y como profesional y por contribuir al buen desarrollo del presente proyecto.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de Ingeniería Química, por su colaboración durante la ejecución de éste proyecto.

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

INGENIERO JEISSON RODRIGUEZ, por su apoyo, aporte constructivo en la realización de este proyecto, por sus consejos y su amistad desinteresada.

INGENIEROS REINALDO CALDERÓN, EYLEEN VANESSA FERNANDEZ, MARIA DUARTE, por su apoyo incondicional durante el ciclo de pregrado, por su amistad, por sus consejos y enseñanzas positivas.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de Ingeniería Química que hicieron parte de nuestra formación profesional.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. METODOLOGÍA	17
1.1. Diseño experimental	18
1.2. Desarrollo de la metodología	18
1.2.1. Cultivo	18
1.2.2. Recuperación de la biomasa	18
1.2.3. Extracción de metabolitos	19
1.2.4. Filtración	19
1.2.5. Cuantificación de proteínas totales	20
1.2.6. Cuantificación de carbohidratos totales	20
1.2.7. Balance de masa	21
2. ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
2.1. Análisis estadístico	23
2.1.1. Extracción de proteínas	23
2.1.2. Extracción de carbohidratos	25
2.2. Tratamiento control	27
2.3. Hidrólisis básica comparada con otros métodos de extracción de carbohidratos	28
2.4. Hidrólisis básica comparada con otros métodos de extracción de proteínas	30
3. CONCLUSIONES	32
4. RECOMENDACIONES	33
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	34
BIBLIOGRAFÍA	37

LISTA DE FIGURAS

1.1. Desarrollo experimental.	17
2.1. Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas.	22
2.2. Superficie de respuesta de la eficiencia de extracción de proteínas.	24
2.3. Diagrama de pareto de la eficiencia de extracción de proteínas.	25
2.4. Superficie de respuesta de la eficiencia de extracción de carbohidratos.	26
2.5. Diagrama de pareto de la eficiencia de extracción de carbohidratos.	26
2.6. Eficiencia de extracción de los mejores experimentos y tratamiento control.	27
2.7. Comparación de la eficiencia de extracción de carbohidratos con diferentes métodos de extracción.	29
2.8. Comparación de la eficiencia de extracción de proteínas con diferentes métodos de extracción.	30

LISTA DE TABLAS

1.1. Diseño de experimentos del pretratamiento térmico.	18
1.2. Medio de cultivo Bold Basal.	19
2.1. Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas extraídas.	23

RESUMEN

TITULO: EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS MEDIANTE HIDRÓLISIS ALCALINA DE BIOMASA MICROALGAL.*

AUTORES: GONZALEZ PEREZ, Liyen Lucia; URIBE MORA, Christian Camilo**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Proteínas, Carbohidratos, Eficiencia de extracción.

Las microalgas son consideradas una alternativa prometedora para sustituir la fuente de materia prima dominante en la obtención de productos de alto valor. Algunos autores exponen en sus trabajos los diferentes beneficios que genera la ingesta de algunas especies de microalgas en la salud de las personas como lo es el aumento de la concentración de hemoglobina en la sangre, la disminución de la desnutrición e intoxicación. Además de las aplicaciones nutricionales también tienen aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica como es el caso de la spirulina. Algunas especies de microalgas como el género *Chlorella vulgaris* han demostrado un alto contenido de carbohidratos (35 % - 55 % de su peso seco) y proteínas (30 % - 60 % de su peso seco) cabe destacar que el contenido de estos metabolitos varían en función de la especie y condiciones de cultivo. A pesar de su potencial inherente son muchas las barreras que han impedido el desarrollo de tecnologías con viabilidad económica que permita la producción y utilización sostenible de biomasa microalgal. En este trabajo se evaluó el efecto del contenido de humedad en la extracción de carbohidratos y proteínas mediante hidrólisis alcalina a partir de *Chlorella vulgaris*, se obtuvo altos porcentajes de eficiencia de extracción utilizando biomasa húmeda con porcentajes de 71 % en proteínas y 52 % en carbohidratos, mostrando que el alto contenido de humedad no limitó la eficiencia de extracción de los metabolitos de interés. De esta manera se puede decir que la extracción de carbohidratos y proteínas con biomasa húmeda es una alternativa eficiente que contribuiría a la producción sostenible de biomasa microalgal.

*Proyecto de grado. Modalidad de investigación.

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Grupo de Investigación CIDES. Director: M.Sc Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirectora: Ingeniera Química Paola Andrea Sanguino Barajas.

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF MOISTURE ON THE EXTRACTION OF CARBOHYDRATES AND PROTEINS BY ALKALINE HYDROLYSIS OF BIOMASS MICROALGAL.***

AUTHORS: GONZALEZ PEREZ, Liyen Lucia; URIBE MORA, Christian****

KEYWORDS: Microalgae, Protein, Carbohydrates, Extraction efficiency.

The Microalgae are considered a promising alternative to replace the dominant source of raw material in the production of high value products. Some authors present their work in different benefits generated intake of some species of microalgae in the health of people as it is the increase in the concentration of hemoglobin in the blood, reducing malnutrition and intoxication. In addition to nutritional applications also have applications in the cosmetic and pharmaceutical industries such as spirulina. Some species of microalgae *Chlorella vulgaris* as gender have demonstrated a high carbohydrate content (35 % - 55 % of its dry weight) and protein (30 % - 60 % of its dry weight) include the content of these metabolites vary depending on species and growing conditions. Despite its inherent potential are many barriers that have prevented the development of economically viable technologies to enable the sustainable production and use of microalgae biomass. In this study the effect of moisture content in the extraction of carbohydrates and proteins by alkaline hydrolysis from *Chlorella vulgaris* was evaluated, high percentages of extraction efficiency was obtained using wet biomass with a percentage of 71 % protein and 52 % carbohydrate, showing that the high moisture content not limit the efficiency of extraction of the metabolites of interest. Thus it can be said that removal of carbohydrates and proteins with wet biomass is an efficient alternative that would contribute to the sustainable production of microalgae biomass.

*** Research Work.

**** Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Research Group CIDES. Director: M.Sc Crisóstomo Barajas Ferreira. Co-Director: Chemical Engineer Paola Andrea Sanguino Barajas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés por la biomasa a partir de microalgas ha crecido tanto en la industria como en la investigación [1]. Estos microorganismos son considerados una de las mejores opciones para sustituir la fuente de materia prima dominante, en la obtención de biocombustibles y productos de alto valor [2].

Las microalgas poseen grandes ventajas entre las cuales se destacan su habilidad de crecer en casi cualquier tipo de agua, una elevada tasa de crecimiento y acumulación de altas cantidades de metabolitos primarios y secundarios [3]. Barrow y Shahidi [4] expusieron en sus trabajos los diferentes beneficios que genera la ingesta de algunas especies de microalgas en la salud humana, como el aumento de las concentraciones de hemoglobina y la disminución de la desnutrición e intoxicación. Además de las ventajas nutricionales, las microalgas puede ser utilizadas para, la fijación de CO_2 , obtención de productos farmacológicos, cosméticos, tratamiento de aguas residuales, entre otras aplicaciones industriales [5].

Algunas especies de microalgas como el género *Chlorella vulgaris* han demostrado un alto contenido de carbohidratos (entre 35 % – 55 % de su peso seco [6]) y proteínas (entre 30 % – 60 % de su peso seco [7]); sin embargo el contenido de los metabolitos varía en función de la especie y condiciones de cultivo [7]. A pesar de su potencial inherente son muchas las barreras que han impedido el desarrollo de tecnologías con viabilidad económica que permitan la producción y utilización sostenible de biomasa microalgal [8].

En el área de los biocombustibles los productos a obtener son el biodiesel, bioetanol, bio-oil, biohidrogeno, etc [9]; sin embargo, el costo de procesamiento de la biomasa microalgal sigue siendo demasiado alto para competir en este mercado [5]. El costo actual de producción de biodiesel a partir de microalgas es diez veces mayor que el costo del petróleo (\$100 por barril) [10], lo anterior debido a que el precio de venta de la biomasa microalgal depende de los costos combinados de cultivo, pretratamiento y extracción [11], lo cual incrementa el costo global en la obtención de metabolitos de valor agregado [7].

Bajo este escenario se genera un número creciente de estudios enfocados a la explo-

ración de técnicas y procedimientos que permitan la industrialización de la biomasa a partir de microalgas [12]. Algunas de estas técnicas emplean la extracción de metabolitos mediante sistemas mecánicos como molienda, prensado, homogeneización a alta presión (HPH), ultrasonido, autoclave, liofilización y microondas [13]. Generalmente estas técnicas son ampliamente utilizadas por su alta eficiencia debido a que son independientes de la especie de microalgas. Sin embargo, estos métodos tienen altos requerimientos energéticos en comparación con otros procedimientos [14].

El uso de solventes químicos para la extracción de metabolitos es menos costoso comparado con las técnicas mecánicas, no obstante pueden ser más propensos a la contaminación del producto final [14]. La exposición de la biomasa a un ambiente ácido puede conducir a la descomposición de los azúcares en metabolitos no deseados que inhiben el proceso de fermentación [15]. Por otra parte, la hidrólisis enzimática tiene gran potencial en el pretratamiento de la biomasa, pero su uso se asocia a una baja velocidad de hidrólisis prolongando el tiempo de finalización de la etapa del proceso [16]. En el caso del pretratamiento alcalino, esta metodología no genera inhibiciones durante la fermentación y proporciona un menor costo de producción en comparación con otros métodos de pretratamiento [17]. En estudios realizados con semillas oleaginosas se evaluó el rendimiento de la glucosa y el consumo de energía con tres tipos de pretratamiento (alcalino, ácido y enzimático) para la producción de bioetanol, se encontró que bajo las condiciones de concentración de biomasa a 50 g/kg y una concentración alcalina de $0,63\text{ mol/dm}^3$ durante 30 min se obtuvo la producción más alta de glucosa. De esta manera se demostró un comportamiento superior en comparación con los otros métodos, en términos de rendimiento de producto y eficiencia energética [18].

Para el caso de su aplicación en biomasa de microalgas, Harun *et al.* [17] evaluaron un tratamiento alcalino para la extracción de carbohidratos a 120°C por 30 min , utilizando $0,75\%$ (p/v) de NaOH . Los autores reportaron una eficiencia en extracción de carbohidratos de $74,2\%$. Debido a las bajas condiciones de temperatura y presión de la técnica. El sistema mostró un comportamiento favorable proporcionando un menor costo de producción con respecto a otros métodos de pretratamiento [17].

No obstante, al desarrollo de nuevas metodologías, los aspectos económicos y energéticos siguen determinando la posibilidad de escalar los procesos de extracción de metabolitos. Algunos estudios realizados en la evaluación del ciclo de vida de los biocombustibles a partir de microalgas identificaron cuatro puntos claves de gran consumo energético: (a) Fuente de nutrientes, (b) diseño de fotobiorreactores, (c) la extracción de lípidos y (d) deshidratación y secado de la biomasa [19]. Siendo esta última etapa, una de las más críticas, por consumir aproximadamente el 69% de

la energía total del sistema [19]. Hasta el momento es común aplicar la deshidratación o secado de la biomasa [4] debido a que la presencia de agua puede inhibir varias etapas posteriores al pretratamiento como es la extracción de metabolitos y transesterificación [19].

La energía que se consume en el pretratamiento térmico no debe ser ignorada, porque puede traer efectos adversos hacia el balance global energético en la producción de productos de alto valor [19]. Una alternativa es la implementación de métodos de extracción en húmedo, lo cual reduciría significativamente la cantidad de energía necesaria para el secado de la biomasa. Según Kanda *et al.* [20] la extracción en húmedo podría alcanzar hasta un 97 % de rendimiento en comparación con otros métodos. Los autores aseguran que es posible obtener un rendimiento del 40,01 % en la extracción de lípidos a partir de microalgas (en especies mixtas), un valor similar comparado con métodos de extracción a partir de biomasa seca como Blich-Dyer [21].

En estudios previos realizados en el grupo de investigación CIDES se encontró que la mejor eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas se logra bajo condiciones óptimas de temperatura a 55°C, relación solvente/biomasa 30 ml/g y concentración 3,67 M, utilizando biomasa pretratada a 105°C por 24 h [22].

Dada la importancia en la reducción del gasto energético durante el pretratamiento de la biomasa, el presente estudio evaluó el efecto del contenido de humedad sobre la eficiencia en extracción de proteínas y carbohidratos de *Chlorella vulgaris*, mediante hidrólisis alcalina utilizando una solución de *NaOH*. De esta manera lograr una metodología de procesamiento favorable para la obtención de metabolitos con potencial de alto valor.

1 METODOLOGÍA

La metodología utilizada para la evaluación del efecto del contenido de humedad en la biomasa durante la extracción de carbohidratos y proteínas se ilustra en la figura 1.1.

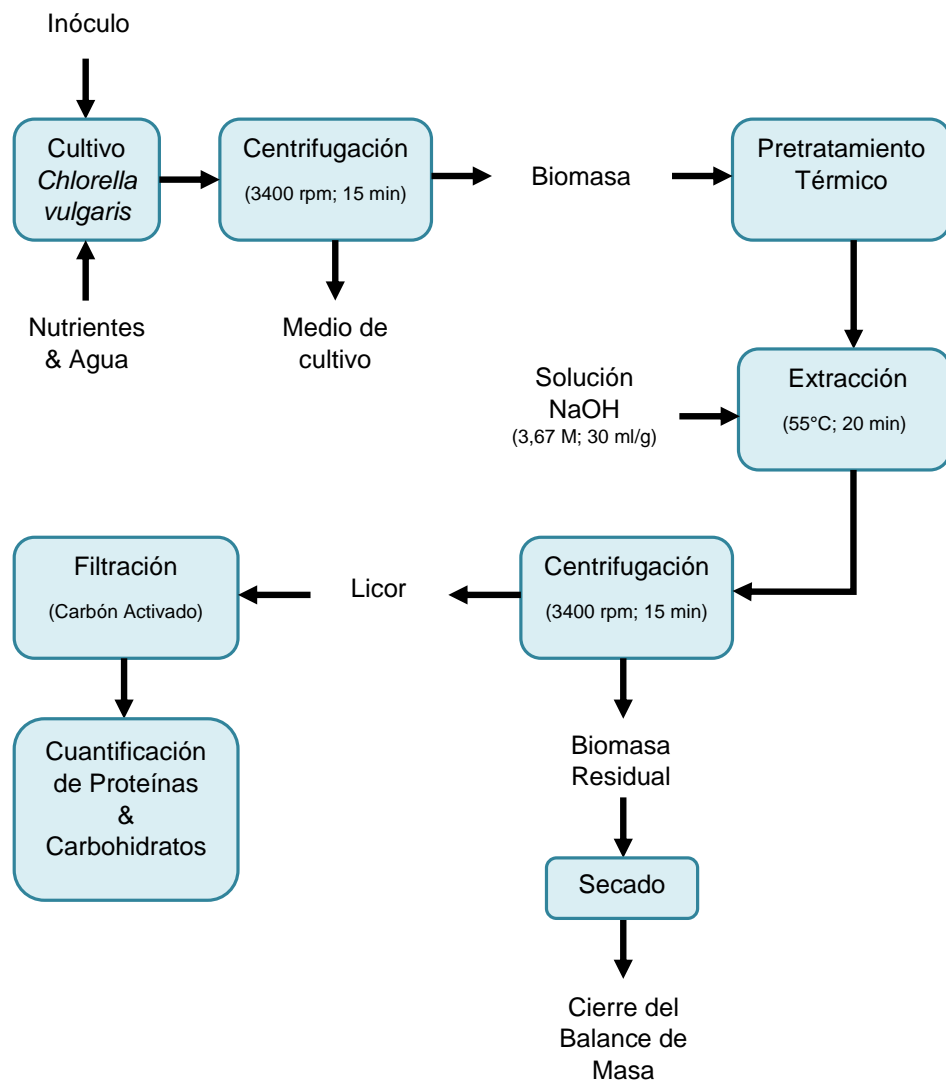


Figura 1.1: Desarrollo experimental.

1.1. Diseño experimental

Se realizó el diseño experimental de composición central 2^2 mediante la herramienta informática STATISTICA 7.0, evaluando las variables temperatura y tiempo del pretratamiento térmico, para determinar su influencia en el porcentaje de recuperación de carbohidratos y proteínas. Se obtuvo un total de 9 experimentos como se presenta en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Diseño de experimentos del pretratamiento térmico.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Temperatura (°C)	33	45	45	75	75	75	105	105	117
Tiempo (h)	18	12	24	10	18	26	12	24	18

1.2. Desarrollo de la metodología

1.2.1. Cultivo

El cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 se desarrolló utilizando fotobioreactores rectangulares de vidrio, con capacidad de 20 L y medio de cultivo Bold Basal (Bischoff & Bold, 1963), tabla 1.2. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo con un flujo de 8000 ml/min, condiciones de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH de 7 ± 1 y ciclo luz-oscuridad 12 : 12 h.

1.2.2. Recuperación de la biomasa

Una vez transcurrido 20 días de cultivo, la biomasa producida fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm en una centrifuga (UNIVERSAL 320 R) durante 15 min, posteriormente la biomasa recuperada (biomasa concentrada) se llevó al proceso de pretratamiento térmico de acuerdo al diseño experimental de la tabla 1.1, con el fin de determinar la influencia del contenido de humedad de la biomasa sobre el porcentaje de recuperación de metabolitos.

Tabla 1.2: Medio de cultivo Bold Basal.

Compuesto	[g/L]
NaNO ₃	2,94 x 10 ⁻³
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,04 x 10 ⁻⁴
NaCl	4,28 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	4,31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	1,29 x 10 ⁻³
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,70 x 10 ⁻⁴
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3,07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7,28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	4,93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6,29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	1,68 x 10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	1,85 x 10 ⁻⁴
EDTA	1,71 x 10 ⁻⁴
KOH	5,53 x 10 ⁻⁴
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1,79 x 10 ⁻⁵

1.2.3. Extracción de metabolitos

La reacción de hidrólisis básica realizada para la extracción de carbohidratos y proteínas se hizo agregando 5 gramos de biomasa pretratada de acuerdo al diseño de experimentos (tabla 1.1), durante 20 *min* utilizando un baño termostataado (Memmert), bajo condiciones óptimas de temperatura a 55°C, relación solvente/biomasa de 30 *ml/g* y concentración 3,67 M [22]. Una vez concluyó el tiempo de reacción, la mezcla obtenida se centrifugó a 3400 *rpm* en una centrifuga (UNIVERSAL 320 R) durante 15 *min*. De esta etapa se obtuvo un extracto rico en carbohidratos y proteínas (sobrenadante o licor y una biomasa concentrada o pellet).

1.2.4. Filtración

El licor obtenido en la etapa de hidrólisis alcalina fue filtrado en una columna de carbón activado. Lo anterior, dado a que la influencia de la temperatura además de maleabilizar la pared celular, también puede degradar moléculas termolábiles

como son las clorofilas y otros pigmentos [23]. Estos compuestos pueden generar sobrestimación en los extractos proteicos [24], debido a los cambios de color [25] y afectar la medición generando dificultades en la cuantificación de metabolitos por métodos colorimétricos.

1.2.5. Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método descrito por Lowry *et al.* [27]. Para llevar a cabo este procedimiento se tomó una alícuota de 1 ml del extracto o licor en un tubo de ensayo, posteriormente se agregó 1,4 ml de solución Lowry. La solución se homogenizó durante 5 min, se mantuvo en reposo por 15 min, posteriormente se añadió 0,2 ml de solución Folin-agua y se dejó reaccionar durante 30 min. Finalmente se determinó por colorimetría la concentración de proteínas utilizando un espectrofotómetro (Pharo300 Merck), a una longitud de onda de 750 nm. La cuantificación de la concentración de proteínas, se realizó mediante la curva de calibración estandarizada. Por otra parte el cálculo de la eficiencia de extracción de proteínas se obtuvo siguiendo la ecuación (1.1).

$$\text{Eficiencia de extracción de proteínas (\%)} = \frac{\text{Proteínas totales extraídas (g/L)}}{\text{Proteínas totales antes de la extracción (g/L)}} \times 100\% \quad (1.1)$$

Donde el contenido de proteínas totales antes de la extracción se calculó a partir de la caracterización realizada por García-Cuadra *et al.* [7] (Contenido de proteínas: 50 % de su peso seco).

1.2.6. Cuantificación de carbohidratos totales

Los carbohidratos fueron cuantificados siguiendo el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.* [26]. Se tomó una alícuota de un 1 ml del extracto y se adicionó a tubos de ensayo. Posteriormente fueron agregados 0,5 ml de fenol al 5 % y 2,5 ml de ácido sulfúrico al 95 %. Finalmente se determinó por colorimetría la concentración de carbohidratos utilizando un espectrofotómetro (Pharo300 Merck) determinando la concentración de monosacáridos (xilosa, arabinosa, glucosa y fructosa) a diferentes longitudes de onda. La cuantificación de la concentración de carbohidratos, se realizó mediante curvas de calibración estandarizadas. Por otra parte el cálculo de la eficiencia se obtuvo siguiendo la ecuación (1.2).

$$\text{Eficiencia de extracción de carbohidratos (\%)} = \frac{\text{Carbohidratos totales extraídos (g/L)}}{\text{Carbohidratos totales antes de la extracción (g/L)}} \times 100 \% \quad (1.2)$$

Donde el contenido de carbohidratos totales antes de la extracción se calculó a partir de la caracterización realizada por Harun *et al.* [17] (Contenido de carbohidratos: 35 % de su peso seco).

1.2.7. Balance de masa

Una vez realizada la extracción se cuantificó la biomasa residual utilizando la metodología de Moheimani *et al.* [28] que consiste en utilizar filtros Whatman GF/C pre-combustionados durante 1 h a 100°C, posteriormente los filtros pasaron a un desecador por 12 h hasta alcanzar peso constante. La biomasa residual fue filtrada y secada durante 1 h a 100°C, después de este tiempo se llevó a un desecador por 12 h hasta alcanzar peso constante. En la ecuación (1.3) se muestra el balance de masa.

$$Biomasa_{(Inicial)} - Biomasa_{(Final)} = Biomasa_{(Residual)} \quad (1.3)$$

2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de extracción de carbohidratos y proteínas obtenidos para cada pretratamiento térmico basados en el diseño de experimentos (tabla 1.1), se presenta en la figura 2.1.

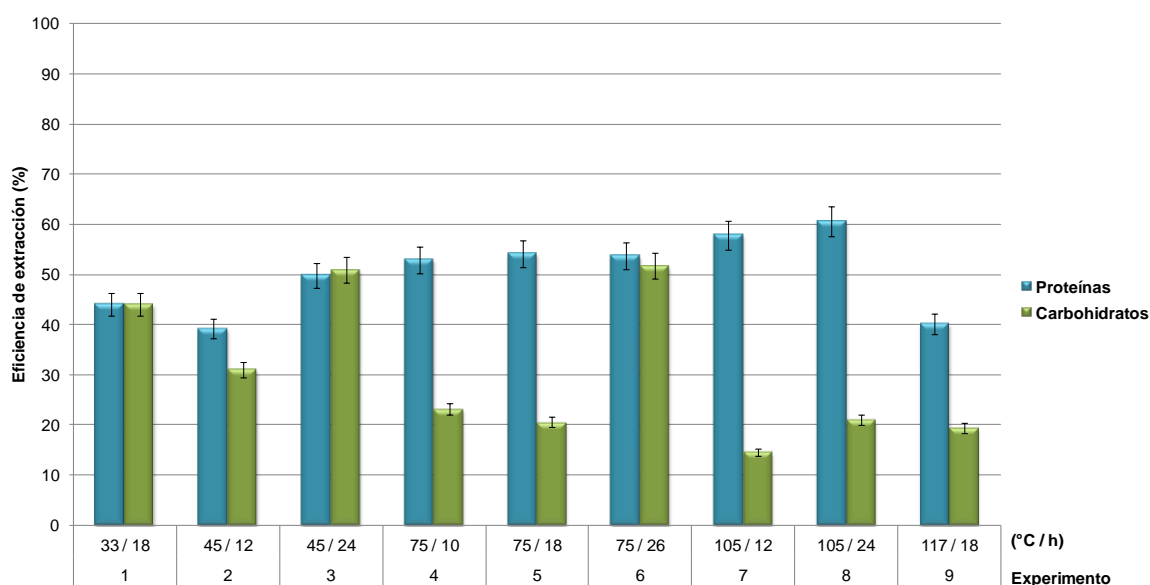


Figura 2.1: Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas.

En la figura 2.1 se observa que en los experimentos 1, 3 y 6 se logró alcanzar un 44 %, 50 % y 54 % de eficiencia en extracción de proteínas y un 44 %, 51 % y 52 % de eficiencia en extracción de carbohidratos. Estos experimentos reportaron los valores más altos de eficiencia en extracción tanto para carbohidratos como para proteínas. Cabe destacar, que el tratamiento 8 bajo condiciones de 105°C a 24 h logró un 61 % de eficiencia en la extracción de proteínas, siendo este el valor más alto comparado con los demás pretratamientos, sin embargo, la eficiencia en la extracción de carbohidratos solo alcanzó un 21 %. En este sentido, es importante señalar que si el interés de la extracción es hacia carbohidratos y proteínas, la biomasa debe ser pretratada bajo las condiciones del experimento 6 (75°C/26 h).

En la tabla 2.1 se presentan las eficiencias de extracción de carbohidratos y proteínas

obtenidas en los diferentes experimentos teniendo en cuenta el contenido de humedad de la biomasa utilizada.

Tabla 2.1: Eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas extraídas.

Experimento	°C / h	Humedad (%)	Proteínas		Carbohidratos	
			Extracción (g/l)	Eficiencia Extracción (%)	Extracción (g/l)	Eficiencia Extracción (%)
1	33 / 18	11,11	6,540	44	4,589	44
2	45 / 12	8,06	6,092	39	3,388	31
3	45 / 24	8,21	7,689	50	5,509	51
4	75 / 10	4,07	8,511	53	2,608	23
5	75 / 18	2,23	8,851	54	2,347	21
6	75 / 26	1,60	8,335	54	5,490	52
7	105 / 12	1,32	9,528	58	1,685	15
8	105 / 24	0,12	10,251	61	2,490	21
9	117 / 18	1,14	6,669	40	2,253	19

Como se observa en la tabla 2.1 en los experimentos 1 y 3 el contenido de humedad de la biomasa utilizada es de 11,11 % y 8,21 % respectivamente. Siendo estos los valores más altos en los nueve tratamientos realizados, sin embargo bajo estas condiciones se logró alcanzar un 44 % y 50 % de eficiencia en la extracción de proteínas y un 44 % y 51 % de eficiencia en la extracción de carbohidratos.

2.1. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos experimentalmente se analizaron utilizando el software STATISTICA 7.0. Se obtuvo la superficie de respuesta y los diagramas de pareto para evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de pretratamiento térmico de la biomasa en la eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas.

2.1.1. Extracción de proteínas

En la figura 2.2 se presenta la superficie de respuesta generada para la extracción de proteínas teniendo en cuenta las variables temperatura y tiempo de pretratamiento térmico de la biomasa.

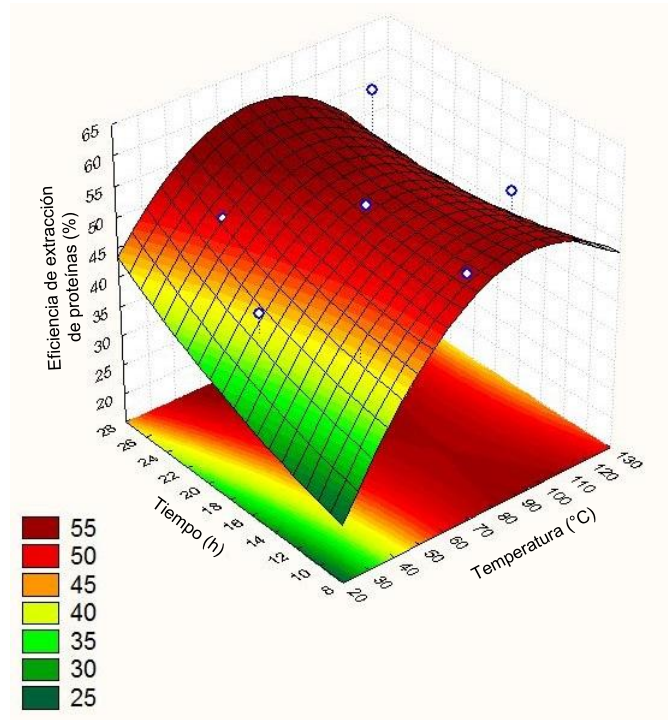


Figura 2.2: Superficie de respuesta de la eficiencia de extracción de proteínas.

El diagrama de superficie de respuesta, mostró que la eficiencia de extracción de proteínas alcanzó los valores más altos a temperaturas entre 80°C – 100°C sin importar los periodos de tiempo. Se puede inferir que la temperatura en el pretratamiento térmico afecta la eficiencia de extracción de los metabolitos de la biomasa, como lo reportan Chen *et al.* [29] en sus trabajos. Man Kee Lam *et al.* [19] expone que pretratar la biomasa a altas temperaturas (biomasa seca) logra romper la pared celular haciendo más fácil el proceso de extracción de los metabolitos. Sin embargo algunos autores mencionan que el pretratamiento térmico a altas temperaturas de la biomasa puede causar deterioro significativo en los metabolitos [8].

Con el fin determinar la influencia del tiempo y temperatura del pretratamiento térmico de la biomasa en la extracción de proteínas se realizó el diagrama de pareto, figura 2.3.

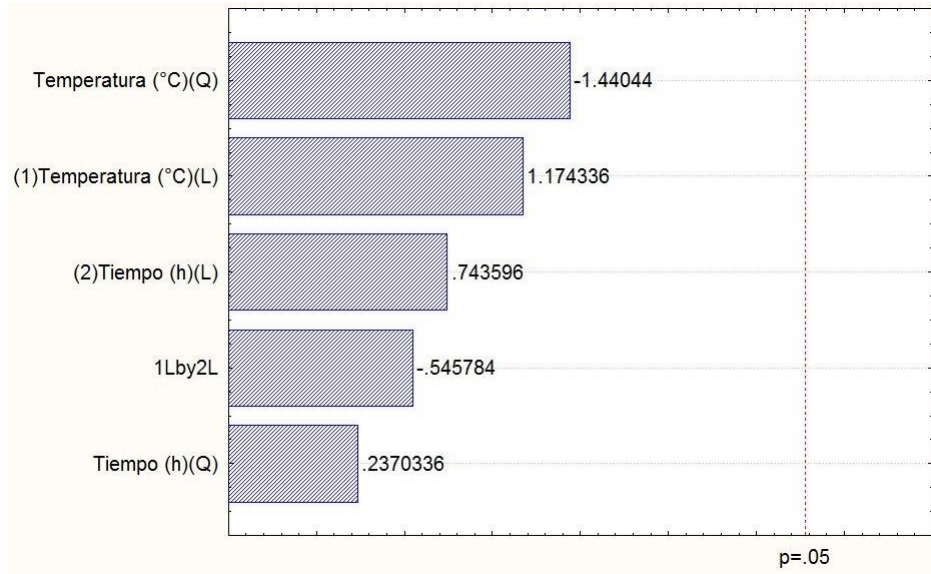


Figura 2.3: Diagrama de Pareto de la eficiencia de extracción de proteínas.

El diagrama de Pareto mostró que la temperatura y el tiempo del pretratamiento térmico no son significativos en la eficiencia de extracción de proteínas, debido a que las variables evaluadas (temperatura y tiempo del pretratamiento térmico) no sobrepasan el umbral de conformidad (0,05). Con lo anterior es posible decir que el contenido de humedad en la biomasa no es una variable determinante en el proceso de extracción de proteínas. Kanda *et al.* [20] propone trabajar la biomasa húmeda para disminuir el gasto energético generado por la etapa del pretratamiento térmico, teniendo en cuenta que esta etapa es una de las más críticas, por consumir aproximadamente el 69% de la energía total del proceso [19].

2.1.2. Extracción de carbohidratos

En la figura 2.4 se presenta la superficie de respuesta generada para la extracción de carbohidratos teniendo en cuenta las variables temperatura y tiempo de pretratamiento térmico de la biomasa.

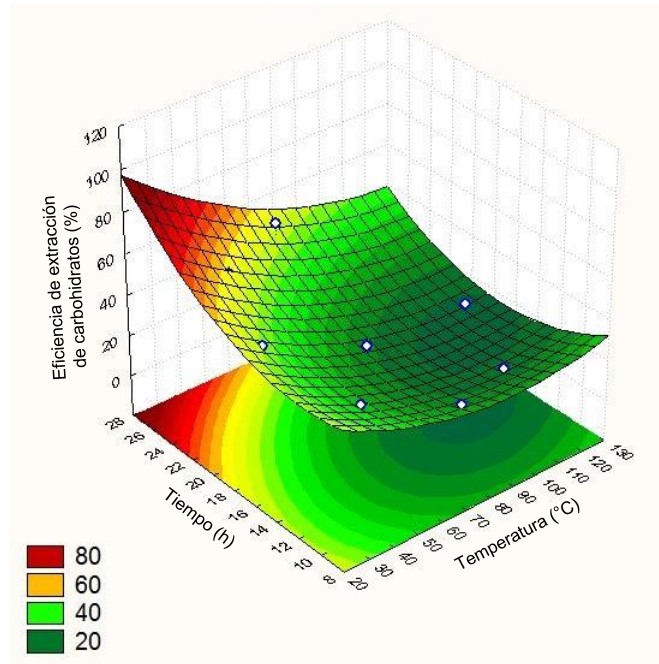


Figura 2.4: Superficie de respuesta de la eficiencia de extracción de carbohidratos.

El diagrama de superficie de respuesta, mostró que para lograr altos valores de eficiencia en extracción de carbohidratos se necesitan bajas temperaturas (20°C – 30°C) y periodos de tiempo altos (> 24h).

Con el fin determinar la influencia del tiempo y la temperatura de pretratamiento térmico de la biomasa en la extracción de carbohidratos se realizó el diagrama de pareto, figura 2.5.

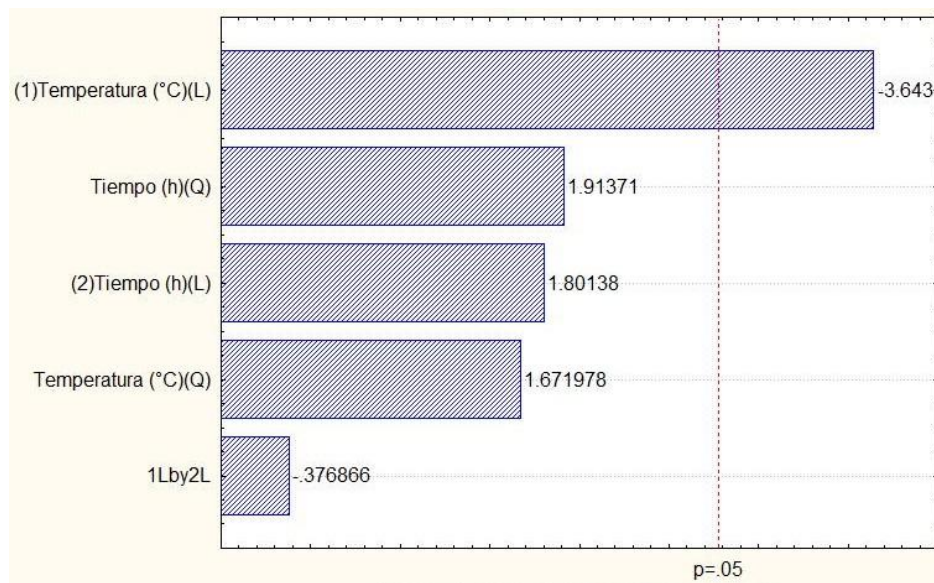


Figura 2.5: Diagrama de pareto de la eficiencia de extracción de carbohidratos.

Como se observa en el diagrama, la eficiencia de extracción de carbohidratos se ve influenciada por la temperatura de pretratamiento térmico. Esto, dado a que la variable sobrepasa el umbral de conformidad (0.05), con valores negativos, lo que indica que la disminución de la temperatura del pretratamiento incrementa la eficiencia de extracción.

Los análisis estadísticos realizados para la extracción de carbohidratos y proteínas indican que las condiciones de pretratamiento no afectan significativamente la eficiencia de extracción de los metabolitos de interés. Debido a lo anterior se realizó una prueba control utilizando *Chlorella vulgaris* concentrada, sin pretratamiento térmico, con un contenido de humedad cercano al 73 %.

2.2. Tratamiento control

El experimento control consistió en utilizar la biomasa con un contenido de humedad cercano al 73 %. En la figura 2.6 se presenta la eficiencia de extracción de los mejores pretratamientos térmicos incluyendo el tratamiento control (25°C/0h).

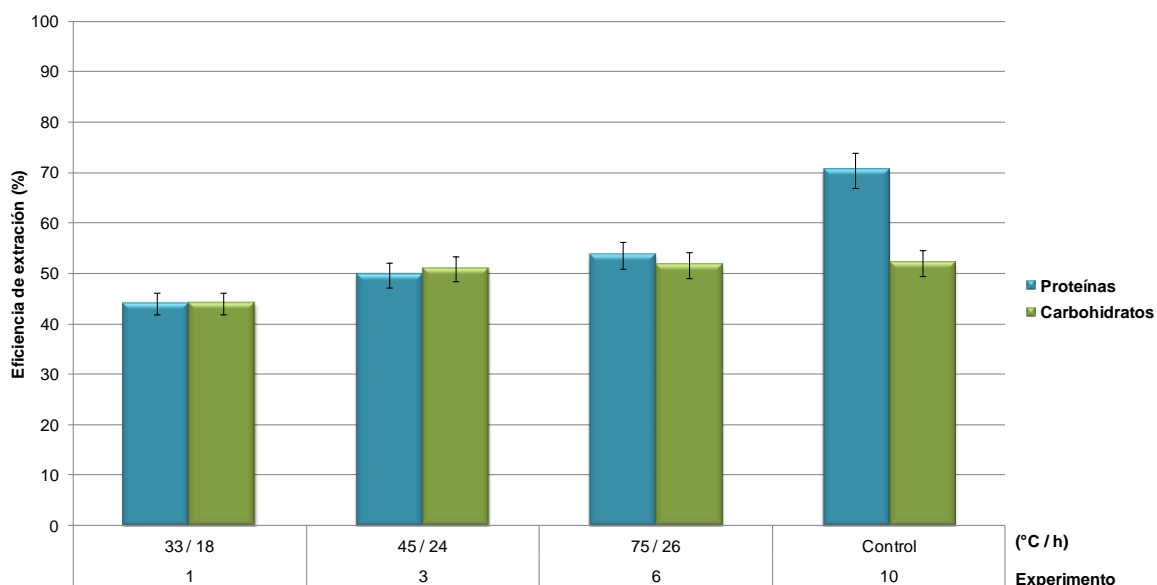


Figura 2.6: Eficiencia de extracción de los mejores experimentos y tratamiento control.

En la figura 2.6 se observa que el tratamiento control alcanzó un porcentaje de eficiencia de 71 % en la extracción de proteínas y un 52 % en la eficiencia de extracción de carbohidratos. Este resultado es mejor al obtenido en los tratamientos 1, 3 y 6 en la extracción de proteínas y similar en la extracción de carbohidratos. Lo anterior demuestra que no se requiere un pretratamiento térmico para obtener

altas eficiencias de extracción a pesar de tener un contenido de humedad cercano al 73 %. Es importante tener en cuenta que el consumo energético generado por la etapa de pretratamiento térmico es costoso. A una escala laboratorio el consumo de un horno (WTC BINDER) utilizado para la etapa del pretratamiento térmico es de $1,6 \text{ kW/h}$, este consumo se incrementa significativamente a una escala industrial aumentando los costos de producción. Utilizar biomasa sin pretratamiento térmico ahorraría este consumo energético y además se lograrían resultados similares o mejores a los obtenidos con biomasa seca.

Molina Grima *et al.* [30] expone que el exceso de humedad en la biomasa microalgal puede influir sustancialmente en la economía de la etapa de extracción de productos de alto valor. Lardon *et al* [31] en sus estudios revela que el contenido de humedad en la biomasa microalgal aumenta tres veces el gasto energético en la etapa de extracción de los metabolitos (7,1 MJ a 22,4 MJ), sin embargo estos valores no son tan significativos en el balance total energético, como lo es el consumo generado en la etapa de secado. Esta etapa consume 81,8 MJ en calor y 8,52 MJ de electricidad, siendo los valores de energía más altos en comparación con las etapas de recuperación y extracción de la biomasa.

Bajo este escenario se propone utilizar biomasa húmeda en condiciones alcalinas como una alternativa en la reducción de costos energéticos, sin afectar la eficiencia de la extracción de los metabolitos de interés.

2.3. Hidrólisis básica comparada con otros métodos de extracción de carbohidratos

En la figura 2.7 se presenta la eficiencia de extracción de carbohidratos bajo condiciones alcalinas utilizando biomasa húmeda en comparación con otros métodos de extracción presentados por diferentes autores.

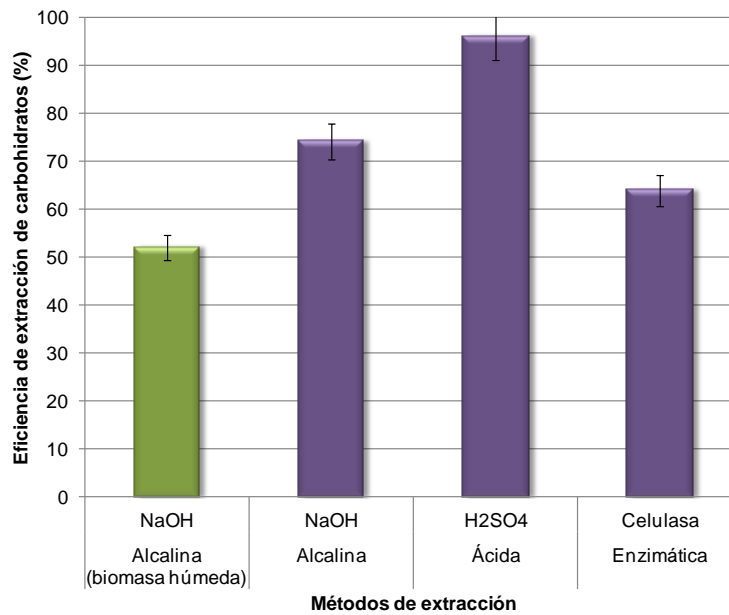


Figura 2.7: Comparación de la eficiencia de extracción de carbohidratos con diferentes métodos de extracción.

Como se observa en la figura 2.7, utilizando biomasa húmeda bajo condiciones alcalinas de 3,67 M a 55°C y una relación solvente/biomasa de 30 ml/g, durante 20 min de reacción, se alcanzó una eficiencia de extracción de 52%. En contraste, la extracción alcalina utilizando biomasa seca a 120°C por 30 min, con 0,75% (p/v) de NaOH, obtuvo una eficiencia de extracción de 74,2% [17]. En el caso de la extracción enzimática los autores reportan una eficiencia de 64% con una relación biomasa/solvente de 10 g/l, y 20 mg de celulasa, durante 5 h de reacción a 40°C [16]. Por otra parte, la hidrólisis ácida (H_2SO_4) logró una eficiencia de 96% con una relación biomasa/solvente de 10 g/l, concentración de ácido al 1%, llevando a cabo la reacción en un autoclave a 121°C durante 20 min [32]. La eficiencia de extracción de carbohidratos obtenida en el presente estudio es menor a los resultados alcanzados en la hidrólisis enzimática, ácida y alcalina reportados por los diferentes autores. Sin embargo el proceso enzimático requiere tiempos largos de reacción, siendo éste 15 veces mayor en comparación con los resultados obtenidos en la hidrólisis alcalina (utilizando biomasa húmeda). En el caso de la hidrólisis ácida, el uso de altas temperaturas en un sistema de autoclave puede aumentar los costos de extracción y posiblemente degradar los metabolitos contenidos en la biomasa microalgal [8]. Por otra parte la hidrólisis básica utilizando biomasa seca, logró mayor eficiencia de extracción en comparación con la eficiencia obtenida bajo las condiciones alcalinas propuestas en este trabajo. No obstante, el uso de NaOH a temperaturas y presiones altas en la etapa de extracción aumentan el grado de inhibición durante

el proceso de fermentación [17]. En este sentido, el uso de biomasa húmeda bajo las condiciones alcalinas presentadas en este trabajo, podría ser una alternativa prometedora en la extracción de carbohidratos. Lo anterior, dado a la reducción de costos y energía en la etapa de pretratamiento térmico de la biomasa. A demás, es posible reducir el grado de inhibición en la etapa de extracción, considerando el efecto de la temperatura y la presión del sistema sobre la extracción de los metabolitos.

2.4. Hidrólisis básica comparada con otros métodos de extracción de proteínas

En la figura 2.8 se presenta la eficiencia de extracción de proteínas bajo condiciones alcalinas utilizando biomasa húmeda en comparación con otros métodos de extracción presentados por diferentes autores.

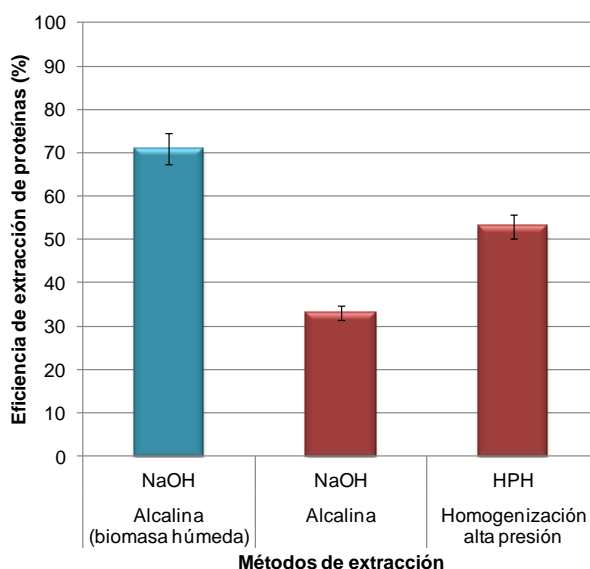


Figura 2.8: Comparación de la eficiencia de extracción de proteínas con diferentes métodos de extracción.

Como se observa en la figura 2.8, utilizando biomasa húmeda bajo condiciones alcalinas de 3,67 M a 55°C y una relación solvente/biomasa de 30 ml/g, durante 20 min de reacción, se alcanzó una eficiencia de extracción de 71%. En contraste, la hidrólisis alcalina bajo condiciones de 2 N de NaOH a 40°C y una relación solvente/biomasa de 50 ml/g, durante 2 h de reacción logrando una eficiencia de extracción de 33% [34]. En el caso de la homogeneización a alta presión (HPH) donde se aplicó 2700 bar de presión en 2 ciclos a una muestra de biomasa (0,5 g de biomasa seca dispersas

en 25 *ml* de agua destilada) los autores reportan una eficiencia de extracción de 53 % [34]. Cabe destacar que la eficiencia de extracción bajo condiciones alcalinas utilizando biomasa húmeda es más alta que la eficiencia de extracción utilizando biomasa seca. Por otra parte la eficiencia de extracción mediante homogeneización a alta presión (HPH) es menor a la eficiencia de extracción bajo condiciones alcalinas utilizando biomasa húmeda. Es importante resaltar que la HPH es una técnica muy costosa debido a sus altos requerimientos energéticos, lo que incrementa los costos de procesamiento de biomasa microalgal. De esta manera, el uso de biomasa húmeda bajo las condiciones alcalinas presentadas en este trabajo, podría ser una alternativa eficiente en la extracción de proteínas. Lo anterior, dado a la reducción de costos y energía en la etapa de pretratamiento térmico de la biomasa.

3 CONCLUSIONES

- (a) A una temperatura de 75°C y 26 h, se presentan las mejores condiciones de pretratamiento térmico para lograr altas eficiencias en extracción de carbohidratos y proteínas alcanzando un 52 % y 54 % respectivamente.
- (b) De acuerdo a los resultados del análisis estadístico, se concluyó que es posible obtener altas eficiencias de extracción con biomasa húmeda, alcanzando un 52 % de eficiencia en la extracción de carbohidratos y 71 % de eficiencia en la extracción de proteínas bajo condiciones alcalinas.
- (c) El alto contenido de humedad en la biomasa ($\approx 73\%$) no limitó la eficiencia de extracción de los metabolitos de interés, reduciendo cerca del 69 % de la energía total del proceso generada por la etapa del pretratamiento térmico, sin influir negativamente en la eficiencia de extracción.
- (d) La eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas en el presente trabajo fue satisfactoria comparada con los resultados expuestos por los diferentes autores; de esta manera se puede decir que la extracción de carbohidratos y proteínas con biomasa húmeda es una alternativa eficiente que contribuiría a la producción sostenible de biomasa microalgal.

4 RECOMENDACIONES

- Dada la alta eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas utilizando biomasa húmeda de *Chlorella vulgaris*, se recomienda estudiar la posibilidad de realizar la extracción directamente en el medio de cultivo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] Uggetti, E., et al., *Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach*. En: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2014. 8(4): p. 516-529.
- [2] Mata, T.M., et al., *Sustainability and economic evaluation of microalgae grown in brewery wastewater*. En: *Bioresource Technology*, 2014. 168(0): p. 151-158.
- [3] Halim, R., et al., *Bioprocess Engineering Aspects of Biodiesel and Bioethanol Production from Microalgae*. En: *Advanced Biofuels and Bioproducts*, J.W. Lee, Editor. 2013, Springer New York. p. 601-628.
- [4] Mata, T.M., A.A. Martins, and N.S. Caetano, *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(1): p. 217-232.
- [5] Safi, C., et al., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014. 35(0): p. 265-278.
- [6] Ho, S.-H., et al., *Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock*. En: *Bioresource Technology*, 2013. 135(0): p. 191-198.
- [7] García-Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González-López, C., Fernández-Sevilla, J. & Acien Fernández, F. (2012). *Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas carbohidratos y lípidos*. *Revista Latinoamericana en Biotecnología Ambiental y Algal.*, 3(2) ,147-161.
- [8] Brennan, L. and P. Owende, *Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(2): p. 557-577.
- [9] Heredia-Arroyo, T., et al., *Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials*. En: *Biomass and Bioenergy*, 2011. 35(5): p. 2245-2253.

- [10] He, P.J., et al., *Cultivation of Chlorella vulgaris on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production*. En: *Bioresource Technology*, 2013. 129(0): p. 177-181.
- [11] Thilakaratne, R., M.M. Wright, and R.C. Brown, *A techno-economic analysis of microalgae remnant catalytic pyrolysis and upgrading to fuels*. En: *Fuel*, 2014. 128(0): p. 104-112.
- [12] Harun, R., et al., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(3): p. 1037-1047.
- [13] Mercer, P. and R.E. Armenta, *Developments in oil extraction from microalgae*. En: *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011. 113(5): p. 539-547.
- [14] Lee, A.K., D.M. Lewis, and P.J. Ashman, *Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements*. En: *Biomass and Bioenergy*, 2012. 46(0): p. 89-101.
- [15] Harun, R., M.K. Danquah, and G.M. Forde, *Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production*. En: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2010. 85(2): p. 199-203.
- [16] Harun, R. and M.K. Danquah, *Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production*. En: *Process Biochemistry*, 2011. 46(1): p. 304-309.
- [17] Harun, R., et al., *Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production*. En: *Applied Energy*, 2011. 88(10): p. 3464-3467.
- [18] Mathew, A.K., et al., *Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: Evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption*. En: *Bioresource Technology*, 2011. 102(11): p. 6547-6553.
- [19] Lam, M.K. and K.T. Lee, *Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward*. En: *Biotechnology Advances*, 2012. 30(3): p. 673-690.
- [20] Kanda, H., et al., *Wet extraction of hydrocarbons from Botryococcus braunii by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane*. En: *Fuel*, 2013. 105(0): p. 535-539.
- [21] Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. En: *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959. 37(8): p. 911-917.
- [22] AYALA TORRES, Edison Gabriel; REYES GOMEZ, Oscar Julián: *Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos*

heterótrofos de chlorella vulgaris utex 1803. Bucaramanga, 2014. Trabajo de grado (ingeniería química).Universidad industrial de Santander. Escuela de ingeniería química.

- [23] Serive, B., et al., *Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae*. En: Bioresource Technology, 2012. 124(0): p. 311-320.
- [24] Slocombe, S.P., et al., *A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass*. En: Bioresource Technology, 2013. 129(0): p. 51-57.
- [25] Schwenzfeier, A., P.A. Wierenga, and H. Gruppen, *Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae Tetraselmis sp.* En: Bioresource Technology, 2011. 102(19): p. 9121-9127.
- [26] DuBois, M., et al., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. En: Analytical Chemistry, 1956. 28(3): p. 350-356.
- [27] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. En: J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- [28] Moheimani, N., et al., *Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition*. En: Algae for Biofuels and Energy, M.A. Borowitzka and N.R. Moheimani, Editors. 2013, Springer Netherlands. p. 265-284.
- [29] Chen, C.-Y., et al., *Microalgae-based carbohydrates for biofuel production*. En: Biochemical Engineering Journal, 2013. 78(0): p. 1-10.
- [30] Molina Grima, E., et al., *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. En: Biotechnology Advances, 2003. 20(7-8): p. 491-515.
- [31] Lardon, L., et al., *Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae*. En: Environmental Science & Technology, 2009. 43(17): p. 6475-6481.
- [32] Kim, J., et al., *Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae*. En: Biotechnology Advances, 2013. 31(6): p. 862-876.
- [33] Ho, S.-H., C.-Y. Chen, and J.-S. Chang, *Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N*. En: Bioresource Technology, 2012. 113(0): p. 244-252.
- [34] Safi, C., et al., *Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods*. En: Algal Research, 2014. 3(0): p. 61-65.
- [35] Safi, C., et al., *Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments*. En: Algal Research, 2014. 3(0): p. 55-60.

BIBLIOGRAFÍA

AYALA TORRES, Edison Gabriel; REYES GOMEZ, Oscar Julián: *Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de chlorella vulgaris utex 1803*. Bucaramanga, 2014. Trabajo de grado (ingeniería química). Universidad industrial de Santander. Escuela de ingeniería química.

Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. En: Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959. 37(8): p. 911-917.

Brennan, L. and P. Owende, *Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. 14(2): p. 557-577.

Chen, C.-Y., et al., *Microalgae-based carbohydrates for biofuel production*. En: Biochemical Engineering Journal, 2013. 78(0): p. 1-10.

DuBois, M., et al., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. En: Analytical Chemistry, 1956. 28(3): p. 350-356.

García-Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González-López, C., Fernández-Sevilla, J. & Acien Fernández, F. (2012). *Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas carbohidratos y lípidos*. Revista Latinoamericana en Biotecnología Ambiental y Algal., 3(2) ,147-161.

Halim, R., et al., *Bioprocess Engineering Aspects of Biodiesel and Bioethanol Production from Microalgae*. En: Advanced Biofuels and Bioproducts, J.W. Lee, Editor. 2013, Springer New York. p. 601-628.

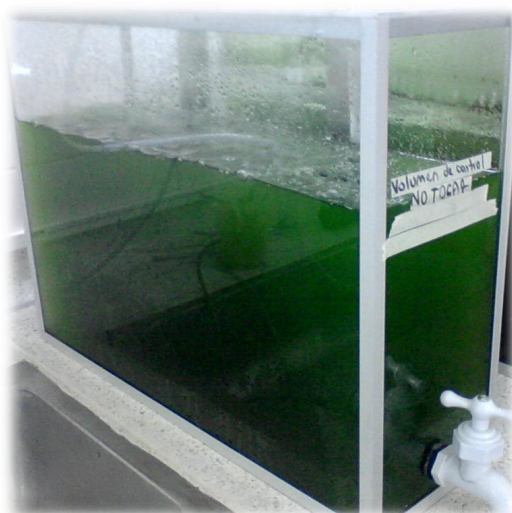
Harun, R., et al., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. 14(3): p. 1037-1047.

Harun, R., M.K. Danquah, and G.M. Forde, *Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production*. En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2010. 85(2): p. 199-203.

- Harun, R. and M.K. Danquah, *Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production*. En: Process Biochemistry, 2011. 46(1): p. 304-309.
- Harun, R., et al., *Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production*. En: Applied Energy, 2011. 88(10): p. 3464-3467.
- He, P.J., et al., *Cultivation of Chlorella vulgaris on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production*. En: Bioresource Technology, 2013. 129(0): p. 177-181.
- Heredia-Arroyo, T., et al., *Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials*. En: Biomass and Bioenergy, 2011. 35(5): p. 2245-2253.
- Ho, S.-H., et al., *Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock*. En: Bioresource Technology, 2013. 135(0): p. 191-198.
- Ho, S.-H., C.-Y. Chen, and J.-S. Chang, *Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N*. En: Bioresource Technology, 2012. 113(0): p. 244-252.
- Kanda, H., et al., *Wet extraction of hydrocarbons from Botryococcus braunii by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane*. En: Fuel, 2013. 105(0): p. 535-539.
- Kim, J., et al., *Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae*. En: Biotechnology Advances, 2013. 31(6): p. 862-876.
- Lam, M.K. and K.T. Lee, *Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward*. En: Biotechnology Advances, 2012. 30(3): p. 673-690.
- Lardon, L., et al., *Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae*. En: Environmental Science & Technology, 2009. 43(17): p. 6475-6481.
- Lee, A.K., D.M. Lewis, and P.J. Ashman, *Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements*. En: Biomass and Bioenergy, 2012. 46(0): p. 89-101.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. En: J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Mata, T.M., A.A. Martins, and N.S. Caetano, *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. 14(1): p. 217-232.

- Mata, T.M., et al., *Sustainability and economic evaluation of microalgae grown in brewery wastewater*. En: *Bioresource Technology*, 2014. 168(0): p. 151-158.
- Mathew, A.K., et al., *Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: Evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption*. En: *Bioresource Technology*, 2011. 102(11): p. 6547-6553.
- Mercer, P. and R.E. Armenta, *Developments in oil extraction from microalgae*. En: *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011. 113(5): p. 539-547.
- Moheimani, N., et al., *Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition*. En: *Algae for Biofuels and Energy*, M.A. Borowitzka and N.R. Moheimani, Editors. 2013, Springer Netherlands. p. 265-284.
- Molina Grima, E., et al., *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. En: *Biotechnology Advances*, 2003. 20(7-8): p. 491-515.
- Safi, C., et al., *Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods*. En: *Algal Research*, 2014. 3(0): p. 61-65.
- Safi, C., et al., *Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review*. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014. 35(0): p. 265-278.
- Safi, C., et al., *Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments*. En: *Algal Research*, 2014. 3(0): p. 55-60.
- Schwenzfeier, A., P.A. Wierenga, and H. Gruppen, *Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp.* En: *Bioresource Technology*, 2011. 102(19): p. 9121-9127.
- Serive, B., et al., *Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae*. En: *Bioresource Technology*, 2012. 124(0): p. 311-320.
- Slocombe, S.P., et al., *A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass*. En: *Bioresource Technology*, 2013. 129(0): p. 51-57.
- Thilakaratne, R., M.M. Wright, and R.C. Brown, *A techno-economic analysis of microalgae remnant catalytic pyrolysis and upgrading to fuels*. En: *Fuel*, 2014. 128(0): p. 104-112.
- Uggetti, E., et al., *Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach*. En: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2014. 8(4): p. 516-529.

ANEXOS



(a) Cultivo *Chlorella vulgaris*.



(b) Recuperación de la biomasa.



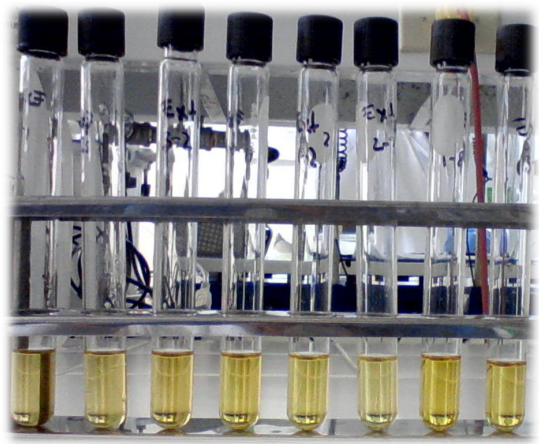
(c) Biomasa concentrada.



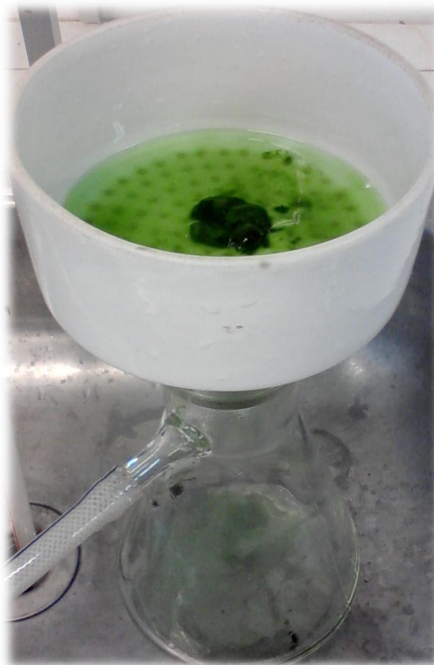
(d) Hidrólisis.



(e) Cuantificación de proteínas.



(f) Cuantificación de carbohidratos.



(g) Biomasa residual.