



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona



FRACCIONAMENT DE MICROALGUES: OPTIMITZACIÓ DE LA TÈCNICA D'EXPLOSIÓ DE VAPOR I POSTERIOR SEPARACIÓ DE COMPONENTS

Treball final de grau

Grau en Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Núria Descarrega Altadill

Tutor acadèmic: Xavier Flotats Ripoll

Tutors externs: Esther Lorente Royo i Carles Torras Font

Institució: Fundació Institut de Recerca en Energia de Catalunya, IREC

09 / juny / 2017

Resum

Actualment les microalgues són el centre d'atenció de moltes investigacions, per ser una font de biomassa renovable i una excel·lent matèria prima per la biorefineria. Quan les microalgues s'utilitzen com a biomassa, el procés consta de quatre etapes: el cultiu de les mateixes, la seva concentració, el fraccionament de la biomassa algal i la producció del producte final.

El present estudi es centra en el fraccionament de les microalgues, sent l'objecte principal maximitzar la quantitat de lípids neutres i sucres recuperables, tant en el procés de la ruptura de la paret cel·lular, com en la posterior separació de fraccions. La microalga escollida és la *Nannochloropsis gaditana*, ja que és una bona font de lípids i carbohidrats per la producció de biocombustibles.

El trencament de la paret cel·lular de les microalgues es va realitzar mitjançant la tècnica d'explosió de vapor (150 °C i 4,7 bar durant 5 minuts), per la seva alta eficiència en la ruptura i en la posterior recuperació dels lípids i sucres. En el subsegüent fraccionament de la mescla resultant de l'explosió de vapor, es van poder identificar tres fases: fase líquida orgànica amb els lípids, la fase líquida que conté carbohidrats i una fase sòlida que es compon principalment de contingut proteic.

Estudis previs van demostrar l'eficàcia i la viabilitat d'utilitzar àcid sulfúric com a catalitzador de la reacció, seguit d'una extracció de lípids amb el dissolvent n-hexà. En el present estudi es va analitzar la variació de la quantitat de catalitzador, obtenint uns rendiments majors de recuperació de lípids i sucres emprant un 5 % d'àcid sulfúric (pes/pes, en base mostra humida).

Es va dur a terme una concentració prèvia a l'extracció de lípids i recuperació de sucres, per tal de millorar el rendiment de recuperació. Es van emprar dos mètodes de concentració: la centrifugadora i la filtració frontal (filtració amb membrana). Ambdós tècniques no van permetre una millora en la recuperació dels dos components orgànics.

Resumen

Actualmente, las microalgas son el centro de atención de muchas investigaciones, por ser una fuente de biomasa renovable y una excelente materia prima para la biorefinería. Cuando las microalgas se utilizan como biomasa, el proceso consta de cuatro etapas: el cultivo de las mismas, su concentración, el fraccionamiento de la biomasa algal y la producción de del producto final.

El presente estudio se centra en el fraccionamiento de las microalgas, siendo el objeto principal maximizar la cantidad de lípidos neutros i azúcares recuperables, tanto en el proceso de la ruptura de la pared celular, como en la posterior separación de fracciones. La microalga escogida es la *Nannochloropsis gaditana*, ya que es una buena fuente de lípidos y carbohidratos para la producción de biocombustibles.

La rotura de la pared celular de las microalgas se utilizó mediante la técnica de explosión de vapor (150 °C y 4,7 bar durante 5 minutos), por su alta eficiencia en la ruptura y en la posterior recuperación de los lípidos y azúcares. En el subsiguiente fraccionamiento de la mezcla resultante de la explosión de vapor, se pudieron identificar tres fases: fase líquida orgánica con los lípidos, la fase líquida que contiene carbohidratos y una fase sólida que se compone principalmente de contenido proteico.

Estudios previos demostraron la eficacia y la viabilidad de utilizar ácido sulfúrico como catalizador de la reacción, seguido de una extracción de lípidos con el disolvente n-hexano. En el presente estudio se analizó la variación de la cantidad de catalizador, obteniendo unos rendimientos mayores de recuperación de lípidos y azúcares empleando un 5 % de ácido sulfúrico (peso/peso, en base muestra húmeda).

Se llevó a cabo una concentración previa a la extracción de lípidos y recuperación de azúcares, para mejorar el rendimiento de recuperación. Se emplearon dos métodos de concentración: la centrifugadora y la filtración frontal (filtración con membrana). Ambas técnicas no permitieron una mejora en la recuperación de los dos componentes orgánicos.



Abstract

Currently, microalgae are the focus of many researches to be a renewable biomass source and an excellent raw material for biorefinery. When the microalgae are used as biomass, the process consists of four stages: the microalgae cultivation, its concentration, fractionation of algal biomass and the final product production.

The present study focuses on the microalgae fractionation, being the main object maximize the neutral lipids quantity and recoverable sugars, both in the process of cell wall disruption and in the subsequent fraction separation. The chosen microalga is *Nannochloropsis gaditana*, since it is a good source of lipids and carbohydrates for biofuel production.

In cell wall disruption process of microalga was performed using the technique of steam explosion (150 °C and 4,7 bar for 5 minutes), for its high efficiency in breaking and subsequent recovery of lipids and sugars. In the subsequent fractionation of the resultant mixture of the steam explosion, were able to identify three phases: organic liquid phase with lipids, liquid phase that contains carbohydrates and solid phase that composes mainly of protein.

Previous studies showed the efficacy and the feasibility of use sulfuric acid as a catalyst of the reaction, followed of a lipid extraction by n-hexane solvent. In the present study we examined the variation of the amount of catalyst, obtaining higher recovery yields of lipids and sugars using a 5 % sulfuric acid (w/w, wet sample basis).

It carried out a previous concentration to lipids extraction and recovery of sugars, in order to improve the performance of recovery. We employed two methods of concentration: the centrifuge and the frontal filtration (filtration with membrane). Both technical did not allow an improvement in the recovery of the two organic components.



Sumari

ÍNDIX DE FIGURES	9
ÍNDIX DE TAULES	11
ACRÒNIMS	13
AGRAÏMENTS	15
1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. Les microalgues i la seva composició	18
1.1.1. Les microalgues	18
1.1.2. La composició de les microalgues	20
1.1.3. Composició del gènere <i>Nannochloropsis</i>	22
1.2. Antecedents	23
2. OBJECTIUS	25
3. MATERIALS I MÈTODES	27
3.1. Disseny experimental	27
3.1.1. Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor	27
3.1.2. Experiment 2: Concentració amb centrifugadora	29
3.1.3. Experiment 3: Concentració amb filtració frontal	31
3.2. Mètodes analítics	34
3.2.1. Anàlisi termogravimètric (TGA)	34
3.2.2. Cromatografia líquida d'alta eficiència	35
3.2.3. Hidròlisi àcida	35
3.2.4. Extracció de lípids	36
3.3. Mètodes estadístics	38
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	39
4.1. Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor	39
4.2. Experiment 2: Concentració amb centrifugadora	42
4.3. Experiment 3: Concentració amb filtració frontal	47
5. CONCLUSIONS I RECOMANACIONS	54
5.2. Conclusions	54

5.3. Recomanacions	55
6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	56
ANNEXOS	60
Annex A. Resum de l'estudi que es presentarà en la EUBEC	60
Annex B. Càlcul pes sec lliure de cendres (DAF)	64
Annex C. Càlcul del percentatge de lípids.....	68
Annex D. Càlcul de lípids en el balanç de matèria.....	70



Índex de figures

Figura 1-1. Fotografies microscòpiques de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> (Sirin, 2013) _	19
Figura 1-2. Lípids extrets en la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> mitjançant el mètode <i>Bligh and Dyer</i> després dels pretractaments (Lorente <i>et al.</i> , 2015) _____	24
Figura 3-1. Equip experimental d'explosió de vapor situat a la Universitat Rovira i Virgili _____	28
Figura 3-2. Esquema representatiu del primer experiment: Tècnica d'explosió de vapor amb la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> _____	29
Figura 3-3. Mostres explotades de la <i>Nannochloropsis gaditana</i> introduïdes a la centrifugadora per la posterior concentració _____	30
Figura 3-4. Esquema representatiu del segon experiment: Concentració amb centrifugadora de les mostres explotades de la <i>Nannochloropsis gaditana</i> _____	30
Figura 3-5. Esquema que descriu el procés de filtració frontal _____	32
Figura 3-6. Equip experimental de filtració frontal que disposa l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC) _____	33
Figura 3-7. Esquema representatiu del tercer experiment: Concentració amb filtració frontal de les mostres explotades de la <i>Nannochloropsis gaditana</i> _____	33
Figura 3-8. Equip experimental d'anàlisi termogravimètric (TGA) que disposa l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya _____	34
Figura 3-9. Mostres de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> en el procés d'extracció de lípids amb n-hexà _____	38
Figura 4-1. Fraccions que es van adquirir de l'extracció amb n-hexà de les mostres explotades i concentrades amb centrifugadora de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> _____	47

Figura 4-2. Resultats del primer assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió de 9 bar i nivell de concentració del 50 % _____ 49

Figura 4-3. Resultats del segon assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió d'1 bar i nivell de concentració del 50 % _____ 49

Figura 4-4. Resultats del tercer assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió d'1 bar fins a 3 bar i nivell de concentració del 25 % _____ 50



Índex de taules

Taula 1-1. Comparativa de la quantitat interior d'oli acumulat per unitat de pes sec de biomassa entre sis microalgues (Chisti, 2007)	20
Taula 1-2. Quantitat de lípids, carbohidrats i proteïnes del gènere <i>Nannochloropsis</i> (Reboloso <i>et al.</i> , 2001)	22
Taula 4-1. Resultats obtinguts en l'Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor amb 1 % d'àcid sulfúric. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	39
Taula 4-2. Resultats obtinguts en l'Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor amb 5 % d'àcid sulfúric. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	40
Taula 4-3. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions prèvies i posteriors a la tècnica d'explosió de vapor respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	43
Taula 4-4. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions posteriors a la concentració amb centrifugadora de mostres explotades respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	44
Taula 4-5. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Rendiments de recuperació de lípids en les tres concentracions resultants de la concentració amb centrifugadora. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	45
Taula 4-6. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions resultants de l'extracció de la fase aquosa adquirida en la primera extracció de la biomassa explotada respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	46
Taula 4-7. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Rendiments de recuperació de sucres en les tres concentracions resultants de la concentració amb centrifugadora	46
Taula 4-8. Resultats obtinguts en l'Experiment 3: Fraccions posteriors a la concentració amb filtració frontal de mostres explotades respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.	51

Taula 4-9. Resultats obtinguts en l'Experiment 3: Rendiments de recuperació de lípids en les tres concentracions resultants de la concentració amb filtració frontal. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard. _____ 51

Taula 4-10. Comparativa dels rendiments resultants de la recuperació de lípids concentrant a un 50 % en centrifugadora i filtració frontal. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard. ____ 52



Acrònims

DAF *Dry ash free* (Sec lliure de cendres)

HPLC *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida d'alta eficiència)

TGA Anàlisi termogravimètric



Agraïments

Voldria començar agraint al Dr. Carles Torras i a la Dra. Esther Lorente, per guiar-me i ajudar-me en el llarg camí de la realització del treball de fi de grau. Per la gran paciència que han tingut ensenyant-me com millorar com a estudiant i professional.

A totes les persones que he conegut a l'IREC, com la Dra. Ester Clavero, Dra. Sònia Abelló, la Dra. Monika Hapońska, el Prof. Joan Salvadó i la Lidia Arce, per donar-me el seu suport quan ho he necessitat, per acollir-me i fer-me sentir un més entre ells.

Al Prof. Xavier Flotats, per ser el meu tutor i guiar-me en aquesta experiència.

Als meus amics, els de la universitat i als del poble, per la complicitat, per els somriures més oportuns i per fer que els quatre anys aquí, hagin sigut més fàcils i plens d'alegria.

Als meus pares i al meu germà, el pilar més fort que tinc a la vida, per fer l'esforç que han fet per donar-me la possibilitat d'estudiar. Per l'immens amor i recolzament incondicional. Per confiar en mi, per ajudar-me a que els dies siguin més fàcils... Tot el que tinc els hi dec a ells.

Als meus avis, el que està al meu costat i els que porto dins del cor, per tota la força i amor rebut, sou les estrelles més boniques del cel.

I, finalment, a ell, per l'enorme paciència i recolzament que m'ha donat, per ajudar-me amb tot allò que he necessitat i més. Simplement, gràcies.



1. Introducció

En els darrers anys, el cultiu de microalgues com a matèria primera per la producció de biocombustibles ha sigut el centre de moltes investigacions. Les microalgues són una font de biomassa renovable amb una ràpida taxa de creixement, baixa competència amb el sector alimentari i amb una capacitat d'acumular lípids i carbohidrats en el seu interior (Lam i Lee, 2012) i s'empren com a matèria prima en les biorefineries.

El concepte de biorefineria consisteix en la transformació de la biomassa en un ample espectre de biocombustibles i productes químics (Nobre *et al.*, 2013). Quan s'utilitza les microalgues com a biomassa el procés consta de quatre etapes: el cultiu de les mateixes, la seva concentració, el fraccionament de la biomassa algal i l'elaboració del producte final.

La primera etapa es centra en l'optimització del cultiu de les microalgues. Es desitja modelar la seva composició per aconseguir una constitució final amb la màxima quantitat de l'element interessat (com lípids o carbohidrats).

L'etapa de concentració de microalgues s'enfoca en disminuir la humitat de la biomassa. Les dues tècniques tradicionals són la sedimentació i la centrifugació. La primera tècnica és de llarga duració i fins els darrers anys no permetia aconseguir la concentració desitjada. La segona tècnica és poc eficient degut a l'elevat requeriment energètic.

Una tercera tècnica emprada per concentrar les microalgues és la filtració tangencial amb membrana. Al principi es va considerar com una tècnica amb baixa eficiència a causa del gran requeriment energètic, l'elevada inversió econòmica i el taponament de les membranes, reduint la permeabilitat d'aquestes. En els darrers anys s'ha comprovat que aquesta tècnica es prometedora en la concentració (Ríos *et al.*, 2013), que es pot reduir el cost en nous materials de membrana (Nurra *et al.*, 2014b) i l'addició de vibració rotatòria disminueix el taponament per acumulació de biomassa sobre la membrana (Rios *et al.*, 2011; Ríos *et al.*, 2012; Nurra *et al.*, 2014c).

La tercera etapa estudia l'optimització del fraccionament de les microalgues. El procés consisteix en dues fases: la ruptura de la paret cel·lular de les microalgues i la posterior separació de components.

L'última etapa és l'elaboració del producte final, emprant les tècniques adients per la transformació dels components.

El present estudi es centra en l'optimització de la tercera etapa: el fraccionament de microalgues. La primera fase d'aquesta etapa es pot dur a terme mitjançant diferents tècniques (Günerken *et al.*, 2015). El mètode escollit és la tècnica d'explosió de vapor ja que presenta una major eficiència en la recuperació de lípids (Lorente *et al.*, 2015). L'explosió de vapor consisteix en sotmetre la biomassa algal a una descompressió sobtada, transformant l'aigua de l'interior de les cèl·lules a vapor, augmentant el volum d'aquestes i provocant la ruptura de la paret cel·lular.

Posteriorment a la tècnica d'explosió de vapor s'obté una mescla de tres fases, que en un posterior fraccionament s'identifiquen: la fase líquida orgànica amb lípids, la fase aquosa que conté carbohidrats i una fase sòlida que es compon principalment de contingut proteic.

La microalga que s'utilitza en aquest estudi és la *Nannochloropsis gaditana* ja que és una bona font de lípids i carbohidrats per la producció de biocombustibles (Gouveia i Oliveira, 2009).

1.1. Les microalgues i la seva composició

1.1.1. Les microalgues

Les microalgues són microorganismes fotosintètics procariotes o eucariotes amb una estructura unicel·lular o multicel·lular simple. A causa de la seva estructura simple tenen la capacitat d'adaptar-se a una gran varietat de condicions ambientals. Viuen suspeses en l'aigua, tant dolça com salada amb unes taxes de creixement i productivitat molt altes (Mata *et al.*, 2010).

Aquests organismes requereixen llum, diòxid de carboni, aigua i sals inorgàniques pel seu creixement. El medi de creixement ha de proporcionar aquells elements inorgànics que construeixen la cèl·lula de la microalga, com el nitrogen, fòsfor, ferro i en alguns microorganismes, silici (Chisti, 2007).

Les microalgues tenen un conreu i creixement fàcil, poden créixer en aigua no apta pel consum humà i tenen facilitats per obtenir nutrients. Per aquests motius, en els darrers anys, les



microalgues s'estudien com a font de matèria primera renovable per la producció de biocombustibles, com el biodièsel, metà, hidrogen, etanol, entre altres (Mata *et al.*, 2010).

1.1.1.1. La microalga *Nannochloropsis gaditana*

L'espècie escollida per realitzar aquest estudi és la *Nannochloropsis gaditana*. El gènere *Nannochloropsis* es troba principalment en el medi ambient marí, tot i que recentment ha estat detectat en aigües dolces (Fawley i Fawley, 2007). És un gènere proposat com a matèria primera en la biorefineria, ja que té la capacitat d'acumular un 60 % de lípids després de la inanició de nitrogen (Rodolfi *et al.*, 2009).

Les cèl·lules del gènere *Nannochloropsis* són esfèriques, amb un diàmetre més petit que 5 micròmetres i amb una paret llisa (Fawley i Fawley, 2007), tal com s'observa en la Figura 1-1.



Figura 1-1. Fotografies microscòpiques de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Sirin, 2013)

Chisti (2007) va realitzar un estudi sobre les microalgues com a matèria primera de biodièsel en el que va comparar la quantitat interior d'oli en varies espècies. Tal com s'il·lustra en la Taula 1-1 un gènere de microalga amb possibles valors per sobre del 50 % i, per tant, un dels adient per la producció de biocombustibles és el *Nannochloropsis*.

Taula 1-1. Comparativa de la quantitat interior d'oli acumulat per unitat de pes sec de biomassa entre sis microalgues (Chisti, 2007)

Microalga	Contingut d'oli (% pes total sec)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75 (1)
<i>Chlorella</i> sp.	28 - 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 - 68
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 - 30

(1) La majoria d'olis acumulats en aquesta microalga són hidrocarburs (Berberoglu *et al.*, 2009). Aquests compostos orgànics estan formats únicament per àtoms de carboni i hidrogen.

1.1.2. La composició de les microalgues

Aquest apartat conté una explicació general sobre els components principals de les microalgues, segons de Feduchi *et al.* (2011).

1.1.2.1. Els lípids

Els lípids són un conjunt de molècules orgàniques insolubles en l'aigua, formades principalment per: carboni, hidrogen i, amb una proporció baixa, oxigen. Les principals funcions que exerceixen en els organismes vius són l'emmagatzematge d'energia i component estructural de la membrana cel·lular.



Els lípids són un grup molt heterogeni que es subdivideix en dos grups segons la seva estructura:

- Lípids saponificables: formats per èsters¹ d'àcids grassos.
- Lípids no saponificables: no contenen àcids grassos.

Els lípids interessants en el present estudi són els que disposen d'una polaritat neutre, ja que són els utilitzats per la producció de biocombustibles. Els lípids neutres són èsters, productes de la reacció d'esterificació² entre els àcids grassos i l'alcohol.

Els àcids grassos són la unitat bàsica dels lípids saponificables i són molècules formades per llargues cadenes hidrocarbonades i un grup carboxílic terminal, amb número parell d'àtoms de carboni. Aquests àcids grassos, per tal de ser utilitzats a nivell cel·lular, es transformen en triglicèrids, que estan formats per una molècula de glicerol unida a tres àcids grassos.

1.1.2.2. Els carbohidrats

Els carbohidrats, glúcids o sucres són biomolècules orgàniques compostes per carboni, hidrogen i oxigen. Tenen enllaços químics covalents, difícils de trencar i que emmagatzemen una gran quantitat d'energia.

Els glúcids compleixen dos funcions fonamentals en els éssers vius: proporcionen energia d'ús immediat i alguns tenen una funció estructural.

Els carbohidrats estan dividits en quatre grups diferents depenent del número de molècules que els complementin: monosacàrids (una molècula), disacàrids (dos molècules), oligosacàrids (de tres a nou molècules) i polisacàrids (deu o més molècules).

¹Compost format per la substitució de l'hidrogen d'un àcid orgànic per un radical alcohòlic.

²La reacció que sintetitza un èster.

1.1.2.3. Les proteïnes

Les proteïnes, també anomenades polipèptids, són compostos orgànics construïts per cadenes lineals d'aminoàcids units per enllaços peptídics. L'aminoàcid és una molècula orgànica amb un grup amino (-NH₂) i un grup carboxílic (-COOH) i l'enllaç peptídic es realitza entre aquests dos grups funcionals perdent una molècula d'aigua.

Aquestes biomolècules tenen un paper fonamental per la vida dels éssers vius. Realitzen moltes funcions diferents com: enzimàtica, estructural, immunològica, entre altres. Es classifiquen segons l'estructura que disposen, la qual té propietats diferents (primària, secundària, terciària i quaternària).

1.1.3. Composició del gènere *Nannochloropsis*

Reboloso *et al.* (2001) va analitzar la composició de la microalga marina *Nannochloropsis* spp. en un quimiòstat cobert sota condicions d'il·luminació continua. La Taula 1-2 mostra la concentració de les principals molècules orgàniques.

Taula 1-2. Quantitat de lípids, carbohidrats i proteïnes del gènere *Nannochloropsis* (Reboloso *et al.*, 2001)

Component	Lípids	Carbohidrats	Proteïnes
Concentració (% pes/pes)	18,4	37,6	28,8



1.2. Antecedents

El present estudi forma part d'un projecte d'investigació sobre la biorefineria a partir de les microalgues, dut a terme per l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC). En aquest apartat es resumeix els avenços adquirits sobre el fraccionament de microalgues, previs al present projecte.

El primer pas del fraccionament de microalgues és la ruptura de la paret cel·lular de la mateixa. Històricament, s'han desenvolupat una sèrie de mètodes que són més o menys eficaços depenent de la microalga (Lee *et al.*, 2010). Aquests inclouen l'ús d'autoclaus, agitació intensa, microones, ultrasons i xoc osmòtic. Cap mètode presenta una eficàcia universal a pesar de la intensitat dels tractaments.

La tècnica en que es centra la investigació és l'explosió de vapor. És un mètode de pretractament eficient que ha estat utilitzat per fraccionar i modificar materials lignocel·lulòsics des de fa més de cent anys, però innovador en l'aplicació de microalgues. El tractament consisteix en exposar la biomassa a vapor amb una temperatura entre 180 i 210 °C i una pressió entre 1 i 3,45 MPa, durant uns minuts. Passat aquest temps es canvia sobtadament a condicions ambientals, fent que la forma i la composició de la biomassa quedi alterada (Montane *et al.*, 1998). Donats els bons resultats obtinguts amb aquest mètode en altres camps, es va aplicar en microalgues (Nurra *et al.*, 2014a) obtenint uns primers resultats positius com a pretractament en el fraccionament de microalgues. En aquest cas l'explosió de vapor actua en l'aigua que es troba dins de les microalgues. El seu canvi de fase té com a conseqüència el corresponent canvi de densitat, fet que provoca un augment dramàtic del volum de les cèl·lules provocant una ruptura de la paret cel·lular.

En posteriors investigacions es va estudiar la millor manera d'aplicar la tècnica d'explosió de vapor en el fraccionament de microalgues. Aquest pretractament es va dur a terme a dues temperatures diferents, 120 °C i 150 °C (corresponen a les pressions de saturació de vapor de 2 bar i 4,7 bar, respectivament) amb un temps de retenció de 5 minuts. El temps de retenció que va ser escollit era el suficient per obtenir una homogeneïtat de la temperatura i proporcionar una explosió apropiada, a causa de les diminutes proporcions de les microalgues (Lorente *et al.*, 2015).

Algunes de les mostres de la biomassa algal, van ser impregnades prèviament amb àcid sulfúric a una concentració de 5 % o 10 % (pes/pes, en base mostra humida, p/p) en agitació durant 10 minuts a una temperatura de 30 °C. L'àcid es va utilitzar com a catalitzador de la reacció.

La tècnica d'explosió de vapor es va estudiar i comparar amb altres pretractaments també utilitzats per trencar la paret cel·lular de les microalgues. La investigació es va realitzar en tres espècies de microalga, una d'elles va ser en la que es centra el present estudi, la *Nannochloropsis gaditana* (Lorente *et al.*, 2015).

Els pretractaments que es van estudiar van ser: la tècnica d'explosió de vapor a 120 °C i 150 °C, els ultrasons, les microones a una temperatura de 150 °C i l'autoclau a 120 °C. Les mostres resultants de cadascun dels pretractaments es van sotmetre a una extracció de lípids amb el mètode *Bligh and Dyer* per tal de determinar els lípids totals que es recuperen després de proporcionar una ruptura de la paret cel·lular. La quantitat de lípids extreta per cada pretractament en l'espècie *Nannochloropsis gaditana* es mostra en la Figura 1-2.

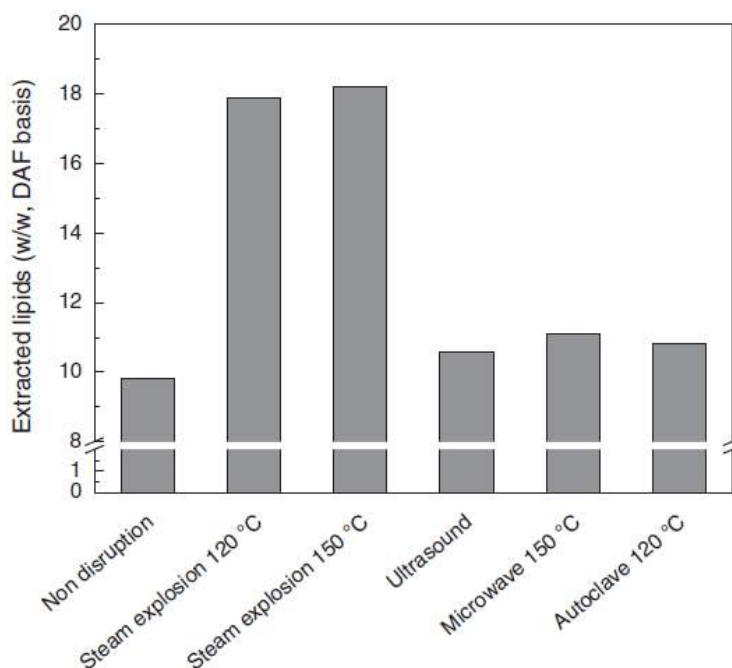


Figura 1-2. Lípids extrets en la microalga *Nannochloropsis gaditana* mitjançant el mètode *Bligh and Dyer* després dels pretractaments (Lorente *et al.*, 2015)

2. Objectius

El present estudi es centra en el fraccionament de microalgues, tant en el trencament de la paret cel·lular de les mateixes com la posterior separació de les fases obtingudes: fase líquida orgànica, fase aquosa i fase sòlida.

L'objecte del present estudi és maximitzar la quantitat de lípids neutres i sucres recuperats durant l'etapa de fraccionament de microalgues.

S'han proposat dos objectius particulars per tal d'assolir l'objecte:

- El primer objectiu es centra en estudiar la quantitat necessària de catalitzador per millorar la metodologia de la tècnica d'explosió de vapor.
- El segon objectiu s'enfoca en estudiar dues tècniques de concentració pel posterior fraccionament de la biomassa algal resultant de l'explosió de vapor.



3. Materials i mètodes

3.1. Disseny experimental

A continuació es descriuen els experiments que es van realitzar en el transcurs del present estudi, per tal d'assolir els objectius prèviament esmentats. Els experiments es van realitzar amb l'espècie de microalga *Nannochloropsis gaditana*.

3.1.1. Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor

El primer experiment es va enfocar en l'optimització de la tècnica d'explosió de vapor. Aquesta tècnica s'utilitza per trencar la paret cel·lular de les microalgues mitjançant una descompressió sobtada, provocant un canvi d'estat de l'aigua de l'interior de les cèl·lules a vapor. Aquest canvi augmenta les seves dimensions i trenca la paret cel·lular de les microalgues. Un fraccionament posterior a l'explosió de vapor permet obtenir tres fraccions de la biomassa resultant: la fase líquida orgànica composta per lípids, la fase aquosa formada pels sucres i la fase sòlida que comprèn el contingut proteic.

Aquest experiment es va dur a terme per analitzar la quantitat de catalitzador (àcid sulfúric) més adient per recuperar una major quantitat de lípids i sucres. Es va realitzar l'explosió de vapor amb dues concentracions diferents d'àcid sulfúric: 1 % i 5 % (p/p, en base mostra humida).

La metodologia que es va seguir per les dues concentracions de catalitzador es descriu a continuació.

Prèviament a la tècnica d'explosió, la biomassa algal es va mesclar amb una determinada concentració d'àcid sulfúric durant 2 hores a temperatura ambient. La mescla es va introduir en un reactor prèviament escalfat a una temperatura de 150 °C (corresponent a una pressió de vapor saturat de 4,7 bar) amb un temps de retenció de 5 minuts. El temps de retenció que es va escollir és suficient per obtenir una homogeneïtat de la temperatura i proporcionar una explosió apropiada (Lorente *et al.*, 2015). Passat el temps de retenció, la mostra va passar a un dipòsit de recollida que es trobava a condicions ambientals, permetent una descompressió sobtada fins a la pressió

atmosfèrica i fent que les cèl·lules augmentessin la seva dimensió, provocant el trencament de la paret cel·lular.

La concentració d'àcid sulfúric durant la reacció no es va mantenir constant, i igual a l'afegida inicialment, a causa de l'efecte de dilució del vapor d'aigua que es va agregar.

Es va afegir hidròxid de sodi a la mostra resultant de l'explosió de vapor per augmentar el pH a 5 per afavorir els posteriors mètodes analítics.

En la Figura 3-1 es mostra l'equip experimental utilitzat, que es disposa en els laboratoris de la Universitat Rovira i Virgili (URV) de Tarragona, al Campus Sescelades.



Figura 3-1. Equip experimental d'explosió de vapor situat a la Universitat Rovira i Virgili

En la Figura 3-2 s'il·lustra l'esquema que resumeix les tasques que es van realitzar en el primer experiment.

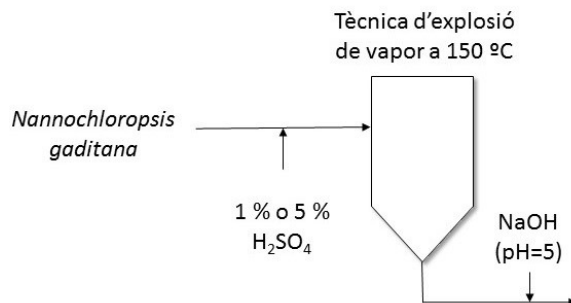


Figura 3-2. Esquema representatiu del primer experiment: Tècnica d'explosió de vapor amb la microalga *Nannochloropsis gaditana*

3.1.2. Experiment 2: Concentració amb centrifugadora

El segon experiment es va centrar en la concentració de la biomassa algal resultant de l'explosió de vapor amb la centrifugadora, per maximitzar la quantitat de lípids i sucres que es recuperen en el posterior fraccionament. La hipòtesi inicial que es va proposar dictava que com més concentrada es trobava una mostra, més components orgànics es podrien quantificar. Per realitzar l'experiment es va utilitzar la centrifugadora *Centrifugue 5810R* (Eppendorf, Alemanya) (Figura 3-3).

L'experiment tenia com a objectiu concentrar a un nivell de 75 %, 50 % i 25 % les mostres resultats de l'explosió de vapor. Per realitzar-ho es va repartir la biomassa algal explotada en 16 *ependorfs* de 40 ml per obtenir 90 ml de cada nivell de concentració per posteriors anàlisis. Seguidament, es van sotmetre a un centrifugat de 4000 rpm durant 15 minuts. Un cop va passar el temps esmentat es va extraure una determinada quantitat del sobrenedant per tal de concentrar les mostres. Per exemple, en el cas de concentrar al nivell de concentració de 25 %, es disposava de 9 *ependorfs* amb 40 ml de mostra explotada i en cadascun es va extraure 30 ml (un 75 % del volum de la mostra) per obtenir el nivell de concentració desitjat.

Per determinar el contingut de lípids i sucres, les mostres amb un cert nivell de concentració es van sotmetre als mètodes analítics que es descriuen en l'apartat 3.2. (pàg. 34).



Figura 3-3. Mostres explotades de la *Nannochloropsis gaditana* introduïdes a la centrifugadora per la posterior concentració

La Figura 3-4 mostra l'esquema del resum de les tasques que es van realitzar durant el segon experiment:

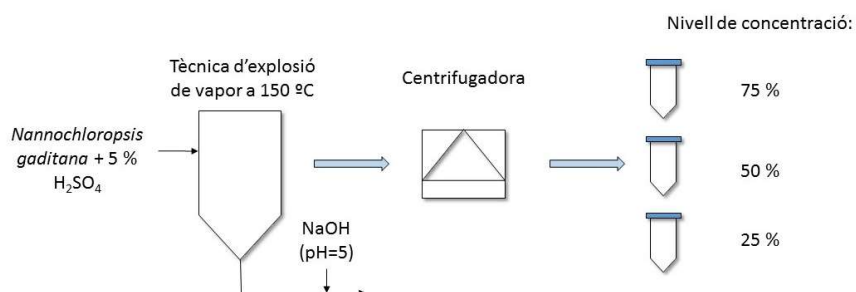


Figura 3-4. Esquema representatiu del segon experiment: Concentració amb centrifugadora de les mostres explotades de la *Nannochloropsis gaditana*

3.1.3. Experiment 3: Concentració amb filtració frontal

El tercer experiment va consistir en concentrar la biomassa resultant de la tècnica d'explosió de vapor amb un equip experimental que duu a terme el procés de filtració frontal. Aquest procés és un tipus de filtració amb membrana. En aquest cas, es va utilitzar per tal de poder filtrar volums de mostra molt reduïts, però seria una tècnica inviable a major escala degut a l'embrutiment que s'hi produeix.

La membrana és una barrera selectiva que permet el procés de separació de components. A un costat de la membrana es troben aquelles espècies susceptibles a travessar-la i en l'altre les que ho han aconseguit. Un dels processos més habituals de separació en membrana és la filtració en què la força impulsora és la diferència de pressió entre els dos costats de la membrana. Es tracta d'un procés físic en què es separen components en membranes semipermeables. Es diferencien tres tipus de filtració segons la mida dels porus:

- Microfiltració
- Ultrafiltració
- Nanofiltració

En la filtració frontal tota la mostra es troba sotmesa a un gradient de pressió per separar els seus components, ja que no existeix recirculació del retingut. En aquest cas, la membrana és més susceptible a tenir un taponament per acumulació de biomassa i, a causa d'això, s'observa que a una pressió constant, el cabal³ del permeat⁴ cada cop és menor i, en conseqüència, la permeabilitat⁵ de la membrana també. A la Figura 3-5 es mostra un esquema que representa el procés de separació de components per la filtració frontal.

³És la quantitat del fluid, mesurat en volum, que es mou per unitat de temps (L/h).

⁴Líquid filtrat, és a dir, producte resultant de la filtració en membrana.

⁵És la mesura del flux (L/h/m²) normalitzat per la pressió (L/h/m²/bar).

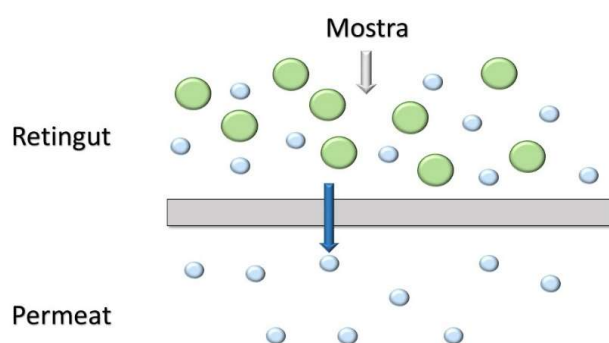


Figura 3-5. Esquema que descriu el procés de filtració frontal

La filtració frontal en el present experiment es va realitzar tres cops, en dos dels quals es va concentrar la mostra a un nivell de concentració del 50 % i durant el tercer, a nivell de 25 %. Els tres assajos es van dur a terme amb una membrana polimèrica amb una mida de porus inferior a 0,2 micròmetres, la qual s'havia utilitzat prèviament en un altre tipus de filtració en membrana i permetia retenir els lípids a la part del retingut.

Un dels equips experimentals de filtració en membrana que es disposa a l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC) i amb el que es realitza l'experiment s'il·lustra en la Figura 3-6.



Figura 3-6. Equip experimental de filtració frontal que disposa l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC)

Les tasques que es van realitzar durant el tercer experiment s'il·lustren en la Figura 3-7:

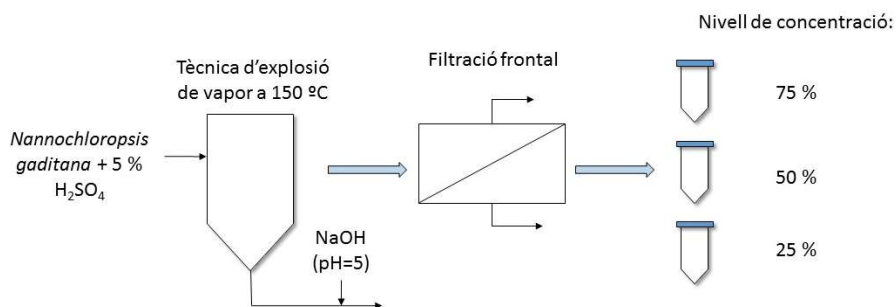


Figura 3-7. Esquema representatiu del tercer experiment: Concentració amb filtració frontal de les mostres explotades de la *Nannochloropsis gaditana*

3.2. Mètodes analítics

En el present apartat s'esmenten els mètodes analítics que es van utilitzar en cada experiment per quantificar els components orgànics de la microalga, exceptuant la fracció sòlida (contingut proteic).

3.2.1. Anàlisi termogravimètric (TGA)

L'anàlisi termogravimètric (TGA) es va utilitzar per mesurar la humitat, el contingut orgànic i les cendres de les mostres, i es va realitzar amb l'instrument *LecoTGA701* (LECO Corporation, EUA), veieu Figura 3-8. Aquest mètode es basa en la mesura de la variació de la massa d'una mostra quan aquesta es sotmet a un programa de variació de la temperatura en una atmosfera controlada.

Primerament, les mostres es van assecar a una temperatura de 105 °C amb una atmosfera de nitrogen i es va mantenir fins que no es va observar cap variació en la massa, assegurant l'evaporació de l'aigua compresa en la mostra. Seguidament, per tal de mesurar el contingut orgànic, la temperatura es va elevar fins 550 °C en una atmosfera d'oxigen i es va conservar fins que es va aconseguir una massa constant.

El pes lliure de cendres (DAF) es va obtenir a partir de l'anàlisi termogravimètric i es va utilitzar per realitzar l'anàlisi i discussió dels resultats de cada experiment (pàg. 39).

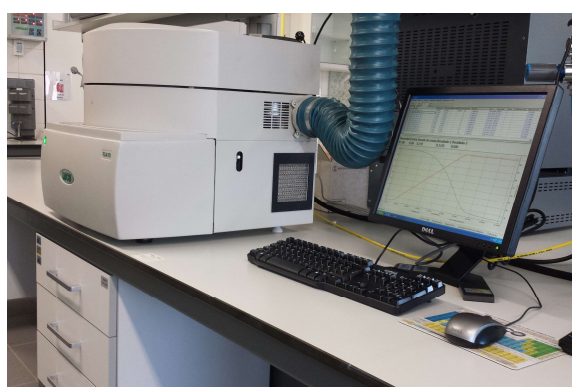


Figura 3-8. Equip experimental d'anàlisi termogravimètric (TGA) que disposa l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya

3.2.2. Cromatografia líquida d'alta eficiència

La cromatografia líquida (*High performance liquid chromatography*, HPLC) és un tipus de tècnica física que es basa amb el principi de retenció selectiva, per tal de separar components d'una mescla, permetent identificar-los i quantificar-los. El procés consisteix en fer passar una mostra determinada per una columna que reté els components a través d'interaccions químiques (fase estacionària) mitjançant un bombeig d'un líquid determinat (fase mòbil).

La cromatografia líquida d'alta eficiència es va realitzar amb l'instrument *Agilent 1100 Series* (Agilent Technologies, EUA).

Aquest mètode es va utilitzar per determinar la quantitat de sucres dissolts presents en cada mostra. Va permetre identificar els sucres mitjançant la comparació dels seus temps de retenció i quantificar-los, amb la integració de la suma total dels pics identificats que van resultar en els cromatogrames.

3.2.3. Hidròlisi àcida

La hidròlisi àcida es va realitzar amb mostra seca, la qual es va aconseguir a partir de la liofilització. La liofilització consisteix en separar l'aigua per sublimació⁶ sotmetent la mostra a les condicions del buit.

La hidròlisi és una reacció química entre una molècula d'aigua i una altra molècula. L'aigua es divideix i els seus àtoms passen a formar part de l'altra espècie química, produint una ruptura d'enllaços. La hidròlisi àcida és un tipus d'hidròlisi en que l'àcid sulfúric s'utilitza per catalitzar la reacció química.

Aquest mètode analític és un procediment estàndard per la determinació de sucres totals en mostres de biomassa (ASTM D1106-84). La hidròlisi àcida es va realitzar en mostres de microalgues que no havien estat sotmeses a la tècnica d'explosió de vapor.

⁶Canvi d'estat de l'aigua, de sòlid a gasós.

La hidròlisi àcida va consistir en col·locar 300 mg de biomassa algal liofilitzada al 72 % (p/p, en base mostra humida) d'àcid sulfúric en un bany d'aigua a 30 °C durant 1 hora. Passat el temps mencionat, es va col·locar a l'autoclau *Autester ST* (JP Selecta, Espanya) que va sotmetre la mostra a 120 °C durant 45 minuts al 4 % d'àcid sulfúric (p/p, en base mostra humida). Després de la hidròlisi, els residus insolubles de l'àcid es van separar mitjançant uns filtres (amb una mida de porus menor a 2 micròmetres). Posteriorment la mostra es va sotmetre a la cromatografia líquida d'alta eficiència (HPLC) per analitzar la quantitat de sucres.

3.2.4. Extracció de lípids

3.2.4.1. Extracció de lípids amb el mètode *Bligh and Dyer*

L'extracció de lípids amb el mètode *Bligh and Dyer* és un mitjà analític molt comú en les microalgues (Bligh i Dyer, 1959). Es va utilitzar per determinar la quantitat total de lípids (lípids apolars o neutres i polars o amfipàtics) i s'utilitza cloroform, metanol i aigua.

Aquest mètode es va utilitzar per determinar la quantitat de lípids de la biomassa algal anterior i posterior a la tècnica d'explosió de vapor.

El procediment va consistir en col·locar 20 ml de mostra amb 75 ml de cloroform-metanol (1:2 v/v) i es van mesclar mitjançant un agitador magnètic a 300 rpm durant 10 minuts. Seguidament, es va afegir 25 ml de cloroform i 25 ml d'aigua destil·lada per tal de formar un sistema de dues fases, que posteriorment es van separar amb la centrifugadora a 4000 rpm durant 10 minuts. La fase del cloroform es va separar, després de transferir acuradament la barreja a un embut de separació, i el dissolvent es va evaporar utilitzant un evaporador rotatori. Finalment, es va mesurar la quantitat de lípids de cada mostra després de deixar-les assecar durant tota la nit a l'estufa de laboratori (Memmert, Alemanya) a 70 °C.

La quantitat de lípids es va determinar a partir de la diferència de pes entre el vial, un cop es va extraure de l'estufa, i el pes del vial.



3.2.4.2. Extracció de lípids amb n-hexà

El dissolvent no polar n-hexà es va utilitzar per determinar la quantitat total de lípids neutres que es trobaven presents en la mostra.

En el segon experiment (pàg. 29) aquest mètode es va dur a terme de dues formes, les quals es van anomenar: una etapa i dues etapes. Tant en l'experiment 1 (pàg. 27) com en l'experiment 3 (pàg. 31) l'extracció de lípids amb n-hexà es va emprar mitjançant una etapa.

L'extracció de lípids mitjançant el mètode d'una etapa, va consistir en afegir 20 ml de mostra i 20 ml de n-hexà en un matràs de fons esfèric. La mescla es va mantenir durant 2 hores a 60 °C i 800 rpm. Seguidament, la mescla esmentada es va introduir en la centrifugadora durant 10 minuts a 4000 rpm. Posterior a la centrifugació, la mescla es va dividir en tres fraccions: fase orgànica, fase aquosa i fase sòlida. Es va separar la fase superior (fase líquida orgànica), la qual contenia el dissolvent n-hexà amb els lípids, i es va col·locar dins l'estufa de laboratori (Mettler, Alemanya) a 70 °C durant tota la nit.

L'extracció de lípids amb el dissolvent n-hexà mitjançant el mètode de dues etapes va consistir en mesclar 20 ml de mostra amb 10 ml de n-hexà, en un matràs de fons esfèric. Aquesta mescla es va mantenir durant 1 hora a 60 °C i 1000 rpm. A continuació es va seguir la mateixa metodologia que amb el mètode d'una etapa, centrifugant i extraient el sobrenedant, col·locant-ho en l'estufa de laboratori. El material restant es va tornar a sotmetre a una extracció amb 10 ml de n-hexà durant 1 hora a 60 °C i 1000 rpm i es va extraure.

En els dos mètodes esmentats (una i dues etapes), la quantitat de lípids es va calcular a partir de la diferència de pes entre el vial un cop extret de l'estufa i el pes de vial.

A la Figura 3-9 s'il·lustra la instrumentació en el moment en que la mostra i el dissolvent es trobaven en agitació constant a una certa temperatura. Quan es va realitzar aquesta tasca, es va col·locar un Soxhlet amb gel per tal d'evitar que els gasos procedents de l'evaporació del dissolvent s'escapessin.



Figura 3-9. Mostres de la microalga *Nannochloropsis gaditana* en el procés d'extracció de lípids amb n-hexà

3.3. Mètodes estadístics

A continuació es detalla la metodologia emprada per l'anàlisi estadística utilitzada per avaluar la variació entre les dues rèpliques obtingudes de l'extracció de lípids (tant per al mètode *Bligh and Dyer* com per al mètode amb dissolvent n-hexà).

Com que el nombre de mostres utilitzades per l'anàlisi era petit (dues rèpliques) i donada la limitació del volum utilitzat durant els experiments, es va utilitzar la mitjana i la seva desviació estàndard per tal de tenir informació sobre el grau de variació dels resultats. Donada la limitació en el nombre de mostres, no ha estat possible una anàlisi estadística més acurada.

4. Resultats i discussió

En aquest apartat es mostren i s'analitzen les dades que es van obtenir després de realitzar cada experiment amb els mètode analítics pertinents.

4.1. Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor

L'objectiu del primer experiment va ser determinar la quantitat d'àcid sulfúric (catalitzador) que era més adequada a l'hora de realitzar la tècnica d'explosió de vapor i extraure una major quantitat de lípids i de sucres. Els assajos es van realitzar a una temperatura de 150 °C, una pressió de 4,7 bar i amb un temps de retenció de 5 minuts.

Les quantitats de catalitzador que es van utilitzar van ser d'un 1 % i un 5 % (p/p, en base mostra humida). Els mètodes analítics posteriors van permetre conèixer la quantitat total de lípids (mètode *Bligh and Dyer*), de lípids neutres (mètode dissolvent n-hexà) i de sucres (hidròlisi i HPLC) en la biomassa algal anterior i posterior a la tècnica d'explosió de vapor. Els resultats que es van obtenir es mostren en la Taula 4-1 i Taula 4-2.

Taula 4-1. Resultats obtinguts en l'Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor amb 1 % d'àcid sulfúric. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Mostra		Sense tractament	Explosió de vapor a 150 °C i 1 % d'àcid sulfúric
Pes (g DAF)		415,5	409,5
Lípids (% p/p base DAF)	<i>Bligh and Dyer</i>	10,9 (0,7)	14,0 (0,8)
	n-Hexà	1,6 (0,1)	3,8 (0,07)
Sucres (% p/p base DAF)		46,1 (hidròlisi)	17,5

Taula 4-2. Resultats obtinguts en l'Experiment 1: Tècnica d'explosió de vapor amb 5 % d'àcid sulfúric. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Mostra		Sense tractament	Explosió de vapor a 150 °C i 5 % d'àcid sulfúric
Pes (g DAF)		346,8	317,9
Lípids (% p/p base DAF)	<i>Bligh and Dyer</i>	10,7 (0,6)	14,0 (0,3)
	n-Hexà	0,2 (0,002)	7,9 (0,2)
Sucres (% p/p base DAF)		39,1 (hidròlisi)	37,4

La tècnica d'explosió de vapor que es va realitzar amb una concentració d'1 % d'àcid sulfúric va permetre recuperar 3,8 % de lípids neutres, representant un 27,0 % dels lípids totals (tant neutres com amfipàtics) (14 %) segons el mètode *Bligh and Dyer*. En canvi, amb una concentració del 5 % es van recuperar 7,9 %, un 56,5 % respecte els lípids totals (14 %).

El contingut de sucres dissolts que es van recuperar després del pretractament va ser major a l'incrementar la concentració d'àcid sulfúric. Amb un 1 % de catalitzador es va recuperar el 17,5 % de sucres respecte el total (46,1 %), assolint un rendiment del 38 %. En canvi, amb un 5 % d'àcid sulfúric el rendiment va augmentar a 95,7 % ja que es van recuperar un 37,4 % de sucres respecte del total (39,1 %). Una major quantitat de catalitzador va provocar una major hidròlisi durant l'explosió de vapor amb els carbohidrats, alliberant possibles enllaços amb els lípids.

Durant el procés de la tècnica d'explosió de vapor l'addició de major concentració d'àcid sulfúric va donar a lloc una major eficiència de recuperació de lípids i de sucres. L'augment de la taxa de recuperació va ser degut a la major hidròlisi durant la tècnica.

Com resultat dels presents resultats, els experiments posteriors es van realitzar amb un 5 % d'àcid sulfúric.



Nobre *et al.* (2013) van utilitzar el gènere *Nannochloropsis* per avaluar l'extracció d'olis i pigments. Una de les extraccions que van realitzar va ser amb n-hexà. Prèviament a l'extracció, la microalga es va moldre, homogeneïtzant les mostres i augmentant l'àrea de contacte de les microalgues amb el dissolvent. El contingut de lípids que es va extraure va ser un 40,7 %. El valor de recuperació de lípids està 15,8 % per sota de l'obtinguda amb una prèvia ruptura de la paret cel·lular amb la tècnica d'explosió de vapor.

Nurra *et al.* (2014b) van utilitzar l'explosió de vapor per trencar la paret cel·lular de la *Nannochloropsis gaditana* a dues temperatures: 120 i 180 °C (corresponents a una pressió de vapor saturat de 2 i 10 bar, respectivament). En ambdós casos es va utilitzar un temps de retenció de 5 minuts i no es va mesclar amb catalitzador. En els dos casos es va recuperar menys del 50 % de lípids neutres respecte el total.

Per altra banda, Jiménez *et al.* (2014) amb la mateixa finalitat que els anteriors autors i utilitzant la mateixa microalga, van emprar una homogeneïtzació a una pressió de 1700 bar. Aquesta tècnica va permetre recuperar un 55,1 % de lípids neutres respecte el total (6 % lípids neutres respecte 10,9 % lípids total).

Els valors de recuperació de Jiménez *et al.* (2014) s'aproxima a l'obtingut en la tècnica d'explosió de vapor realitzada en el primer experiment. Amb la tècnica utilitzada i els mètodes emprats per la recuperació de lípids que van utilitzar aquests autors es va recuperar un 1,4 % menys de lípids neutres que en el present estudi.

4.2. Experiment 2: Concentració amb centrifugadora

El segon experiment tenia com a objectiu concentrar la mostra de biomassa explotada per maximitzar la quantitat de lípids recuperables, posteriors a la tècnica d'explosió de vapor. La hipòtesi que es va proposar prèviament dictava que com més concentrada estaria la mostra, més lípids es recuperarien.

Els resultats que es van obtenir es van analitzar mitjançant un balanç de matèria, on es va partir de 100 % de pes sec lliure de cendres (DAF) de biomassa algal sense tractament. Les quantitats dels components orgànics, resultants dels mètodes analítics, es representen respecte el pes sec lliure de cendres (DAF) de la mostra de la microalga no tractada. Les dades resultants de l'explosió de vapor i de la concentració es mostren en la Taula 4-3 i la



Taula 4-4.

Taula 4-3. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions prèvies i posteriors a la tècnica d'explosió de vapor respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Mostra		Sense tractament	Explosió de vapor a 150 °C i 5 % d'àcid sulfúric
Pes DAF (%)		100	97
Lípids pes DAF (%)	<i>Bligh and Dyer</i>	22,2 (0,8)	22,3 (0,8)
	n-Hexà	2,1 (0,03)	17,6 (0,4)
Sucres pes DAF (%)		18,8 (hidròlisi)	12,9

Taula 4-4. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions posteriors a la concentració amb centrifugadora de mostres explotades respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Nivell de concentració		75 %		50 %		25 %	
		Fase orgànica	Fase aquosa	Fase orgànica	Fase aquosa	Fase orgànica	Fase aquosa
Mostra		Fase orgànica	Fase aquosa	Fase orgànica	Fase aquosa	Fase orgànica	Fase aquosa
Pes DAF (%)		80,1	15,6	64,0	31,3	49,2	46,9
Lípids n-hexà (%)	1 etapa	16,4 (0,4)	-	14,9 (0,8)	-	12,6 (0,3)	-
	2 etapes	14,7 (0,6)	-	13,5 (0,3)	-	6,7 (0,4)	-
		2,8 (0,4)		3,1 (0,3)		5,1 (0,1)	
Sucre (%)		-	3,3	-	6,7	-	9,8

El procés que es va utilitzar per la ruptura de la paret cel·lular va ser l'explosió de vapor a una temperatura de 150 °C i amb una concentració de catalitzador del 5 %, ja que en l'experiment anterior (pàg. 39) es va determinar que eren les condicions idònies per obtenir una major recuperació de lípids i sucres.

Un cop la mostra de biomassa algal es va sotmetre a la tècnica d'explosió de vapor, es van recuperar el 79,1 % dels lípids neutres respecte el total (22,3 %). Tanmateix, els sucres dissolts que es van recuperar respecte el total (18,8 %) va ser un 68,6 %. Tant en els lípids, com en els sucres, el posterior fraccionament de la biomassa algal explotada va donar uns resultats favorables de recuperació.

Per una part, els rendiments de recuperació de lípids que es van adquirir en la posterior concentració de la mostra explotada (nivells de concentració de 25 %, 50 % i 75 %) amb dues formes



d'extracció amb el dissolvent n-hexà (una i dues etapes), respecte el total (22,3 %) segons el mètode *Bligh and Dyer*, es mostren en la Taula 4-5.

Taula 4-5. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Rendiments de recuperació de lípids en les tres concentracions resultants de la concentració amb centrifugadora. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Nivell de concentració (%)	Extracció n-hexà	Rendiment recuperació lípids neutres (%)
75	1 etapa	73,8 (2,7)
	2 etapes	79,0 (3,2)
50	1 etapa	67,1 (3,4)
	2 etapes	74,4 (2,5)
25	1 etapa	56,5 (2,0)
	2 etapes	53,1 (2,0)

Amb els resultats esmentats es va determinar que la hipòtesi proposada era errònia perquè el rendiment de recuperació de lípids disminuïa a mesura que disminuïa el nivell de concentració (a menor nivell, major concentració). En altres paraules, el rebuig de la hipòtesi va indicar que concentrar amb centrifugadora no era eficient ja que no produïa una maximització de la quantitat de lípids neutres en la mostra explotada.

Les recuperacions de lípids amb dues etapes, exceptuant la mostra amb un nivell de concentració del 25 %, van mostrar un major valor. Per l'excepció del 25 % no es va trobar una explicació coherent i es va atribuir a un error de mostreig. Conseqüentment, es va proposar una segona hipòtesi: a la fase aquosa resultant de l'extracció amb n-hexà queden romanents lípids per separar i quantificar.

La hipòtesi va portar a realitzar una segona extracció amb n-hexà a la fase aquosa que va resultar de la recuperació de lípids de la biomassa algal sotmesa a l'explosió de vapor. Els resultats que es van assolir es mostren en la Taula 4-6.

Taula 4-6. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Fraccions resultants de l'extracció de la fase aquosa adquirida en la primera extracció de la biomassa explotada respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Fraccions de la segona extracció	Fase orgànica	Fase aquosa
Pes DAF (%)	54,5	24,6
Lípids n-hexà (%)	0,7 (0,07)	-
Sucres (%)	-	5,7

La segona hipòtesi que es va proposar va resultar no ser errònia, ja que en la fase aquosa procedent de l'extracció amb n-hexà es van identificar i quantificar lípids romanents mitjançant una segona extracció.

Per altra part, els rendiments que es van assolir en la recuperació de sucres de les tres concentracions realitzades, respecte el total (18,8 %) (veieu Taula 4-3), es mostren a la Taula 4-7.

Taula 4-7. Resultats obtinguts en l'Experiment 2: Rendiments de recuperació de sucres en les tres concentracions resultants de la concentració amb centrifugadora

Nivell de concentració (%)	Rendiment recuperació sucres (%)
75	17,6
50	35,6
25	52,1



Els rendiments que es van aconseguir de recuperació de sucres van determinar que com més concentrada es trobava la mostra, més sucres es recuperaven de la fase aquosa del fraccionament.

En la Figura 4-1 es mostra les fraccions que es van obtenir durant l'extracció amb n-hexà. Els tres primers *eppendorfs* estan ordenats d'esquerra a dreta, de més nivell de concentració (75 %) a menys (25 %). L'*eppendorf* situat a la dreta de la figura mostra les fraccions resultants de la segona etapa en un nivell de concentració del 50 %.



Figura 4-1. Fraccions que es van adquirir de l'extracció amb n-hexà de les mostres explotades i concentrades amb centrifugadora de la microalga *Nannochloropsis gaditana*

4.3. Experiment 3: Concentració amb filtració frontal

L'experiment 3 es va realitzar amb l'objectiu de concentrar la mostra explotada amb filtració frontal per maximitzar la recuperació de lípids. La filtració amb membrana assegurava que en la fase aquosa procedent de la posterior extracció amb n-hexà no restava una quantitat important de lípids, recuperant-los tots a la fase líquida orgànica. Durant el present experiment es van realitzar tres assajos, en els dos primers es va concentrar la mostra al nivell de concentració del 50 % i el tercer al nivell de 25 %. Aquest experiment es va centrar en la recuperació dels lípids, deixant per un estudi posterior la recuperació dels sucres.

L'assaig número 1 es va iniciar amb 100 g de mostra explotada per tal de concentrar-la al 50 %. La filtració frontal és més susceptible al taponament de la membrana i per aquesta raó, l'experiment

es va realitzar amb una pressió de 9 bar. L'assaig es va finalitzar quan es van aconseguir 50 g de permeat, assegurant que el retengut estava amb un nivell de concentració del 50 %.

Les mostres que van resultar dels experiments es van analitzar amb el mètode d'extracció de lípids amb n-hexà amb una etapa. A causa de no disposar d'una quantitat de mostra suficient, en el segon i tercer assaig, el mètode es va realitzar amb la meitat de pes habitual, sent aquest de 10 g.

El segon assaig es va realitzar amb l'objectiu de concentrar la mostra al 50 %, amb una quantitat inicial de 60 g i una massa final de 30 g de permeat, d'aquesta manera es va assegurar l'obtenció de la concentració desitjada. Aquest assaig es va dur a terme per tal de comparar-lo amb els resultats del primer i estudiar l'efectivitat de l'extracció de lípids amb 10 g de retengut. La pressió que es va utilitzar en la filtració va ser d'1 bar ja que presentava un menor taponament per acumulació de biomassa.

El tercer assaig es va iniciar amb 160 g de mostra explotada per tal de concentrar-la al nivell de concentració de 25 %. Es va obtenir una quantitat final de permeat de 120 g i de retengut 40 g. La filtració frontal va començar amb una pressió d'1 bar i per tal d'augmentar la velocitat de filtració, es va augmentar gradualment fins a 3 bar.

A cadascun dels tres assajos descrits amb anterioritat, es va analitzar la permeabilitat de la membrana per tal d'estudiar el comportament de la mateixa, en front el taponament causat per la biomassa algal a diferents pressions. Els resultats es mostren a la Figura 4-2, a la Figura 4-3 i a la Figura 4-4.



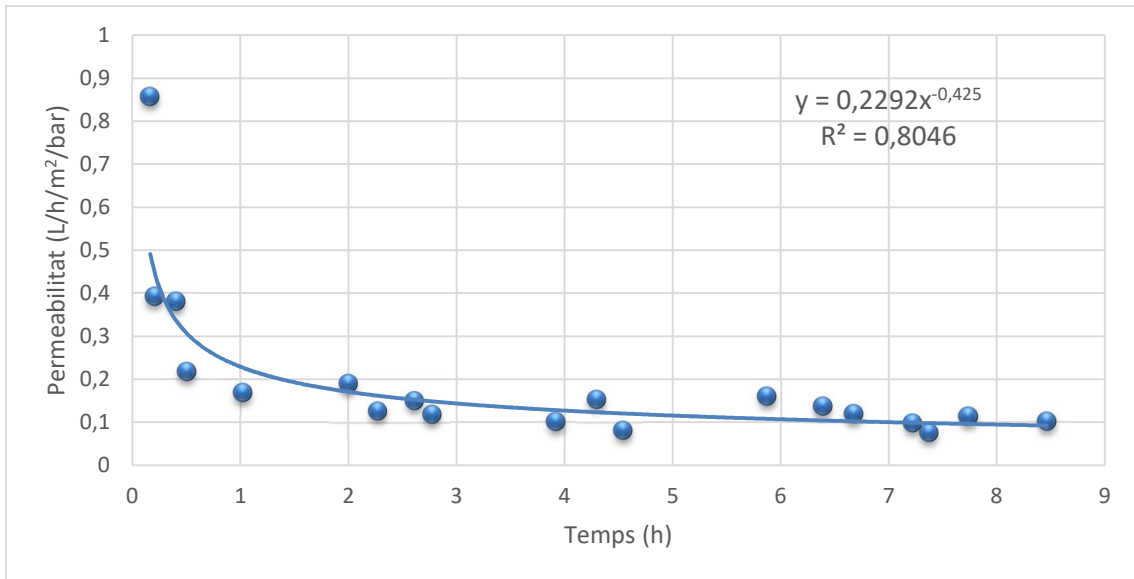


Figura 4-2. Resultats del primer assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió de 9 bar i nivell de concentració del 50 %

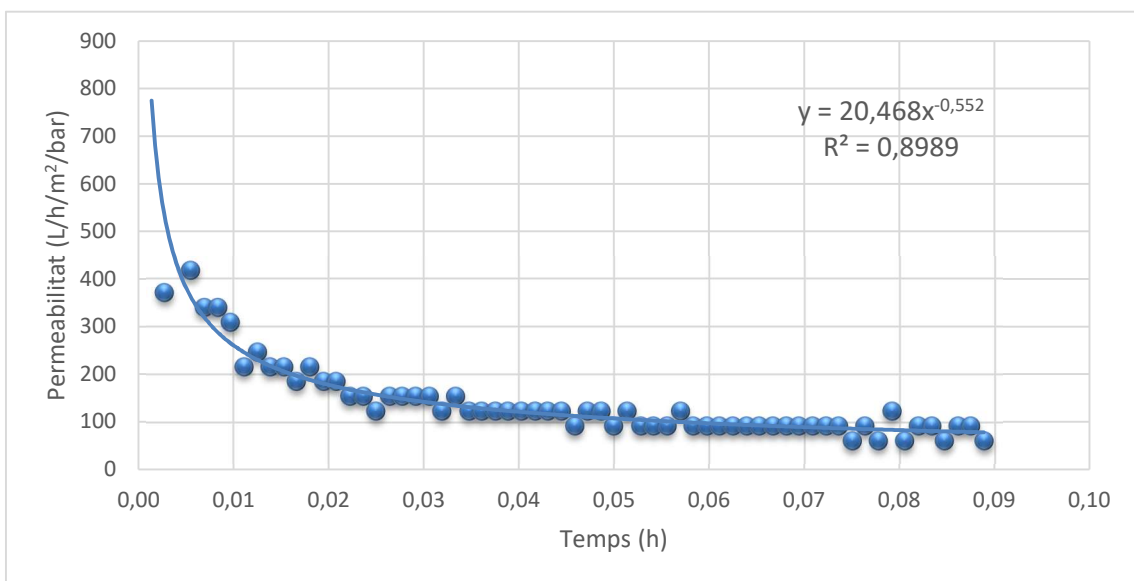


Figura 4-3. Resultats del segon assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió d'1 bar i nivell de concentració del 50 %

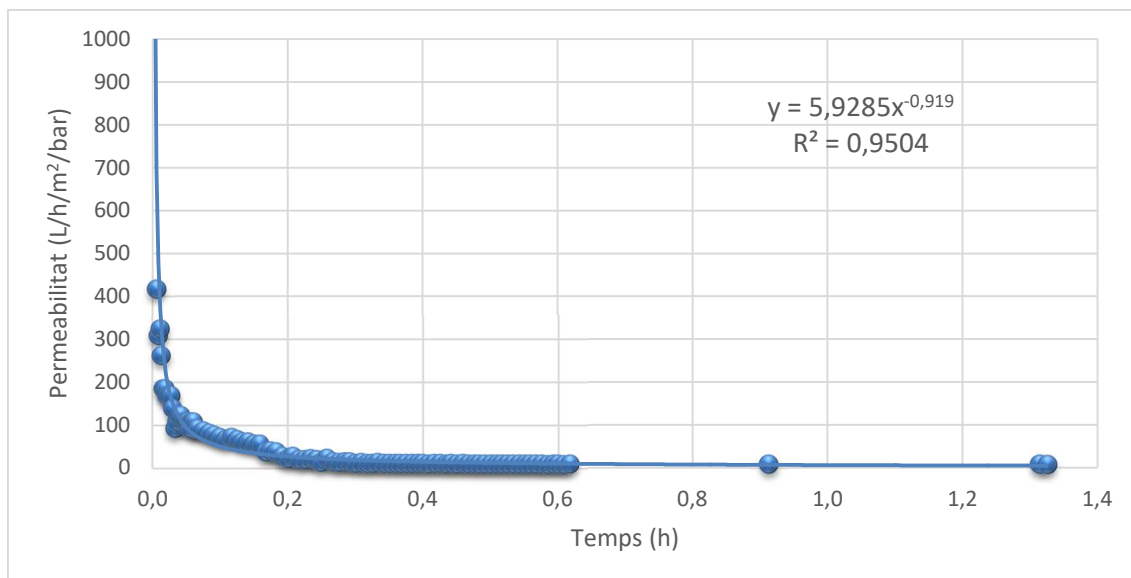


Figura 4-4. Resultats del tercer assaig de l'Experiment 3: Evolució temporal de la permeabilitat de la membrana amb una pressió d'1 bar fins a 3 bar i nivell de concentració del 25 %

El comportament de la membrana es va veure afectat per l'exposició de la totalitat de la mostra explotada a una determinada pressió, sense la disposició de recirculació del retint, i va provocar un major taponament per acumulació de biomassa. Per aquest motiu, es va observar una disminució gradual del cabal de permeat i, consegüentment, el descens de la permeabilitat.

Els resultats que es van obtenir durant el fraccionament de la biomassa concentrada, es mostren en la Taula 4-8. Les dades es van obtenir aplicant el balanç de matèria que ja s'havia aplicat en el segon experiment (pàg. 42), per poder comparar els resultats dels dos experiments.

Taula 4-8. Resultats obtinguts en l'Experiment 3: Fraccions posteriors a la concentració amb filtració frontal de mostres explotades respecte el balanç de matèria. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Nivell de concentració	50 % (1)	50 % (2)	25 %
Mostra	Fase orgànica	Fase orgànica	Fase orgànica
Pes DAF (%)	78,8	75,7	56,3
Lípids n-hexà (%)	16,4 (0,2)	16,3 (0,6)	12,0 (2,3)

(1) Extracció n-hexà una etapa amb 20 g. (2) Extracció n-hexà una etapa amb 10 g.

Els rendiments d'extracció de lípids amb el dissolvent n-hexà que es van obtenir de cada una de les concentracions respecte el total (22,3 %, resultat de l'experiment 2) segons el mètode *Bligh and Dyer* es mostra a la Taula 4-9.

Taula 4-9. Resultats obtinguts en l'Experiment 3: Rendiments de recuperació de lípids en les tres concentracions resultants de la concentració amb filtració frontal. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Nivell de concentració (%)	Rendiment recuperació lípids (%)
50 (1)	73,5 (2,3)
50 (2)	73,3 (3,0)
25	53,7 (8,6)

(1) Extracció n-hexà una etapa amb 20 g. (2) Extracció n-hexà una etapa amb 10 g.

En els dos assajos en els que es va concentrar la mostra al 50 %, els rendiments de recuperació de lípids obtinguts tenien un valor molt similar, tot i que es van utilitzar diferents formes d'extracció de lípids amb n-hexà (el primer amb una etapa i el segon amb la meitat de la quantitat habitual).

En el tercer assaig, el rendiment que es va obtenir no es podia considerar representatiu, ja que la desviació estàndard calculada de les dues rèpliques de l'extracció de lípids amb el dissolvent n-hexà va ser de 2,3 % en referència al 12,0 % (que representa una variació del 19,3 % sobre la mostra).

Les extraccions que es van realitzar amb una quantitat de mostra de 10 g no es van permetre resultats concloents correctes i, per tant, no es van poder comparar directament amb els resultats que es van aconseguir en el segon experiment.

La primera mostra que es va concentrar al 50 % i es va analitzar amb el mètode analític habitual es va poder comparar amb la quantitat obtinguda de lípids amb extracció d'una etapa del segon experiment (pàg. 42).

A la Taula 4-10 es mostra la comparativa dels rendiments que es van obtenir amb la concentració del 50 %, amb les dues formes de concentració: centrifugadora i filtració frontal.

Taula 4-10. Comparativa dels rendiments resultants de la recuperació de lípids concentrant a un 50 % en centrifugadora i filtració frontal. Entre parèntesi s'indica la desviació estàndard.

Nivell de concentració	Rendiment recuperació lípids (%)	
50 % Centrifugadora	Extracció 1 etapa	67,1 (3,4)
	Extracció 2 etapes	74,4 (2,5)
50 % Filtració frontal	73,5 (2,3)	

Al concentrar la mostra amb centrifugadora el rendiment que es va aconseguir amb l'extracció en dues etapes es va aproximar a l'obtingut amb filtració amb membrana. En canvi, en l'extracció de lípids amb una etapa, va presentar una diferència del 6,4 % amb la filtració frontal ja que presentava una quantitat de lípids rellevant en la fase aquosa.



Lorente *et al.* (2017) van estudiar la recuperació de lípids concentrant la biomassa algal sotmesa a la tècnica d'explosió de vapor (temperatura de 150 °C, pressió de 4,7 bar, 5 % d'àcid sulfúric i 5 minuts de retenció) amb filtració amb membrana. Els mètodes de filtració amb membrana que es van utilitzar eren la filtració tangencial i la tangencial vibratòria. La biomassa algal explotada es va concentrar prèviament a l'extracció de lípids, i en ambdós mètodes la quantitat de lípids en el permeat era menor a 1 %. El retingut no presentava una recuperació major que la de la mostra explotada i la quantitat de sucres en el permeat era aproximadament igual que abans de ser concentrada.

5. Conclusions i recomanacions

5.2. Conclusions

A partir dels resultats obtinguts en cada experiment es pot concloure:

- La tècnica d'explosió de vapor és el mètode més adient per trencar la paret cel·lular de la microalga *Nannochloropsis gaditana*, ja que és el que permet una recuperació major de lípids (56,5 %).
- El rendiment de recuperació de lípids neutres de la mostra sense pretractar és menor (1,9 %) que l'obtingut després de sotmetre la biomassa algal a la tècnica d'explosió de vapor (56,5 %).
- En la tècnica d'explosió de vapor és eficaç afegir prèviament un 5 % d'àcid sulfúric quan es treballa a una temperatura de 150 °C, una pressió de 4,7 bar i un temps de retenció de la mostra de 5 minuts. La recuperació de lípids (56,5 %) i sucres (95,7 %) és major que quan s'utilitza una menor concentració de catalitzador (recuperació de lípids del 27,0 % i de sucres del 38 %, per una concentració del 1 %).
- La concentració prèvia a l'extracció de lípids i recuperació de sucres, de les mostres sotmeses a la tècnica d'explosió de vapor, no millora el rendiment de recuperació d'ambdós components orgànics.
- L'extracció de lípids amb el dissolvent n-hexà d'una mostra amb baix nivell de concentració (25 %), i emprant la meitat de la quantitat utilitzada inicialment (20 g), no permet obtenir una recuperació representativa, ja que la desviació estàndard de les dues rèpliques és molt elevada (indica una variació del 19,3 % sobre la mostra, una desviació del 2,3 % en referència al 12,0 %).



5.3. Recomanacions

- Continuar estudiant diferents condicions per la tècnica d'explosió de vapor, per tal d'aconseguir el major rendiment de recuperació possible.
- Analitzar altres mètodes per realitzar l'extracció de lípids, per tal d'augmentar la seva recuperació després de trencar la paret cel·lular de les microalgues.
- Estudiar altres mètodes de concentració per intentar augmentar la quantitat recuperada de lípids i sucres reduint la concentració de dissolvent necessari per realitzar l'extracció.
- Investigar el comportament d'altres gèneres de microalgues per augmentar la quantitat dels components orgànics desitjats.

6. Referències bibliogràfiques

- Berberoglu, H., Gomez, P.S., Pilon, L., 2009. *Radiation characteristics of Botryococcus braunii, Chlorococcum littorale, and Chlorella sp. used for CO₂ fixation and biofuel production*. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer 110, 1879-1893.
- Bligh, E.G., Dyer, W.M., 1959. *A rapid method of lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911-917
- Chisti, Y., 2007. *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances 25, 294-306.
- Fawley, K.P., Fawley, M.W., 2007. *Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa*. Protist 158, 325-336.
- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., Yáñez, E., 2011. *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Panamericana.
- Gentile, M.P., Blanch, H.W., 2001. *Physiology and xanthophyll cycle activity of Nannochloropsis gaditana*. Biotechnology and bioengineering 75, 1-12.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C., 2009. *Microalgae as a raw material for biofuels production*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 269-274.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. *Cell disruption for microalgae biorefineries*. Biotechnology Advances 33, 243-260.
- Jiménez-Callejón, J.M., Robles-Medina, A., Macías-Sánchez, M.D., Hita-Peña, E., Esteban-Cerdán, L., González-Moreno, P.A., Molina-Grima, E., 2014. *Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production*. Bioresource Technology 169, 198-205.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2012. *Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward*. Biotechnology Advances 30, 673-690.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. Bioresource Technology 101, S75-S77.



- Lorente, E., Haponska, M., Clavero, E., Torras, C., Salvadó, J., 2017. *Microalgae fractionation using steam explosion, dynamic and tangential cross-flow membrane filtration*. *Bioresource Technology* 237, 3-10.
- Lorente, E., Farriol, X., Salvadó, J., 2015. *Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae*. *Fuel Processing Technology* 131, 93-98.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217-232.
- Matos, Â.P., Feller, R., Moecke, E.H.S., Sant'Anna, E.S., 2015. *Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate*. *Bioresource Technology* 197, 48-55.
- Montane, D., Farriol, X., Salvadó, J., Jollez, P., Chornet, E., 1998. *Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw*. *Biomass and Bioenergy* 14, 261-276.
- Nobre, B.P., Villalobos, F., Barragán B.E., Oliveira, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A.S.S., Mendes, R.L., Sovová, H., Palavra, A.F., Gouveia, L., 2013. *A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass*. *Bioresource Technology* 135, 128-136.
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Ríos, S., Rey, M., Lorente, E., Salvadó, J., 2014b. *Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation*. *Bioresource Technology* 163, 136-142.
- Nurra, C., Franco, E.A., MasPOCH, M.L., Salvado, J., 2014a. *Cheaper membrane materials for microalgae dewatering*. *Journal of Materials Science* 49, 7031-7039.
- Nurra, C., Clavero, E., Salvadó, J., Torras, C., 2014c. *Vibrating membrane filtration as improved technology for microalgae dewatering*. *Bioresource Technology* 157, 247-253.
- 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**. *Journal of Agriculture*

and Food Chemistry 49, 2966-2972.

Ríos, S.D., Salvadó, J., Farriol, X., Torras, C., 2012. *Antifouling microfiltration strategies to harvest microalgae for biofuel*. Bioresource Technology 119, 406–418.

Rios, S.D., Clavero, E., Salvado, J., Farriol, X., Torras, C., 2011. *Dynamic microfiltration in microalgae harvesting for biodiesel production*. Industrial and Engineering Chemistry Research 50, 2455–2460.

Ríos, S.D., Castañeda, J., Torras, C., Farriol, X., Salvadó, J., 2013. *Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production*. Bioresource Technology 133, 378-388.

Ríos, S.D., Torres, C.M., Torras, C., Salvadó, J., Mateo-Sanz, J.M., Jiménez, L., 2013. *Microalgae-based biodiesel: economic analysis of downstream process realistic scenarios*. Bioresource Technology 136, 617–625.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*. Biotechnology and Bioengineering 102, 100-12.

Sirin, S., 2013. *Pre-concentration strategies for microalgae harvesting as biorefinery process chain*. Tesis doctoral, Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili.



Annexos

Annex A. Resum de l'estudi que es presentarà en la EUBEC

El present estudi forma part del projecte amb codi oficial CTQ2014-56285-R "Cultivo, concentración, fraccionamiento y obtención del producto en refinería de microalgas", els quals es realitzen en l'Institut de Recerca en Energia de Catalunya (IREC).

L'IREC presentarà una part de l'estudi realitzat en la 25na edició de *European Biomass Conference & Exhibition* (EUBCE) al juny del 2017, el qual es durà a terme a Estocolm, Suècia. El resum de l'estudi que s'exposarà es mostra seguidament:





SUBJECT 1: BIOMASS RESOURCES
TOPIC 1.4: Algae production systems



EUBCE 2017
European Biomass Conference & Exhibition

STOCKHOLM · SWEDEN
Stockholm Convention Center
12 - 18 JUNE

Microalgae fractionation into bioproducts by steam explosion and membrane filtration

E. Lorente^a, M. Haponska^a, C. Torras^a, E. Clavero^a, N. Descarrega^a, J. Salvadó^b

^aCatalonia Institute for Energy Research, IREC, Marcel·lí Domingo 2, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

^bDepartament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Av. Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

ABSTRACT

Microalgae, a renewable biomass source of second generation, is in the focus of scientists and companies to be used as biorefinery raw material. However, the implementation of a microalgae biorefinery still requires the development of technologies, especially involving the harvesting and fractionation processes. Search for appropriate pretreatment cell disruption methods for microalgae is essential in order to increase the lipid extraction efficiency and/or to release the carbohydrates and sugars present in the cell. Furthermore, the application of membrane filtration could facilitate the different fractions.

The initial experimental results show that the application of acid-catalysed steam explosion technique as a pre-treatment in the fractionation of microalgae allows the disruption of the cellular structure and hydrolyses the carbohydrates, making lipids more accessible by solvent extraction.

Regarding membrane filtration, membranes with pore size lower than 0.2 micrometers allowed the rejection of almost all the lipids and permitted the permeation of the aqueous phase of hydrolyzed carbohydrates. Following extraction could recover the lipids using much less amount of solvent.

Purpose of the work and approach

Recently, bioproducts from microalgae gained increased attention in the field of biobased economy and biotechnology [1]. However, despite the promising benefits of microalgae as an alternative renewable source of biomass, a considerable amount of research and development efforts are still to be carried out because of several remaining hurdles to the development of the microalgae biorefinery technology, mainly related to harvesting and feedstock extraction [2].

The extraction of components from microalgae is particularly problematic due to the chemically complex and structurally robust nature of most algal cell walls. Therefore, it is often necessary to disrupt the cell walls and other cellular structures in order to make the microalgae components (lipids, carbohydrates, proteins) sufficiently accessible for extraction. Pre-treatment is a key unit operation affecting the refinery efficiency of microalgae biomass. Several pre-treatment methods have been proposed for microalgae cell disruption [3], although the most efficient pre-treatment method has not yet been unequivocally confirmed.



Steam explosion is an efficient and economical method, which has long been used for fractionating and modifying lignocellulosic materials [4]. This treatment exposes biomass to steam at temperatures between 120–150 °C (for microalgal biomass) for several minutes, followed by sudden depressurization to ambient condition, resulting in the cell rupture due to the phase change of liquid water inside the cells.

The purpose of the present study is to evaluate the coupling of the steam explosion process and tangential cross-flow filtration in order to facilitate both lipid extraction and post-extraction use of the microalgal biomass.

Scientific innovation and relevance

A novel route for microalgae downstream is being proposed in this work. It combines steam explosion as cell disruption method with fractionation paths consisting on membrane filtration and extraction.

For fractionation, two strategies are considered, (a) performing the filtration of the steam exploded sample before the extraction of lipids or (b) filtration after the extraction process. The use of different membranes is analyzed in order to improve the fractionation of the sample after the steam explosion treatment, into three fractions: lipids, carbohydrates and residual solid, containing proteins and other valuable products.

Preliminary results

The application of acid-catalysed steam explosion pretreatment to three types of microalgae biomass (*Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella sorokiniana* and *Phaeodactylum tricornutum*) results in higher lipid extraction efficiencies compared to autoclaving, ultrasound and microwave techniques.

The results indicate that the steam explosion disrupts the cell wall and, in addition, the hydrolysis of polysaccharides allows the lipids being more accessible to solvent extraction.

With the exploded sludge, fractionation steps are required to obtain the lipids, carbohydrates and proteins. Membrane filtration and solvent extraction were used. Microfiltration membrane with pore size lower than 0.2 micrometers allows the rejection of almost all the lipids and permits the permeation of the aqueous phase of hydrolyzed carbohydrates. Then, the retentate has a much smaller volume than the initial one and a high concentration of lipids. Therefore, the amount of solvent needed to extract the lipids in the retentate fraction is much lower, cutting the operation costs.

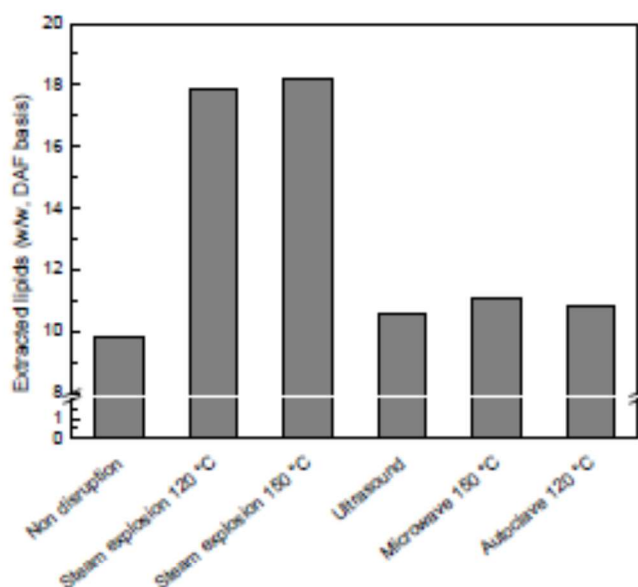


Fig. 1 Lipid extracted from *Nannochloropsis gaditana* by Bligh and Dyer method after pretreatment

Acknowledgements

This work was supported by the project CTQ2014-56285-R "Cultivo, concentración, fraccionamiento y obtención de producto en refinería de microalgas" funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The research was also supported by the European Regional Development Funds (ERDF, FEDER Programa Competitividad de Catalunya 2007-2013). M. Haponska is grateful to the Universitat Rovira i Virgili (URV) for her PhD scholarship.

References

- [1] U. Prateek, A. Sonu, A review of Third-Generation Biofuels from Microalgae. *Journal of Biofuels* 7 (2016) 14-19
- [2] M.K. Lam, K.T. Lee, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 673-690
- [3] J.R. McMillan, I.A. Watson, M. Ali, W. Jaafar, Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment, *Appl. Energ.* 103 (2013) 128-134
- [4] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 673-686
- [5] E. Lorente, X. Farriol, J. Salvadó, Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Processing Technology* 131 (2015) 93-98

Annex B. Càlcul pes sec lliure de cendres (DAF)

Els resultats de cada experiment, tant de la mostra sotmesa o no a la tècnica d'explosió de vapor com la quantitat de lípids i sucres recuperats, es donen en pes sec lliure de cendres (DAF).

Primerament, a partir de l'anàlisi termogravimètric (TGA) s'aconsegueix la quantitat d'humitat i de cendres que contenia cada mostra i, amb el següent càlcul, es va aconseguir el percentatge de el pes sec lliure de cendres de cadascuna.

$$DAF (\%) = 100 - \text{Percentatge mitjà d'humitat} - \text{Percentatge mitjà de cendres}$$

Seguidament, es va calcular el pes sec lliure de cendres en grams, a partir del pes fresc de cada una de les mostres.

$$\text{Pes mostra DAF (g)} = \text{Pes mostra (g)} \cdot \frac{DAF \text{ mostra } (\%)}{100}$$



En les següents taules es mostra el procediment descrit anteriorment en el tercer experiment, quan la mostra es va concentrar al 50 %.

Concentració al 50 % (1): Permeat				Mitjana
Humitat (%)	88,53	88,58	88,63	88,58
Cendres (%)	8,13	8,17	8,10	8,13
DAF (%)	3,29			

Concentració 50 % (1)	Alimentació (mostra explotada)	Retingut	Permeat
Pes (g)	100	69	27,6
Pes DAF (g)	5,12	4,20	0,91

En la següent taula es mostren tots els valors del pes sec lliure de cendres calculats en cada un dels experiments:

Experiment	Mostra biomassa algal	DAF (%)
Primer experiment	Mostra sense tractament (primer assaig)	11,10
	Mostra explotada (150 °C i 1 % àcid sulfúric)	6,90
	Mostra sense tractament (segon assaig)	8,80
	Mostra explotada (150 °C i 5 % àcid sulfúric)	4,70
Segon experiment	Mostra explotada (150 °C i 5 % àcid sulfúric)	5,12
	Concentració 75 %	5,64
	Concentració 50 %	6,76
	Concentració 25 %	10,39
	Fracció líquida	3,30
Tercer experiment	Mostra explotada (150 °C i 5 % àcid sulfúric)	5,12
	Concentració 50 % (1)	6,03
	Frasi líquida 50 % (1)	3,29
	Concentració 50 % (2)	8,00
	Frasi líquida 50 % (2)	2,82

	Concentració 25 %	11,94
	Frase líquida 25 %	3,00

Annex C. Càlcul del percentatge de lípids

Els lípids presents en cada una de les mostres es van quantificar mitjançant una extracció de lípids (*Bligh and Dyer* o dissolvent n-hexà). Seguidament, el vial amb el dissolvent es va introduir a una estufa, i passada la nit, es va calcular la quantitat de lípids realitzant la diferència entre el vial amb els lípids i el pes del vial previ a la introducció del material (obtenint el pes sec).

El càlcul que descriu el percentatge de lípids presents en una mostra és el següent:

$$\text{Lípids (\%)} = \frac{\text{Lípids DAF (g)}}{\text{Pes mostra DAF (g)}} \cdot 100$$

L'extracció de lípids es va realitzar en dues rèpliques, de les quals es va calcular la desviació estàndard mitjançant la funció del programari Excel, utilitzant la següent fórmula:

$$\text{Desviació estàndard} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

En la següent taula, es mostra els càlculs descrits anteriorment en el cas de concentrar al 50 % amb la filtració frontal (tercer experiment).

Retingut de la filtració frontal concentrant al 50 % (1)

Rèplica	1	2
Pes mostra (g)	20,00	20,05
Pes mostra DAF (g)	1,21	1,21
Vial (g)	18,73	18,84
Vial + lípids (g)	18,98	19,09
Lípids (g)	0,25	0,25
Lípids (%)	20,95	20,55
Mitjana lípids (%)	20,75	
Desviació estàndard	0,30	

Annex D. Càlcul de lípids en el balanç de matèria

Tant en el segon, com en el tercer experiment, les quantitats obtingudes de lípids es van representar respecte un balanç de matèria, on la biomassa algal sense pretractament representava els 100 g DAF i la biomassa sotmesa a l'explosió de vapor, 97 g DAF.

Els pesos DAF de l'alimentació, del retingut i del permeat en els dos experiments es van calcular com s'explica en l'Annex 2 (pàg. 64). Seguidament, es volia conèixer els grams DAF que representava el retingut amb els lípids, de les dues tècniques de concentració, dins el balanç de matèria.

El càlcul que es va utilitzar es mostra a continuació, tenint en compte que el pes DAF de l'alimentació (anomenat *feed* en el càlcul) del balanç de matèria són 97 g DAF.

$$\text{Retingut (balanç mat.) (g)} = \frac{\text{Feed (balanç mat.) (g)}}{\text{Feed (concentració) (g)}} \cdot \text{Retingut (concentració) (g)}$$

Finalment, es va calcular la quantitat de lípids presents en el retingut respecte del balanç de matèria, és a dir, els lípids recuperats.

$$\text{Lípids (balanç mat.) (g)} = \frac{\text{Lípids extracció (\%)}}{100} \cdot \text{Retingut (balanç mat.) (g)}$$



A continuació, es mostra una taula amb els càlculs assenyalats anteriorment en el tercer experiment, al concentrar la mostra explotada al 50 %.

Concentració al 50 % (1)

	Pes DAF alimentació (g)	Pes DAF retingut (g)
Filtració frontal	5,12	4,16
Balanç de matèria	97	78,82
Lípids recuperats DAF (g)	16,36	