

**MEJORAMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS PRESENTES
EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA
DE CLORITO DE SODIO**

**SINDY JULIETH BELEÑO RODRÍGUEZ
JOHANNA XIMENA VILLAMIZAR SANDOVAL**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**MEJORAMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS PRESENTES
EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA
DE CLORITO DE SODIO**

**SINDY JULIETH BELEÑO RODRÍGUEZ
JOHANNA XIMENA VILLAMIZAR SANDOVAL**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

**Director
VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

**CRISÓSTOMO BARAJAS-FERREIRA
Ingeniero Químico M.Sc**

**Codirector
ANDRÉS FERNANDO BARAJAS-SOLANO
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIA

A Dios por regalarme la vida, la sabiduría y la fortaleza para superar cada prueba y etapa de la vida.

A mis padres Teresa y Víctor por su amor incondicional, apoyo, educación y sobre todo por ser mi mayor motivación e inspiración para salir adelante cada día.

Los amo.

A mis hermanas Jeanne y Jody y a mi futuro sobrino por ser mis grandes amores.

Todo esto es por ustedes.

A Yole, Ana y Diana por su cariño y sus consejos. Gracias por ser mis compinches, porque más que mis amigas son mis hermanas. Las quiero mucho.

A mi familia y en especial a mis abuelos y mi primo Javier, por sus afectos y por brindarme su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida.

A todos mis amigos con quienes compartí y experimente una formación profesional, por aguantarme y por tantos gratos y hermosos recuerdos.

A mi compañera, por su esmero y colaboración para sacar adelante este trabajo.

Sindy Julieth Beleño Rodríguez.

A Dios, por darme la vida, la salud y ser el motor de ella, porque ha estado conmigo en cada momento, cuidándome y dándome la fortaleza para seguir siempre adelante sin decaer, dándome inteligencia, sabiduría, paciencia, entendimiento y capacidad para alcanzar una de las metas más importantes de mi vida. Además por su infinito amor y bondad.

A mis padres Carlos Villamizar e Hilda Sandoval, Por haberme apoyado en cada momento quienes se han preocupado por mi bienestar y educación toda mi vida, por sus buenos consejos, sus valores, que han hecho de mí una gran persona, por la motivación y la confianza que han depositado en mí sin dudar ni un solo momento en mis capacidades, por todo el amor que día a día me demuestran los amo.

A mis hermanos Oscar y Natalia, por su comprensión y amor para mi superación personal, porque siempre me han apoyado incondicionalmente sin importar lo que haga.

A mi familia, por la confianza, apoyo e interés que han puesto durante mi vida.

A Hernán por ser un gran amigo, por su amor, su gran paciencia, su apoyo y estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos.

A mi compañera de trabajo por el compromiso y empeño que le pusimos para lograr este proyecto.

A todas y cada una de las personas que de alguna u otra manera, aportaron a hacer posible este triunfo, que me ha permitido crecer intelectualmente y aprender a ser persona.

Johanna Ximena Villamizar Sandoval

AGRADECIMIENTOS

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por confiar en nosotros, brindarnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo de grado, por toda su colaboración Y por su respaldo como director del proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO, por su apoyo, orientación, dedicación y valiosas enseñanzas en el desarrollo de este proyecto.

Grupo de investigación CIDES y al laboratorio de biomasa, por permitirnos contar con todos los medios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su atención, colaboración durante la ejecución de éste proyecto y su disposición para enseñarnos las normas de seguridad del laboratorio.

QUÍMICA NATALIA, por su ayuda y préstamos de equipos durante la ejecución de este proyecto.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su ayuda, enseñanzas, por su desinteresada colaboración y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, en especial a la Facultad de Físicoquímicas, los profesores de ingeniería química y todas aquellas personas que hicieron parte de nuestra formación profesional.

Nuestras familias y amigos por el constante apoyo y compañía.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. METODOLOGÍA	18
1.1 MÉTODOS DE CULTIVO	18
1.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
1.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINAZAS	19
1.4 MONTAJE EXPERIMENTAL	20
1.5 EXTRACCIÓN CON UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE CLORITO DE SODIO	21
1.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	22
1.7 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS	22
2. RESULTADOS	23
2.1 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS	23
2.2 BALANCE DE MASA	25
2.3 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL TRATAMIENTO	27
2.4 MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	29
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
4. CONCLUSIONES	34
5. RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
BIBLIOGRAFIA	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña. ...	20
Tabla 2. Diseño experimental	22
Tabla 3. Matriz de diseño con los resultados de carbohidratos obtenidos durante el tratamiento.....	23
Tabla 4. Porcentaje de la biomasa solubilizada en el tratamiento para cada experimento realizado.	27
Tabla 5. Resumen de los mejores experimentos para la extracción de carbohidratos.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del desarrollo experimental.	19
Figura 2. Porcentaje de monosacáridos extraídos en el tratamiento para cada experimento realizado.	25
Figura 3. Diagrama de Pareto de los efectos estándares teniendo como variable de repuesta: rendimiento del tratamiento.	28
Figura 4. Superficies de respuesta: Variables independientes a. Temperatura y 1/R; b. Tiempo y 1/R; c. Tiempo y Temperatura.	30
Figura 5. Comparación de los diferentes métodos para la extracción de carbohidratos.	33

RESUMEN

TITULO: MEJORAMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE CLORITO DE SODIO

AUTORES: SINDY JULIETH BELEÑO RODRÍGUEZ,
JOHANNA XIMENA VILLAMIZAR SANDOVAL **

PALABRAS CLAVES: microalgas, carbohidratos, vinazas, *Chlorella vulgaris*, extracción.

Las microalgas surgen como materia prima prometedora en la producción de biocombustibles ya que algunas especies contienen hasta un 40% de carbohidratos en peso seco. El principal problema que se presenta es el alto costo a la hora de realizar la extracción de este metabolito debido a que la disrupción de la pared celular representa un obstáculo a superar para la extracción efectiva y por lo que muchos tratamientos requieren de un pretratamiento.

Este estudio evalúa un método que consta de una etapa para la extracción de carbohidratos a partir de un tratamiento con una solución acidificada de clorito de sodio y la influencia de variables relación biomasa/solvente, temperatura y tiempo con el fin de mejorar el rendimiento en cuanto a la obtención de carbohidratos a partir de biomasa proveniente del cultivo de la microalga *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 utilizando como medio de cultivo vinazas. Se realiza un diseño de experimentos en el software STATISTICA 7.0 y se determina las mejores condiciones de extracción.

Los resultados muestran que el efecto de las variables juegan un papel importante en el proceso, la relación biomasa/solvente y la temperatura pueden afectar negativamente la extracción llegando a degradar los azúcares fermentables. Además el análisis de los resultados mostró que la mayor cantidad de carbohidratos se extrae a temperatura de 70°C, relación biomasa solvente 1:80 g/ml y tiempo de 4 h, obteniendo una productividad de 0,322 g de carbohidratos/g biomasa con grandes posibilidades como materia prima para la producción de bioetanol u otros productos.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Dr.Sc Viatcheslav Kafarov, M.Sc Crisostomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano.

ABSTRACT

TITLE: IMPROVEMENT OF THE EXTRACTION OF CARBOHYDRATE FROM *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 WITH A ACIDIFIED SOLUTION OF SODIUM CHLORITE^{*}.

AUTHORS: SINDY JULIETH BELEÑO RODRÍGUEZ,
JOHANNA XIMENA VILLAMIZAR SANDOVAL^{**}

KEYWORDS: Microalgae, carbohydrate, vinasse, *Chlorella vulgaris*, extraction.

Microalgae are emerging as promising feedstock in the production of biofuel, since some of these species contain up to 40% dry weight of carbohydrates. The fundamental problem resides in the high costs when performing the extraction of this metabolite because the disruption of the cell wall is an obstacle to overcome for effective extraction and therefore many treatments require pretreatment.

This study evaluates a method which comprises a step for extraction of carbohydrates starting from a treatment with an acidified solution of sodium chlorite and the influence of variables biomass/solvent ratio, temperature and time in order to improve performance in terms to obtain carbohydrates from biomass from the cultivation of microalgae *Chlorella* UTEX 1803 *Vulgaris* using vinasse as a cultivation medium. A design of experiments was performed in the STATISTICA 7.0 software and also the best extraction conditions were determined.

Results shown that the effect of the variables play a role in the process, the biomass / solvent ratio and the temperature can negatively influence the extraction, degrading fermentable sugars. Also, the analysis of the results showed that most amount of carbohydrates are extracted at 70°C, biomass/solvent at 1:80 g/ml and time 4 h, getting a productivity of 0,322 g carbohydrate / g biomass with great potential as a feedstock for the production of bioethanol or other products.

^{*} Proyecto de Grado

^{**} Facultad de Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Dr.Sc Viatcheslav Kafarov, M.Sc Crisostomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son consideradas como una de las fuentes de materia prima renovable más prometedoras para la producción de biocombustibles, ya que posee grandes ventajas como: rápido crecimiento, alta eficiencia en la fijación de CO₂, no compiten por tierras cultivables y agua potable, además tienen el potencial de acumular cantidades considerables de lípidos, carbohidratos (Chen *et al.*, 2013) y proteínas para la producción de suplementos alimenticios (Iwamoto, 2003).

Los carbohidratos son el mayor producto derivado de la fotosíntesis y el metabolismo de fijación de carbono (Ho *et al.*, 2011), los cuales son acumulados en los plástidos como material de reserva (almidón), o en la pared celular (celulosa, pectina y polisacáridos sulfatados) (Chen *et al.*, 2013), sin embargo el metabolismo tanto de la celulosa y el almidón varía significativamente entre géneros y especies (Rangel-Yaguí *et al.*, 2004; Rizmani-Yazdi *et al.*, 2011). Se ha comprobado que géneros como *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, y *Tetraselmis* acumulan una gran cantidad de carbohidratos (> 40% de su peso seco) (John *et al.*, 2011); para el caso de *Chlorella vulgaris* se ha encontrado que puede contener entre 37% y 55% de carbohidratos (Brennan y Owende, 2010; Dragone *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Illman *et al.*, 2000). Para aprovechar estos carbohidratos es necesario realizar un proceso de disrupción celular de manera que la pared celular externa (compuesta principalmente de pectina, agar y alginato) y la interna (compuesta de celulosa y otros materiales como hemicelulosa y glicoproteína) (Yamada *et al.*, 1982) sean destruidas con el fin de liberarlos (Chundawat *et al.*, 2011); además es necesario realizar un (o varios) pretratamiento que mejoren el proceso de extracción de los azúcares fermentables. Sin embargo ya que los procesos de pretratamiento contribuyen

significativamente en el costo, el pretratamiento seleccionado debe ser económicamente atractivo, simple de aplicar, energéticamente eficiente y tener un bajo potencial de degradación (Harun *et al.*, 2011).

Uno de los principales problemas en el aprovechamiento de los diferentes metabolitos microalgales es la etapa de extracción (Serive *et al.*, 2012), debido a que los carbohidratos en biomasa de microalgas son esencialmente celulosa en la pared celular, almidón en los plástidos sin lignina y hemicelulosas de bajo contenido, que pueden ser fácilmente transformados en azúcares fermentables, sin embargo la disrupción de la pared celular representa el principal obstáculo a superar para la extracción efectiva de los diferentes metabolitos (Barsanti & Gualtieri, 2006; Sing, 2011); sin embargo, hasta la fecha son muy pocos los estudios enfocados en el uso de estos carbohidratos a partir de microalgas para la producción de bioetanol, lo cual requiere un mayor entendimiento y conocimiento para apoyar la viabilidad técnica de esta materia prima de última generación (Chen *et al.*, 2013), una de las principales razones es el costo de transformación, los cuales siguen siendo demasiado altos para ser rentables (Serive *et al.*, 2012). Debido a esto el desarrollo de técnicas de extracción en microalgas se ha convertido en un campo de creciente interés para la comunidad científica.

En la actualidad se encuentran numerosos trabajos sobre la extracción de los metabolitos presentes en la biomasa. Harun *et al* (2011) utilizaron un tratamiento alcalino para la extracción de carbohidratos donde el rendimiento máximo fue de 35,01% de los carbohidratos totales, trabajando a 120°C, 0,75% w/v de NaOH durante 30 minutos; el mayor problema de esta técnica son los altos costos energéticos sin obtener rendimientos significativos. Para la hidrolisis enzimática a pesar de los altos rendimientos obtenidos por Ho *et al.* (2012) este no es un método viable debido a que estos valores no compensan lo caro que puede llegar a ser el tratamiento por el alto costo de las enzimas (Harun y Danquah, 2011; Daroch *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). El proceso de tratamiento ácido es

preferible, ya que aporta una mayor eficiencia en la conversión de materiales celulósicos, las condiciones ácidas pueden conducir a la descomposición de los azúcares en compuestos no deseados que inhiben el proceso de fermentación (Girio *et al*, 2010; Harun *et al*, 2010; Moxley & Zhang, 2007). Debido a esto durante este proceso influyen significativamente diversos parámetros en la cantidad total de azúcares fermentables tales como: el tiempo del proceso, la temperatura, la cantidad de sustrato y la concentración del ácido (Harun *et al* 2011a).

Sui *et al.* (2012) realizaron la extracción de polisacáridos de una especie de *Chlorella* utilizando un tratamiento con una solución de clorito de sodio acidificada con ácido acético a una temperatura de 75°C, relación biomasa/solvente de 1/80 ml/g durante 4 horas , encontrando que cantidades considerables de polisacáridos pueden ser extraídos después del tratamiento de las células (rendimiento de polisacárido recuperado, 19-22%), esto se debe a que el dióxido de cloro generado logra tanto la ruptura de la pared celular como la extracción de carbohidratos (Núñez y Pavlik, 1999).

Es por ello que el objetivo principal de esta investigación es mejorar el método de extracción empleado por Sui *et al.*(2012), que consta de solo 1 etapa para la extracción de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la biomasa obtenida de la cepa *Chlorella Vulgaris*, utilizando como medio de cultivo para la obtención de la biomasa vinazas efluentes de la industria del etanol producido con melaza de caña de azúcar y como tratamiento una solución ligeramente acidificada de clorito de sodio. Para lograr mejores resultados de extracción se investiga los efectos de las variables de proceso, tales como el tiempo, la temperatura, la relación biomasa/solvente. La técnica de diseño compuesto central (CCD) se utiliza para la optimización del proceso.

1. METODOLOGÍA

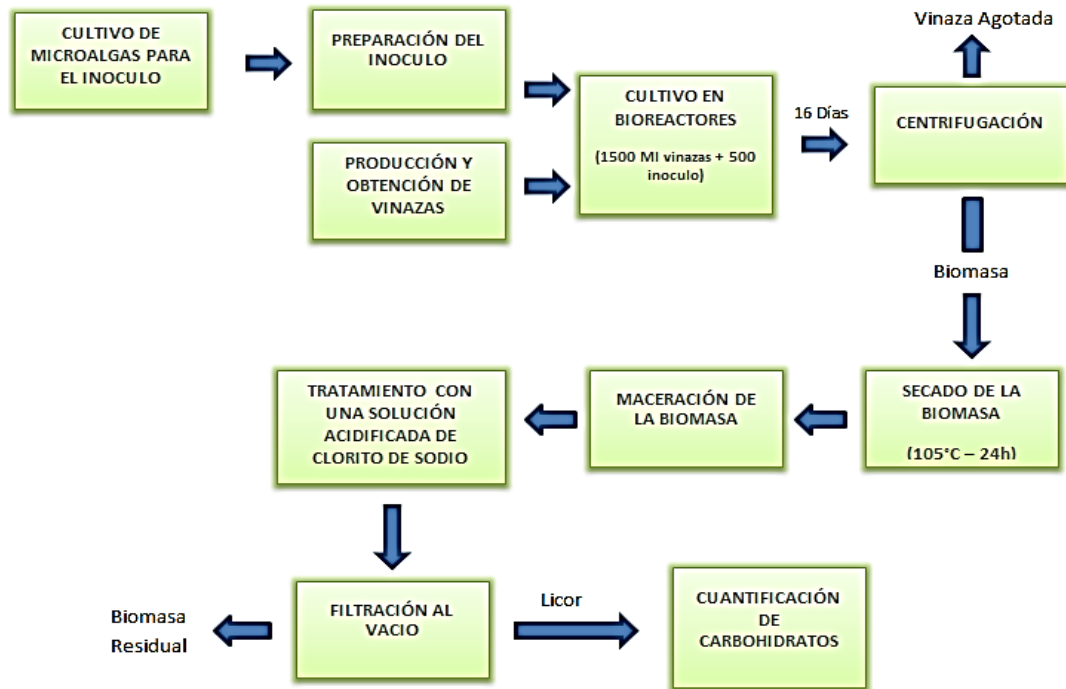
1.1 MÉTODOS DE CULTIVO

Chlorella vulgaris UTEX 1803 fue adquirida de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L de macronutrientes es: NaNO_3 (2,94), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-1}$), NaCl ($4,28 \times 10^{-1}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-1}$), KH_2PO_4 (1,29), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-1}$) y micronutrientes (mg/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-2}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-3}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-3}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-3}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-3}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-1}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-1}$), KOH ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

Para el cultivo inicial se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14cm y 35cm de altura con un volumen del cultivo de 2000 mL. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 2 L/min y condiciones de temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO_2 considerándose este cultivo como el tratamiento control.

1.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Figura 1. Descripción del desarrollo experimental.



1.3 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINAZAS

El medio de cultivo usado para la obtención de biomasa fue vinazas, cuya composición se muestra en la tabla 1. Las vinazas fueron obtenidas de la producción de alcohol etílico a partir de melaza de caña fermentada de manera anaerobia en un proceso de evaporación sin recirculación en el Laboratorio de Procesos de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

La fermentación se realizó en un tanque en el cual se diluyeron 45 Kg de melaza comercial en 151 litros de agua agitando manualmente la mezcla hasta alcanzar aproximadamente 18° Brix, luego, se procedió a realizar el proceso de

pasteurización elevando la temperatura hasta 80°C utilizando vapor de agua, posteriormente se enfrió hasta 40°C por medio de un serpentín utilizando agua como medio de enfriamiento y se ajustó el pH a 4,2 mediante la adición de ácido sulfúrico al 95% de pureza. El inóculo fue preparado utilizando 20 litros de la mezcla y adicionando una serie de activadores que permiten un ambiente más propicio para el crecimiento de 500 g de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; los activadores y su respectiva cantidad fueron: cloruro de amonio (144g), sulfato de magnesio (24g), úrea (24g) y roca fosfórica (10g), el inóculo se aireó por 30 min y posteriormente se agregó al tanque que contenía la mezcla inicial donde se aireó por una hora y se tapó para el inicio del proceso de fermentación, el cual se llevó a cabo durante 3 días. A continuación se procedió a la evaporación del mosto con el uso de un evaporador a 94°C obteniendo como producto un alcohol de un 32% de pureza y como producto de desecho la vinaza utilizada como sustrato para el crecimiento de *C. vulgaris*.

Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña.

SUSTANCIA	CONTENIDO PROMEDIO
Fósforo (g P/L)	0,055 – 0,057
Potasio (g K/L)	24,60 – 24,62
Sodio (g Na/L)	0,57 – 0,58
Nitrógeno total (g N/L)	2,318 – 2,376
Carbono Orgánico Total (g/L)	2,137 – 2,138

Fuente: Laboratorio Químico de Consultas Industriales (LQCI) de la UIS.

1.4 MONTAJE EXPERIMENTAL

500 mL de inóculo de *C. vulgaris* UTEX 1803 fueron mezclados con 1500 mL de vinazas en reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm de altura. Los reactores se conectaron a un sistema de aireación por burbujeo

para la inyección de aire con un flujo de 2 L/min y condiciones de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sin control de pH. Debido al color oscuro de las vinazas que impide el paso de luz homogéneamente en todo el reactor, se recubrieron los reactores para impedir el paso de luz y así evitar posibles ruidos en la medición por procesos fotosintéticos permitiendo así un ciclo de oscuridad de 24h; el cultivo tuvo una duración de 18 días.

Transcurridos los 18 días, la biomasa producida se recuperó mediante centrifugación a 3600 rpm durante 15 minutos. Una vez separada de las vinazas, la biomasa recuperada fue secada a 105°C durante 24 horas. Después de obtener la biomasa seca se almacenó en bolsas plásticas sellables hasta el momento de su uso.

1.5 EXTRACCIÓN CON UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE CLORITO DE SODIO

Para la extracción de carbohidratos se partió del método descrito por Sui *et al.* (2012), el cual consiste en adicionar 5 g de biomasa seca previamente macerada a un Erlenmeyer con 400 mL de una solución de clorito de sodio (1 % p/v) y levemente acidificada con 1 mL de ácido acético glacial. La mezcla se calentó en un baño maría durante 4 horas a 75°C .

Una vez transcurrido el tiempo, el recipiente se sacó del baño y el extracto obtenido fue llevado a un proceso de filtración al vacío, obteniendo finalmente el licor en el Erlenmeyer y biomasa residual en el papel filtro. El licor obtenido se le realizó cuantificación de carbohidratos y la biomasa residual fue secada y posteriormente pesada.

1.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del diseño experimental se realiza en la herramienta informática STATISTIC 7.0. El diseño realizado está basado en composición central factorial 3^3 de 17 experimentos con replica (Tabla 2), éste fue realizado para evaluar el efecto de la variables relación biomasa/solvente, tiempo y temperatura.

Tabla 2. Diseño experimental

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Relación Bio/Slte (g/mL)	1:40	1:40	1:120	1:120	1:80	1:40	1:40	1:120	1:120	1:80	1:13	1:146	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
Temperatura (°C)	50	90	50	90	70	50	90	50	90	70	70	70	36	104	40	70	70
Tiempo (h)	2	6	6	2	4	6	2	2	6	4	4	4	4	4	0,7	7	4

* *Bio: Biomasa, Slte: Solvente*

1.7 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Se tomó una muestra de 1mL de cada licor al cual se le adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico al 95.5% y se procedió a homogenizar las muestras. Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 480nm 485nm 487nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa, Fructosa, Galactosa y Glucosa respectivamente.

2. RESULTADOS

2.1 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

La matriz de diseño experimental completa con los respectivos resultados de la cantidad de carbohidratos extraído durante el desarrollo de cada ensayo en términos de la media, la varianza y la desviación estándar se muestra en la tabla 3, siendo los ensayos 5, 10 y 17 repeticiones del punto central.

Tabla 3. Matriz de diseño con los resultados de carbohidratos obtenidos durante el tratamiento.

Prueba	Relación Bio/Site * (g/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Carbohidratos			Rendimiento %
				Media (g/g)	Varianza (g/g) ²	Desviación estandar(g/g)	
1	1:40	50	2	0,0029	7,05E-07	8,40E-04	0,73
2	1:40	90	6	0,0457	1,73E-04	1,31E-02	11
3	1:120	50	6	0,0778	6,21E-04	2,49E-02	19
4	1:120	90	2	0,2321	1,60E-03	4,00E-02	58
5 (c)	1:80	70	4	0,3222	7,32E-06	2,71E-03	81
6	1:40	50	6	0,0076	6,41E-06	2,53E-03	2
7	1:40	90	2	0,2429	2,99E-03	5,47E-02	61
8	1:120	50	2	0,0455	7,87E-05	8,87E-03	11
9	1:120	90	6	0,1802	6,72E-03	8,20E-02	45
10 (c)	1:80	70	4	0,3222	7,32E-06	2,71E-03	81
11	1:13	70	4	0,0203	1,96E-05	4,43E-03	5
12	1:146	70	4	0,0497	3,33E-04	1,82E-02	12
13	1:80	36	4	0,0879	3,47E-03	5,89E-02	22
14	1:80	103,5	4	0,0364	1,50E-05	3,88E-03	9
15	1:80	70	0,65	0,2268	2,92E-04	1,71E-02	57
16	1:80	70	7,35	0,1604	2,67E-03	5,17E-02	40
17 (c)	1:80	70	4	0,3222	7,32E-06	2,71E-03	81

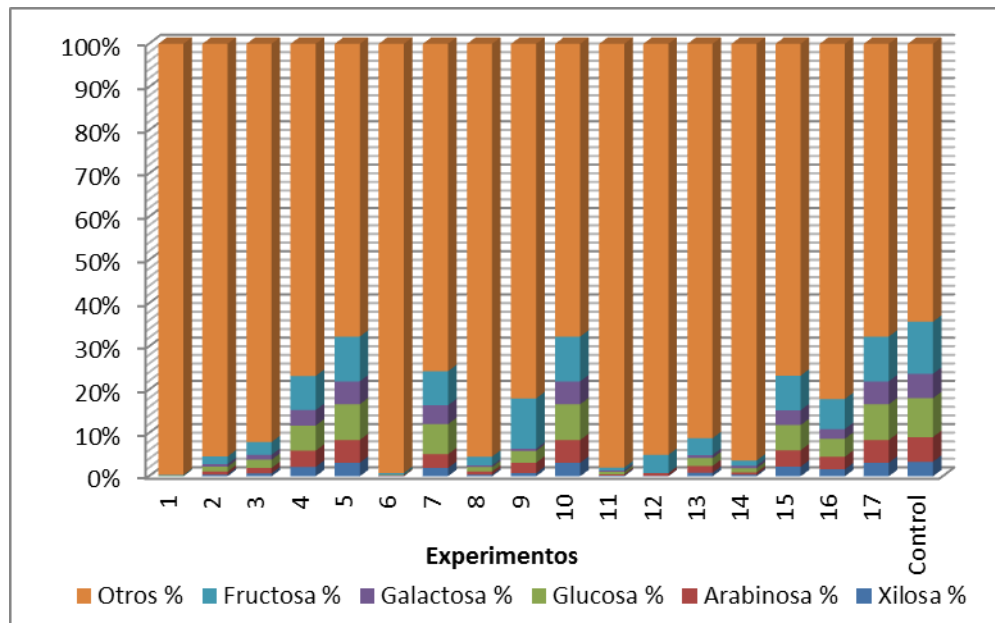
* Bio: Biomasa, Site: Solvente

Como se observa en la tabla 3 los valores de desviación estándar son bajos, indicando la buena precisión de los valores medidos de la cantidad de carbohidratos extraídos. Al comparar los resultados obtenidos se aprecia que la mejor extracción de carbohidratos ocurre a una temperatura de 70 °C, relación biomasa/solvente de 1:80 g/mL, durante 4h, obteniendo hasta 0,322 g de carbohidratos/g de biomasa y rendimiento del 81%.

El grupo de monosacáridos evaluados fueron: Xilosa, Arabinosa, Galactosa, Glucosa, y fructosa (Figura 2). La glucosa junto con la fructosa fueron los monosacáridos con mayor extracción en la biomasa, encontrando los mayores porcentajes de extracción entre 7-10% de la biomasa inicial. A diferencia de estos monosacáridos la xilosa presentó los más bajos porcentajes de extracción del grupo.

El experimento de nombre "Control" de la figura 2 corresponde a las mismas condiciones que realizó la extracción el autor Sui *et al.* (2012).

Figura 2. Porcentaje de monosacáridos extraídos en el tratamiento para cada experimento realizado.



Durante el tratamiento se observa que el licor producto de la extracción es de color verde claro, indicando la presencia de clorofila en la biomasa sometida al tratamiento. La solución acidificada de clorito de sodio además de extraer carbohidratos también tiene la propiedad de liberar los pocos pigmentos que la biomasa tiene guardado.

2.2 BALANCE DE MASA

Se realiza un balance de masa para cada prueba con el fin de obtener datos cuantitativos de la cantidad de biomasa que entró, solubilizó y resultó como residuo del proceso y así saber cuáles fueron los porcentajes de solubilización de carbohidratos por cada gramo de biomasa solubilizada (tabla 4). Para esto se aplica la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Biomasa}_{Inicial} - \mathbf{Biomasa}_{Residual} = \mathbf{Biomasa}_{Solubilizada} \quad (1)$$

Donde la biomasa inicial es la arrojada por el diseño de experimentos reflejado en la Tabla 1.

Para cuantificar la biomasa residual, se tomó el peso del papel filtro antes de ser utilizado en la etapa de filtración en donde se depositó tal biomasa, se envió por 24 horas a horno a 105°C y 12 horas en desecador y finalmente se pesó el papel filtro usado. La biomasa residual del proceso es el resultado de la diferencia entre peso final y el peso inicial del papel filtro.

La biomasa solubilizada, es la diferencia entre la biomasa inicial y la biomasa residual.

El porcentaje de solubilización de carbohidratos se calcula de acuerdo a la ecuación 2.

$$\% \text{ Solubilización carbohidratos} = \frac{\text{g Carbohidrato solubilizado}}{\text{g carbohidratos iniciales}} * 100 \quad (2)$$

En la tabla 4 se muestra la cantidad de masa solubilizada para cada ensayo durante el tratamiento. En general se observaron pérdidas de biomasa cercanas a un 38%, donde el mayor porcentaje de solubilización de carbohidratos se observa en los ensayos 5,10 y 17. Al igual se puede observar que las pruebas 2, 9 y 14 presentan mayores porcentajes de biomasa solubilizada y menor porcentaje de solubilización de carbohidratos y como consecuencia porcentajes de perdidas mayores. Las altas temperaturas afecta negativamente generando la degradación de los azúcares fermentables, esta es la razón por la cual en algunas pruebas se obtienen porcentajes de extracción bajos.

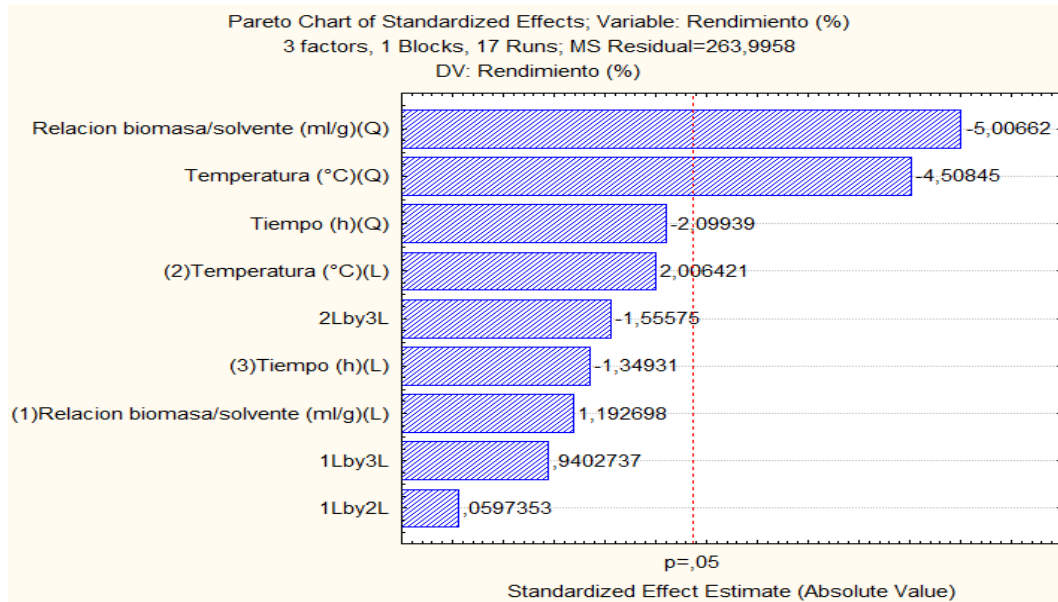
Tabla 4. Porcentaje de la biomasa solubilizada en el tratamiento para cada experimento realizado.

PRUEBAS	%Biomasa solubilizada	% Solubilización carbohidratos
1	52,24	0,73
2	72,27	11,42
3	48,42	19,44
4	72,93	58,04
5	64,18	80,54
6	49,48	1,89
7	60,14	60,72
8	51,66	11,39
9	83,76	45,05
10	64,18	80,54
11	43,18	5,08
12	64,72	12,43
13	46,38	21,99
14	76,34	9,11
15	56,89	56,70
16	66,28	40,10
17	64,18	80,54
Control	63,55	89,32

2.3 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL TRATAMIENTO

Usando los datos obtenidos y empleando el software STATISTICA 7.0 se realizaron los diagramas de Pareto y las superficies de respuesta que nos permiten observar el efecto que tienen las variables temperatura, tiempo y relación biomasa/solvente sobre el proceso de extracción de carbohidratos con una solución acidificada de clorito de sodio.

Figura 3. Diagrama de Pareto de los efectos estándares teniendo como variable de respuesta: rendimiento del tratamiento.



En el diagrama de Pareto presentado en la figura 3 se observa la significancia de las variables y sus interacciones, sobre el rendimiento de los carbohidratos iniciales, teniendo en cuenta que los carbohidratos corresponden al 40% de la biomasa seca total (Ho et al, 2012). Los bloques que no pasan el umbral (línea roja punteada), refieren a los efectos no significativos, que para este diseño es el tiempo y las interacciones de las tres variables. El efecto más importante lo causan la relación biomasa/solvente y la temperatura separadamente, produciendo una reducción en la extracción de carbohidratos.

En las superficies de respuesta se grafica el rendimiento del tratamiento como función de dos de las variables estudiadas manteniendo la otra constante en su punto medio. Los perfiles para valores predichos muestran el cambio de la variable respuesta “rendimiento” para las variaciones de cada una de las variables estudiadas.

La figura 4 muestra las superficies de respuestas de las variables de estudio. En la superficie de respuesta a tiempo constante se ve que el rendimiento de la extracción aumenta con la relación biomasa/solvente, llegando a un máximo que se encuentra aproximadamente en 1:80 g/mL y luego comienza a disminuir, un efecto similar se observa en la temperatura para un máximo cercano entre los 70-75 °C. Para la superficie de respuesta a relación biomasa/solvente constante se puede observar que tiene una forma cóncava hacia abajo, viendo nuevamente el máximo para la temperatura; con respecto al tiempo se puede ver que aparentemente para un tiempo entre 3-4 h el rendimiento es máximo. En la superficie de respuesta c. se observa que el máximo para la relación biomasa/solvente es el mismo mostrado en las gráficas anteriores.

2.4 MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

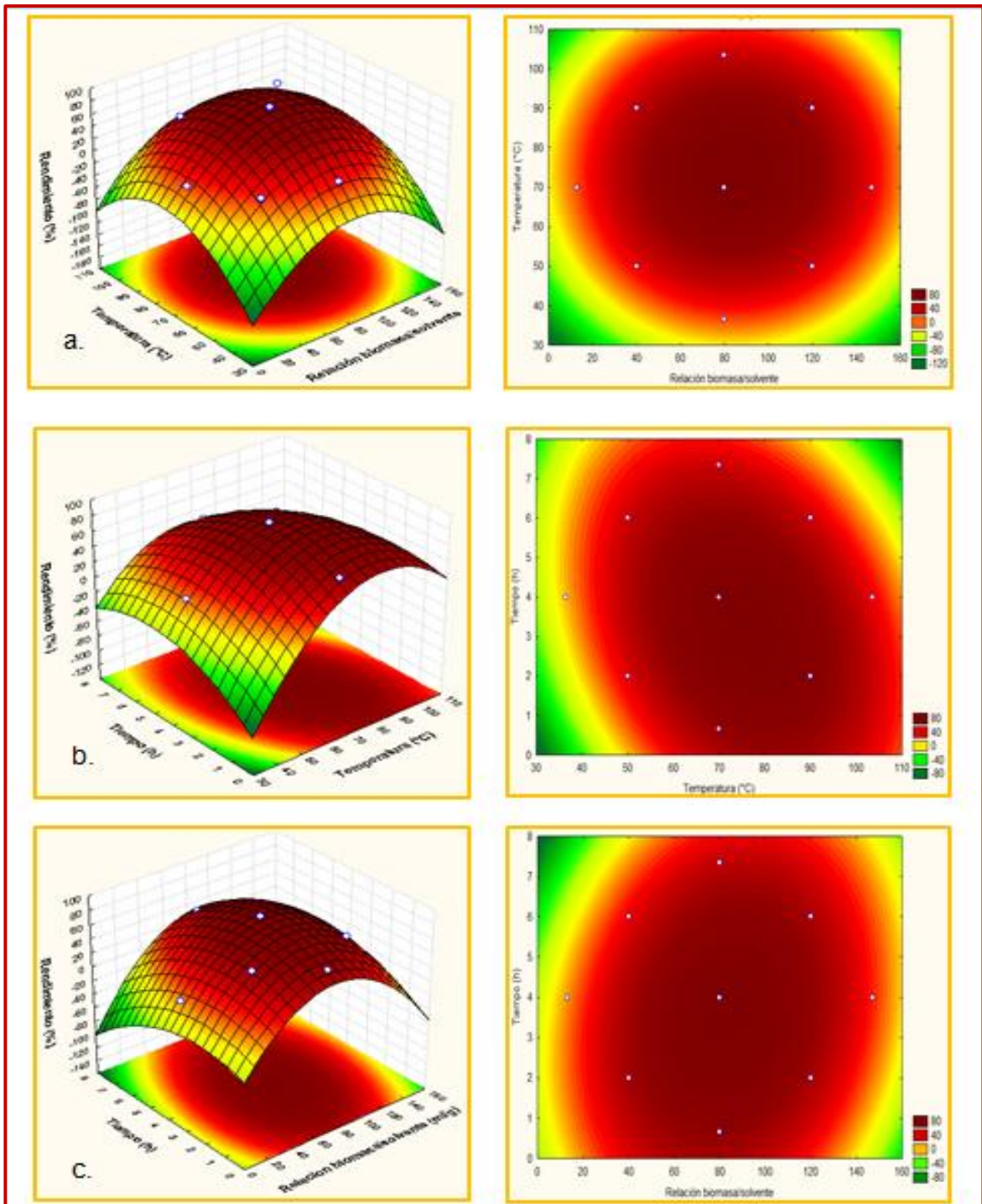
La tabla 5 presenta las mejores condiciones y los resultados de los experimentos para la extracción de carbohidratos. El mayor rendimiento de los carbohidratos iniciales se presenta a las condiciones 1:80; T: 70°C; t: 4h.

Tabla 5. Resumen de los mejores experimentos para la extracción de carbohidratos.

Relación Bio/Slte * (g/mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Carbohidratos Extraídos (g/g)	Rendimiento %
1:120	90	2	1,1607	58
1:80	70	4	1,6109	81
1:40	90	2	1,2144	61
1:80	70	0,65	1,1341	57

*Bio:Biomasa, Slte:Solvente.

Figura 4. Superficies de respuesta: Variables independientes a. Temperatura y 1/R; b. Tiempo y 1/R; c. Tiempo y Temperatura.



3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El presente estudio revela que la extracción de carbohidratos empleando una solución acidificada de clorito de sodio es una técnica prometedora para la industria de bioetanol y biorefinería debido a los altos porcentajes de carbohidratos extraídos. La técnica consiste en tratar el material orgánico con solución de clorito de sodio a la que se le agrega ácido acético hasta pH alrededor de cuatro, para generar dióxido de cloro (Núñez y Pavlik, 1999). La efectividad de la solución acuosa de dióxido de cloro disminuye cuando el PH aumenta (E.P.A., 1999). Las sustancias de naturaleza orgánica reaccionan con dióxido de cloro causando la interrupción de distintos procesos celulares. El dióxido de cloro es un agente oxidante que reacciona directamente con aminoácidos y el ARN de la célula, atacando la estructura celular o los ácidos en el interior de esta y evitando la formación de proteínas. El dióxido de cloro afecta la membrana celular cambiando las proteínas y grasas de la membrana e interfiriendo en la inhalación. Cuando el dióxido de cloro penetra en la pared celular se da paso a extracción de carbohidratos, dando lugar a los buenos resultados obtenidos durante la extracción.

Si se analiza los experimentos y sus respectivos resultados de la extracción de carbohidratos se puede observar las variables más influyentes en el tratamiento como lo son la temperatura y la relación biomasa solvente, afectando negativamente la obtención de azúcares fermentables. Los mejores resultados de la extracción ocurren a temperaturas entre 70-90 °C, cabe notar que el tiempo de exposición debe ser de 2-4 h, debido a que exponer la muestra por mucho tiempo a altas temperaturas puede llegar a degradar los azúcares fermentables.

El mayor porcentaje de rendimiento de los carbohidratos iniciales alcanzado fue de 81%, usando temperatura de 70°C, tiempo de 4 h y relación biomasa/solvente de 1:80 g/ml, presentando diferencias significativas con los demás experimentos, mostrando así el efecto negativo de la temperatura y la relación biomasa/solvente. Al comparar el rendimiento máximo obtenido con respecto al método Sui *et al.* (2012) donde el rendimiento máximo fue de 89% de los carbohidratos iniciales trabajando a 75 °C y a las mismas condiciones de relación biomasa/solvente y tiempo, se observa que una variación de 5°C representa una diferencia mínima en el porcentaje de carbohidratos extraídos. Cabe notar que el autor Sui *et al.*, (2012) realiza un fraccionamiento de los carbohidratos para la extracción de ellos.

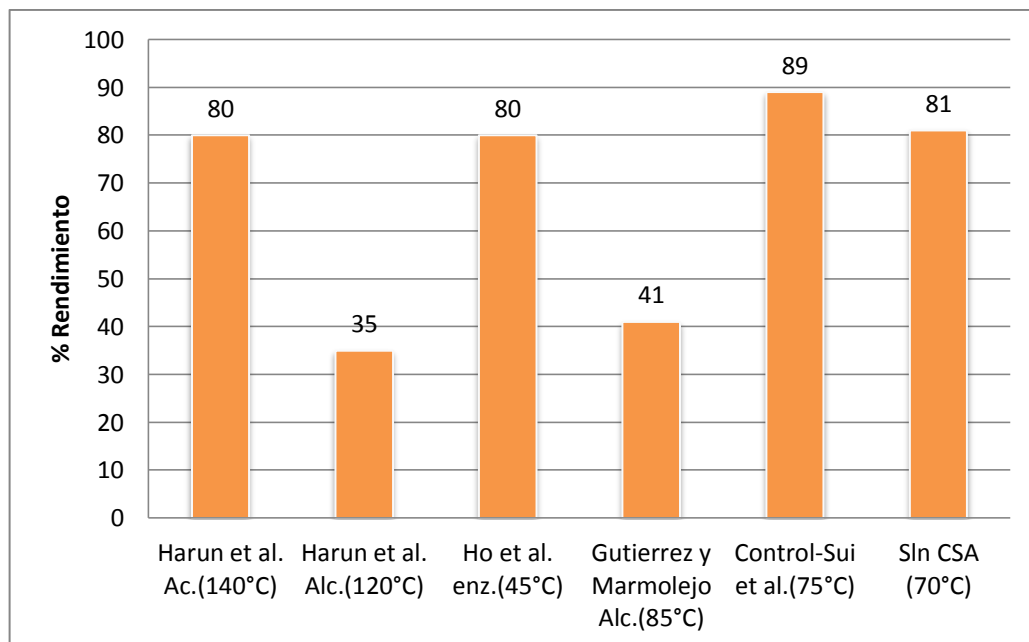
Gutiérrez y Marmolejo (2013) trabajaron evaluando un método que constó de dos etapas para la extracción de proteínas y carbohidratos utilizando un pre-tratamiento alcalino, estos autores lograron extraer cantidades altas de carbohidratos de 2,92 g/L en donde se obtuvo un rendimiento de los carbohidratos iniciales del 41 %, a temperatura de 85°C, molaridad de 3M y relación solvente / biomasa de 45 mL/g, sin embargo estas cantidades son menores a las extraídas en este estudio. Se puede observar que aunque el pre-tratamiento alcalino es eficiente no es tan significativo como el tratamiento con una solución de clorito de sodio acidificada debido a que su extracción de carbohidratos ocurre a una temperatura de 85°C dando lugar a un incremento en el consumo energético.

Harun *et al.* (2011) realizaron un tratamiento alcalino de la biomasa de microalgas de la especie *Chlorococcum infusionum*, variando las condiciones de temperatura, el tiempo de tratamiento y la concentración de NaOH, estos autores obtuvieron un rendimiento máximo de 35,01% de los carbohidratos iniciales, trabajando a 120°C, 0,75% w/v de NaOH durante 30 minutos, siendo menos eficiente en la extracción de carbohidratos en comparación con el presente estudio.

Si ahora se compara con el estudio realizado por Harun *et al.* (2011) donde emplea un tratamiento ácido obteniendo el mayor rendimiento (80%) a 140 °C durante 60 min, se puede observar que el presente trabajo representa menos gasto energético.

Otro trabajo con el cual se pueden generar comparaciones es el de Ho *et al.* (2012), en el cual utilizando la hidrólisis enzimática de *C. vulgaris* SP obtienen rendimientos cercanos a este estudio, alrededor del 80%. Sin embargo estos valores en el rendimiento no compensan lo costoso que puede llegar a ser la hidrólisis enzimática, es decir no permite obtener una buena relación rendimiento/costo de proceso en comparación con otros tratamientos (Harun y Danquah, 2011; Daroch *et al.*, 2013) debido a que algunas enzimas son muy caras y por lo tanto, el tratamiento enzimático no es un método viable (Zhao *et al.*, 2013).

Figura 5. Comparación de los diferentes métodos para la extracción de carbohidratos.



4. CONCLUSIONES

Mediante el tratamiento de clorito de sodio acidificado se logró obtener un porcentaje del 81% de extracción de carbohidratos de la microalga *Chlorella vulgaris*, una diferencia de 5°C por debajo del método utilizado como referencia representa una diferencia mínima en el porcentaje de carbohidratos extraídos.

La extracción de carbohidratos empleando una solución de clorito de sodio acidificada presentó un incremento significativo en la productividad llegando a obtener hasta 0,322 g de carbohidratos/g de biomasa con grandes posibilidades como materia prima para la producción de bioetanol u otros productos.

El análisis del efecto de las variables: tiempo, relación biomasa/solvente y temperatura mostró que un aumento de la relación biomasa solvente y de la temperatura afecta negativamente la extracción de los carbohidratos.

Tratamiento de una solución de clorito de sodio acidificada es la mejor forma de extracción de carbohidratos debido a que no necesita un pre-tratamiento para lograr la disrupción celular, sino solo se lleva a cabo en una etapa logrando tanto la ruptura de la pared celular como la extracción de carbohidratos haciendo este un método más sencillo a la hora de realizar.

Este método es energéticamente más eficiente, se usa menos tiempo y menos temperatura que los métodos empleados actualmente.

5. RECOMENDACIONES

Implementar el tratamiento de la solución acidificada de clorito de sodio para la extracción de metabolitos con potencial de valor como lípidos y proteínas.

Para futuros trabajos se propone realizar este tratamiento a microalgas con paredes celulares complejas y altos contenidos de metabolitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Barsanti, P. Gualtieri, “Algae- Anatomy, Biochemistry, and biotechnology” *Journal of Plant physiology*, vol. 134, n°3, 2007.
- [2] L. Brennan, P. Owende, “Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products” *Renewable and Sustainable Energy Review*, vol. 14, n°2, pp. 557–577, 2010.
- [3] C.-Y. Chen, X.-Q. Zhao, H.-W. Yen, S.-H. Ho, C.-L. Cheng, D.-J. Lee, F.-W. Bai, J.-S. Chang, Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 78, pp. 1-10, 2013.
- [4] S.P.S. Chundawat, G.T. Beckham, M.E. Himmel, B.E. Dale, “Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals”, *Annu. Rev. Cell Biomol.*, vol. 2, pp. 121–145, 2011.
- [5] M. Daroch, S. Geng, G. Wang, “Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks” *Applied Energy*, vol. 102, pp. 1371–1381, 2013.
- [6] G. Dragone, B.D. Fernandes, A. P. Abreu, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, “Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae” *Applied Energy*, vol. 88, n°10, pp. 3331–3335, 2011.
- [7] M. Dubois, K. Gilles, P. Rebers y F. Smith, «Colorimetric Method for determination of Sugars and Related Substances» *Analytical Chemistry*, vol. 3, n° 28, pp. 350-356, 1956.

- [8] S. Fon-Sing, A. Isdepsky, M.A. Borowitzka, N.R. Moheimani, "Production of biofuels from microalgae" *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, vol. 18, n°1, pp.47-72, 2013.
- [9] F.M. Girio, C.Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marqués, R. Bogel-Lukasik, "Hemicelluloses for fuel ethanol: a review" *Bioresource Technology*, vol. 101, n° 13, pp. 4775–4800.
- [10] D. Gutierrez y C. Marmolejo, "Diseño de un sistema de dos etapas para la extracción de proteínas de microalgas. Bucaramanga, 2013. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de físicoquímicas.
- [11] R. Harun, M.K. Danquah, "Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production" *Chemical Engineering Journal*, vol 168, pp. 1079–1084, 2011
- [12] R. Harun, M.K. Danquah, "Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production" *Process Biochemistry*, vol. 46, n°1, pp. 304–309, 2011.
- [13] R. Harun, M.K. Danquah, G.M. Forde, "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production" *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 85, n°2, pp. 199–203, 2010.
- [14] R. Harun, W. Jason, T. Cherrington, M.K. Danquah, "Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production" *Applied Energy*, vol. 88, pp. 3464-3467, 2011.

- [15] S.H. Ho, S.-W. Huang, C.Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.-S. Chang, "Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock" *Bioresource Technology*, vol. 135, pp. 191-198, 2013.
- [16] S.H. Ho, S.W. Huang , C.Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.-S. Chang, "Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E" *Bioresource Technology*, vol. 135, pp. 157-165, (2013).
- [17] S.H. Ho, C.Y. Chen, J.S. Chang, "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N" *Bioresource Technology*, vol.113, pp.244–252, 2012.
- [18] S.H. Ho, C.Y. Chen, D.J. Lee, J.S. Chang, "Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems- a review" *Biotechnology Advances*, vol 29, pp.189–198, 2011.
- [19] A.M. Illman, A.H. Scragg, S.W. Shales, "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen médium" *Enzyme Microbial Technology*, vol 27, n°8, pp. 631–635, 2000.
- [20] H. Iwamoto. "Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- major industrial species: *Chlorella*". Richmond A. (Ed.), *Handbook of Microalgae Biotechnology*, Black-well Publishing, Oxford, pp. 255-263, 2003.
- [21] R.P. John, G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, "Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioetanol" *Bioresource Technology*, vol. 102, n°1, 186–193, 2011.

- [22] G. Moxley, Y.H.P. Zhang, “More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification” *Energy Fuels*, vol. 21, n°6, 3684–3688, 2007.
- [23] C. Núñez, C. Pavlik, “Disgregado de tejidos leñosos por el método clorito – ácido acético - carbonato. Evaluación del daño producido a las fibras.” *Revista de Ciencia y Tecnología*, Año 2 , N° 2, 1999.
- [24] C.D. Rangel-Yagui, E.D.G. Danesi, J.C.M. de Carvalho, S. Sato, Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process, *Bioresour. Technol.*, vol.92, pp.133–141, 2004.
- [25] H. Rismani-Yazdi, B.Z. Haznedaroglu, K. Bibby, J. Peccia, Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels, *BMC Genomics* 12 (2011) 148.
- [26] B. Serive, R. Kass, J.B. Bérard, V. Pasquet, L. Picot y J.-P. Cadoret, “Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae” *Bioresource Technology*, vol. 124, pp. 311-320, 2012.
- [27] Z. Sui, Y. Gizawb, J.N. BeMiller, “Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*” *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, pp. 1– 7, 2012.
- [28] T. Yamada, K. Sakaguchi, “Comparative studies on *Chlorella* cell walls – induction of protoplast formation” *Arch. Microbiol.* , vol. 132, pp. 10–13, 1982.
- [29] G. Zhao, X. Chen, L. Wang, S. Zhou, H. Feng, W.N. Chen, R. Lau, “Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation» *Bioresource Technology*, vol. 128, pp. 337–344, 2013.

[30] United States Environmental Protection Agency (E.P.A.), "Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual", cap. 4, pp. 1-41, April 1999.

BIBLIOGRAFIA

A.M. ILLMAN, A.H. SCRAGG, S.W. SHALES, "Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen médium" *Enzyme Microbial Technology*, vol 27, n°8, pp. 631–635, 2000.

B. SERIVE, R. KASS, J.B. BÉRARD, V. PASQUET, L. PICOT Y J.-P. CADORET, "Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae" *Bioresource Technology*, vol. 124, pp. 311-320, 2012.

C. NÚÑEZ, C. PAVLIK, "Disgregado de tejidos leñosos por el método clorito – ácido acético - carbonato. Evaluación del daño producido a las fibras." *Revista de Ciencia y Tecnología*, Año 2 , N° 2, 1999.

C.D. RANGEL-YAGUI, E.D.G. DANESI, J.C.M. DE CARVALHO, S. SATO, CHLOROPHYLL production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process, *Bioresour. Technol.*, vol.92, pp.133–141, 2004.

C.-Y. CHEN, X.-Q. ZHAO, H.-W. YEN, S.-H. HO, C.-L. CHENG, D.-J. LEE, F.-W. BAI, J.-S. CHANG, Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 78, pp. 1-10, 2013.

D. GUTIERREZ Y C. MARMOLEJO, "Diseño de un sistema de dos etapas para la extracción de proteínas de microalgas. Bucaramanga, 2013. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de físicoquímicas.

F.M. GIRIO, C.FONSECA, F. CARVALHEIRO, L.C. DUARTE, S. MARQUÉS, R. BOGEL-LUKASIK, “Hemicelluloses for fuel ethanol: a review” *Bioresource Technology*, vol. 101, n° 13, pp. 4775–4800.

G. DRAGONE, B.D. FERNANDES, A. P. ABREU, A.A. VICENTE, J.A. TEIXEIRA, “Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae” *Applied Energy*, vol. 88, n°10, pp. 3331–3335, 2011.

G. MOXLEY, Y.H.P. ZHANG, “More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification” *Energy Fuels*, vol. 21, n°6, 3684–3688, 2007.

G. ZHAO, X. CHEN, L. WANG, S. ZHOU, H. FENG, W.N. CHEN, R. LAU, “Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation» *Bioresource Technology*, vol. 128, pp. 337–344, 2013.

H. IWAMOTO. “Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- major industrial species: *Chlorella*”. Richmond A. (Ed.), *Handbook of Microalgae Biotechnology*, Black-well Publishing, Oxford, pp. 255-263, 2003.

H. RISMANI-YAZDI, B.Z. HAZNEDAROGLU, K. BIBBY, J. PECCIA, Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels, *BMC Genomics* 12 (2011) 148.

L. BARSANTI, P. GUALTIERI, “Algae- Anatomy, Biochemistry, and biotechnology” *Journal of Plant physiology*, vol. 134, n°3, 2007.

L. BRENNAN, P. OWENDE, "Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products" *Renewable and Sustainable Energy Review*, vol. 14, n°2, pp. 557–577, 2010.

M. DAROCH, S. GENG, G. WANG, "Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks" *Applied Energy*, vol. 102, pp. 1371–1381, 2013.

M. DUBOIS, K. GILLES, P. REBERS Y F. SMITH, «Colorimetric Method for determination of Sugars and Related Substances» *Analytical Chemistry*, vol. 3, n° 28, pp. 350-356, 1956.

R. HARUN, M.K. DANQUAH, "Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production" *Chemical Engineering Journal*, vol 168, pp. 1079–1084, 2011

R. HARUN, M.K. DANQUAH, "Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production" *Process Biochemistry*, vol. 46, n°1, pp. 304–309, 2011.

R. HARUN, M.K. DANQUAH, G.M. FORDE, "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production" *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 85, n°2, pp. 199–203, 2010.

R. HARUN, W. JASON, T. CHERRINGTON, M.K. DANQUAH, "Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production" *Applied Energy*, vol. 88, pp. 3464-3467, 2011.

R.P. JOHN, G.S. ANISHA, K.M. NAMPOOTHIRI, A. Pandey, "Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol" *Bioresource Technology*, vol. 102, n°1, 186–193, 2011.

S. FON-SING, A. ISDEPSKY, M.A. BOROWITZKA, N.R. MOHEIMANI, "Production of biofuels from microalgae" *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, vol. 18, n°1, pp.47-72, 2013.

S. HO, S.W. HUANG , C.Y. CHEN, T. HASUNUMA, A. KONDO, J.-S. CHANG, "Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E" *Bioresource Technology*, vol. 135, pp. 157-165, (2013).

S.H S.H. HO, C.Y. CHEN, J.S. CHANG, "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N" *Bioresource Technology*, vol.113, pp.244–252, 2012.

S.H. HO, C.Y. CHEN, D.J. LEE, J.S. CHANG, "Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems- a review" *Biotechnology Advances*, vol 29, pp.189–198, 2011.

S.H. HO, S.-W. HUANG, C.Y. CHEN, T. HASUNUMA, A. KONDO, J.-S. CHANG, "Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock" *Bioresource Technology*, vol. 135, pp. 191-198, 2013.

S.P.S. CHUNDAWAT, G.T. BECKHAM, M.E. HIMMEL, B.E. DALE, "Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals", *Annu. Rev. Cell Biomol.*, vol. 2, pp. 121–145, 2011.

T. YAMADA, K. SAKAGUCHI, "Comparative studies on *Chlorella* cell walls – induction of protoplast formation" *Arch. Microbiol.* , vol. 132, pp. 10–13, 1982.

United States Environmental Protection Agency (E.P.A.), "Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual", cap. 4, pp. 1-41, April 1999.

Z. SUI, Y. GIZAWB, J.N. BEMILLER, "Extraction of polysaccharides from a species of Chlorella" Carbohydrate Polymers, vol. 90, pp. 1– 7, 2012.