

Extracción de lípidos de microalgas como pre-tratamiento para mejorar la digestión anaeróbica.

M. Caporgno¹, M. Olkiewicz¹, J. Pruvost², J. Font¹, O. Lepine³, J. Legrand², C. Bengoa^{1(*)}

¹ Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Av. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, España

² Université de Nantes, CNRS, GEPEA, UMR 6144, bd de l'Université, CRTT-BP 406, 44602 Saint-Nazaire Cedex, Francia

³ AlgoSource SAS, 37 bd de l'Université, BP 406, 44602 Saint-Nazaire Cedex, Francia
(*)- christophe.bengoa@urv.cat

Resumen

Una de las desventajas que posee la utilización de microalgas para la producción de biogás es la resistencia de las paredes celulares que dificultan la digestión y por consiguiente la biodegradabilidad. Una posible solución es la aplicación de pre-tratamientos, y uno de los sugeridos es la utilización de solventes para extraer los lípidos de las mismas. Nuestros resultados sugieren que para *Nannochloropsis occulata*, la extracción de lípidos permite incrementar la biodegradabilidad de la misma de 30% a 38%-40% según el solvente utilizado. En el caso de *Chlorella vulgaris*, la biodegradabilidad varía entre 43% y 44% en los casos analizados. Los resultados sugieren que la influencia del solvente está condicionada por las características de la especie.

Abstract

One disadvantage for microalgae conversion to biogas is their high cell walls resistance which hinders digestion. A possible solution to increase microalgae biodegradability is pre-treatment application. Lipid extraction with solvents has been suggested as a possible pre-treatment. Our results suggest that lipid extraction from *Nannochloropsis occulata* increases their biodegradability from 30% to 38% -40%, depending on the solvent. On the other side, biodegradability of *Chlorella vulgaris* varies between 43% and 44% in all cases. The results suggest that the solvent influence is determined by the specie characteristics.

1. Introducción

La sociedad actual depende de los combustibles de origen fósil para la producción de energía, sin embargo esta fuente de energía no es renovable y se prevé su agotamiento en los próximos años (Shafiee & Topal, 2009). Las microalgas comenzaron a ser investigadas como posible materia prima para la producción de biocombustibles, principalmente biodiesel, debido a las numerosas ventajas que presentan sobre las materias primas utilizadas actualmente para su producción. Sin embargo, la producción de biodiesel a escala industrial no es aún posible, y el biogás se ha convertido en una alternativa (Brennan & Owende, 2007).

Uno de los inconvenientes que presenta la digestión anaeróbica de las microalgas, es la resistencia que ofrece la pared celular de las mismas (Sialve et al. 2009). Es por eso la aplicación de métodos de pre-tratamiento es necesaria. Algunos autores sugieren que la extracción de los lípidos mediante solvente puede constituir una opción para mejorar la digestión de las mismas (Alzate et al, 2013; Kinnunen et al, 2013).

2. Materiales y métodos

La especie de agua salada *Nannochloropsis occulata* (SN) ha sido proveída por Alphabiotec (Francia), con una concentración de 28% de sólidos. Una vez recibido se almacenó a -15°C hasta su utilización. Una parte fue liofilizada y se comprobó la humedad una vez acabado el secado. La especie de agua dulce *Chlorella vulgaris* (DC) ha sido proveída por IFREMER-Nantes (Francia) en forma sólida, secada en una corriente de aire a 45°C con un contenido de agua de 6.28%. El inóculo utilizado consiste en fango digerido, extraído de una planta piloto que opera a 33°C. Previo al

inicio de los experimentos, el inóculo fue sometido a un proceso de “desgasificación” interrumpiendo la alimentación para digerir el material orgánico remanente (Angelidaki et al., 2009). Los lípidos de de microalga seca fueron extraídos en un Soxhlet, durante 7 horas, con hexano, y una mezcla parcialmente miscible de metanol-hexano 2:3 v/v. Los lípidos fueron cuantificados por pesado. Los cuatro residuos se identifican como: HN y HC, correspondientes a *Nannochloropsis* y *Chlorella* provenientes de la extracción con hexano, MN y MC los de la extracción con metanol-hexano. La digestión anaeróbica fue realizada en batch a 33°C, utilizando botellas de 120 mL, por triplicado (Angelidaki et al., 2009). La relación entre el contenido de sólidos volátiles (SV) en el sustrato y en el inóculo es 0,5. La producción de biogás se midió mediante desplazamiento de líquido, y su composición se analizó por cromatografía de gases. El período de incubación duró aproximadamente 25 días, cuando la producción de gas resultó insignificante. Los sólidos totales (ST) y los sólidos volátiles (SV) fueron analizados según los apartados 2540B y 2540E del Standard Methods (Rice et al., 2012). Proteínas, carbohidratos y lípidos en microalgas fueron analizados siguiendo los métodos de Lowry, Dubois y Bligh & Dyer respectivamente. Los lípidos extraídos fueron convertidos en biodiesel (fatty acids methyl ester FAMES) mediante transesterificación con catalizador ácido (Dufreche et al., 2007) y analizados por cromatografía de gases (Agilent Technologies, Application Note 228-398). Acabado el experimento, el contenido de ácidos volátiles fue también analizado con el método anterior. La determinación de NH_4^+ se realizó con un electrodo sensitivo de iones amonio. La biodegradabilidad se define como el porcentaje del metano medido frente a la producción teórica calculada (Angelidaki & Sanders, 2004).

3. Resultados y discusión

En la tabla 1 se presentan los rendimientos de lípidos extraídos, el material saponificable y el biodiesel producido de ambas microalgas y con los dos solventes utilizados. Se observa que la mezcla de solventes presenta un rendimiento de lípidos extraídos más elevado. Los solvente no polares como el hexano permiten mayoritariamente la extracción de compuestos no polares. Una fracción de estos compuestos no polares está formada por el material saponificable, que es el que puede convertirse a biodiesel. En el caso de la mezcla de solventes, la elevada polaridad permite no solo incrementar la extracción de compuestos no polares sino que también extrae compuestos polares como fosfolípidos y una fracción de compuestos polares no lipídicos como proteínas y carbohidratos (Ehimen et al., 2009). La extracción de este grupo de compuestos polares no saponificables hace que el rendimiento de material saponificable disminuya en el solvente polar. Por otra parte, el incremento en la extracción de material saponificable hace que el rendimiento de biodiesel se incremente.

Tabla 1. Rendimientos de lípidos, material saponificable y biodiesel.

(%)	Lípidos ^(a)		Mat. saponificable ^(b)		Biodiesel ^(c)	
	Hexano	Met-hex	Hexano	Met-hex	Hexano	Met-hex
<i>Nannochloropsis oculata</i>	10.1±0.4	48.1±2.6	54.7±0.6	29.2±0.5	5.0±0.1	12.6±0.2
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.7±0.9	17.6±0.2	65.1±0.4	33.4±0.4	2.4±0.0	4.5±0.1

^(a) Rendimiento de lípidos en base seca libre de cenizas (VS).
^(b) Rendimiento de material saponificable en base de lípidos extraídos.
^(c) Rendimiento de biodiesel en base seca (TS).

El análisis de los datos presentados en la tabla 1 permite concluir que ambas especies de microalgas presentan bajos rendimientos de biodiesel. En este caso, y al igual que en otras muchas especies donde el contenido de lípidos es inferior al 40%, la digestión anaeróbica constituye una mejor alternativa para la producción de bio-combustibles (Sialve et al., 2009). Los resultados de la digestión anaeróbica de las microalgas y los residuos procedentes de la extracción de lípidos se observan en la figura 1. La parte a

de la figura muestra los resultados para *Nannochloropsis oculata* y la parte b, para *Chlorella vulgaris*. El volumen de metano a 0°C y 1 atm se expresa como mL de metano por gramo de materia orgánica alimentada al reactor (VS).

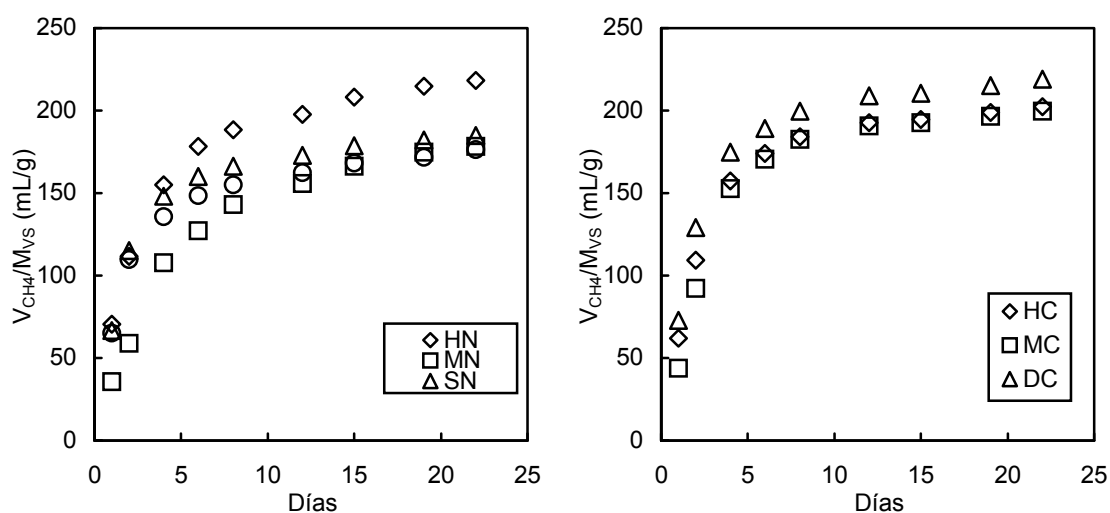


Figura 1. Producción de metano a partir de *Nannochloropsis oculata* (izquierda) y *Chlorella vulgaris* (derecha). Reactores en modo batch a 33°C y tiempo de digestión de 22 días.

En la parte 1a se puede ver que el residuo HN produce una cantidad de metano que supera a la producida a partir del alga con lípidos (SN), 218 ± 6 mL_{CH₄}/g_{VS} y 176 ± 7 mL_{CH₄}/g_{VS} respectivamente. Por otro lado, el residuo MN y la microalga sometida a secado produjeron 178 ± 7 mL_{CH₄}/g_{VS} y 184 ± 3 mL_{CH₄}/g_{VS} respectivamente, similar a la producción de SN. En la parte 1b se puede ver que las curvas prácticamente se superponen unas con otras, indicando una producción de metano similar.

La biodegradabilidad calculada en el caso de la especie *Nannochloropsis* resultó 30%, 40% y 38% para SN, HN y MN respectivamente. La extracción con hexano incrementa la biodegradabilidad en 10 unidades, mientras que la mezcla de solventes la incrementa 8 puntos. El hecho de que con la mezcla de solvente se observe una mayor biodegradabilidad a pesar de que la cantidad de metano producida no sea más elevada, se debe a que la cantidad teórica de metano de los residuos es mucho menor que la de la microalga en su totalidad. A pesar de requerir un mayor tiempo para su digestión, los lípidos producen una cantidad de metano considerablemente mayor comparada con las proteínas y los carbohidratos (Angelidaki & Sanders, 2004). La extracción de los lípidos genera un residuo que puede producir mucho menos metano. En el caso de la especie *Chlorella*, el bajo porcentaje de lípidos y el menor rendimiento en la extracción hacen que la cantidad teórica de metano entre los sustratos difiera poco. Adicionalmente, las producciones de metano de los diferentes sustratos fue similar y por tanto, la biodegradabilidad resulta 44%, 43% y 44% para DC, HC y MC respectivamente.

Halim et al. describe que el solvente penetra al interior de las células, los lípidos se disuelven y finalmente se establece un proceso de difusión entre el interior y el exterior de la célula por la diferencia de concentraciones, sin ruptura celular (Halim et al., 2012). Alzate et al. y Keymer et al. observaron un incremento en la producción de metano luego de la extracción de lípidos y lo atribuyeron a la acción del solvente (Alzate et al., 2013; Keymer et al., 2013).

Diferentes métodos de pre-tratamiento fueron evaluados por Bohutskyi et al. para incrementar la producción de metano a partir de *Nannochloropsis sp.* y *Chlorella sp.* Los autores observaron que ambas especies poseen una pared celular de elevada resistencia y que se necesitan pre-tratamientos poderosos para lograr su ruptura. En el caso de *Chlorella sp.*, la resistencia es aún mayor y se hizo necesario la aplicación de

un pre-tratamiento termoquímico para mejorar la digestión (Bohutskyi et al. 2013). En el caso de DC, el proceso de secado puede ser la causa de la poca variación observada en la producción de metano. Ha sido reportado que los procesos de de secado hacen las células más resistentes (Kinnunen et al., 2013).

Los análisis realizados una vez acabado los experimentos, demostraron que el contenido de ácidos volátiles se encontraba por debajo del límite de detección del equipo y que la concentración de NH_4^+ se encontraba por debajo de los valores considerados perjudiciales para la digestión anaeróbica. Esto confirma que la baja producción de metano se debe a las características propias de las microalgas utilizadas y no a procesos de inhibición.

Conclusión

La extracción de lípidos influye en la biodegradabilidad de las microalgas, pero la influencia depende tanto de la microalga como del solvente utilizado. Más que considerar la extracción como un método de pre-tratamiento, debería considerarse la digestión anaeróbica de los residuos generados luego de la extracción de lípidos o de otros compuestos valiosos como una alternativa para mejorar el balance económico del proceso.

Bibliografía

Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I. (2014). Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chem Eng J* 243 (1), 405-410.

Angelidaki, I. & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3, 117–129.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B. (2009). Defining the biomethane potential [BMP] of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays, *Water Sci Technol* 59, 927-934.

Bohutskyi, P., Betenbaugh, M.J., Bouwer, E.J. (2014). The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresource Technol* 155, 366-372.

Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14 (2), 557-577.

Dufreche, S., Hernandez, R., French, T., Sparks, D., Zappi, M., Alley E. (2007). Extraction of Lipids from Municipal Wastewater Plant Microorganisms for Production of Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* 84, 181-187.

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv* 30 (3), 709-732.

Keymer, P., Ruffell, I., Pratt, S., Lant, P. (2013) High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion oo microalgae. *Bioresource Technol* 131, 128-133.

Kinnunen, H.V., Koskinen, P.E.P., Rintala, J. (2014). Mesophilic and thermophilic anaerobic laboratory-scale digestion of *Nannochloropsis* microalga residues. *Bioresource Technol* 155, 314-322.

Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S. (2012), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd edition. (APHA, AWWA, WEF).

Shafiee, S. & Topal, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished?, *Energ Policy* 37, 181-189.

Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotechnol Adv* 27, 409-416.