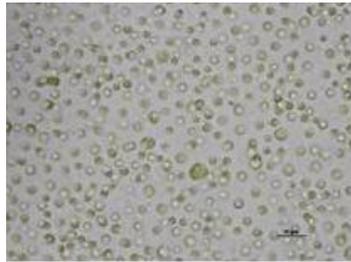


# COMPENDIO METODOLÓGICO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL



Proyecto IMARPE - FINCyT  
“DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL  
POTENCIALMENTE ACUMULADORA DE LÍPIDOS PARA LA OBTENCIÓN  
DE COMBUSTIBLE”

Contrato N° 025 – FINCyT – PIBAP -2007

Carla Aguilar S., Iliana Chang A., Liz Tenorio G., Gheraldine Ynga H.,  
Alberto Oscanoa H., Lenin Flores R.

Callao, noviembre 2011



## AUTORES

Blgo. Alberto Oscanoa Huaynate  
Blga. Iliana Chang Ávila  
Blga. Gheraldine Ynga Huamán  
M.Sc. Carla Aguilar Samanamud \*  
Ing. Liz Tenorio García-Blásquez  
Qco. Leenin Flores Ramos

(\*) caguilar@imarpe.gob.pe

**Área de Biotecnología Acuática,  
Dirección de Investigaciones en  
Acuicultura, Gestión Costera y  
Aguas Continentales.  
INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ**

## DISEÑO Y DIAGRAMACION

Ismael Zárate Miranda

Noviembre 2011

LIMA, PERÚ

Esq. Gamarra y Gral. Valle S/N,  
Chucuito, Callao  
Lima, Perú  
<http://www.imarpe.pe>

## CONTENIDO

Pag.

CULTIVO DE MICROALGAS EN AMBIENTE CONTROLADO	
Figura 1. Flujo descriptivo del cultivo en laboratorio.....	5
Instructivo 02.1.....	6
CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS EN INVERNADERO	
Figura 2. Área de trabajo y periodo de cultivo.....	10
Instructivo 02.2.....	11
OBTENCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL	
Figura 3. Procesamiento de la muestra.....	15
Instructivo 03.1.....	16
DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES	
Figura 4. Secuencia del proceso de extracción de lípidos totales.....	18
Instructivo 01.1.....	19

## AGRADECIMIENTO

Al Programa Financiamiento para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), ejecutado por la Presidencia del Consejo de Ministros (PCM), quien con fondos del Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y, a través del financiamiento de Proyectos de Investigación Básica, Aplicada y Precompetitiva (PIBAP) contribuyó con el desarrollo del proyecto DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL POTENCIALMENTE ACUMULADORA DE LÍPIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE COMBUSTIBLE, aprobado mediante contrato N° 025-FINCyT-PIBAP-2007.

Al Instituto del Mar del Perú: IMARPE, sede del Área de Biotecnología Acuática (ABA), por el co-financiamiento, respaldo y apoyo constante durante el desarrollo del proyecto, que ha permitido formar un grupo de jóvenes investigadores interesados en la Biotecnología Acuática.

A las diferentes entidades académicas como, Universidad Nacional de Ingeniería, Universidad Nacional Agraria la Molina, Universidad Científica del Sur, Universidad de Florencia (Italia), Universidad de Antofagasta (Chile), y empresas privadas como; Biocombustibles del Perú SAC, Pure Biofuels del Perú SAC, MERCK Peruana SA, GEA Westfalia SA, Baires SAC, INDURA SA, LECO Soluciones Analíticas SAC, Kossodo SAC, Spena Fish Acuicultura SAC y Maipasac SAC, quienes, desde su ámbito de acción, contribuyeron con el desarrollo de las metodologías vertidas en el presente documento.

A la ayuda y el apoyo de la Blga. Sulma Carrasco, Jefa de la Unidad de Investigaciones en Acuicultura, la Qca. María Elena Jacinto, Coordinadora de Apoyo Científico, al equipo Editor del IMARPE. A todos ellos un agradecimiento especial por su valioso tiempo brindado en la corrección del presente documento. Así mismo, un especial agradecimiento a la Técnica Química Claudia Illa García, quien realizó los primeros análisis para la obtención de lípidos totales.

## PRESENTACIÓN

Lo descrito en este documento es el resultado de una serie de experiencias realizadas, así como modificaciones y adaptaciones de técnicas empleadas en diversos organismos acuáticos, con la finalidad de evaluar la producción de biomasa microalgal con alto contenido lipídico, desde su cultivo hasta el análisis de lípidos totales.

La biomasa microalgal es la materia orgánica producida a partir del cultivo de microalgas que, bajo determinadas condiciones, acumula los denominados compuestos bioactivos, metabolitos secundarios o biomoléculas.

El desarrollo de nuevas técnicas o la modificación de estas, para describir procesos, conllevan a la obtención o mejora de un producto, el cual deberá contar con los máximos niveles de calidad y cantidad que se requiere producir.

Durante la investigación, el desarrollo de cada flujo de trabajo, se ha llevado a cabo bajo determinadas condiciones ambientales y estructurales, que deben de servir al usuario como referente mas no como patrón, pues éstas contribuyen, en gran medida, a definir el proceso, que para cada lugar y condición es particularmente especial.

Este Compendio Metodológico reúne parte de los resultados del proyecto “DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL POTENCIALMENTE ACUMULADORA DE LÍPIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE COMBUSTIBLE”. Por ello, debido a lo novedosa que ha sido la producción de biomasa microalgal como matriz de investigación, así como, por lo breve y detallado que pretende ser el documento, se ha visto por conveniente denominarlo; COMPENDIO METODOLÓGICO, con la intención de introducir a quienes consideren a las microalgas como una alternativa de desarrollo productivo.

IMARPE, Noviembre 2011

## CULTIVO DE MICROALGAS EN AMBIENTE CONTROLADO



Figura N° 1. Flujo descriptivo del cultivo en laboratorio, en condiciones controladas; a) Cámara de flujo laminar para la siembra y repique; b) Cultivo en matraces de 1 L; c) Cultivo en botella de 7 L; d) Cultivo en botella de 20 L; e) Cultivo en tanque de 250 L. El tiempo de cultivo de todo el flujo desde que ingresa el nivel de cepa al laboratorio hasta tanques de 250 L es de aproximadamente 22 días. Las condiciones en este ambiente se detallan en el instructivo.

	<b>INSTRUCTIVO</b>	Cod.: P-LT/BA- 02.1
	<b>CULTIVO DE MICROALGAS EN AMBIENTE CONTROLADO</b>	Edición 01
		Fecha 2/11

## 1. OBJETIVO

Obtener cultivo de microalgas en pequeños volúmenes (de 0,5 a 250 L), a partir de inóculos de 0,25 L.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica será aplicada en cultivos de microalgas mantenidos en laboratorio, sometidos a condiciones controladas de luz, temperatura, nutrientes y CO<sub>2</sub>.

## 3. FUNDAMENTO

La técnica consiste en aumentar el cultivo de microalgas utilizando recipientes de diferentes volúmenes. Ésta se basa en trasvasar de un matraz de menor capacidad a otro de mayor capacidad, una determinada cantidad de cultivo celular, de manera tal, que el número de células por mililitros (capacidad de carga) aumente en un determinado periodo de tiempo. En este nivel se usan nutrientes químicamente puros (de 0,5 a 1,0 L) e industriales (a partir de 7 L), los cultivos tiene que ser altamente puros y axénicos.

## 4. REFERENCIAS

Laing I. 1991. Cultivation of marine, unicellular algae. Lab. Leaflet, MAFF. Direct. Fish. Res., Lowestoft, (67). 31 pp.

Karlson B., C. Cusack and E. Bresnan. 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative Phytoplankton analysis. UNESCO. 99 pp.

## 5. TERMINOLOGÍA

*Microalgas:* Organismos fotosintéticos, capaces de convertir energía solar en química debido a su estructura celular sencilla. Además, tienen una mejor disponibilidad para asimilar Carbono en forma de Dióxido de Carbono y otros nutrientes del medio acuoso. Están ampliamente distribuidos y adaptados a una serie de condiciones.

*Capacidad de carga:* Número de células por mililitro de cultivo.

*Inóculo:* Cantidad de cultivo que se añade en cada nivel de escalamiento.

## 6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Microscopio binocular de campo claro, campo oscuro y contraste de fase.
- Bomba de aire (blower) de 3 HP.
- Bomba de filtración al vacío de ½ HP.
- Sistema de esterilización de agua de mar por radiación ultra violeta.
- Filtro tipo cunco de fibra de vidrio, de 1 micra para el sistema de aireación.
- Campana de flujo laminar.
- Estufa.
- Autoclave.
- Matraces de 0,5 y 1,0 L.
- Botellas de plástico de 7 y 20 L.
- Tanques de 250 L.
- Mangueras siliconada de 3/16 pulgadas de diámetro.
- Llaves de conexión y salida de aireación.

- Piedras difusoras de 4x4 cm.
- Tapones de jebe.
- Cámara de Neubauer.
- Láminas porta y cubreobjeto.
- Pipetas descartables de 5 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- Termómetro de columna Mín/Máx.
- Luxómetro.

## 6.2 REACTIVOS

- Medio Guillard (1975) modificado (F medio).
- Nutriente agrícola Bayfoland®.
- Lugol extra concentrado.
- Alcohol de 96°.
- Extran neutro (detergente para vidrio).
- Aceite de inmersión.
- Tiosulfato de sodio.
- Hipoclorito de sodio al 2,8 %.

## 7. DESARROLLO DEL PROCESO

- 7.1. El tipo de cultivo a este nivel es de tipo batch.
- 7.2. Antes de empezar la jornada registre diariamente los siguientes parámetros; pH, temperatura e iluminación, los rangos sugeridos deberían estar en pH: 7,5-8,5; T: 18-20°C; iluminación: 1000 – 3000 Lux.
- 7.3. Para cultivos entre 0,5 a 1 L utilice agua de mar previamente envejecida y esterilizada con radiación ultravioleta, filtre a 0,45 micras y luego a 0,22 micras, autoclave lo filtrado en frascos de vidrio con tapa, deje enfriar y almacene en refrigeración hasta que prepare los cultivos.
- 7.4. Para la preparación de los cultivos agregue 1mL de cada uno de los reactivos stocks del medio Guillard Modificado, por cada litro de agua de mar a emplear.
- 7.5. A partir de cultivos de 7 L, utilice agua de mar filtrada a 1 micra, esterilizada con radiación ultravioleta, y tratada con hipoclorito de sodio al 2,8 % (0,25 mL /L de agua de mar), por 24 h. Declarar

con tiosulfato de sodio al 24,81% (0,1 mL/L de agua de mar) una hora antes de la siembra.

- 7.6. Para la preparación de los cultivos a este nivel, adicione 0,5mL de nutriente agrícola (para el presente estudio se empleó Bayfoland®), por cada litro de agua de mar a utilizar.
- 7.7. Agregue una cantidad del cultivo microalgal que se requiere aumentar. La cantidad vertida se conoce como inóculo, éste variará según el volumen a cultivar. Para los volúmenes de 0,5 será de 10%, para los siguientes niveles, aumentará a razón de múltiplo de 5.
- 7.8. Una vez sembrado (nutrido e inoculado el medio), mantenga el cultivo por un periodo entre 72 a 96 h, para los volúmenes hasta 20 L y hasta 120 h, para los tanques de 250 L.
- 7.9. Culminado el periodo de cultivo y, evaluada la capacidad de carga de los cultivos en los tanques de 250 L, estos servirán de inóculo a los biorreactores.

## 8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

*Evaluación de la capacidad de carga de los cultivos:*

Células menores a 6µ:

$$N_a = \frac{\sum \text{Cel. } C_a}{5} \times 250000$$

Células mayores a 6µ:

$$N_b = \frac{\sum \text{Cel. } C_b}{4} \times 10000$$

*Donde:*

$N_a$  y  $N_b$  = Número de células por mL (cel/mL).

$\Sigma$  Cel.  $C_a$ = Suma de células en la diagonal central de la cámara Neubauer.

$\Sigma$  Cel.  $C_b$ = Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara Neubauer.

Tasa de crecimiento celular:

$$K = 1/C_b \times \left( \Delta C_b / \Delta t \right)$$

Dónde:

$K$ = Tasa de crecimiento.

$C_b$ = Concentración celular final.

$\Delta C_b$ = Variación concentración celular (Concentración final - concentración inicial).

$\Delta t$ = Variación tiempo (Tiempo final - tiempo inicial).

## 9. REGISTROS

Parámetros físico-químicos

a.- Del ambiente:

Fecha	Hora	Temperatura Ambiental (°C)						
		A min.(*)	A max.(*)	B min.(*)	B max.(*)	C min.(*)	C max.(*)	Promedio

(\*) Puntos de toma de temperatura: A: Nivel matraz 0,5 L; B: nivel matraz 1,0 L y C: nivel botellas de 7 y 20 L.

Fecha	Hora	Luminosidad (Lux)													
		A(*)			B(*)			C(*)			D(*)			Promedio	
		Pto.1	Pto.2	Pto.3	Pto.1	Pto.2	Pto.3	Pto.1	Pto.2	Pto.3	Pto.1	Pto.2	Pto.3		

(\*) Puntos de toma de intensidad lumínica: A: Matraces 0,5 L; B: Matraces 1,0 L; C: Botellas de 7 y 20 L; D: Tanques de 250 L: Pto 1, pto. 2 y pto. 3: puntos dentro de cada nivel.

b.- Del cultivo:

Fecha	Microalga:									
	A 0.5 L(*)		A 1.0 L(*)		B 7L (*)		B 20L (*)		C 250L (*)	
	pH	T (°C)	pH	T (°C)	pH	T (°C)	pH	T (°C)	pH	T (°C)

(\*) Puntos de toma de parámetros: A: Matraces 0,5 L y 1,0 L; B: Botellas 7,0 L y 20 L, C: Tanque 250 L.

c.- Conteo celular:

Células menores a 6μ										
Fecha de conteo	Conteo	Primer cuadrante (*)	Segundo cuadrante (*)	Tercer cuadrante (*)	Cuarto cuadrante (*)	Quinto cuadrante (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula $N_a$	Nº cel/mL x10 <sup>n</sup>
	1º									
	2º									
	3º									
	1º									
	2º									
	3º									

(\*) Cuadrantes de conteo en la cámara de Neubauer. 1º, 2º y 3º.....Nº: Número de conteos.

Células mayores a 6μ									
Fecha de conteo	Conteo	Primer cuadrante (*)	Segundo cuadrante (*)	Tercer cuadrante (*)	Cuarto cuadrante (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula $N_b$	Nº cel/mL x10 <sup>n</sup>
	1º								
	2º								
	3º								
	1º								
	2º								
	3º								

(\*) Cuadrantes de conteo en la cámara de Neubauer. 1º, 2º y 3º.....Nº: Número de conteos.

# CULTIVO DE MICROALGAS EN INVERNADERO



Figura N°2: Flujo descriptivo del cultivo masivo en invernadero; a) Inóculos; b) Biorreactores con nutrientes; c) Siembra de inóculos en biorreactores; d) control de aireación y CO<sub>2</sub>; e) Nivel de cultivo masivo en biorreactores verticales de 600 L.

	<b>INSTRUCTIVO</b>	Cod.: P-LT/BA- 02.2
	<b>CULTIVO MASIVO DE MICROALGAS EN INVERNADERO</b>	Edición 01
		Fecha 2/11

## 1. OBJETIVO

Establecer pautas para la obtención del cultivo microalgal a nivel masivo a partir de inóculos de 250 L, utilizando biorreactores verticales, con capacidad de 600 L.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica se aplica a cultivos masivos de microalgas que se mantienen en invernadero, sometidos a condiciones variables y extremas de iluminación y temperatura, controlando solo el consumo de nutrientes y CO<sub>2</sub>.

## 3. FUNDAMENTO

La técnica consiste en cultivar de forma masiva una determinada cantidad de células y cosecharlas luego de un periodo de tiempo, empleando bolsas verticales de 25 cm de diámetro y 1,80 m de alto, en grupos de 20 unidades y conectados a sistemas cerrados de aire, CO<sub>2</sub> y agua. El sistema de cultivo es semi-continuo, del cual se cosecha el 50% de manera tal, que el volumen celular en las bolsas permanezca siempre constante en el tiempo; en este nivel se usa nutrientes agrícolas y CO<sub>2</sub>.

## 4. REFERENCIAS

Lemus, N., T. Urbano, B. Arredondo, M. Guevara, A. Vazquez, L. Carreon y N. Vallejo (2006) Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivados en sistemas discontinuos y semicontinuos. Ciencias Marinas., 32(3):597-603.

Ling, X., P. Weathers, X.Xiong y C. Liu (2009) Microalgal bioreactors:

Challenges and opportunities. Eng. Life Sci., 9(3):178-189.

## 5. TERMINOLOGÍA

*Biorreactor*: Son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con microorganismos, células vegetales y animales, viables o no viables.

En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, concentración de oxígeno, Temperatura, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva, en función de los flujos de entrada y salida.

*Cultivo masivo*: Es el proceso mediante el cual células procariotas o eucariotas pueden cultivarse en grandes volúmenes con la finalidad de explotar su potencial biológico.

*Siembra*: Introducción de un concentrado conocido de volumen de cultivo microalgal (inóculo) a recipientes con medio líquido. Esto marca el inicio de la etapa de cultivo

*Cosecha*: Vaciado del volumen cultivado a tanques acopiadores para usos diversos. Marca el final de la etapa del cultivo.

## 6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Microscopio binocular de campo claro, campo oscuro y contraste de fase.
- Bomba de aire de alta presión (Blower) de 3 HP.

- Sistema de esterilización de agua de mar por radiación ultra violeta.
- Multiparámetro de campo.
- Luxómetro.
- Termómetro de columna Mín/Máx.
- Bolsas de 30 L de capacidad.
- Tanques de cosecha de 300 L.
- Mangueras de 3/16 pulgadas de diámetro.
- Llaves de conexiones y salida de aireación.
- Piedras difusoras de 2,5 x 1,5 cm.

## 6.2 REACTIVOS

- Nutriente agrícola Bayfoland.
- Balón de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> de uso industrial con pureza 99,999%) de 6m<sup>3</sup> de capacidad.
- Lugol.
- Etanol de 96°.
- Detergente industrial.
- Aceite de inmersión.

## 7. DESARROLLO DEL PROCESO

- 7.1. Antes de empezar la jornada, registre y determine diariamente los siguientes parámetros; pH, salinidad, oxígeno, temperatura e iluminación; estas últimas dependerán de la condición estacional en la cual se lleven a cabo los cultivos.
- 7.2. Inicie el cultivo, llenando las bolsas de los biorreactores al 50% con agua de mar filtrada a una micra y pasada por

radiación UV, luego se le completa el otro 50% con el inóculo microalgal.

- 7.3. Aplique nutriente agrícola (Bayfoland ®) 0,075 mL/L y CO<sub>2</sub> 0,025 g/L, este último de manera diaria y horaria.
- 7.4. Una vez sembrado (nutrido e inoculado el medio), mantenga el cultivo entre 2 a 5 días para propiciar la acumulación de lípidos a nivel celular.
- 7.5. Culminado el periodo de cultivo, y evaluada la productividad (g/L), a partir de 5 bolsas por biorreactor elegidas al azar, se realiza la cosecha con la ayuda de una bomba de succión de ½ HP, los cultivos se acopian en tanques de 300 L, para su posterior concentración mediante el método de centrifugación.
- 7.6. Para el conteo celular, guiarse de la metodología empleada en ambientes controlados.

## 8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

$$\mu = \left( \frac{1}{C_b} \right) \left( \frac{\Delta C_b}{\Delta t} \right)$$

$$P = \mu \times C_b$$

Donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento.

P = productividad.

C<sub>b</sub> = concentración final.

$\Delta t$  = tiempo de cultivo.

$\Delta C_b$  = diferencia de concentración.





# OBTENCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL



Figura 3. Flujo del proceso para la obtención de la biomasa microalgal; a) Cosecha, la cual se somete a una centrifugación; b) Biomasa húmeda, ésta se seca a través de una liofilización; c) Biomasa seca que será pulverizada manualmente para embolsar finalmente el producto; d) Polvo algal, llamado también harina de algas.

	<b>INSTRUCTIVO</b>	Cod.: P-LT/BA- 03.1
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA ALGAL</b>	Edición 01
		Fecha 2/11

## 1. OBJETIVO

Obtener biomasa microalgal, a partir de cultivo masivo en biorreactores.

## 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica será aplicada a cultivos de microalgas previamente cosechados y colocados en tanques de 300 L.

## 3. FUNDAMENTO

La técnica consiste en concentrar el cultivo líquido a través de una centrífuga separadora de limpieza manual. Ésta se basa en separar el líquido del medio donde crecen las células con la mínima destrucción, a fin de obtener un alto contenido del metabolito acumulado durante la etapa de cultivo.

## 4. REFERENCIAS

Shimatsu, H. 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hidrobiología* 512:39-44.

Instituto de Salud Pública de Chile. Subdpto. Laboratorios del Ambiente. Sección Química de Alimentos. Determinación de humedad. Método de la estufa de aire. 2011, PRT-701.02-023 Pág: 1-2.

## 5. TERMINOLOGÍA

*Biomasa microalgal*: Materia orgánica constituida por células de microalgas capaces de generar energía.

## 6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Centrífuga separadora de limpieza manual OTC 2 (Gea Westfalia Separador).
- Bomba de succión iFD-Stator (NETZSCH).
- Liofilizador.
- Morteros de porcelana de 400g.
- Manguera plástica de 1”.
- Espátula de plástico.
- Bolsas herméticas con cierre de 16.5 x 14.9 cm.
- Bandejas de acero inoxidable de 26 x 38 cm.
- Balanza.

## 7. DESARROLLO DEL PROCESO

- 7.1. Para este proceso se emplea una centrífuga separadora de limpieza manual, conectada a una bomba de succión.
- 7.2. Coloque la manguera de entrada al tanque de cosecha, encienda el equipo para que el volumen de cultivo cosechado y acopiado en un tanque de 300 L, se dirija a la centrífuga de limpieza manual.
- 7.3. Asegúrese que la centrífuga trabaje a una velocidad promedio de salida de 100 L/h. El tamaño y la concentración celular pueden influenciar en la variación de la velocidad.
- 7.4. Culminado el tiempo de centrifugado, retire la biomasa húmeda con la ayuda de una espátula del cono receptor.
- 7.5. Coloque la biomasa húmeda obtenida en bandejas de acero inoxidable ó placas petri, esparciéndola de manera homogénea, formando una capa delgada no mayor a 1 cm de espesor, cubra las bandejas con bolsa hermética, etiquetadas y codificadas, lleve a refrigeración por 24 h.

- 7.6. Transcurrido el tiempo de refrigeración, seque las muestras mediante un liofilizador, por un periodo de 48 h.
- 7.7. Culminada la liofilización, retire la biomasa seca de las bandejas o placas con la ayuda de espátulas y coloque en morteros de porcelana para su posterior homogenización.
- 7.8. Homogenice el producto de manera mecánica, pese y almacene en bolsas herméticas, correctamente etiquetadas y codificadas.
- 7.9. Almacene en un desecador la biomasa embolsada, protegida de la humedad y la luz, para su posterior análisis.
- 7.10. La calidad de la biomasa seca se comprueba, realizando la prueba de humedad, mediante el método de estufa de aire a 50 °C por 5 h hasta que el peso sea constante. El rango de humedad aceptable está entre 5 a 7%.

## 8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

$$BH = P_1 - P_2 \quad BS = P_3 - P_4$$

$$PH = BH \div V \quad PS = BS \div V$$

$$C = (BS*100)/BH$$

Donde:

BH = Biomasa húmeda (g).

BS = Biomasa seca (g).

P<sub>1</sub> = Peso total biomasa húmeda (bandeja + biomasa húmeda) (g).

P<sub>2</sub> = Peso bandeja (g).

P<sub>3</sub> = Peso total biomasa seca (bolsa hermética + biomasa seca) (g).

P<sub>4</sub> = Peso bolsa hermética (g).

V = Litros.

PBH = Productividad biomasa húmeda (g/L).

PBS = Productividad biomasa seca (g/L).

C = Porcentaje de conversión de biomasa húmeda a seca (%).

## 9. REGISTROS

Registro de cálculo de muestra

Registro de data de Biomasa Algal							
Fecha	Código	Volumen (L)	Peso bandeja P <sub>2</sub>	Peso total Biomasa húmeda (g) P <sub>1</sub>	Peso bolsa hermética (g) P <sub>4</sub>	Peso total biomasa seca(g) P <sub>3</sub>	Observaciones

## EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

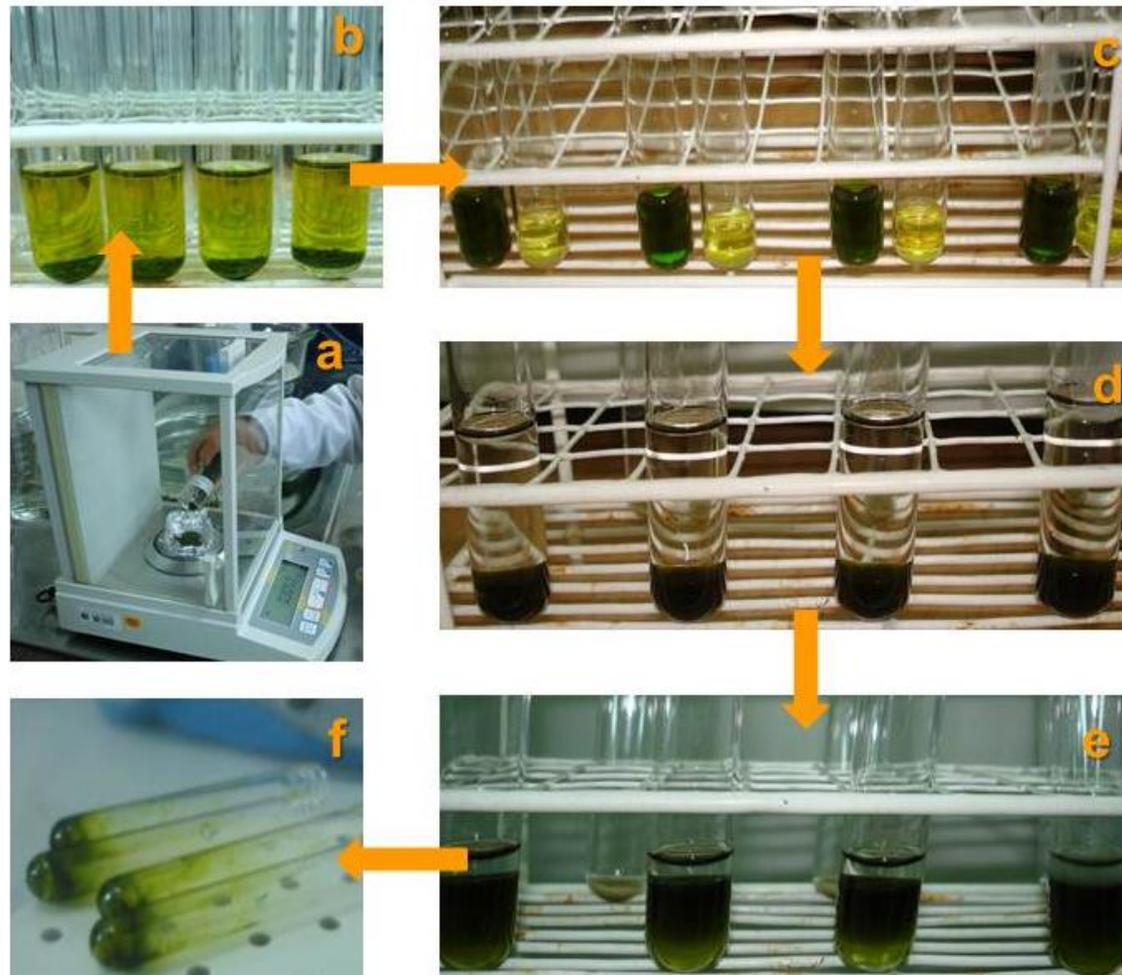


Figura 4. Secuencia del proceso de extracción de lípidos totales; a) Pesado de muestra; b) Mezcla con solventes; c y d) Lavado con solventes; e) Separación de fases, f) Obtención de lípidos totales.



## INSTRUCTIVO

Cod.:  
P-LAB/BA- 01.1

Edición 01

Fecha: 02/11

### EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

#### 1. OBJETIVO

Determinar el contenido lípidos totales en microalgas, mediante extracción directa con solventes en frío.

#### 2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta técnica será aplicada a muestras de biomasa microalgal previamente liofilizada.

#### 3. FUNDAMENTO

El método consiste en la extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal, mediante una mezcla de solventes y el posterior aislamiento de la fase orgánica a través de evaporación de ellos y concentración del extracto. El método ha sido adaptado para extraer lípidos totales en cualquier organismo microalgal previamente secado por liofilización.

#### 4. REFERENCIAS

Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Bertha Olivia Arredondo Vega y Doménico Voltolina, Centro de investigaciones Biológicas del Noereste, S.C. México 2007. 97 pg.

#### 5. TERMINOLOGÍA

*Lípidos Totales:* Los lípidos son compuestos orgánicos, constituidos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, a veces por azufre, fósforo y nitrógeno. Son de diferentes tipos como; aceites, ésteres y fosfolípidos. Se le denomina lípidos totales al conjunto de estos compuestos orgánicos que puedan estar presentes en la biomasa algal con la que se trabaje.

#### 6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

##### 6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- Balanza analítica de precisión, Capacidad: 100 microgramos.
- Micropipeta de 10  $\mu$ L-100  $\mu$ L.
- Micropipeta de 0,5 mL-5mL.
- Tubos de vidrio de 15 mL con tapa.
- Tubos de vidrio de 10 mL con tapa.
- Ultrasonido.
- Vórtex.
- Centrífuga refrigerada hasta 6000 rpm.
- Campana extractora de gases.

##### 6.2 REACTIVOS

- Cloroformo p.a.
- Metanol p.a.
- Antioxidante BHT
- Estándar interno de ácido graso C17:0

#### 7. DESARROLLO DEL PROCESO

- 7.1. Pese 50 mg. de microalga liofilizada en un tubo de vidrio de 15 mL (Tubo 1). Adicione 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2).
- 7.2. El tubo con muestra se coloca en un baño de agua con hielo, el cual es sometido a ultrasonido durante 15 min. (3 ciclos).
- 7.3. Incube el tubo por 24 h en refrigeración (4 °C) y protegido de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- 7.4. El tubo con muestra en frío, se vuelve a someter a ultrasonido por 15 min (3 ciclos) más.
- 7.5. Centrifugue el tubo con muestra en frío a 5000 rpm por 20 min. Extraiga la fase líquida con una pipeta Pasteur y transféralo a un tubo de vidrio de 15 mL

(Tubo 2). Agregue 1,5 mL de cloroformo: metanol (1:2) a la biomasa residual y centrifugue nuevamente a 5000 rpm por 20 min. a 5 °C y recupere el extracto en Tubo 2.

**7.6.** Agregue 2 mL de agua destilada al Tubo 2, que contiene el extracto y agite con vortex. Elimine el exceso de agua de la capa superior y centrifugue a 5000 rpm por 10 min a 5 °C y separe la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.

**7.7.** Agregue 1 mL de cloroformo y separe la fase inferior (cloroformo: lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Coloque fase orgánica lipídica en un tubo seco de 10 mL (Tubo 3), previamente pesado y guardado en desecador.

**7.8.** Lave la fase acuosa del Tubo 2 con 1 mL de cloroformo, mezcle con vortex y centrifugue nuevamente a 5000 rpm

durante 10 min. recupere la fase inferior lipídica y transfiera a Tubo 3.

**7.9.** Seque la fase lipídica (Tubo 3) con nitrógeno gaseoso dentro de una campana de extracción.

**7.10.** Coloque Tubo 3 en desecador y péselo hasta peso constante; registre peso en formato correspondiente.

## 8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

$$\%G = \left( \frac{T_2 - T_1}{W} \right) \times 100\%$$

Donde:

%G=Porcentaje de grasa en muestra seca.

$T_2$  = Peso del Tubo 3 con la grasa seca (mg).

$T_1$  = Peso del Tubo 3 vacío (mg).

W = Peso de la muestra (mg)

## 9. REGISTROS

Las muestras se analizarán por triplicado y se colocarán los datos en el siguiente registro:

Nombre de la Cepa	Fecha	Nº Tubo	Peso de muestra (W)	Peso de tubo vacío $T_1$	Peso de tubo con grasa $T_2$	Resultado (%G)	Promedio



**INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ**

Esquina Gamarra y General Valle s/n Chucuito Callao Telf: (051)- 016250800  
<http://www.imarpe.pe>