



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Estudio de hidrólisis básica para la recuperación de la fracción proteica de biomasa algal crecida en plantas de tratamiento de purines

Autor:

Ruiz Vegas, Javier

Tutor:

Bolado Rodríguez, Silvia

Lorenzo Hernando, Ana

**Departamento de Ingeniería
Química y Tecnología del Medio
Ambiente**

Valladolid, Octubre de 2017.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	5
2.	LISTA DE ILUSTRACIONES.....	6
3.	LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	8
4.	INTRODUCCIÓN.....	10
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1	BIOMASA ALGAL.....	14
5.2	HIDRÓLISIS BÁSICA.....	14
5.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	17
6.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	19
6.1	RENDIMIENTO GLOBAL DE LA EXTRACCIÓN.....	19
6.2	COMPOSICIÓN DEL SÓLIDO FINAL RECUPERADO.....	23
7.	CONCLUSIONES.....	33
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. RESUMEN

Este trabajo estudia la optimización del proceso de obtención de proteínas de biomasa algal crecida en plantas de tratamiento de purines. Se trata de un trabajo experimental en el que se ha partido de biomasa algal liofilizada, mayoritariamente *Scenedesmus almeriensis*, procedente de plantas de tratamiento ubicadas en la Estación de las Palmerillas, de la Fundación Cajamar en Almería. Se ha aplicado un proceso de hidrólisis básica para la extracción proteica variando las condiciones de tiempo, temperatura y concentración de NaOH utilizada. Las condiciones ensayadas para la extracción son 0.5h, 2h y 5h para el tiempo; 25°C, 40°C y 55°C para la temperatura; y 0,1M, 0,5M y 2M para la concentración de NaOH. Posteriormente, se realiza una precipitación por variación de pH, obteniéndose así el sólido final proteico recuperado.

Se evalúa el rendimiento de extracción global y la pureza del sólido final proteico, analizando la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos obtenidos en cada experimento. Estos resultados se analizan en función de la severidad de las condiciones de operación empleadas. De este modo, es posible obtener un punto óptimo entre la cantidad de producto obtenida y los recursos gastados en la extracción.

Palabras clave: Microalga liofilizada, proteína, carbohidratos, lípidos, hidrólisis básica.

ABSTRACT

This work studies the influence of several conditions in the proteins extraction process from algal biomass obtained from pig manure wastewaters treatment. The predominant species in the freeze-dried algal biomass used in this experimental work is *Scenedesmus almeriensis*, An alkaline hydrolysis process for protein extraction has been applied, and the studied variables were time, temperature and NaOH concentration used. The conditions tested for the extraction are 0.5h, 2h and 5h for the time; 25 ° C, 40 ° C and 55 ° C for the temperature; and 0.1M, 0.5M and 2M for the NaOH concentration. Subsequently, extract purification is done by protein precipitation by acidification, obtaining the final recovered protein.

The global extraction yield and purity of the final protein extract were evaluated by analyzing the proteins, lipids and carbohydrates content of in the extracts obtained for each experiment. These results were evaluated according to the severity of the different operating conditions used. In this way, it was possible to obtain an optimal point where the maximum amount of product was obtained using the minimum quantity of resources in the extraction.

Key words: Freeze-dried microalgae, proteins, carbohydrates, lipids, basic hydrolysis

2. LISTA DE ILUSTRACIONES

TABLAS

Tabla 1. Composición química de diferentes microalgas (% en materia seca).
Página 10.

Tabla 2: Nomenclatura de los experimentos (NaOH=0,1M). Página 14.

Tabla 3: Nomenclatura de los experimentos (NaOH=0,5M). Página 15.

Tabla 4: Nomenclatura de los experimentos (NaOH=2M). Página 15.

Tabla 5: Porcentaje de nitrógeno Kjeldahl en el pellet intermedio básico y en el sólido proteico recuperado, y porcentaje total de nitrógeno Kjeldahl recuperado.
Página 30.

GRÁFICAS

Gráfica 1: Esquema de la hidrólisis básica y posterior precipitación. Página 16.

Gráfica 2: Rendimiento global de extracción, expresado como gramo recuperado tras la precipitación por cada 100 gramos de biomasa. Página 19.

Gráfica 3: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 0,1M. Página 20.

Gráfica 4: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 0,5M. Página 21.

Gráfica 5: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 2M. Página 22.

Gráfica 6: Factor de recuperación para los ensayos a mayor severidad. Página 23.

Gráfica 7: Composición macromolecular de los sólidos proteicos recuperados.
Página 24.

Gráfica 8: Rendimiento específico de extracción. Página 24.

Gráfica 9: Cantidad proteica de cada sólido proteico recuperado. Página 25.

Gráfica 10: Gramos de carbohidratos por cada 100 gramos finales recuperados.
NaOH 0,1M. Página 26.

Gráfica 11: Gramos de carbohidratos por cada 100 gramos finales recuperados.
NaOH 0,5M. Página 26.

Gráfica 12: Gramos de carbohidratos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 2M. Página 27.

Gráfica 13: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,1M. Página 28.

Gráfica 14: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,5M. Página 28.

Gráfica 15: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 2M. Página 29.

3. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
NKT	Nitrógeno Kjeldahl
HPLC-IR	Cromatografía de líquidos de alta resolución (detector de índice de refracción)
v/v	Porcentaje en volumen
M	Molaridad (mol/L)

4. INTRODUCCIÓN

Desde principios de los años 50, se investiga en la búsqueda y desarrollo de nuevas fuentes de proteínas para diferentes aplicaciones. La demanda de proteínas aumenta continuamente debido al incremento de la población y a las necesidades energéticas que ello conlleva.

La biomasa microalgal es una fuente prometedora de proteínas, lípidos, hidratos de carbono y otros productos de alto valor añadido de gran relevancia para multitud de industrias, por ejemplo, para producción de piensos y biocombustibles entre otros. En comparación con otras fuentes vegetales de proteínas, tales como la soja y el aceite de palma, las microalgas se pueden cultivar de manera más eficiente y sostenible (Vanthoor-Koopmans et al., 2013).

Alga	Protein	Carbohydrates	Lipids
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Spirogyra</i> sp.	6–20	33–64	11–21
<i>Arthrospira maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	8–14	4–9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Tabla 1: Composición química de diferentes microalgas (% en materia seca). (Saha et al., 2015)

Uno de los principales inconvenientes en la producción de algas es la cantidad de energía utilizada en todo el proceso y los costes de inversión (Norsker et al., 2011). El cultivo de microalgas conlleva gastos importantes y la mayoría de las especies de microalgas tienen una pared celular resistente que necesita ser rota/fragmentada antes de extraer el o los productos de interés, lo que supone un consumo de energía. De hecho, la extracción eficiente de la biomasa microalgal a menudo se ve afectada por la rigidez de su pared celular. Existen diversos trabajos de producción de proteínas con microalgas crecidas en reactores cerrados, en condiciones controladas, pero, en la mayoría de los casos, los costes de producción hacen que el proceso global no resulte económicamente viable. Las microalgas pueden crecer en condiciones reales, al aire libre, pero

también en aguas residuales, actuando como sistema de tratamiento para efluentes difíciles de tratar por métodos tradicionales, como son las procedentes de explotaciones porcinas. De hecho, en ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz (Park et al., 2011). Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Hernández Pérez et al., 2014). En el medio de cultivo favorable, los microorganismos verdes encuentran el nitrógeno y fósforo necesarios para su desarrollo que, de lo contrario, tienen que añadirse a través de fertilizantes que encarecen el proceso de producción y no resultan respetuosos con el medio ambiente. Los purines se caracterizan por presentar concentraciones muy elevadas de nitrógeno y fósforo que las plantas de tratamiento de residuos son incapaces de procesar. Para resolver este problema, se puede combinar la producción de microalgas con el tratamiento de aguas residuales.

Del mismo modo, es destacable la capacidad de las microalgas para metabolizar dióxido de carbono. La reducción de los niveles atmosféricos de dióxido de carbono, gas de efecto invernadero, es un objetivo prioritario de alcance global, y la utilización de estos microorganismos fotosintéticos capaces de retirar CO₂ puede ser una solución al problema. De hecho, las microalgas y las cianobacterias, son únicas y muy valiosas ya que son los mayores transformadores de CO₂ en O₂ del planeta, con rendimientos de fijación de carbono más de cinco veces superiores a las mejores plantaciones de maíz, además de ser fuente de biomasa y uno de los grupos ecológicos más variables del mundo (Hernández-Pérez et al., 2014).

Por lo tanto, se debe poner énfasis en la explotación máxima de la biomasa de microalgas al tiempo que se minimiza el uso de energía. En la mayoría de los casos, las proteínas son la fracción más grande de las microalgas, y los lípidos son una parte menor excepto para algunas especies de algas (Carioca et al., 2009).

Las proteínas se componen de diferentes aminoácidos y, por lo tanto, la calidad de las proteínas se determina principalmente por el contenido, la proporción y la disponibilidad de sus aminoácidos.

Para explotar todos los productos de las microalgas, es necesario aplicar el concepto de biorrefinería. El principal reto es separar las diferentes fracciones sin dañarlas. Deben desarrollarse procesos que proporcionen elevados rendimientos de recuperación de las diferentes fracciones de la biomasa con elevada pureza, sin afectar o degradar al resto. Las técnicas desarrolladas tienen que ser, además, baratas y con bajo consumo de energía. El primer enfoque en la obtención de los

productos debe ser hacerlos fácilmente extraíbles. Cuando los productos se liberan de las células, se necesitan diferentes técnicas de extracción, separación y purificación, por ello, es importante tener en cuenta que las tecnologías deben adaptarse a cada especie de interés. Por ejemplo, algunas especies de algas no tienen una pared celular, lo que hace que la rotura celular sea menos costosa energéticamente hablando. Estas diferencias deben tenerse en cuenta al seleccionar la técnica de rotura celular (Vanthoor-Koopmans et al., 2013). Después de la recolección de algas y la recuperación de los productos comercializables, la biomasa residual permanece y puede convertirse en diferentes direcciones. Se han realizado intentos para generar bioetanol a partir de la biomasa algal. Se puede lograr mediante la fermentación de los hidrolizados de biomasa algal rica en carbohidratos, empleando levaduras en condiciones anaeróbicas. Además, la biomasa residual de las algas también se puede utilizar para la generación de metano, un portador de energía que genera una huella de carbono insignificante, mediante degradación anaeróbica en plantas de biogás. (Koller et al., 2014).

La combinación de la digestión anaerobia y la producción de microalgas destinada a la obtención de diferentes compuestos de alto valor añadido y biocombustibles pueden resultar económica y medioambientalmente atractiva, reduciendo los costes directos debidos al consumo eléctrico y calorífico de la planta de producción y procesado de biomasa. El crecimiento de esta biomasa en plantas de tratamiento de aguas residuales supone un valor añadido y reduce los costes debidos al suministro de CO₂ y nutrientes (Ramón-Suárez, 2012).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 BIOMASA ALGAL

Para este estudio de extracción proteica fue utilizada una biomasa microalgal procedente del tratamiento de aguas residuales de purines, que fue liofilizada previo uso y amablemente proporcionada por la Universidad de Almería. La especie de microalga predominante en esta biomasa es la *Scenedesmus almeriensis*, que presenta una pared celular rígida que le confiere una resistencia muy útil para el tratamiento de aguas de alta carga contaminante.

La composición inicial de la biomasa microalgal es 34,4% de proteínas, 36,7% de carbohidratos, 8,0% de lípidos y 15,6% de cenizas. Como se puede ver, debido a su procedencia y a la época de cultivo (meses de Septiembre y Octubre), las fracciones predominantes son las proteínas y los azúcares, ambos metabolismos promovidos por la facilidad de acceso a nutrientes debido a su alto contenido en las aguas de purines.

5.2 HIDRÓLISIS BÁSICA

Las hidrólisis básicas para la extracción proteica se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL. La cantidad inicial de alga pesada fue 2,5 g secos, utilizando la disolución de sosa correspondiente en cada caso para obtener una concentración final de alga del 5% w/w.

Se realizaron tantos experimentos, por duplicado, como combinaciones existen entre las tres variables analizadas de la hidrólisis a los 3 niveles empleados: Concentración de NaOH, temperatura y tiempo. La nomenclatura utilizada numera cada nivel de intensidad de variable como 0, 1 ó 2, refiriéndose la primera cifra a la concentración de NaOH, la segunda a la temperatura y la tercera al tiempo:

Experimento	Concentración de NaOH (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Grado de severidad
J000	0,1M	25°C	0,5h	0
J001			2h	1
J002			5h	2
J010		40°C	0,5h	1
J011			2h	2
J012			5h	3
J020		55°C	0,5h	2
J021			2h	3
J022			5h	4

Tabla 2: Nomenclatura de los experimentos (Concentración de NaOH=0,1M)

Experimento	Concentración de NaOH (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Grado de severidad
J100	0,5M	25°C	0,5h	1
J101			2h	2
J102			5h	3
J110		40°C	0,5h	2
J111			2h	3
J112			5h	4
J120		55°C	0,5h	3
J121			2h	4
J122			5h	5

Tabla 3: Nomenclatura de los experimentos (Concentración de NaOH=0,5M)

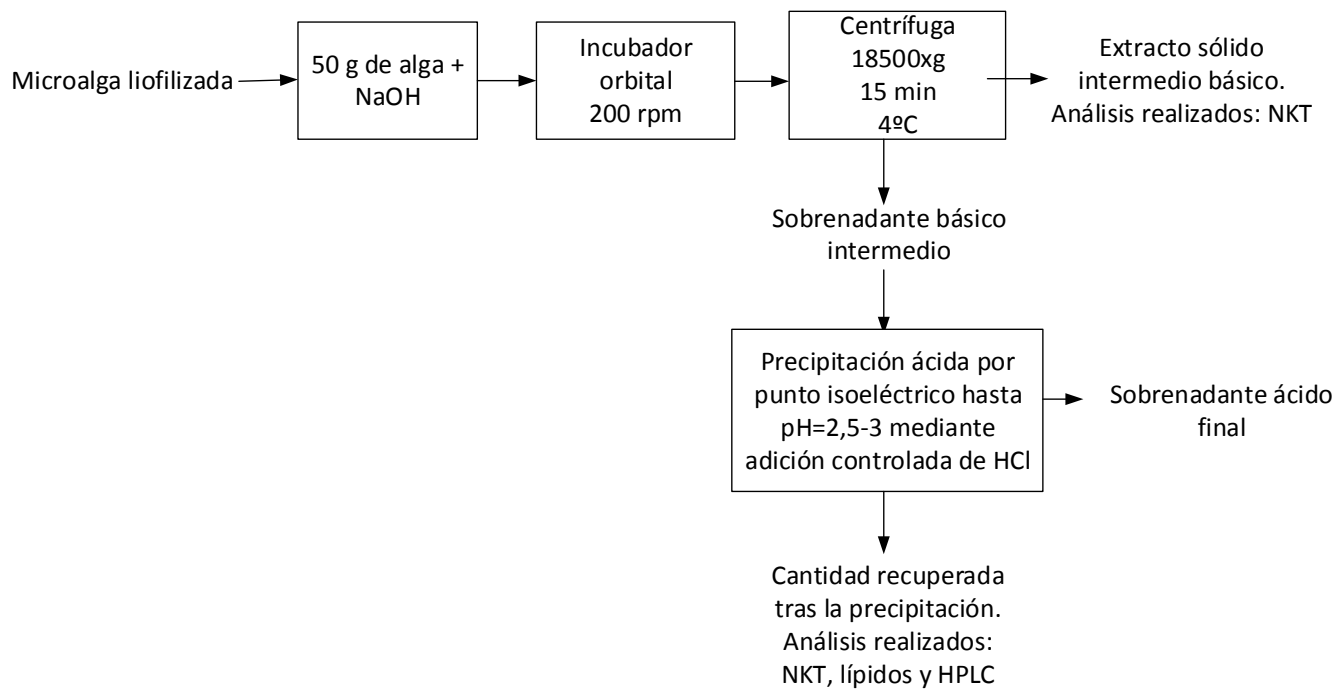
Experimento	Concentración de NaOH (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Grado de severidad
J200	2M	25°C	0,5h	2
J201			2h	3
J202			5h	4
J210		40°C	0,5h	3
J211			2h	4
J212			5h	5
J220		55°C	0,5h	4
J221			2h	5
J222			5h	6

Tabla 4: Nomenclatura de los experimentos (Concentración de NaOH=2M)

Se definió el grado de severidad como el valor obtenido sumando las cifras del código correspondiente a cada muestra, ya que las cifras más altas se corresponden con condiciones más severas.

Las hidrólisis se llevaron a cabo en un incubador orbital a temperatura constante bajo agitación de 200 rpm. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se

centrifugó la solución a 18500xg durante 15 minutos a 4°C. De las dos fases obtenidas, el sólido se secó a 40°C, se pesó y almacenó para un posible posterior análisis, y se recuperó el sobrenadante, al que se le sometió a una precipitación por punto isoelectrico. El sobrenadante se acidificó hasta pH 2,5-3 mediante adición controlada de HCl 2M, para precipitar las proteínas solubilizadas por la hidrólisis básica. El sólido obtenido de la centrifugación (en las mismas condiciones que la anterior) del sobrenadante acidificado se definió como sólido final proteico recuperado, se secó a 40°C, se pesó y se almacenó en frío para posterior análisis.



Gráfica 1: Esquema de la hidrólisis básica y posterior precipitación.

El rendimiento global de extracción se definió como la relación que existe entre la masa del sólido final proteico recuperado por precipitación por cada 100 gramos de biomasa algal inicial.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

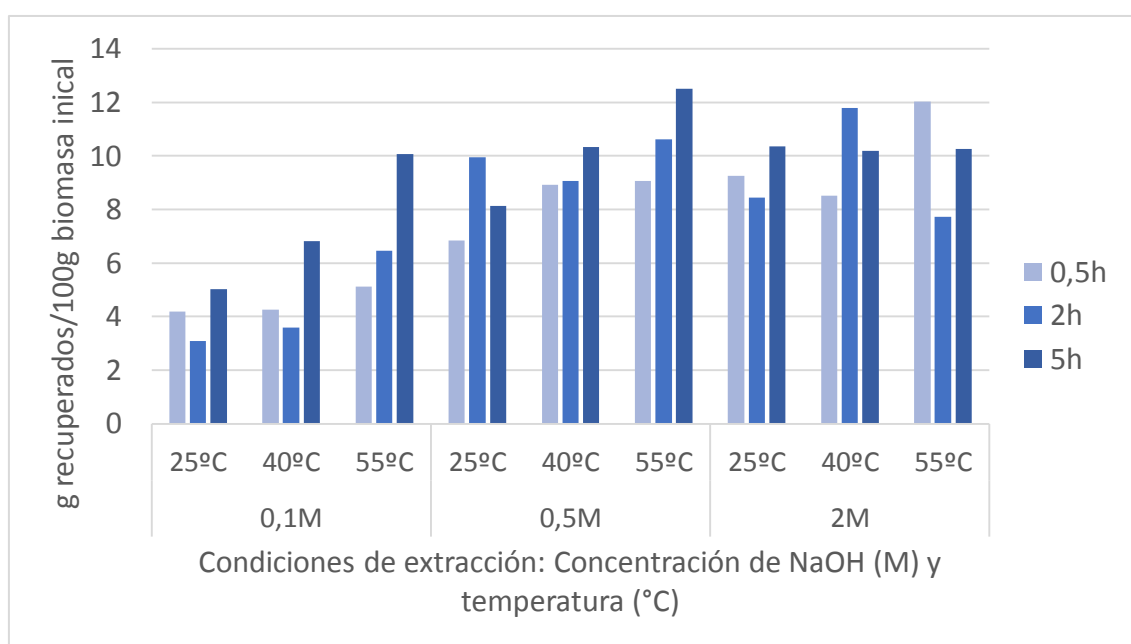
El extracto sólido básico intermedio fue sometido a un análisis de contenido en proteínas, mientras que a la biomasa algal inicial y al sólido proteico final se cuantificó el contenido en tanto en proteínas, como en lípidos y en carbohidratos.

La cantidad de proteínas fue determinada mediante el método de nitrógeno Kjeldahl Total (NKT), que comprende la digestión de la muestra, destilación y valoración final con sulfúrico. El porcentaje de nitrógeno Kjeldahl es calculado a partir del volumen de valorante gastado, y transformado en porcentaje de proteínas multiplicándolo por un factor de 5,95 (Gonzalez López et al., 2010). El contenido en lípidos fue obtenido por gravimetría mediante extracción sólido-líquido de la fase lipídica con disolvente orgánico (Cloroformo:metanol 2:1) siguiendo el método Kochert (Kochert et al., 1978). El contenido en carbohidratos fue determinado aplicando un protocolo modificado del NREL, que consiste en dos hidrólisis ácidas consecutivas, una concentrada y otra diluida, para la solubilización de los carbohidratos y su posterior cuantificación en forma de glucosa equivalente (Bolado-Rodríguez et al., 2016). Primero, se realizó una hidrólisis ácida concentrada de 0,3 g en base seca de producto con 3 mL de H₂SO₄ al 72% (v/v), incubándolo en un baño termostático a 30°C durante 1h. Posteriormente, se añaden 84 mL de agua destilada para diluir la concentración de ácido del 72% al 4%. La hidrólisis ácida diluida se lleva a cabo durante 1h a 121°C. Los líquidos de las hidrólisis fueron filtrados y almacenados hasta su posterior análisis, para lo que fue empleada una columna de BioRad HPX-87H de exclusión-iónica, instalada en un módulo Waters e2695 equipado con un módulo de detección Waters 2414 de índice de refracción. Se cuantificó la concentración de los azúcares simples (glucosa, xilosa, arabinosa) en las fracciones líquidas de los hidrolizados. Se usó como fase móvil H₂SO₄ con una concentración 0,025 M a un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura de la columna era de 50 °C y la del detector de 35 °C. Fueron usados estándares externos para la cuantificación de los compuestos. La determinación de sólidos totales, humedad y cenizas, de la materia prima y los sólidos se llevó a cabo de acuerdo a los procedimientos analíticos del NREL (“National Renewable Energy Laboratory”) modificado (Muñoz et al., 2016).

6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

6.1 RENDIMIENTO GLOBAL DE LA EXTRACCIÓN

En la gráfica 2 se observa el rendimiento global de extracción en función de las diferentes condiciones utilizadas. Todos los resultados presentados se encuentran en base seca.



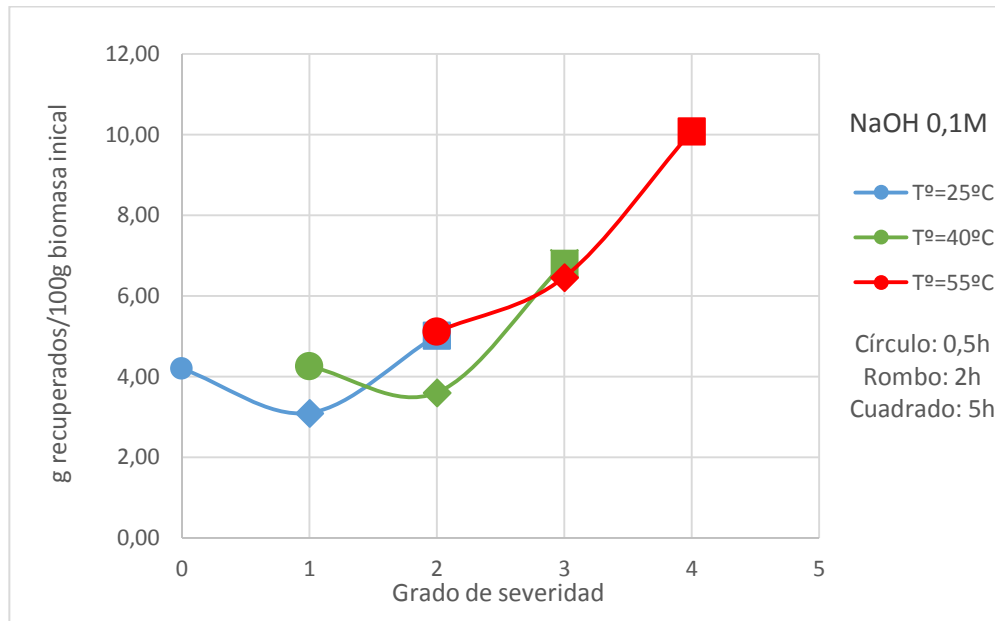
Gráfica 2: Rendimiento global de extracción, expresado como gramo recuperado tras la precipitación por cada 100 gramos de biomasa.

Como puede observarse en la gráfica, el proceso de extracción no proporciona rendimientos altos, siendo el máximo rendimiento global obtenido del 12,5% (w/w) utilizando 5 horas, 55°C y 0,5M NaOH como condiciones del proceso de extracción. Otros dos ensayos proporcionaron rendimientos cercanos. Usando 2 horas, 40°C y 2M; y 0,5 horas, 55°C y 2M como condiciones de proceso, se obtuvieron 11,8 y 12,0%.

En general, un aumento en las variables tiempo, temperatura y concentración de sosa provoca un aumento más o menos notable del rendimiento, excepto en los casos de severidad más extrema, donde comienza a descender. Esto es debido a que la combinación simultánea de las condiciones más severas hace que la proteína se transforme y degrade en otros compuestos durante la extracción y no se pueda recuperar de la totalidad de la proteína extraída. El efecto del tiempo también varía según el resto de las condiciones de

operación. Resulta necesario, por tanto, una optimización del proceso, que localice el punto óptimo de condiciones de operación a aplicar para maximizar la extracción, minimizando el uso de energía (en forma de temperatura), de tiempo de reacción y de producto químico (concentración de sosa), y reduciendo al mínimo por tanto la degradación de la proteína extraída.

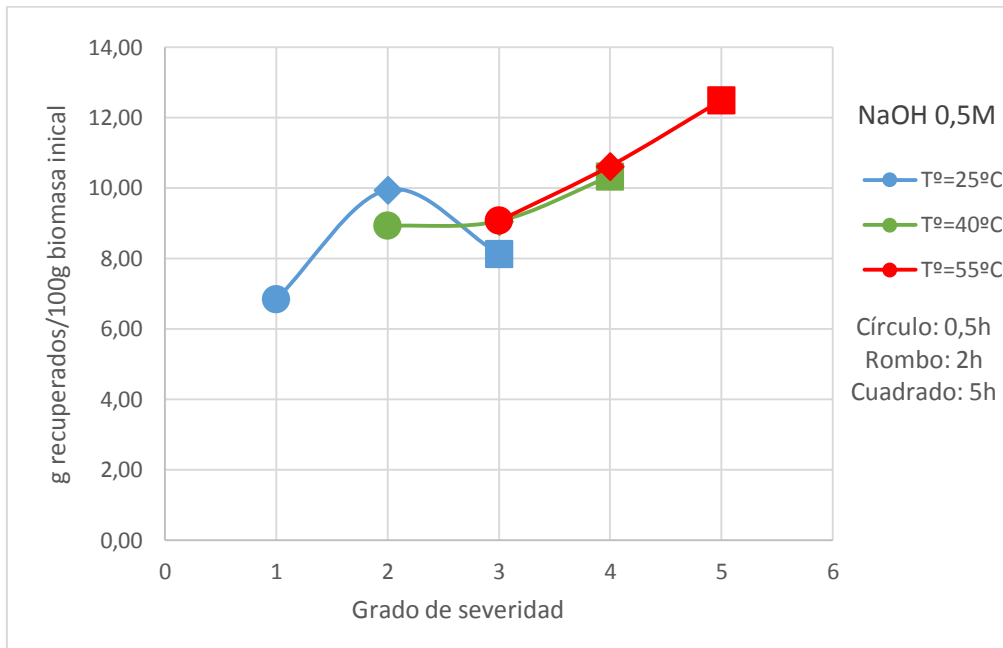
El efecto que tuvo cada una de las variables de forma individual y el grado de severidad sobre el rendimiento en la extracción se presenta a continuación.



Gráfica 3: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 0,1M.

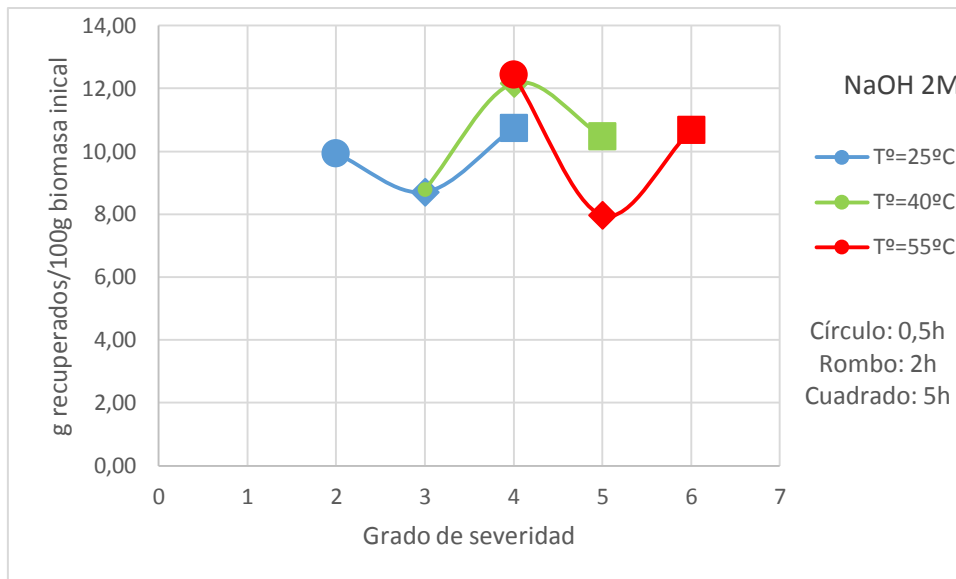
En la gráfica 3, para una concentración de NaOH 0,1M observamos bajos valores de rendimiento. Se sitúan todos por debajo de 7% excepto el más severo de todos, que pasa por encima del 10%. Si observamos el grado de severidad, a partir de grado 2 se obtiene más cantidad de producto sólido final conforme aumenta dicho grado. Con respecto a la temperatura, si comparamos cada punto en distinto color tal y como marca la leyenda, en el 100% de los casos aumenta el rendimiento conforme lo hace la temperatura, teniendo el resto de variables constantes, aunque este aumento es mayor cuando se opera a 55°C, especialmente a tiempos largos, es decir, en las condiciones más severas. En el caso de 0,5h, el aumento del rendimiento apenas se produce en varias décimas, pero endureciendo las condiciones de tiempo, el rendimiento aumenta considerablemente con la temperatura. Por último, el tiempo no es una variable que aumente considerablemente el rendimiento si se mantienen el resto de variables constantes. Cada línea de un color se puede considerar isoterma, pues une los puntos de temperatura constante. Si observamos dichos puntos, sólo aumenta el rendimiento en las hidrólisis que utilizan 5 horas. Pasando de 0,5h a

2h sólo mejora el rendimiento a 55°C, en el resto de los casos incluso disminuye. Son condiciones demasiado suaves como para que la hidrólisis mejore.



Gráfica 4: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 0,5M.

Para una concentración de NaOH 0,5M, los rendimientos aumentan con respecto al anterior caso. Antes apenas llegaban al 7% y en esta ocasión se sitúan entre el 7 y el 13%, por lo tanto si aumenta la concentración de NaOH aumenta el rendimiento. Con respecto a las condiciones de severidad, si analizamos en las condiciones 1, 2 y 3 los rendimientos están muy parejos, hay que irse a factor 4 y 5 de severidad para observar un aumento del rendimiento. El efecto de la temperatura es menor a esta mayor concentración de NaOH, resultando considerable únicamente en las condiciones más severas (55° C y 5 h). Por último, observando las líneas de temperatura constante vemos el efecto del tiempo sobre el rendimiento de extracción. En las isotermas de 40 °C y 55 °C, el rendimiento aumenta si el tiempo lo hace, y en la isoterma de 25 °C también, excepto en la hidrólisis que utiliza 5 horas. Por lo tanto, se puede concluir que en general un endurecimiento de las condiciones de extracción provoca un aumento de rendimiento, aunque las variaciones son menores que a concentraciones de NaOH más bajas.

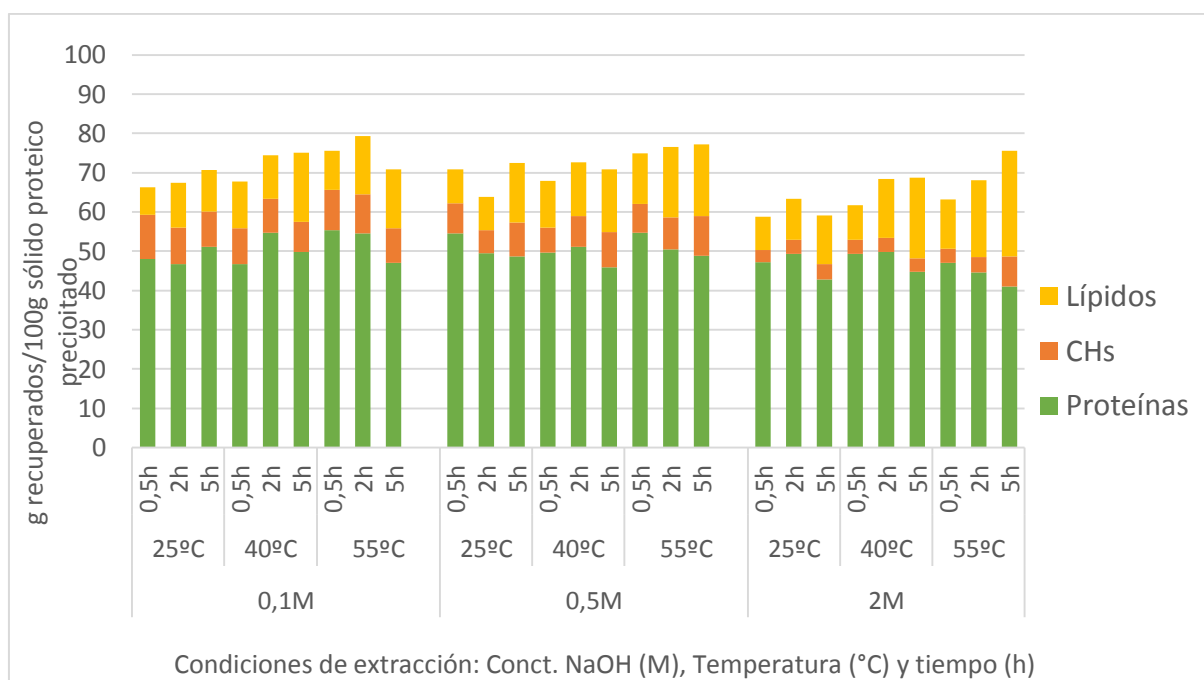


Gráfica 5: Rendimiento global de extracción frente al grado de severidad para una concentración de NaOH de 2M.

Por último, para una concentración de NaOH 2M, los rendimientos se encuentran en un rango del 8 al 12,5%. Son valores ligeramente superiores a las hidrólisis de NaOH 0,5M excepto en las condiciones más severas. Si observamos el número de grado de severidad, se producen rendimientos máximos para un valor de 4, sin embargo, para un factor 5 y 6 no aumenta el rendimiento. Esto es debido a que la proteína extraída se degrada y no precipita cuando cambia el punto isoeléctrico. Para valores tan elevados de la concentración de NaOH, el aumento del resto de las variables de operación deja de ser relevante, llegando, incluso a reducir el rendimiento. Para un tiempo constante, la temperatura no provoca un aumento claro del rendimiento excepto cuando dichos experimentos sólo suponen un grado de severidad 4. La combinación simultánea de las condiciones más fuertes provoca la degradación proteica de la que ya se ha hablado. Ocurre lo mismo para el tiempo, cuando la temperatura es constante sólo se aumenta el rendimiento con el tiempo cuando se combinan las variables de la hidrólisis de tal manera que se obtiene el valor 4 de severidad.

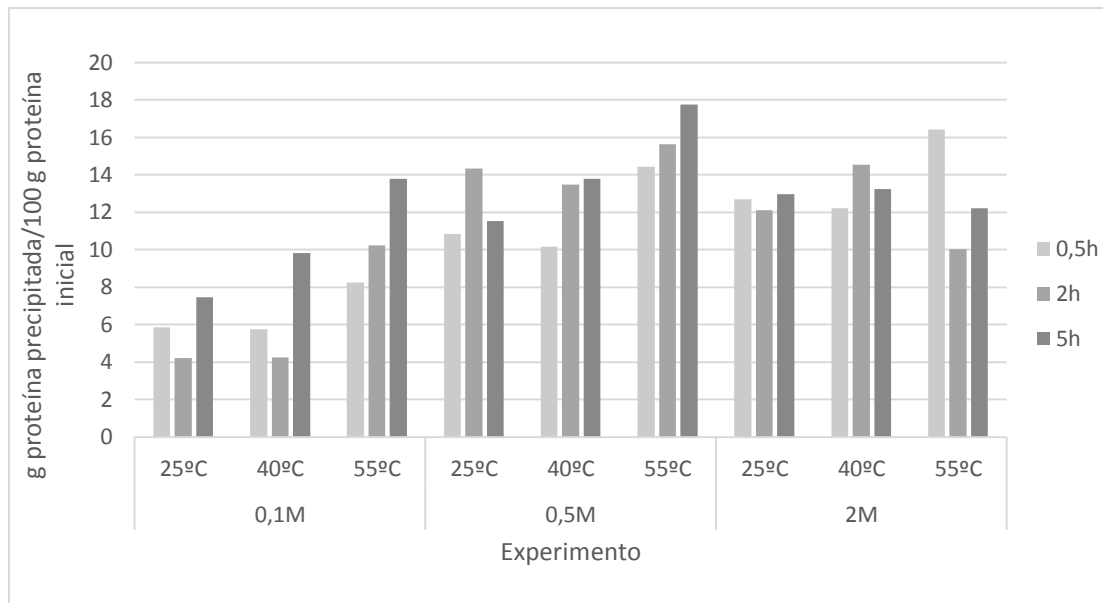
6.2 COMPOSICIÓN DEL SÓLIDO FINAL RECUPERADO

Una vez obtenidos y secados los sólidos proteicos finales tras la precipitación, se realizó el análisis para determinar su composición. Sorprendentemente todos los sólidos recuperados, independientemente de las condiciones de extracción, presentaron una composición bastante similar, donde la fracción predominante era la proteica con valores oscilando entre el 41,0 y el 55,4%. A continuación, la fracción predominante es la de los lípidos, con valores oscilando entre el 7,0 y el 26,9%. Por último, también hay una presencia menor de carbohidratos, con valores entre el 3,1% y el 10,2%. Es de esperar un alto contenido en cenizas en forma de sales (en torno al 30% en la mayoría de los casos) debido al uso de sosa para la extracción.



Gráfica 7: Composición macromolecular de los sólidos proteicos recuperados.

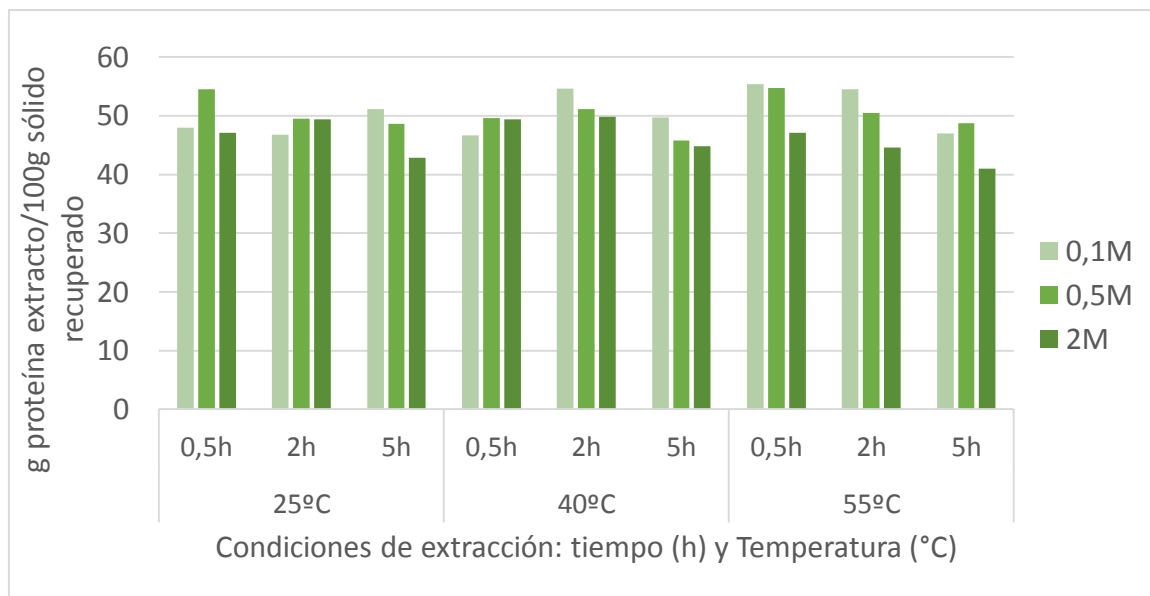
La cantidad de proteínas de cada gramo de sólido recuperado es mucho mayor que el contenido proteico de la biomasa microalgal inicial, demostrando que el proceso de purificación de las proteínas solubilizadas durante la hidrólisis básica ha sido eficaz. Sin embargo, estos valores solo suponen la mitad de la masa total del sólido recuperado, siendo la otra mitad impurezas que podrían afectar a procesos posteriores o incluso a su uso final.



Gráfica 8: Rendimiento específico de extracción.

El rendimiento específico de extracción se define como los gramos de proteína recuperados por cada 100 gramos de proteína que contiene la biomasa microalgal inicial. En este caso, los valores de rendimiento son ligeramente más altos a los obtenidos en términos de rendimiento global, alcanzando hasta un 17,7% para las condiciones de operación de 0,5M, 55 °C y 5 horas (rendimiento global 12,5%). Otros dos ensayos lograron también valores altos de rendimiento, los correspondientes a una concentración de sosa 2M, 55 °C y 0,5h de tiempo de reacción (rendimiento global 12%); y 0,5M, 55 °C y 2h de extracción (Rendimiento global 10,60%). Con estas condiciones se obtuvo un 16,4 y un 15,6% de rendimiento específico respectivamente. Las condiciones de los dos ensayos con máximo rendimiento proteico coincidieron con aquellos que proporcionaron los máximos rendimientos globales. Sin embargo, donde para el rendimiento global se obtenía un 11,8% (2M, 40°C y 2h) sólo se obtuvo un 14,5% de rendimiento en proteínas; y donde se consiguió un 15,6% de rendimiento proteico (0,5M, 55°C y 2h) sólo se logró un 10,6% de rendimiento global. Esto se puede interpretar con lo anteriormente expuesto, que en el primer caso la extracción global ha sido más eficaz, pero la proteína se ha degradado y no ha precipitado, reduciendo el rendimiento específico de la fracción.

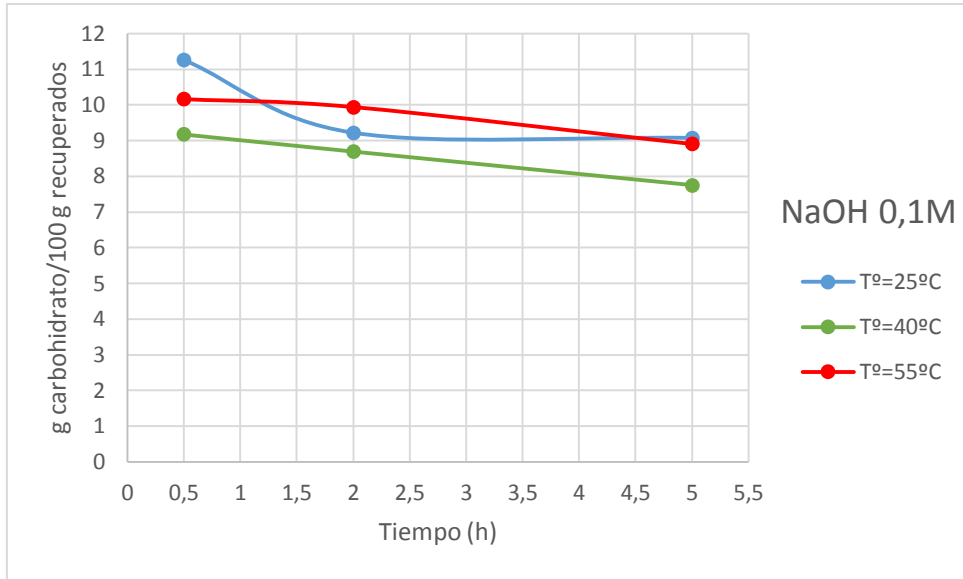
Estudiando cada fracción de forma individual, se puede observar el efecto de la variación de las condiciones de operación en la solubilización de cada una de las fracciones.



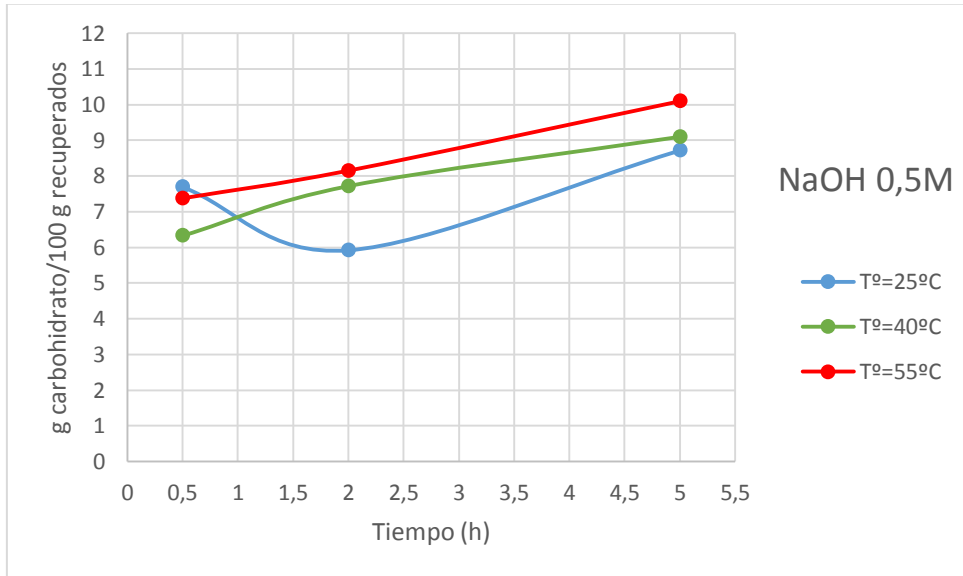
Gráfica 9: Cantidad proteica de cada sólido proteico recuperado.

Como ya se ha mencionado antes, en la gráfica 9 se muestra que la cantidad de proteína que contiene cada sólido recuperado es prácticamente independiente de las condiciones a las que se obtuvo dicho sólido, es decir, las condiciones de extracción influyeron en la cantidad de producto extraído, pero no en la cantidad de proteína del mismo. Sin embargo, se observó un ligero descenso de estos valores con un aumento del tiempo de reacción para unas condiciones de concentración y temperatura determinadas, lo que sugiere que la proteína se extrae en periodos cortos de tiempo y que según avanza la hidrólisis se solubilizan otros componentes. Esto podría llevar a pensar que, a la hora de una optimización del proceso, un tiempo de reacción corto sería más beneficioso para la extracción que uno largo. Además, esto también sería favorable a la hora de escalar esta técnica.

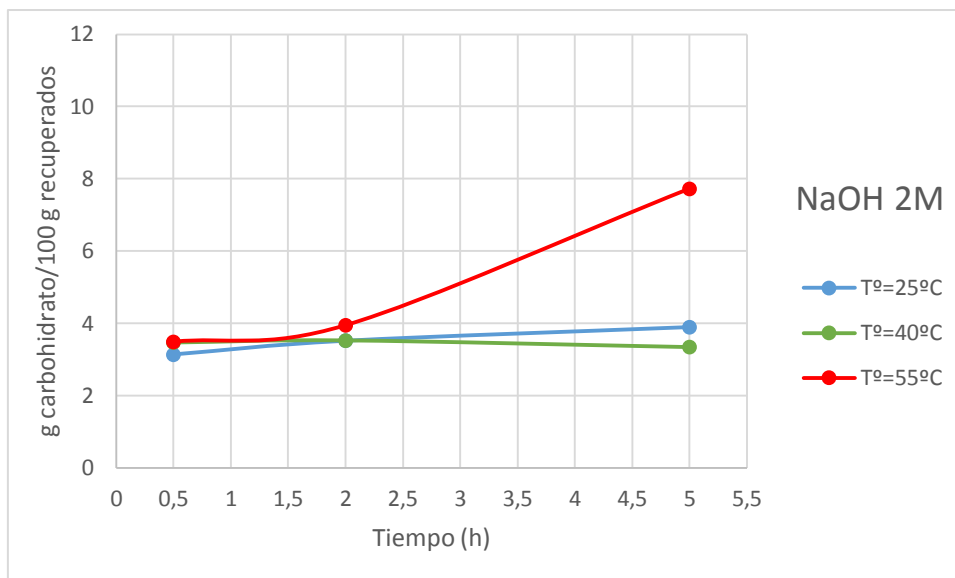
En cuanto al resto de los componentes recuperados en el sólido precipitado, se presentan a continuación los resultados de carbohidratos y lípidos.



Gráfica 10: Gramos de carbohidratos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,1M.



Gráfica 11: Gramos de carbohidratos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,5M.

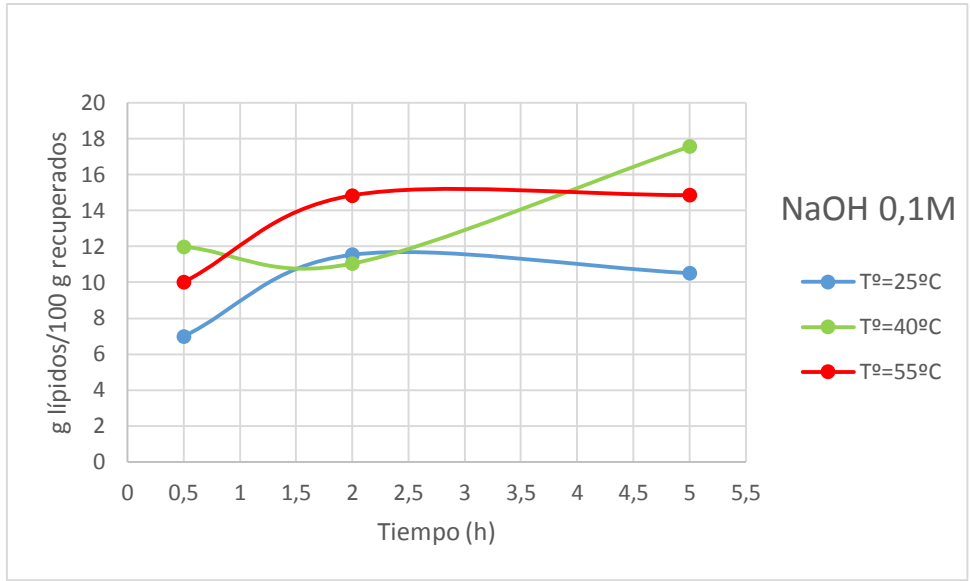


Gráfica 12: Gramos de carbohidatos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 2M.

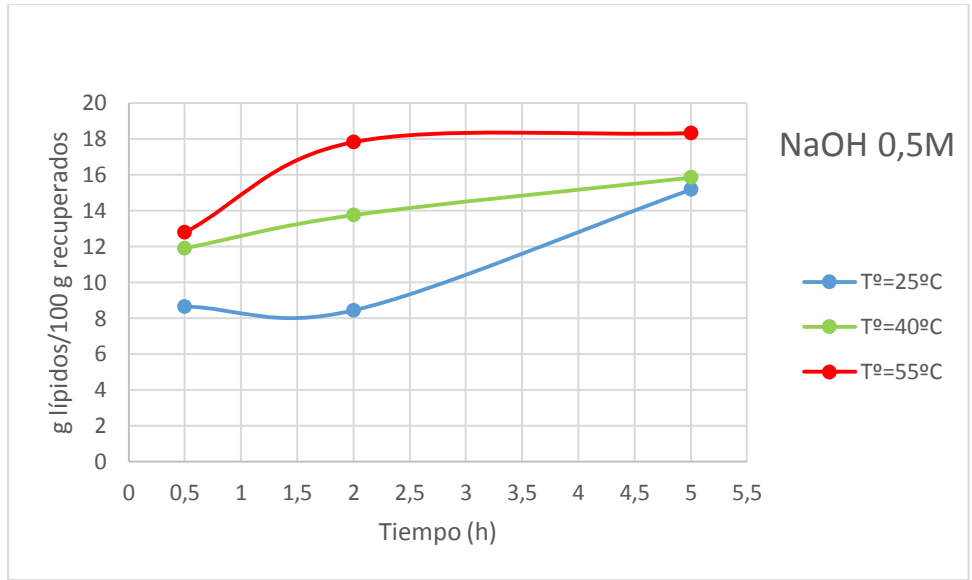
Tal y como aparece en las gráficas 10, 11 y 12, el contenido en carbohidatos recuperado disminuye notablemente conforme aumenta la cantidad de NaOH utilizada en la extracción para la mayoría de los casos, ya que en la gráfica de NaOH 0,1M la mayor parte de los puntos del eje de ordenadas con tiempo y temperatura constantes son mayores que en la gráfica de NaOH 0,5M, y lo mismo en la gráfica de NaOH 2M.

La temperatura apenas afectó a la variación del contenido de carbohidatos en las muestras, ya que en algunos casos aumenta ligeramente y en otros disminuye, y no se observa un patrón claro manteniendo el resto de variables constantes.

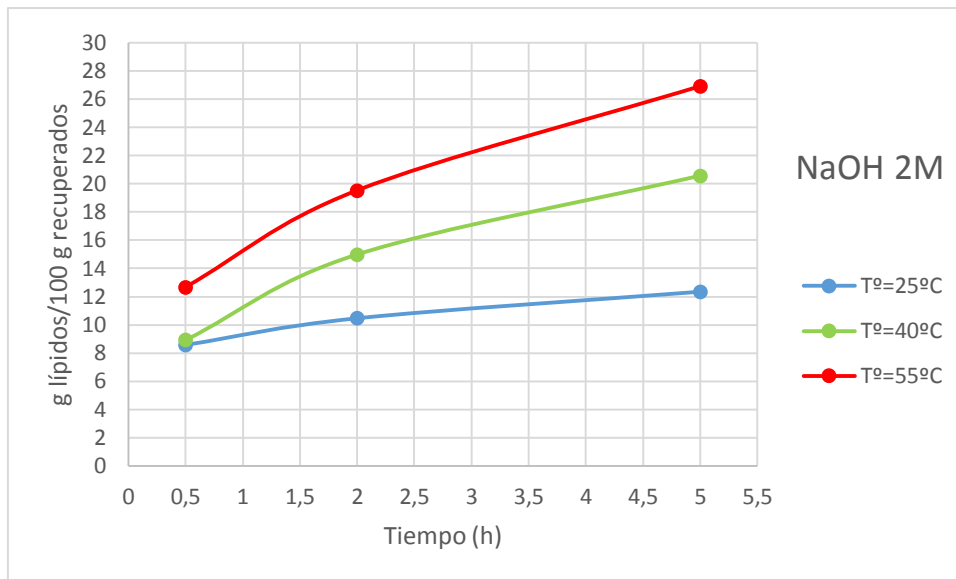
Con respecto al tiempo, en el caso de NaOH 0,1M se observa que el aumento de dicha variable degrada la cantidad de carbohidatos de las muestras. Los resultados parecen indicar dos efectos contrapuestos, por un lado al aumentar la severidad de la hidrólisis aumenta la liberación de azúcares, pero a la vez y en gran medida la degradación de los mismos. A bajas concentraciones de NaOH, la recuperación de azúcares es la más elevada, pero su reducción con el tiempo parece relacionada con la degradación de los mismos. A mayores concentraciones de NaOH, la importancia de la degradación minimiza el aumento de la extracción con la severidad de la hidrólisis.



Gráfica 13: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,1M.



Gráfica 14: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 0,5M.



Gráfica 15: Gramos de lípidos por cada 100 gramos finales recuperados. NaOH 2M.

En el caso de los lípidos, no parece existir degradación. De forma general, conforme aumenta la molaridad de la sosa utilizada, aumenta la cantidad de lípidos en el sólido final recuperado, aunque este efecto es mucho más considerable con NaOH 2 M y apenas se observa al aumentar de NaOH 0,1 a 0,5M. Por otro lado, observando en cada gráfica las isotermas de diferentes colores, vemos el efecto que individualmente provoca la temperatura y el tiempo en la cantidad de lípidos recuperados. En la mayoría de los casos dicha cantidad aumenta conforme lo hacen la temperatura y el tiempo, pero muy especialmente para condiciones de severidad elevadas. De hecho, el efecto de estos parámetros de operación no está definido cuando se trabaja con NaOH 0,1 M, con rendimiento cruzados en función de temperatura y tiempo y result evidente en la operación con NaOH 2M

Por último, con el objetivo de conocer el destino de las proteínas no recuperadas en el sólido precipitado, se analizó la composición en N Kjeldahl de algunos de los sólidos intermedios básicos, residuos de la etapa de extracción.

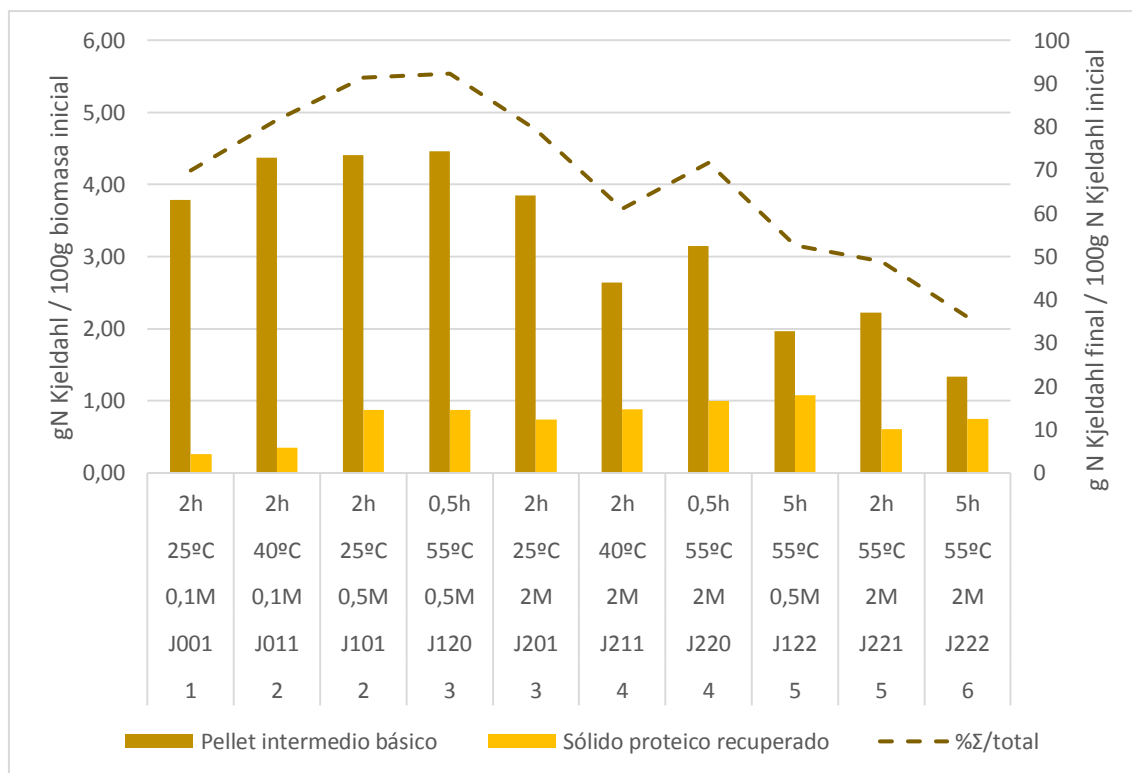


Tabla 5: Porcentaje de nitrógeno Kjeldahl en el pellet intermedio básico y en el sólido proteico recuperado, y porcentaje total de nitrógeno Kjeldahl recuperado.

En la gráfica 16 se presenta, para una selección de muestras, la cantidad de nitrógeno presente en la biomasa hidrolizada tras la extracción (pellet intermedio básico) y la cantidad de nitrógeno inicial obtenido en el sólido proteico recuperado, tomando como base de cálculo 100 gramos de biomasa inicial. Se presenta, además el porcentaje de nitrógeno recuperado calculado como la suma del N en el pellet intermedio básico más el del sólido proteico dividido por el N inicial.

Se observó que el nitrógeno presente en la biomasa exhausta es en todos los casos elevado y considerablemente superior al recuperado en el sólido precipitado. Su valor disminuyó con el grado de severidad de la hidrólisis, como era de esperar al aumentar la eficacia de extracción con el mismo. Por otro lado, el nitrógeno presente en el sólido recuperado aumentó con la intensidad aplicada por la misma razón, pero se redujo a severidades elevadas, lo que indica una degradación del mismo. Los reducidos rendimientos de extracción conseguidos hacen pensar en una necesidad de aumentar la severidad de las condiciones de operación, pero nuevamente, este aumento conlleva una degradación del

material extraído, reduciendo el rendimiento global del proceso. Así, al realizar el balance total al nitrógeno, se observó que aumentó progresivamente hasta el grado de severidad 3 y después comenzó a descender, corroborando la hipótesis de degradación de la proteína extraída que, en las condiciones de severidad aplicadas, al elevado pH y temperaturas aplicadas, podría incluso perderse en forma de gas por stripping.

7. CONCLUSIONES

Los experimentos de hidrólisis básicas con la posterior precipitación del sólido proteico demostraron que, conforme más recursos se utilizan en la extracción, más producto final se obtiene; excepto en los casos de mayor severidad, donde la combinación simultánea de las condiciones más severas hace que la proteína se transforme y degrade en otros compuestos. El máximo rendimiento de extracción total es del 12.5% (w/w) utilizando 5 horas, 55 °C y 0,5M NaOH como condiciones del proceso de extracción. Otros dos ensayos proporcionaron rendimientos cercanos. Usando 2 horas, 40 °C y 2M; y 0,5 horas, 55 °C y 2M como condiciones de proceso, se obtuvieron 11.8 y 12.0%. Sin embargo, una vez obtenidos todos los sólidos recuperados, la cantidad de proteína que contiene cada uno es prácticamente independiente de las condiciones a las que se obtuvo dicho sólido. Además, a mayor grado de severidad, mayores pérdidas de biomasa se producen, dado que ésta está sometida a condiciones más severas de temperatura y pH que degradan la fracción proteica, los carbohidratos y los lípidos.

El contenido en carbohidratos disminuye notablemente conforme aumenta la cantidad de NaOH utilizada en la extracción para la mayoría de los casos. El aumento del tiempo de reacción también provoca una degradación de carbohidratos, sobre todo cuando se trabaja con bajas concentraciones de NaOH. Por último, la temperatura apenas afectó a la variación del contenido de carbohidratos en las muestras. El contenido en lípidos sufre el efecto contrario al de azúcares. De forma general, conforme aumenta la molaridad de la sosa utilizada, aumenta la cantidad de lípidos en el sólido final. Por otro lado, conforme aumentan el tiempo y la temperatura, la cantidad de lípidos aumenta ligeramente.

Además, el nitrógeno presente en la biomasa exhausta disminuyó con el grado de severidad de la hidrólisis y el nitrógeno presente en el sólido recuperado aumentó con la intensidad aplicada, como era de esperar al aumentar la eficacia de extracción con el mismo. Por último, se observó que la cantidad de nitrógeno aumentó progresivamente hasta el grado de severidad 3 y después comenzó a descender, indicando probablemente una degradación de la proteína extraída.

8. BIBLIOGRAFÍA

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., & Eppink, M. H. M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology*, 135, 142–149.

Saha, S. K., McHugh, E., Murray, P., & Walsh, D. J. (2015). Microalgae as a source of nutraceuticals. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry: Second Edition*, 25, 255–291.

Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6(PA), 52–63.

Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermue, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29 (1), 24–27.

Carioca, J.O.B., Hiluy Filho, J.J., Leal, M.R.L.V., Macambira, F.S., 2009. The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil. *Biotechnol. Adv.* 27 (6), 1043–1050.

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2), 157–173.

Ramos Suárez, Juan Luis. (2012). Producción y aprovechamiento de biogás a partir de microalgas en un concepto de biorrefinería, (March 2014). Retrieved from http://www.conama2012.conama.org/web/generico.php?idpaginas=&lang=es&menu=90&referer=1&id=170&tipo=C&op=view&from=view_personas

López, C. V. G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591.

Kochert G., (1978) Quantitation of the Macromolecular Components of Microalgae, in *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*, J. Hellebust and S. Cragie (Eds.), Cambridge University Press, London, 189

Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., & Bolado Rodríguez, S. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 265–271.