

Artículo de revision crítica

Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos

García-Cuadra F.* , Jawiarczyk N., González-López C.V., Fernández-Sevilla J.M. y Acién Fernández F.G.

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Almería. Carretera Sacramento s/n. E04120 Almería, España. Teléfono: +34 950 214456; Fax: +34 950 015484E04120

*Autor de correspondencia (fgc828@ual.es)

Resumen

En el presente trabajo se revisan las alternativas de valorización de biomasa de microalgas que se están estudiando actualmente. Dichas alternativas son función de la propia composición de la biomasa y de su facilidad de ruptura celular para conseguir aprovechar los componentes intracelulares. Así, se analizan los diferentes procedimientos individuales encaminados al aprovechamiento de cada componente de la biomasa: obtención de péptidos y aminoácidos por hidrólisis de proteínas, producción de bioetanol por fermentación de carbohidratos, obtención de biodiesel a partir de lípidos y generación de biogás a partir de biomasa microalgal. Seguidamente, se lleva a cabo un estudio de las posibles combinaciones de estos procesos presentando el concepto de biorrefinería, que permite lograr una valorización más completa de la biomasa. El desarrollo de este tipo de procesos integrados permite incrementar la viabilidad de los proyectos basados en microalgas como materia prima para la obtención de biocombustibles y compuestos de interés en general.

Palabras clave: *Microalgas, Proteínas, Lípidos, Carbohidratos, Biorrefinería*

Valorization of microalgal biomass: Exploitation of proteins, carbohydrates and lipids

Abstract

In this paper a review of the alternatives to valorize microalgal biomass that are currently under consideration is conducted. These alternatives are function of biomass composition and the ease of cellular breaking to make the most of the intracellular compounds. Thus, the different individual procedures aimed at valorize each component of the biomass are analyzed: protein hydrolysis in solutions of peptides and amino-acids, bioethanol production by fermentation of carbohydrates, production of biodiesel from lipids and generation of biogas from microalgal biomass. Afterwards, a study of the possible combinations of these processes is carried out introducing the biorefinery concept, which allows a more complete valorization of the biomass. The development of this kind of integrated processes allows increasing the feasibility of projects base on microalgae as raw material to produce biofuels and compounds of interest in general.

Keywords: *Microalgae, Proteins, Lipids, Carbohydrates, Biorefinery*

1. Introducción

La búsqueda de nuevas materias primas para su empleo en la producción de combustibles es una preocupación de la sociedad actual. En este sentido, el uso de microalgas ha despertado gran interés en los últimos años debido, principalmente, a su plasticidad metabólica y a su elevada velocidad de crecimiento (Spolaore *et al.*, 2006). Así, estos microorganismos se utilizan en industrias especializadas como la de producción de pigmentos de alto valor agregado (Pulz *et al.*, 2004), y se plantea su uso para la obtención de biocombustibles (Chisti, 2007). Actualmente el mayor interés se centra en el campo energético, principalmente en la producción de biodiesel. No obstante, las microalgas poseen otros compuestos como las proteínas, en proporciones suficientes para despertar interés respecto a su valorización para producir suplementos alimentarios (Iwamoto, 2003), y productos beneficiosos para la salud o biofertilizantes (Ördög *et al.*, 2004). Por otra parte, los carbohidratos, pueden utilizarse como aditivo alimentario, como compuestos con actividad inmunológica (Barrow y Shihidi, 2008), o pueden transformarse en bioetanol mediante fermentación alcohólica.

El problema fundamental que presenta la producción de estos compuestos a partir de biomasa microalgal es que actualmente los procesos no son económicamente viables; los costos de producción son aún elevados, debido al gran requerimiento energético que conllevan el cultivo, cosechado y recuperación de la biomasa, en comparación con el bajo precio de venta de algunos de estos productos, como el biodiesel o el bioetanol. Por estas razones las líneas de investigación se centran hoy día en reducir dichos costos. De esta manera, los costos en la fase de cultivo pueden reducirse mediante la mejora en el diseño de los fotobiorreactores a emplear y mediante la utilización

de aguas residuales (principalmente de origen urbano y agrícola) suplementadas con los nutrientes necesarios (Pitman *et al.*, 2011); así se logra simultáneamente la producción de biomasa más económica y que las microalgas actúen como agentes biorremediadores (Rawat *et al.*, 2011). Por otra parte, respecto a los procesos “downstream” y la valorización de la biomasa, es necesario estudiar cada proceso de forma individual (producción de biodiesel, bioetanol, etc.), así como de forma conjunta aplicando el concepto de biorrefinería (Ehimen *et al.*, 2009; Sialve *et al.*, 2009).

El aprovechamiento de la biomasa de microalgas depende en gran medida de su composición y estado. Los componentes principales de la biomasa de microalgas son habitualmente proteínas (30-60%), carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%) (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2000, 2001). Estos porcentajes varían en función de la especie y condiciones de cultivo. La producción a elevadas velocidades de crecimiento favorece el aumento del contenido en proteínas y reduce el contenido en lípidos, mientras que a baja velocidad de crecimiento el comportamiento es opuesto. Otros factores como la composición del medio, la temperatura o la radiación solar a la que están expuestas también alteran dicha composición (Ación *et al.*, 1998). Respecto a su estado, cabe diferenciar entre biomasa seca y húmeda. La biomasa de microalgas se produce en cultivos sumergidos con concentraciones de 0.5-2.0 g/l, siendo uno de los principales problemas su recuperación y concentración hasta valores de 100-200 g/l para la obtención de pastas concentradas, o incluso su secado a menos del 5% de humedad para su completa estabilización.

El presente trabajo lleva a cabo una revisión de los procesos encaminados a la producción de biofertilizantes, bioetanol y biodiesel, tanto de forma separada como en su conjunto bajo el concepto de biorrefinería, de modo que la

valorización de la biomasa microalgal pudiera resultar en un proceso económicamente viable. Se analizan los procesos que implican el aprovechamiento de la fracción proteica mediante hidrólisis enzimática, el aprovechamiento de los carbohidratos tras su extracción e hidrólisis a azúcares simples y posterior fermentación alcohólica, y el aprovechamiento de lípidos ya sea mediante extracción de éstos o mediante transesterificación directa de la biomasa. Por último, el residuo de biomasa resultante de los distintos procedimientos se emplearía en la producción de biogás en condiciones anaerobias.

2. Valorización de la fracción proteica

Las proteínas contenidas en la biomasa microalgal son la fracción mayoritaria de la misma y, por ende, es necesaria su valorización para poder hacer viable económicamente la utilización completa de la biomasa. Este aprovechamiento se puede realizar en alimentación humana o animal. Sin embargo, buena parte de la microalgas que se cultivan actualmente contienen proteínas que no se digieren debido a las paredes celulares que poseen las células intactas (Shelef y Soeder, 1980). Por otra parte, los aminoácidos y los péptidos que constituyen las proteínas son productos deseados tanto en el campo de la salud, como en la alimentación, la agricultura y la industria. Por este motivo, la hidrólisis se ha convertido en el principal enfoque para el aprovechamiento de las proteínas, atendiendo fundamentalmente a métodos de hidrólisis química con bases o ácidos. A pesar de que estas metodologías permiten alcanzar altos rendimientos, también pueden favorecer la formación de compuestos tóxicos (Jarunrattanasri *et al.*, 2007) o la degradación de algunos aminoácidos, por lo que actualmente sólo se utilizan para la obtención de aminoácidos con fines industriales.

Cuando la finalidad es el empleo en alimentación, salud o biofertilizantes, se prefieren los métodos enzimáticos, ya que son menos intensos y destructivos, a la vez que más específicos. Bajo esta metodología y en función del destino de los hidrolizados obtenidos, se pueden utilizar enzimas con distintos tipos de actividad. Así, es deseable que los hidrolizados destinados a alimentación o salud contengan más concentración de péptidos de bajo peso molecular que aminoácidos, por ser los primeros más digeribles que los propios aminoácidos (Clemente, 2000); por tanto, no se necesita que el grado o rendimiento de hidrólisis sea tan elevado resultando ser las enzimas con actividad endoproteasa las más adecuadas. El caso opuesto es la obtención de hidrolizados con alta concentración en aminoácidos para su uso como biofertilizante (Órdög *et al.*, 2004), por su poder revitalizante y sus efectos sobre las plantas que minimizan las consecuencias de plagas y enfermedades (El Ghamry *et al.*, 2009); aquí la metodología aplicada implica la utilización consecutiva de enzimas con actividad endoproteasa y exoproteasa (Clemente, 2000) ya que se debe maximizar el contenido en aminoácidos libres.

La hidrólisis enzimática de la biomasa de microalgas ha sido estudiada por diferentes autores (Morris *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2012, Sari *et al.*, 2012) y, en todos los casos, para aumentar el rendimiento de aprovechamiento de las proteínas, la biomasa debe ser pre-tratada. Morris *et al.* (2008) llevan a cabo una extracción con etanol con el fin de eliminar el color de los hidrolizados, comprobando que el rendimiento de hidrólisis aumentaba alrededor 10%. De igual modo, Sari *et al.* (2012) comprobaron que el rendimiento de extracción de proteínas era aproximadamente 15% más alto en la biomasa de *Chlorella fusca* a la que previamente se le habían eliminado los lípidos respecto al obtenido con la biomasa sin pre-tratar. A diferencia de lo anterior,

Romero *et al.* (2012) trataron la biomasa inicialmente mediante procedimientos físicos, como el molido y el calentamiento de la suspensión de biomasa. Los resultados que obtuvieron mostraron que el molido aumentaba el rendimiento de hidrólisis en un 30%, con excepción del caso de adición de alúmina. En cambio, el tratamiento térmico aumentó el grado de hidrólisis en el mejor de los casos en torno a un 15%. No obstante, la combinación del molido y tratamiento térmico no mejoró los resultados obtenidos. Posteriormente, estos autores, estudiaron el efecto de la adición de una enzima con actividad beta-glucanasa-celulasa-xilanasasa (Vizcozyme® L, Novozyme a/s); así consiguieron un aumento del 30% en el grado de hidrólisis.

El empleo de distintas enzimas en estos estudios puso de manifiesto el hecho de que las enzimas que trabajan a pH ácido dan resultados pobres debido, principalmente, a que en este rango de pH las proteínas se insolubilizan, por lo que se prefiere el uso de enzimas que trabajan a pH neutro o básico. En este sentido, Morris *et al.* (2008) obtuvieron los mejores resultados con las enzimas papaina y pancreatina (Merck, Whitehouse Station, USA) a pH 7.0 y 7.5, respectivamente, alcanzando un grado de hidrólisis en torno al 17% sin aplicar ningún pre-tratamiento a la biomasa de *Chlorella vulgaris*, y 20-22% de grado de hidrólisis con biomasa previamente tratada con etanol.

De forma similar, en el trabajo de Sari *et al.* (2012), de las enzimas ensayadas seleccionaron la endoproteasa Protex 40XL (Genencor International Oy, Leiden, Netherlands), con la biomasa de *Chlorella fusca* al 4% en peso. Con esta enzima se operó a pH 11 y se obtuvo un rendimiento de extracción de proteínas del 60% para la biomasa de microalgas y de algo menos de 80% para la biomasa sin lípidos. En términos de grado de hidrólisis, los resultados fueron aproximadamente del 35% y 40%, respectivamente. Por otra parte, Romero *et al.*

(2012), con el objetivo de obtener hidrolizado con alta concentración de aminoácidos libres, aplicó un proceso en dos etapas mediante la utilización sucesiva de Alcalase® 2.5L y Flavourzyme® 1000L (Novozyme a/s, Bagsvaerd, Dinamarca), y valores de pH de 8 y 7, respectivamente, sobre biomasa de *Scenedemus almeriensis* a concentraciones de entre 200 y 350 g/L. El mayor grado de hidrólisis, 59%, se consiguió con la mínima concentración de biomasa y 230 minutos de ensayo (aproximadamente 2 horas cada enzima). La repetición sucesiva del proceso de hidrólisis conllevó un aumento cada vez más pobre en el grado de hidrólisis.

En resumen, al comparar los distintos procesos se observa que las temperaturas de trabajo de las distintas enzimas son similares (50°C para las de MERCK y NOVOZYME a/s, y 60°C para GENENCOR), al igual que los tiempos de trabajo, que están en torno a 3-4 horas. Respecto a la concentración de biomasa de trabajo, los ensayos de Morris *et al.* (2008) y Romero *et al.* (2012) muestran que existe una concentración óptima, pero por norma general la disminución de la concentración conlleva un aumento del grado de hidrólisis. Cabe resaltar que la producción de concentrados de aminoácidos por esta vía se hace a partir de biomasa húmeda, sin necesidad de secarla lo que repercute en una notable reducción de costes. La calidad del producto final obtenido vendrá determinado por la calidad de la biomasa de partida (contenido en proteínas y perfil de aminoácidos de las mismas) y condiciones de operación (concentración de biomasa durante la hidrólisis y grado de hidrólisis alcanzado), midiéndose en función de la concentración total de aminoácidos libres producidos y su perfil.

3. Valorización de la fracción de carbohidratos

La fracción de carbohidratos también aparece en gran proporción en la biomasa microalgal,

y en consecuencia, es necesario tener en cuenta la posible valorización de la misma mediante aplicación en alimentación y salud humana o animal, o directamente por su conversión a bioetanol. Este biocombustible constituye el 85% de la producción total mundial, siendo Estados Unidos de América y Brasil los mayores productores de bioetanol, fundamentalmente de segunda generación. Hoy en día, la caña de azúcar, el maíz, el trigo o el mandioca entre otros, son las principales materias primas para la obtención de bioetanol (segunda generación), aunque a lo largo de los últimos años el uso de las microalgas para la generación de bioetanol de tercera generación está adquiriendo interés (Choi *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Esto es debido a que, en comparación con los cultivos de cereales, las microalgas presentan una estructura más simple, una velocidad de crecimiento muy superior y, además, no requieren disponer de tierras fértiles que podrían dedicarse al cultivo de alimentos. Debido a esto, se ha planteado la obtención de etanol a partir de los carbohidratos presentes en la biomasa microalgal. En la misma se podrán encontrar azúcares simples, tales como glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, manosa, etc., y otros polisacáridos más complejos como almidón, celulosa y hemicelulosa (Nahak *et al.*, 2011; Daroch *et al.*, 2013; Doan *et al.*, 2012). Especies de microalga como *Chlorella*, *Chlamydomonas* o *Scenedesmus* podrían ser candidatas prometedoras debido a su alto contenido en carbohidratos (Singh *et al.*, 2011), si bien esto depende no solo de la cepa de microalga, sino también de las condiciones de cultivo.

Un aspecto fundamental a considerar es que los polisacáridos contenidos en la biomasa han de ser liberados y convertidos en azúcares fermentables antes de proceder a la fermentación alcohólica de los mismos (Harun *et al.*, 2010). La aplicación de técnicas de ruptura celular mediante

homogeneizadores, molinos de bolas o ultrasonicadores pueden aumentar considerablemente la extracción de productos intracelulares. Así, la biomasa ha de ser pre-tratada e hidrolizada física (medios mecánicos, pirólisis), biológica (microorganismos y/o enzimas) o químicamente (ácidos o bases). La hidrólisis ácida es ampliamente utilizada en los pre-tratamientos de biomasa microalgal, ya que permite obtener una buena relación rendimiento/costo de proceso en comparación con otros métodos (Harun y Danquah, 2011; Daroch *et al.*, 2013). Respecto a la fermentación alcohólica, el rendimiento de esta etapa es ampliamente variable en función de la especie de microalga utilizada y las condiciones de hidrólisis y fermentación empleadas, reportándose valores entre 0.26 g-etanol/g-biomasa seca de *Chlorococcum infusionum* (0.75% p/v NaOH, 120°C, 30 min, *Saccharomyces cerevisiae*) (Harun *et al.*, 2010) y 0.52 g-etanol/g-biomasa seca de *Chlorococcum* sp. (3% v/v H₂SO₄, 160°C, 15 min, *Saccharomyces cerevisiae*) (Harun y Danquah, 2011). Otros autores reportan valores obtenidos tras la hidrólisis ácida entre 0.40 g-etanol/g-biomasa seca de *Chlorella vulgaris* (3% H₂SO₄, 110°C, 105 min., *Escherichia coli* (Lee *et al.*, 2011), 0.29 g-etanol/g-biomasa seca de *Chlamydomonas reinhardtii* (3% H₂SO₄, 110°C, 30 min., *Saccharomyces cerevisiae*) (Nguyen *et al.*, 2009) hasta tan solo 0.023 g-etanol/g-biomasa seca de *Scenedesmus obliquus* (2N H₂SO₄, 120°C, 30 min., *Kluyveromyces marxianus*) (Miranda *et al.*, 2012). Por otro lado, Choi *et al.* (2010) aplicaron un tratamiento enzimático, alcanzando 0.23 g-etanol/g-biomasa seca de *Chlamydomonas reinhardtii* (amilasa, 90°C, 30 min; glucoamilasa, 55°C, 30 min.; *Saccharomyces cerevisiae*). Así, la productividad de bioetanol depende de las condiciones empleadas en la hidrólisis de los carbohidratos que componen la biomasa microalgal. La mayoría de ellos forman parte de la pared celular, mientras que

su estructura y composición son variables para cada cepa. Por ello, las condiciones empleadas en la extracción han de optimizarse para cada microalga. El rendimiento alcanzado en la conversión de los azúcares en bioetanol será también función del contenido en azúcares fermentables de la biomasa y del microorganismo y las condiciones empleadas en la etapa de fermentación alcohólica (Daroch *et al.*, 2013, Doan *et al.*, 2012), por lo que estos parámetros han de optimizarse para cada caso.

Al igual que en el caso del aprovechamiento de la fracción proteica, la producción de bioetanol a partir de microalgas se puede hacer partiendo de biomasa húmeda, eliminando por tanto la necesidad de secado. Sin embargo, la producción de bioetanol implica un proceso en dos etapas y posterior recuperación de bioetanol más complejo que la producción de aminoácidos, por lo que su viabilidad dependerá del contenido inicial de azúcares fermentables de la biomasa y el rendimiento del proceso en su conjunto. Ya que el precio del producto final es bajo al tratarse de un biocombustible, solo los procesos que se aproximen a los máximos teóricos de conversión podrán ser competitivos.

4. Valorización de la fracción lipídica

La fracción lipídica de la biomasa de microalgas es habitualmente menor que las de proteínas y carbohidratos, pero posee moléculas bioactivas relevantes tales como pigmentos, esteroides y ácidos grasos poliinsaturados de gran interés para el hombre. No obstante, en este momento despierta mayor interés el desarrollo de procedimientos que permitan ser llevados a cabo a gran escala, de tal forma que la producción pueda ser dirigida a la obtención de biocombustibles. Bajo este objetivo general, se está trabajando en dos líneas

principales: la extracción de lípidos para posteriormente realizar la transesterificación de las fracciones saponificables, y la transesterificación directa de la biomasa. Ambos métodos poseen ventajas e inconvenientes, ya que mientras la extracción de lípidos y su posterior transesterificación es más compleja y costosa desde un punto de vista energético, la transesterificación directa aplica tratamientos intensos con agentes químicos, lo cual dificulta la posterior valorización de otras fracciones de la biomasa.

La extracción de los lípidos de microalgas se puede realizar con un solo disolvente orgánico o con mezclas de ellos. Así, se han logrado rendimientos de extracción en biomasa húmeda mediante sistemas presurizados de más de un 80% para mezclas hexano:etanol tras una hora de contacto (Chen *et al.*, 2012). En cambio, Chen-Hsi *et al.* (2011) han ensayado diferentes mezclas de disolventes con biomasa seca (*Pavlova* sp.) obteniendo rendimientos del 44.7% para mezclas acetato de etilo:metanol en 3 horas y 15.3% con hexano en sistema soxhlet durante 15 horas. La comparación de estos resultados con los obtenidos con *Chlorococcum* sp. (Halim *et al.*, 2011), donde se logra un 80% de extracción mediante sistema soxhlet con hexano, muestra la importancia de la elección de la cepa de microalga con la que trabajar.

Estos autores (Chen-Hsi *et al.*, 2011; Halim *et al.*, 2011) también estudiaron la utilización de CO₂ supercrítico para la extracción de lípidos y, aunque los rendimientos son ligeramente superiores a los obtenidos con los sistemas soxhlet con hexano, el costo de los equipos de extracción supercrítica a nivel industrial hace pensar que este tipo de procedimientos no son viables para aplicaciones en biocombustibles, mientras que los sistemas de extracción con disolvente están muy extendidos en la industria de extracción de aceites vegetales. Además, otros autores han desarrollado sistemas de extracción en continuo que, a priori, son mucho más eficientes desde el

punto de vista energético y de consumo de disolvente, y permiten alcanzar mayores rendimientos de extracción en menos tiempo que el sistema soxhlet (Iqbal y Theegala, 2012).

Respecto a la aplicación de la transesterificación de los lípidos de microalgas, Nagle y Lemke (1990) evaluaron el uso de diferentes catalizadores, observando que los mayores rendimientos de conversión, 68%, se conseguían mediante catálisis ácida específica, frente al 32% alcanzado mediante catálisis alcalina y, aunque otros autores han estudiado la catálisis heterogénea (Umdu *et al.*, 2009) la mayor parte de los estudios se están orientando hacia la catálisis ácida específica. En esta línea, Miao y Wu (2006) estudiaron las cantidades de catalizador, en este caso ácido sulfúrico, las proporciones de metanol:aceite, y la temperatura, concluyendo que trabajando con altas proporciones de catalizador (100%) se conseguía biodiesel de buena calidad (baja densidad) en tiempos más cortos, pero a costa de una disminución del rendimiento de conversión. La temperatura también provocaba la disminución de la densidad del biodiesel, al igual que la proporción de metanol:aceite de 56:1, consiguiendo un mínimo a partir de las 4 horas de reacción. En cambio, el rendimiento apenas se veía afectado por las cantidades de metanol añadidas.

Actualmente, la línea de investigación en auge es la relacionada con la transesterificación directa de la biomasa de microalgas, por ser más atractiva energéticamente que la extracción de lípidos y posterior transesterificación. En este caso, estudios como el realizado por Ehimen *et al.* (2010) mostraron resultados similares a los obtenidos por Miao y Wu (2006), ya que en sus experimentos el aumento de la proporción metanol:biomasa dio lugar a una disminución de la densidad. De igual modo, el aumento de temperatura conlleva una mayor conversión de FAME (fatty acid methyl ester) y disminución de los tiempos de reacción;

ambos autores determinaron que a partir de 4 horas de reacción las densidades eran mínimas bajo sus distintas condiciones óptimas. Por otra parte, la humedad de la biomasa tiene una influencia considerable en el rendimiento, como se observa en los estudios de Ehimen *et al.* (2010) y Haas *et al.* (2011), ya que la disminución de ésta provoca un aumento del rendimiento y una disminución de la necesidad de adición de metanol. Desde este punto de vista, es preferible utilizar biomasa seca, si bien conlleva un aumento de los costos globales del proceso debido a la recuperación de la biomasa y posterior secado.

5. Aprovechamiento de la biomasa de microalgas en procesos de obtención de biogás

La generación de energía mediante fermentación anaerobia es un proceso muy extendido actualmente, sobre todo en el tratamiento de residuos sólidos y aguas residuales, como el procesamiento de los lodos obtenidos del tratamiento de efluentes acuosos; así se aprovecha la materia orgánica, contenida en dichos lodos, produciendo biogás que usualmente se utiliza para generar energía eléctrica y térmica. En lo referente a las microalgas, ya en los años 50 (Golueke *et al.*, 1957) se expuso la idea del empleo de éstas en procesos de generación de biogás, pudiendo realizarse tanto en estado sólido, es decir, con biomasa seca (Mussnug *et al.*, 2010), como con el propio cultivo concentrado, esto es, con biomasa húmeda (Sánchez y Travieso, 1993). Uno de los puntos clave en la digestión anaerobia de microalgas es una buena biodegradabilidad de la biomasa. Esto depende principalmente de la composición bioquímica y la naturaleza de la pared celular, ya que en muchos casos está compuesta por polisacáridos complejos que no pueden ser degradados por los microorganismos presentes en estos sistemas

(Sialve *et al.*, 2009). Para mejorar la biodegradabilidad de las células, que pueden permanecer intactas incluso después de un mes en oscuridad dentro de los digestores (Mussgnug *et al.*, 2010), se pueden llevar a cabo diferentes pre-tratamientos sobre la biomasa, como la aplicación de ultrasonido, homogeneización de alta presión, tratamientos químicos y térmicos, etc., que incrementan el rendimiento en la degradación de la biomasa y la producción de biogás.

Otro factor importante para la operación de estos sistemas es el contenido proteico de la biomasa, ya que la existencia de una elevada proporción de proteínas provoca la formación de NH_3 y pH básico, dando lugar a la inhibición de la metanogénesis. Los rangos de concentración de $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ que involucran la aparición de fenómenos inhibitorios oscilan entre 1.7 y 14 g/L, dependiendo de las condiciones del proceso (Angelidaki *et al.*, 1993) y, una vez que estos efectos aparecen, se observa una elevada concentración de ácidos grasos volátiles en el cultivo (Sánchez y Travieso, 1993). La temperatura del proceso también puede incrementar la inhibición (Angelidaki *et al.*, 1994) y dificultar la operación, ya que en estos sistemas el aumento de temperatura va acompañado de un aumento de la productividad y de la biodegradación de la biomasa (Zamalloa *et al.*, 2012). Por otra parte, la presencia de iones Na^+ puede aparejar la disminución de la toxicidad de los productos de degradación de proteínas, aunque una alta concentración de Na^+ también puede producir inhibición en los microorganismos metanogénicos (Rinzema *et al.*, 1988), la cual puede ser minimizada por la adaptación de éstos a ambientes salinos. Al igual que sucede con el NH_3 , las elevadas temperaturas también provocan el aumento de los efectos inhibitorios del Na^+ (Chen *et al.*, 2008).

Los procesos de digestión anaerobia de microalgas pueden ser operados en discontinuo o en continuo, siendo éste último

el modo de operación más interesante a nivel industrial. Así, Sánchez y Travieso (1993) trabajaron en discontinuo, mientras que Ras *et al.* (2011) operaron en continuo, en ambos casos cultivos de *Chlorella vulgaris*. Los resultados del primero mostraron que las tasas de degradación de la biomasa, medidas en base a la demanda química de oxígeno (COD) eran mayores a mayor concentración de COD, consiguiendo una reducción del 75% del COD inicial en 28 días. En este periodo de tiempo, la concentración de células, medidas en función del contenido en clorofila, aumentaba hasta alcanzar un máximo en el día 16. Por otra parte, la producción de biogás evoluciona asintóticamente hacia un valor, que fue alcanzado en 32 días, coincidiendo con una disminución acusada en el contenido de clorofila, obteniendo unos rendimientos de 0.40-0.45 L de biogás por cada gramo de COD eliminado, y una calidad de gas de alrededor de 70% de CH_4 . Por otra parte, trabajando en continuo bajo tiempos hidráulicos de retención (HRT) de 16 y 28 días, Ras *et al.* (2011) consiguieron una eliminación de COD de 33% y 51% en 65 y 35 días, respectivamente. Las productividades de metano a los 65 días fueron de 0.11 y 0.18 L/g-COD para los ensayos a HRT de 16 y 28 días, respectivamente. Estos datos muestran que a mayor HRT se consigue mayor aprovechamiento de la materia orgánica y, al igual que en el estudio en discontinuo, la producción de metano tiende a crecer asintóticamente hasta un máximo que se alcanza a 28-32 días; por ello, no conviene operar a HRT superiores a 32 días.

Por su parte, Mussgnug *et al.* (2010) estudiaron el uso de distintas especies de microalgas en la producción de metano en sistemas en discontinuo durante 35 días, comprobando que dicha productividad está fuertemente vinculada a la cepa seleccionada. Además, la producción de metano no está estrictamente relacionada con la velocidad de degradación de las células, ya que según los

datos de su estudio, *Arthrospira platensis* se degradaba totalmente en apenas 3 días, produciendo 0.481 L/g-VS (sólidos volátiles) frente a *Chlamydomonas reinhardtii*, que producía 0.587 L/g-VS, permaneciendo tras 28 días en el digestor todavía en torno al 30% de células intactas. Las especies con mayor velocidad de degradación y menor contenido en materia no degradable por la microbiota del digestor muestran mayores productividades de biogás. Además, se comprobó que el uso de biomasa seca de microalgas disminuía la producción de biogás sobre un 20% respecto el uso de biomasa fresca, Mussgnug *et al.* (2010), seguramente debido a la dificultad de degradación de la biomasa seca por parte de los microorganismos del digestor.

6. Concepto de biorrefinería

Los procesos encaminados a la valorización de las distintas fracciones de la biomasa (proteínas, carbohidratos y lípidos) son actualmente viables técnicamente, como se ha mostrado en este trabajo. El problema aparece a nivel económico, ya que el costo asociado a la producción y recuperación de la biomasa, sumado al costo del propio proceso de aprovechamiento de la biomasa, hacen que el proceso en su conjunto no sea viable desde el punto de vista económico. Por ello, es imprescindible abordar la valorización de la biomasa desde un enfoque integral, acoplando los procesos individuales de valorización de forma que se puedan aprovechar al máximo todas las fracciones de la biomasa; éste es el concepto de biorrefinería. Se ha de aprovechar la ventaja que conlleva el hecho de que las microalgas tengan diversos contenidos en proteínas, carbohidratos, lípidos, etc., en función de la cepa seleccionada y las condiciones de cultivo (Doan *et al.*, 2012), con el objeto de desarrollar un proceso integrado que permita hacerlo viable económicamente. Para ello, es imprescindible decidir en qué orden se van a

provechar los distintos componentes de la biomasa y este es un aspecto que aún no está determinado. Para definir dicha integración hay que tener en cuenta dos hechos, (i) que la extracción de un tipo de compuestos conlleva por definición el aumento de concentración del resto de componentes de la biomasa, lo cual puede facilitar los posteriores procesos de aprovechamiento, y (ii) que en cada etapa se pueden perder componentes del resto de fracciones o alterarse estos incluso al punto de hacerlos inaceptables, dependiendo del grado de agresividad de las condiciones de operación empleadas en cada etapa.

Según el trabajo de Mussgnug *et al.* (2010), la producción de hidrógeno por parte de los cultivos de ciertas especies de microalgas bajo las condiciones adecuadas, puede convertirse en el primer proceso del aprovechamiento de las microalgas. Además, la inducción de este tipo de metabolismo puede provocar la acumulación de lípidos y carbohidratos, como ocurre en *C. reinhardtii*, beneficiando así los posteriores procesos de valorización, tal como muestran los datos de Mussgnug *et al.* (2010) que aumentaron un 123% la producción de biogás, con este tipo de biomasa. Partiendo de biomasa completa una ruta de aprovechamiento sería valorizar en primer lugar los carbohidratos mediante su conversión en bioetanol. La biomasa residual tras este proceso es aún una fuente rica en proteínas y lípidos, por lo que podrían ser posteriormente extraídos y destinar el lodo residual posteriormente a la generación de biogás (Suali y Sarbatly, 2012). Otra posibilidad sería valorizar en primer lugar los lípidos mediante su conversión en biodiesel y, seguidamente, utilizar la biomasa residual para obtener biogás (Gouveia y Oliveira, 2009), biofertilizantes o alimentos para animales ricos en proteínas (Singh y Olsen, 2011), o para ser fermentada de cara a la generación de bioetanol (Singh y Olsen, 2011). Otro ejemplo son los estudios tanto de Sari *et al.* (2012) como de Morris *et al.* (2008), que realizaron ensayos para el

aprovechamiento de proteínas después de haber extraído los lípidos de la biomasa de *Chlorella fusca* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente, y los resultados de ambos estudios mostraron que los rendimientos de los procesos aumentaban, pudiendo, en primer lugar aprovechar la fracción lipídica extraída para la obtención de biodiesel mediante la transesterificación de la fracción saponificable y/o la purificación de lípidos para usos en alimentación o salud y, posteriormente valorizar la fracción proteica de la biomasa.

La biomasa residual tras el uso de todos estos componentes, se puede destinar a la generación de biogás. Así, ensayos de digestión anaerobia de productos resultantes de la extracción de lípidos y transesterificación *in situ* de biomasa de *Chlorella* sp. (Ehimen *et al.*, 2009), mostraron que cuando se empleaba esta biomasa los tiempos de retención a los que se alcanza el máximo de producción de metano eran menores que cuando se empleaba la biomasa directamente para este fin, sin tratamiento previo alguno, aunque la producción acumulada disminuía. Este fenómeno es debido a que los tratamientos aplicados en primer lugar hidrolizan algunos compuestos, principalmente carbohidratos y proteínas. En cambio, otro efecto que cabe esperar de la utilización de los residuos obtenidos de la transesterificación *in situ* es el aumento de los niveles de H₂S en el biogás, debido a la alta proporción de azufre en la biomasa, lo cual perjudica el proceso de gasificación. Igualmente, la extracción con disolventes elimina lípidos de las membranas celulares y, por tanto, tanto la transesterificación como la extracción con disolventes, los componentes celulares de las

microalgas están más disponibles para la microbiota del digestor. Por otro lado, la pérdida de rendimiento respecto a la digestión de la biomasa sin tratar, se puede explicar por el aumento de la proporción de proteínas en la biomasa al eliminar los lípidos, lo que en un funcionamiento prolongado del digestor puede hacer que se acumule amonio con sus correspondientes efectos tóxicos. Respecto a la extracción mediante mezclas cloroformo:metanol se produce una disminución de los rendimientos de producción debido a la elevada toxicidad del cloroformo para los microorganismos metanogénicos, como se mostró en los trabajos de Thiel (1969). Ehimen *et al.* (2009) también ensayaron la co-digestión de los residuos de extracción con disolventes y transesterificación *in situ*, con una proporción de glicerol similar a la que se obtendría mediante la transesterificación de los ácidos grasos utilizados para obtener biodiesel, alcanzando una mejora del proceso del 4% y 7%, respectivamente.

Teniendo en consideración los datos de los estudios revisados en este trabajo y de ensayos realizados por los autores del mismo (hidrólisis enzimática de proteínas y termohidrólisis ácida de carbohidratos), se propone un proceso de biorrefinería de biomasa microalgal para su aprovechamiento íntegro, según el esquema de la Figura 1. El proceso se llevó a cabo con biomasa liofilizada de *Scenedemus* sp., previamente tratada con un homogeneizador de alta presión. Los rendimientos, operando a 150 g/L de biomasa seca, fueron de 80.6% de grado de hidrólisis con un rendimiento neto en aminoácidos libres del 59%, y 51.6% para la termohidrólisis ácida de carbohidratos.

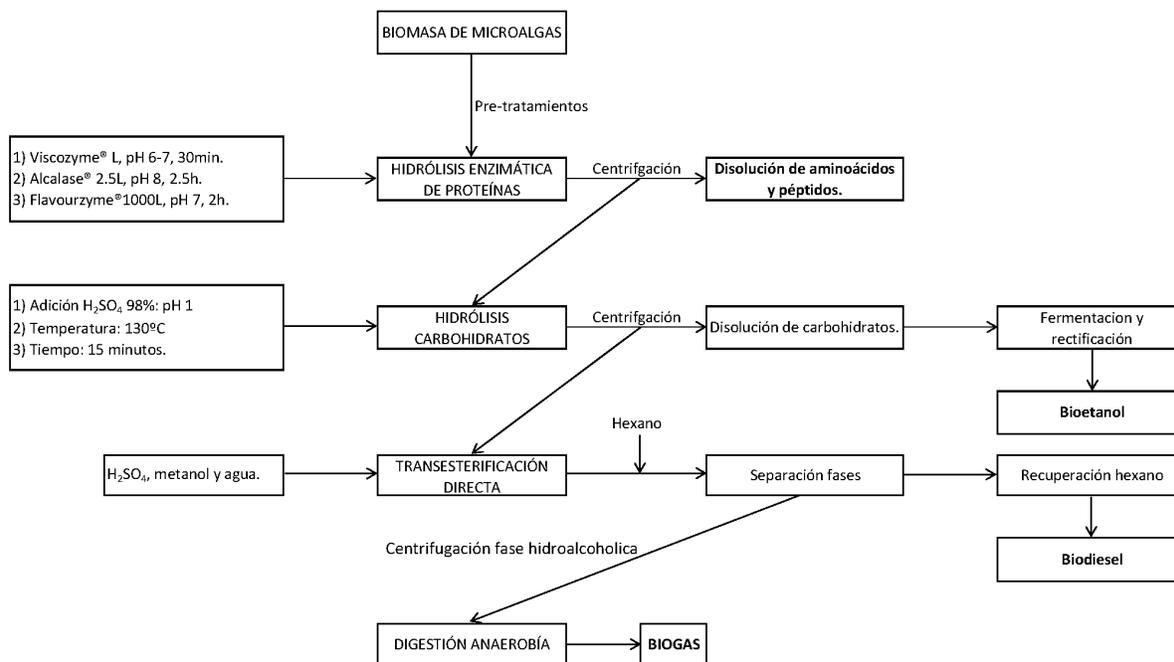


Figura 1. Esquema de biorrefinería para el aprovechamiento de proteínas mediante hidrólisis enzimática, carbohidratos mediante hidrólisis a azúcares y fermentación a bioetanol, transesterificación directa de los lípidos a biodiesel y digestión anaerobia de los residuos.

Los criterios para la elección del orden de las etapas del proceso de biorrefinería basaron en: 1) mantener la calidad de los aminoácidos, que de otra manera se descompondrían y alteraría, ya que los procedimientos de hidrólisis de carbohidratos y transesterificación directa son muy agresivos; 2) con este orden hay una progresiva acumulación de lípidos, aumentando la proporción de ácidos grasos en la biomasa desde 8.1% al 17.5% para los ensayos realizados; 3) al eliminarse la mayor parte de componentes antes del proceso de transesterificación, el biodiesel obtenido tendrá un menor contenido de impurezas, ya que por ejemplo, en los ensayos llevados a cabo se produjo una reducción del contenido de cenizas del 22% y 36%, en los procedimientos de aprovechamiento de proteínas y carbohidratos, respectivamente.

7. Conclusiones

Actualmente existen procesos para la valorización de cada componente que integra la biomasa de forma individual, pero los costos de producción con las tecnologías actuales suelen hacerlos inviables. En este sentido, las investigaciones futuras deben centrarse en el concepto de biorrefinería buscando el orden más adecuado para encadenar los procesos individuales, así como la modificación de las condiciones de operación para maximizar el rendimiento del proceso completo. El cultivo de la microalga es el primer eslabón de este proceso global y debe orientarse a la utilización del CO₂ de fuentes industriales y al uso de aguas residuales como fuente de nutrientes. El final del proceso pasa por la co-digestión de los residuos de la biomasa con otros residuos de otras industrias, de tal forma que la obtención de energía vía metanogénesis sea viable.

8. Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo dentro del proyecto Cenit Vida, con financiación de Algaenergy SA y Ministerio de Economía y Competitividad Industrial (CDTI). Se agradece su colaboración a Gustavo Ciudad y Laura Azócar del Centro de Gestión de Residuos y Bioenergía -BIOREN, Temuco, Chile.

9. Referencias

- Acién Fernández, F.G., Garcia Camacho, F., Sanchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M., Molina Grima, E., 1998. Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures. Effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (6), 605-616.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 506-564.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonian loads: effect of temperature. *Water Res.*, 28, 727-731.
- Barrow, C., Shahidi, F., 2008. *Marine nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Chen, M., Liu, T., Chen, X., Chen, L., Zhang, W., Wang, J., Gao, L., Chen, Y., Peng, X., 2012. Subcritical co-solvents extraction of lipid from wet microalgae pastes of *Nannochloropsis* sp. *Eur. J. Lipids Sci. Technol.*, 114, 205-212.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Biotechnol.*, 99, 4044-4064.
- Chen-Hsi, C., Tz-Bang, D., Hsien-Chueh, P., Shyue-Ming, J., Yun-Huin, L., Hom-Ti, L., 2011. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresour. Technol.*, 102, 10151-10153.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotech. Adv.*, 25, 294-306.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.*, 101: 5330-5336.
- Clemente, A., 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Foods Sci. & Technol.* 11, 254-262.
- Daroch M., Geng A., Wang, G., 2013. Recent advances in liquid biofuels production from algal feedstocks. *Appl. Energy*, 102, 1371-1381.
- Doan, Q.C., Moheimani, N.R., Mastrangelo, A., Lewis, D.M., 2012. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass Bioenerg.*, 46, 79-88.
- Ehimen, E. A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington G.C., 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *Glob. Change Biol. Bioenergy*, 1, 371-381.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89, 677-684.
- El-Ghamry, A. M., El Hai, K.M.A., Ghoneem, K.M., 2009. Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of Faba vean cultivated in clayey soil. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 3, 731-739.

- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic digestion of algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47-55.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 269-274.
- Haas, M.J., Wagner, K., 2011. Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113, 1219-1229.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 102, 178-185.
- Harun, R., Danquah, M.K. Forde, G.M., 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 199-203.
- Harun, R., Danquah, M.K., 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochem.*, 46(1), 304-309.
- Iqbal, J., Theegala, C., 2012. Optimizing a continuous flow lipid extraction system (CFLES) used for extracting microalga lipids. *Glob. Change Biol. Bioenergy.*, doi: 10.1111/j.1757-1707.2012.01195.x
- Iwamoto, H., 2003. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species-*Chlorella*. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgae Biotechnology*. Black-well Publishing, Oxford, 255-263.
- Jarunrattanasri, A., Theerakulkait, C., Cadwallader, K.R., 2007. Aroma components of acid-hydrolyzed vegetable protein made by partial hydrolysis of rice bran protein. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3044-3050.
- Kim, J., Um, B. H., Kim, T., 2012. Bioethanol production from microalgae, *Schizocytrium* sp., using hydrothermal treatment and biological conversion. *Korean J. Chem. Eng.*, 29, 209-214.
- Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C., Lee, J., 2011. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 164, 878-888.
- Miao X., Wu Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.*, 97, 841-846.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., 2012. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 555-564.
- Morris, H.J., Almarales, A., Carrillo, O., Bermudez, R.C., 2008. Utilization of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour. Technol.*, 99, 7723-7729.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51-56.
- Nagle, N., Lemke, P., 1990. Production of methyl ester fuels from microalgae. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 355-361.
- Nahak, S., Nahak, G., Pradhan, I., Sahu, R.K., 2011. Bioethanol from marine algae: a solution to global warming problem. *J. Appl. Environ. Boil. Sci.*, 1 (4), 74-80.

- Nguyen, T.M., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H., Sim, S.J., 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. J. Microbiol. Biotechnol. 19 (2), 161-166.
- Ördög, V., Stirk, W.A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J., Németh, L., 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. J. Appl. Phycol., 16, 309-314.
- Pitman, J.K., Dean, A. P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresour. Technol., 102, 17-25.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65 (6), 635-48.
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chorella vulgaris*. Bioresour. Technol., 102, 200-206.
- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux F., 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Appl. Energy, 88, 3411-3424.
- Reboloso Fuentes, M.M., Acién Fernández, F.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil Guerrero, J.L., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chem. 70, 345-353.
- Reboloso-Fuentes, M.M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J.J., Guil-Guerrero, J.L. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. J. Agric. Food Chem. 49, 2966-2972.
- Rinzema, A., VanLier, J., Lettinga, G., 1988. Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. Enzyme Microb. Technol., 10, 24-32.
- Romero García, J.M., Acién Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., 2012. Development of process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. Bioresour. Technol. 112, 164-170.
- Sánchez Hernández, E.P., Travieso Córdoba, L., 1993. Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. Resour. Conserv. Recy., 9, 127-132.
- Sari, Y. W., Marieke E. B., Sanders, J.P.M., 2012. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. Ind. Croops Prod., 43, 78-83.
- Shelef, G., Soeder, C.J., 1980. Algae biomass production and use. Elsevier/North Holland Biomedical press, Amsterdam., 265-285.
- 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.
- Singh, A., Olsen, S.I., 2011. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. Appl. Energy., 88: 3548-3555.
- Singh, A., Olsen, S.I., Nigam, P.S., 2011. A viable technology to generate third-generation biofuel. J. Chem. Technol. Biotechnol., 86: 1349-1353.

- Spolaore, P., Joannis-Cssan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosc. Bioeng.*, 101, 87-96.
- Suali, E., Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renew. Sust. Energy. Rev.*, 16, 4316-4342.
- Thiel, P.G., 1969. The effect of methane analogues on methanogenesis in anaerobic digestion. *Water Res.*, 3, 215-223.
- Umdu, E.S, Mand, T., Seker, E., 2009. Transesterification of *Nannocloropsis oculata* microalga's lipids to biodiesel on Al_2O_3 supported CaO and MgO catalysts. *Bioresour. Technol.*, 100 (11), 2828-2831.
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedemus obliquus* and *Phaeodactylum tricorutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl. Energy*, 92, 733-738.