



EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE SEPARACIÓN EN LA CONGLOMERACIÓN DE LA BIOMASA ALGAL DE *Chlamydomonas* sp.

Cerón-Ortiz A.N.^{ayb}, Bomaye-Andrade E.^a, Gutiérrez-Camacho V.S.^a, Limón-Mendoza M.A.^a y Ángeles-Monroy M.A.^b

^aIngeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior del Occidente del Estado de Hidalgo, Paseo del Agrarismo 2000. Carr. Mixquiahuala - Tula, km 2.5. Mixquiahuala de Juárez, Hgo., C.P. 42700, aceron@itsoeh.edu.mx

^bAcuacultura en Aguas Continentales, Centro de Estudios Tecnológicos en Aguas Continentales No.2, Tezontepec de Aldama, Hgo., C.P. 42760

Recibido 25 de octubre 2016; aceptado 19 de diciembre 2016

Palabras clave:

Microalgas, proteínas,
floculante

RESUMEN. El uso de la microalga *Chlamydomonas* sp. en la industria alimentaria se debe a su contenido de proteínas, ácidos grasos y pigmentos; su producción se realiza en cultivos celulares a pequeña y gran escala, cuya biomasa se puede recuperar a través de equipos especializados, métodos físicos o químicos. La selección del método depende de los costos de inversión, tiempo y efecto en el contenido bioquímico. Por ello, el estudio evaluó la centrifugación, sedimentación y floculación como métodos de separación en la conglomeración de biomasa derivada de cultivos estáticos de *Chlamydomonas* sp. Para lo cual se generó un volumen de 1500 ml con aproximadamente 14×10^6 cél·ml⁻¹ de biomasa, distribuyéndolos en cantidades independientes de 250 ml (ocho repeticiones por tratamiento) para determinar el efecto de los tres métodos en la cantidad de biomasa conglomerada, tiempo de obtención del conglomerado, color y contenido bromatológico (proteínas, carbohidratos y lípidos). La centrifugación se aplicó a 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 min de exposición a 4500 rpm; la sedimentación por gravedad y la floculación al adicionar una solución de NaOH al 0.5N (1 ml por repetición). La centrifugación registró el menor tiempo de conglomeración de biomasa (5 min) y una recuperación del $97 \pm 1\%$; similar a los $96 \pm 2\%$ en la sedimentación. Ambos métodos no impactaron negativamente el contenido de proteínas (41.68 ± 1.63 y $39.16 \pm 6.27\%$) ($P > 0.05$); aunque la centrifugación necesita una mayor inversión económica durante su aplicación. En cuanto a la floculación, acelera la precipitación celular en comparación con la sedimentación, pero tiene un efecto negativo en el contenido de proteínas ($24.66 \pm 1.10\%$) y el color del conglomerado. Por ello, se recomienda que para el aprovechamiento del valor nutrimental de *Chlamydomonas* sp., los métodos de sedimentación y centrifugación son los más factibles.

Key words:

Microalge. proteins,
floculant

ABSTRACT. The use of the micro-algae *Chlamydomonas* sp. in the food industry is due to its content of protein, fatty acids and pigments; its production is made in cell cultures to small and large scale, whose biomass can be recovered through specialized equipment, physical or chemical methods. The selection of the method depends on the costs of investment, time and effect on biochemical content. For this reason, the study evaluated centrifugation, sedimentation and flocculation as methods of separation in the conglomeration of biomass derived from static culture of *Chlamydomonas* sp. To which generated a volume of 1500 ml with approximately 14×10^6 cel·ml⁻¹ of biomass, distributing them in 250 ml (eight repetitions per treatment) independent quantities to determine the impact of the three methods in the amount of biomass engineered, time of the conglomerate, color and bromatological content (proteins, carbohydrates and lipids). The centrifugation is applied to 1, 2, 3, 4, 5, 10 and 15 min exposure at 4500 rpm; the gravity sedimentation and flocculation by adding a solution of NaOH to the 0.5N (1 ml per repetition). The centrifugation recorded the shortest time of conglomeration of biomass (5 min) and a recovery of $97\% \pm 1$; similar to the $96 \pm 2\%$ on sedimentation. Both methods not negatively impacted the protein content (41.68 ± 1.63 and $39.16 \pm 6.27\%$) ($P > 0.05$). The centrifugation needs greater economic investment during its application. The flocculation accelerates cellular precipitation compared to sedimentation, but it has a negative effect on protein content ($24.66 \pm 1.10\%$) and the color. For this reason, the methods of sedimentation and centrifugation are the most feasible.





INTRODUCCIÓN

Los estudios relacionados con la aplicación científica y tecnológica de las microalgas tienen su origen en la falta de alimento y fuentes proteicas ocurridas entre los años 30's y 40's¹; lo que dio lugar a incrementar su producción² y determinación del contenido de moléculas orgánicas³. Una clase de algas en estudio son las Chlorophytas (algas verdes), cuyos contenidos de clorofilas (a y b), carotenoides, proteínas y polisacáridos las potencializan como materia prima a utilizar en la industria alimentaria. Al respecto, la *Chlamydomonas* sp., es una microalga que posee entre un 30% y 50% de proteínas con base a su peso seco; porcentajes aprovechables si la biomasa se conglera posterior al cultivo. Además de buscar la disminución en la complejidad y costos del proceso de conglomeración^{4,5}, actualmente se han utilizado la centrifugación, sedimentación y floculación como métodos de separación y conglomeración de biomasa en otras especies⁶, no así en este tipo de alga verde.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de tres métodos de separación en la conglomeración de biomasa algal de *Chlamydomonas* sp. y determinar su efecto en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos (contenido bromatológico), así como los cambios de color.

METODOLOGÍA.

La microalga *Chlamydomonas* sp. se cultivó mediante inóculos sucesivos de 10 hasta los 1500 ml⁷; el crecimiento en estos últimos se determinó diariamente a través del conteo celular. Una vez alcanzados los 14×10^6 cel•ml⁻¹ en los cultivos de algas, se extrajeron volúmenes de 250 ml con un total de 10 repeticiones por tratamiento para evaluar el efecto del método de conglomeración (variable independiente) en cuatro variables dependientes (cantidad de biomasa, tiempo de recuperación del conglomerado, el color y el contenido bromatológico) a través de un diseño experimental unifactorial. Los tratamientos se identificaron como FC=centrifugación, FS=sedimentación y QF=floculación. En FS la biomasa se precipitó por gravedad y en QF se indujo mediante una solución de NaOH (hidróxido de sodio) 0.5 N a una razón de 1 ml por cada repetición⁸. Asimismo, en ambos tratamientos se

contabilizó el número de células en la columna de agua sin previa agitación de la biomasa en los frascos. La centrifugación se realizó en una Centrifuga VS-550 Multi-tube Carrier Refrigerated Centrifuge a 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 min de exposición a 4500 rpm; al final de cada tiempo se realizó el conteo celular. La pérdida en peso y humedad de los conglomerados se determinaron a través de la técnica del peso seco constante en un horno SHEL LAB a 50 °C⁹. Asimismo, se determinaron los porcentajes de carbohidratos¹⁰, proteínas¹¹ y lípidos^{12,13}. Los cambios en el color de la microalga viva y seca se efectuaron mediante un análisis comparativo de acuerdo a la escala Pantone®, indicando la cuatricomía CMYK (C=cian, M=magenta, Y=amarillo y K=negro). A los datos obtenidos se les verificó la normalidad distributiva (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad de Bartlett, mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVI; al cumplir ambos supuestos se aplicó un análisis de varianza y pruebas de HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El máximo crecimiento en biomasa se alcanzó al día 14 del cultivo ($14 \times 10^6 \pm 216,363$ cel•ml⁻¹), lo cual es similar a lo reportado en otros estudios (15×10^6 cel•ml⁻¹) para *Chlamydomonas* sp.⁷. Sin embargo, hasta el día 17 se observaron las fases de crecimiento típicas de acuerdo al patrón estándar¹⁴, las cuales concuerdan con la cinética de crecimiento de esta especie. Así mismo se observó un cambio paulatino en la intensidad de color en la columna de agua del cultivo (Figura 1).

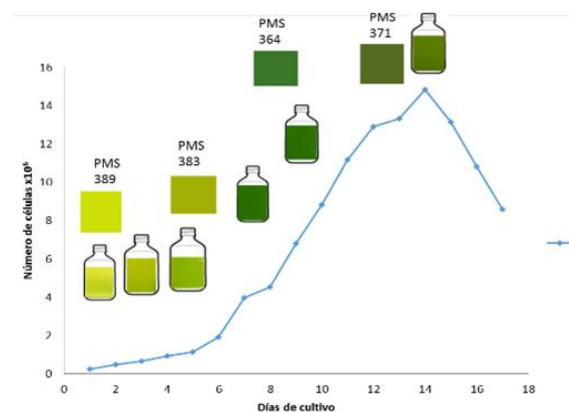




Figura 1. Tendencia en el crecimiento y los cambios observados en el color del agua de cultivo de *Chlamydomonas* sp. con base a la escala Pantone®.

La sedimentación originó una precipitación celular y una disminución en la coloración del cultivo en un tiempo mayor, pero fue a partir del día 8 donde no se registraron cambios significativos en el número de células en la columna de agua ($268,823.59 \pm 0.06 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$) ($P > 0.05$) (Figura 2). La conglomeración de la biomasa fue de 96 ± 2 en densidades cercanas a los $14 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Además, por sus dimensiones (entre 10 y 20 μm) necesita un mayor tiempo de precipitación que microalgas de tamaño mayor (70 μm)¹⁵. Los resultados antes mencionados se relacionan con la velocidad de sedimentación, la densidad del cultivo y el tamaño de las mismas¹⁶.

La floculación fue el segundo método más rápido con una biomasa en la columna del agua de $9.78 \times 10^4 \pm 0.58 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ al día cinco, cantidad que no varió significativamente posterior a ese día ($P > 0.05$), recuperando el 93 ± 6 % (Figura 3). Lo cual se debe a la acción del floculante en la formación de agregados más pesados al inducir la adherencia entre las células de algas por la repulsión electrostática entre las partículas coloidales y las fuerzas de Van der Waals^{17, 18, 19}. Algunos estudios con NaOH refieren que el tiempo de floculación se relaciona con la especie de microalga, la concentración y tipo de floculante⁸; y aunque mencionan una recuperación similar a la del estudio, la alcanzan en un tiempo menor a los cuatro días. Por lo cual es necesario evaluar diferentes concentraciones de NaOH en la floculación de *Chlamydomonas* sp. Asimismo, el floculante tuvo un efecto en la tonalidad del color, el cual pasó de un PMS 356 en la escala Pantone® hasta un PMS 375, probablemente por la degradación de los pigmentos presentes en la microalga, ya que en contacto con disolventes químicos son más lábiles y existe modificación de su estructura química o la destrucción del pigmento observando una decoloración y reducción del valor nutritivo²⁰. Resultados similares se han registrado en la especie *Nannochloropsis oculata* al aplicar sulfato de aluminio como floculante²¹.

El efecto de la centrifugación en el número de células (columna de agua y fondo del tubo cónico) y el color, no registraron diferencias significativas posterior a los cinco minutos a 4500 rpm ($P > 0.05$)

(Figura 4). La biomasa recuperada en el tiempo referido fue del 97 ± 1 % y el número de células en la columna del agua de $0.0000002675 \pm 9.735 \times 10^{-8} \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los valores son similares a los mencionados por otros autores, quienes reportan el 95 % de recuperación en menos de 5 min entre 1000 y 2000 rpm^{22, 23}. La eficacia del método permite la recolección de metabolitos de alto valor (17) sin que lo limite el tamaño del alga o la densidad del cultivo. Aunque los costos en el proceso se elevan por el consumo energético del equipo (3.000 kW/ton) y las capacidades del volumen de centrifugación^{24, 25}, factores a valorar en la factibilidad del método para *Chlamydomonas* sp.

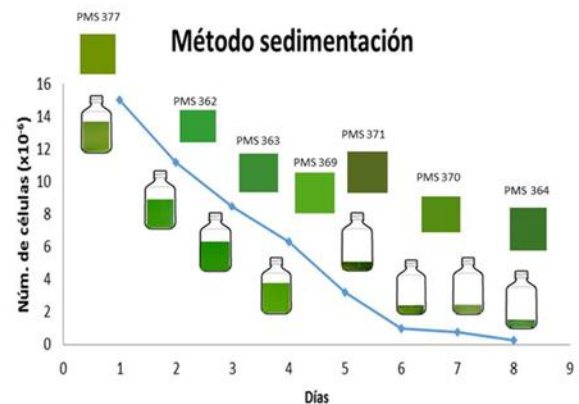


Figura 2. Tendencia en el número de células y cambio de color (escala Pantone®) en la columna del agua de *Chlamydomonas* sp. con el método de sedimentación.

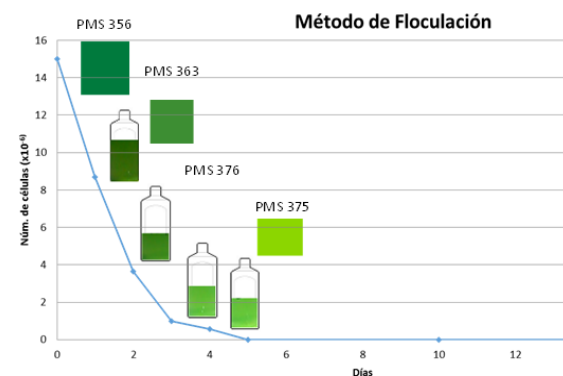


Figura 3. Resultados observados en la conglomeración y cambio de color (escala Pantone®) en la columna del agua con el método de floculación.

La biomasa seca de los métodos de floculación y centrifugación posterior a su molido atravesaron la malla del tamiz número 100, a diferencia de la biomasa seca derivada del método de



sedimentación (se retuvo el 30 %). Lo cual se relaciona con el mayor grado de dificultad durante la molienda por su textura granular. El color del polvo para la biomasa conglomerada por centrifugación y sedimentación se identificó con el tono 364 de la escala de Pantone®, mientras que el polvo derivado de la conglomeración por floculación se identificó con el tono 377.

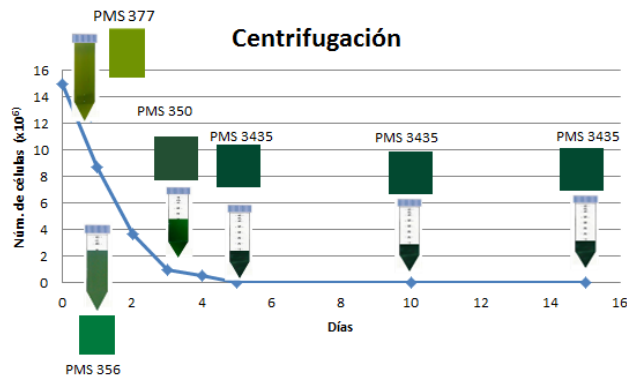


Figura 41. Resultados observados en la conglomeración y cambio de color (escala Pantone®) en la columna del agua con el método de centrifugación.

En cuanto al efecto del método de conglomeración en el contenido de biomoléculas se registraron diferencias significativas entre los tratamientos para proteínas y carbohidratos ($P < 0.05$) (Tabla 1). Los máximos niveles de proteínas se registraron en la biomasa seca derivada de la centrifugación y sedimentación ($P = 0.0120$); y en los de floculación para carbohidratos ($P = 0.0285$). En lípidos no existe una diferencia estadística entre los métodos aplicados ($P = 0.2556$). Lo anterior se puede explicar debido a que el NaOH como sustancia polar tiene efectos en la integridad de las proteínas, produciendo una desnaturalización química. Esta característica no se aplica a los lípidos y carbohidratos, ya que son biomoléculas que responden de manera diferente a los compuestos inorgánicos polares²⁶. Los cambios en el contenido de moléculas orgánicas en los conglomerados derivados del método de separación son un aspecto relevante para su aplicación en diferentes industrias, ya que limitaría su aprovechamiento como fuente de proteínas y pigmentos en industrias como la alimentaria y farmacéutica^{20, 27}.

Tabla 1. Porcentajes promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de las biomoléculas obtenidas en la biomasa algal seca conglomerada mediante el uso de tres métodos de separación.

	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
Centrifugación	41.68 ^a (1.63)	29.04 ^b (5.97)	28.27 ^a (6.61)
Sedimentación	39.16 ^a (6.27)	33.79 ^b (3.80)	24.14 ^a (1.05)
Floculación	24.66 ^b (1.10)	54.54 ^a (2.73)	22.57 ^a (0.60)

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, donde a>b. Nivel de significancia 95 %. Seis repeticiones por tratamiento por variable dependiente.

CONCLUSIONES

Las diferencias en las características físicas y contenido bioquímico entre conglomerados obtenidos en los tres métodos de separación son derivados de los mecanismos propios de cada uno. La floculación a pesar de ser el segundo método más rápido en la sedimentación del alga *Chlamydomonas sp.*, el uso del NaOH como agente químico floculante disminuyó el contenido de proteínas, incremento el contenido de carbohidratos y es posible que modificara la estructura química del pigmento atenuando el color del conglomerado. En cuanto a la sedimentación y la centrifugación fueron los métodos que no registraron un impacto negativo en el contenido de proteínas y el color. Aunque la sedimentación tardó más tiempo en concentrar la microalga en el fondo del recipiente comparada con la centrifugación, este último es un método que pudiera tener a niveles masivos un gasto económico elevado. Por lo cual, el uso de algunos de los métodos de separación en la conglomeración de *Chlamydomonas sp.* dependerá del uso que se dará a la biomasa, las condiciones de operación y las necesidades de cada productor. Por ejemplo, los métodos de sedimentación y centrifugación se recomendarían si se requieren un conglomerado con valores superiores al 30 % de proteínas y que además mantenga la coloración típica de la microalga. Asimismo, para la selección entre alguno de estos dos métodos se deberá de considerar el tiempo que se requiera invertir en la conglomeración y si se cuenta con el equipo especializado para utilizar la centrifugación.





AGRADECIMIENTOS RECONOCIMIENTOS

Y/O

Lo autores del estudio agradecen al ITSOEH y CETAC 02 por el apoyo económico y de infraestructura proporcionados.

REFERENCIAS

1. Albarracín, I. (2007). XV Simposio Electrónico Internacional. Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo. Buenos Aires, Argentina.
2. Chisti, Y. (2007). Biodiesel From Microalgae Beats Bioethanol. *Trends In Biotechnology*. 26:126-131.
3. Abdel-Raouf, N. Al-Homaidan, A. A y Ibraheem, I.B.M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
4. Rawat, I. Ranjith-Kumar, R. Mutanda, T. y Bux, F. (2011). *Applied Energy* 88: 3411-3424.
5. Prajapati SK, Kaushik, P. Malik A y Vijay, VK. (2013). Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances* 31:1408-1425.
6. Ho, S.H., Chen, C. Y., Lee D. J., y Chang, J. S., (2011). A review. *Biotechnology Advances* 29:189-198.
7. Mendoza, O. E. M. y Hernández G. O. A. (2012). Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Ingeniero en Industrias Alimentarias. ITSOEH. México.
8. Nava-Gómez, B., Valenzuela-Espinoza, E., Sampedro-Ávila, J.E., Bonett-Calzada, B. y León-Mancilla, S. (2013). XX Congreso Nacional de Ciencias y Tecnología del Mar, DGECyTM, del 1 al 4 de octubre en Los Cabos, B.C.
9. Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J.R. (ed.): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge.
10. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. (1956). *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
11. Lowry, H.O., N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr y R.J. Randall. (1951). *Biological Chemistry*, 193:265-275.
12. Pande, S.V., R. Parvin Khan y T.A. Venkatasubramanian. (1963). *Analyt. Biochem.*, 6:415-423.
13. Bligh, E.G. y W.J. Dayer. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
14. Fogg, G. E. y Thake, B. (1987). The University of Wisconsin Press Third Edition EU A 126 pp.
15. Palomino, M.A, Estrada, F.C. y López, G.J. (2010). Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa. *Inclusão Social e Energia*, 149-157.
16. Muñoz, R. and Guieysse, B. (2006). A review, *Water Research* 40 (15):2799–2815.
17. Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. and Foulkes, L. (2000). A summary, *Aquaculture Research* 31 (8–9):637–659.
18. Halim, R., Danquah, M. K., y Webley, P. A. (2012). A review. *Biotechnology advances*, 30(3):709-732.
19. Montilla-Escudero, E. A. (2011). Gracilaria Verrucosa, Pontificia Universidad Javeriana Santa Marta Colombia.
20. Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., y Mira, H. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54 (2), 209-215.
21. Surendhiran, D. y M. Vijay. (2013). Study on flocculation efficiency for harvesting *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 5(4): 1761-1769.
22. Molina, E., J.F., F.G. Acien, Y. Chisti. (2001). *Journal Of Biotechnology*, 92:113-131.
23. Bermeo, C. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalga en agua residual mediante técnicas de centrifugado. Universidad de Cádiz, España.
24. Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313.
25. Bosnjakovic, M. (2013). Biodiesel from algae. *Journal of Mechanics Engineering and Automation*, 3(3):179-188.
26. Lehninger, A. L. (1995). *Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega, S. A. de C. V.
27. Primo-Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*, Volumen 2. Editorial Reverté, S.A.

