

**DISEÑO DE UNA CADENA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE
MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO**

GLORIA ESTEFANY GUERRERO SEPÚLVEDA

YEFERSON YESID ROJAS AMAYA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

**DISEÑO DE UNA CADENA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE
MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO**

GLORIA ESTEFANY GUERRERO SEPÚLVEDA

YEFERSON YESID ROJAS AMAYA

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación, presentado para optar al
título de Ingeniero Químico**

Directores

VIATCHESLAV KAFAROV

Ingeniero Químico Dr. Sc

CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA

Ingeniero Químico MSc.

Codirector

ANDRÉS FERNANDO BARAJAS

Biólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

Dedicatoria

A Dios primero que todo por ser mi guía en cada momento y por no permitirme desfallecer.

A mis padres Héctor Rojas y Jacqueline Amaya, por ese gran apoyo y comprensión, por dejarme como herencia el espíritu de lucha, perseverancia, el gusto por trabajar arduamente y ser una persona honesta, este triunfo más que mío es de ustedes los amo con todo mi corazón.

A mi hijo Juan Sebastián Rojas Medrano, que amo con todo mi corazón, este logro es el comienzo que me ayuda a brindarte un mejor futuro, eres el motor de mi vida.

A mis hermanos, Paola y Felipe Rojas Amaya, que estuvieron presentes a lo largo de este proceso. Los amo hermanitos.

A Paola Medrano, que ha sido una persona muy importante, siempre acompañándome en este camino, sobre todo ahora que tenemos un gran motivo para seguir adelante.

A mi compañera de tesis, Estefany Guerrero, dicen que si quieres acabar una amistad solamente hay que hacer una tesis pero este caso fue la excepción, gracias por trabajar hombro a hombro en esta agotable responsabilidad.

Finalmente, agradezco al grupo de investigación de Biomasa, por dejarnos pertenecer a él, brindándonos y poniendo a disposición sus conocimientos para que este proyecto pudiera salir mejor.

Yeferson Rojas

Dedicatoria

Agradezco enormemente a Dios por guiarme durante toda mi carrera y permitirme finalizarla.

A mis padres Gloria Sepúlveda, y Carlos Guerrero por el apoyo incondicional que siempre recibí de su parte, por todo su esfuerzo y dedicación, gracias mil y mil gracias a ustedes que son el motor de mi vida.

A mis hermanos Andrés, Jati, Ale, y Dani por su apoyo emocional especialmente a Dani por acompañarme en todo este proceso, los adoro.

A todos mis tíos y primos, porque siempre tenían una palabra de aliento.

A mis amigos que siempre estuvieron ahí para hacerme reír, o en su defecto llorar juntos en los momentos más difíciles.

A mi amigo y compañero de tesis Yeferson Rojas quien me aguantó durante todo el proceso y deseo éxitos en su vida.

Estefany Guerrero.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	17
1.1 Microalga y medio de cultivo.....	17
1.2 Obtención y Caracterización de vinazas	18
1.3 Cultivo en bioreactores	19
1.4 Cuantificación de Biomasa.....	19
1.5 Recuperación de Biomasa	20
1.6 Pre-tratamiento térmico con tiempo variable.....	20
1.7 Organosolv.....	20
1.8 Filtración y neutralización.....	21
1.9 Cuantificación de Azúcares.....	21
2. ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama metodología.....	17
Figura 2. Diagrama metodología.....	23
Figura 3. Eficiencia de extracción de carbohidratos.....	25
Figura 4. Porcentaje concentración de carbohidratos.....	26

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Temperatura y tiempo de pretratamiento	20
Tabla 2. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña	22
Tabla 3. Humedad relativa de la biomasa en el pre tratamiento térmico	24

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN BIOMASA PROCEDIMIENTO ANALÍTICO EN EL LABORATORIO (LAP-NREL) (NREL/TP-510-42621).....	37
--	----

RESUMEN

TÍTULO: DISEÑO DE UNA CADENA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO *

AUTORES: GLORIA ESTEFANY GUERRERO SEPÚLVEDA, YEFERSON YESID ROJAS AMAYA**

PALABRAS CLAVES: microalga, biocombustibles, carbohidratos, extracción.

La biomasa de microalgas es considerada como materia prima renovable potencial para la producción de biocombustibles y otros productos químicos, debido a sus ventajas de crecimiento rápido, eficiente fijación del dióxido de carbono, no competir por tierras cultivables y acumular grandes cantidades de carbohidratos. La mayor cantidad de carbohidratos se encuentra en la pared celular (principalmente como celulosa y polisacáridos solubles) pueden convertirse fácilmente en azúcares fermentables. Sin embargo, para lograr la liberación de dichos compuestos es necesario realizar diferentes tipos de pretratamientos a la biomasa algal de manera que mejore el resultado de la disrupción celular para la liberación de dichos compuestos.

En este estudio, se estableció la metodología óptima para la extracción de carbohidratos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. las paredes celulares se hidrolizaron por el método organosolv con el fin de realizar el rompimiento de las cadenas de polisacáridos para la obtención de monosacáridos (xilosa, glucosa, fructosa, arabinosa) bajo las condiciones de un pretratamiento térmico con tiempo variable usando dos temperaturas (75 y 105°C)

Los resultados mostraron que para el pre-tratamiento a 105°C con tiempo de secado de 1h el porcentaje total de azúcares el del 20% (glucosa con un 16,32%, xilosa con el 1,83%, arabinosa el 1,70% y 0,45% de fructuosa), considerándose este como una estrategia viable para la producción de bioetanol a partir de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

* Trabajo de grado

** Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Dr. Sc.Viatcheslav Kafarov. Codirector: Biólogo Andrés Barajas

ABSTRACT

TITLE: DESIGN OF A CARBOHYDRATE CHAIN EXTRACTION OF MICROALGAE, LABORATORY SCALE*

AUTHORS: GLORIA ESTEFANY GUERRERO SEPÚLVEDA, YEFERSON YESID ROJAS AMAYA**

KEY WORDS: microalgae, biofuels, carbohydrate, extraction.

Microalgae biomass is considered as a potential renewable feedstock for the production of biofuels and other chemicals, because of its advantages of rapid growth, efficient carbon dioxide fixation, not compete for arable land and accumulate large amounts of carbohydrates. The most carbohydrates found in the cell wall (mainly as soluble cellulose and polysaccharides) can be readily converted to fermentable sugars. However, for the release of these compounds is necessary to make different types of pretreatments into the algal biomass so as to improve the outcome of cell disruption for the release of those compounds.

In this study, was established the optimal method for the extraction of carbohydrates in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. The cell walls are hydrolyzed by organosolv method in order to perform breaking of the polysaccharide chains to obtain monosaccharides (xylose , glucose, fructose , arabinose) under the conditions of a time-varying thermal pretreatment using two different temperatures (75 and 105 ° C)

The results showed that for the pre- treatment at 105 ° C with drying time of 1 h the total percentage of sugar obtained is 20% (glucose with a 16,32%, xylose with 1,83%, fructose with 0,45% and 1,70% arabinose) considering this as a viable option for the production of bioethanol from biomass *Chlorella vulgaris* strategy.

* Graduation Project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Bio. Andrés Barajas

INTRODUCCIÓN

El incremento del precio del petróleo, la creciente demanda de combustibles, la necesidad de preservar el medio ambiente y mitigar el proceso de cambio climático originado por el uso extensivo de combustibles fósiles [1] han generado interés por la búsqueda de fuentes alternativas de energía no contaminantes y renovables, las cuales se definen como formas de energía que tienen una fuente prácticamente inagotable con respecto al tiempo de vida de un ser humano en el planeta, y cuyo aprovechamiento es técnicamente viable [2].

Dentro de los posibles reemplazos a las fuentes de energía convencional, las microalgas han surgido como una opción promisoría, debido a su mayor eficiencia fotosintética para la construcción de complejas moléculas, siendo más eficaces en la captura de CO₂ y consumo de nutrientes con respecto a las plantas superiores [3], además no requieren tierras cultivables y pueden cultivarse en agua salobre [4, 5, 6].

Las microalgas están constituidas principalmente de carbohidratos (entre 40-70%) proteínas (10-20%) y lípidos (15-30%), los cuales pueden ser una buena alternativa para la obtención de productos valiosos [7]. Trabajos como el de González y Kafarov [8] han demostrado que la producción de microalgas enfocada únicamente a la producción de biocombustibles tienen un alto costo, por lo cual es necesario utilizar integralmente los diferentes metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas, lípidos) que posteriormente pueden ser transformados en productos de alto valor agregado como biocombustibles mediante la aplicación de una gran variedad de procesos.

Uno de los metabolitos de mayor importancia son los carbohidratos que son una de las más significativas fuentes de energía y nutrientes biológicos [9]. Cabe destacar que la mayor cantidad de trabajos se han enfocado en la extracción de carbohidratos en macroalgas, y en especial las de la familia Phaeophyta; sin embargo para algunas microalgas marinas se ha encontrado que entre un 20-30%

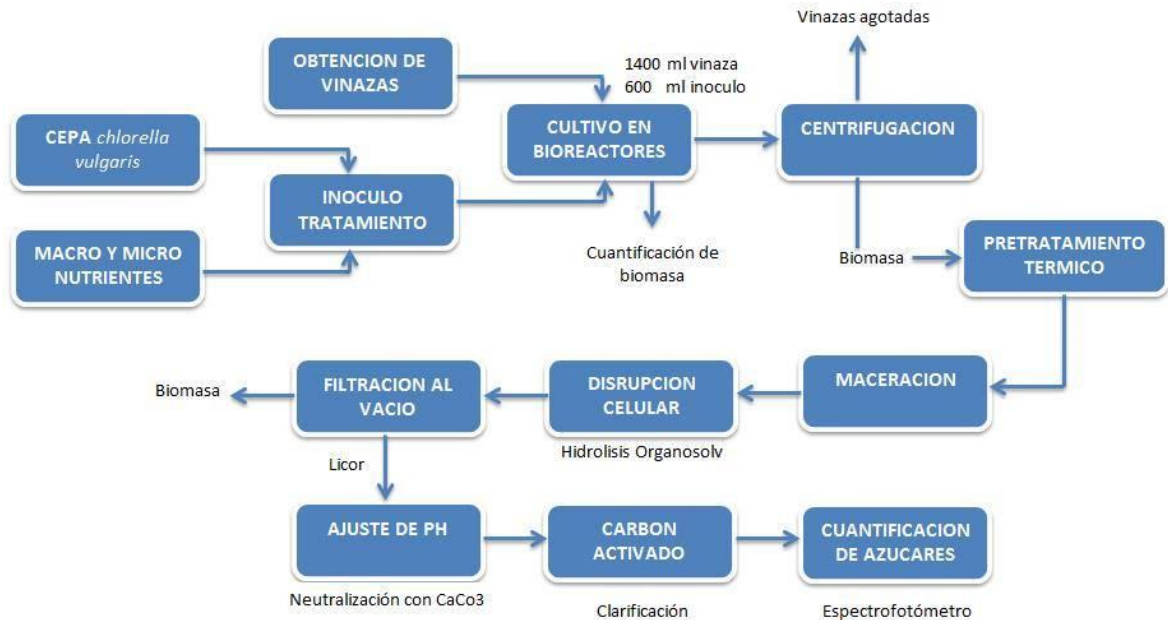
de la biomasa se constituye de celulosa o almidón, además de contener varios monosacáridos como glucosa, xilosa, galactosa, fructosa y otros [10]. De éstos, el almidón y la glucosa se utilizan convencionalmente para la producción de biocombustibles, sobre todo para el bioetanol, especies de microalga como *Chlorella vulgaris* es candidata debido a su alto contenido en carbohidratos [11].

Uno de los principales obstáculos en la utilización de la biomasa de microalgas es su hidrólisis a azúcares solubles simples [12, 13] ya que la mayor cantidad de carbohidratos se encuentra en la pared celular (principalmente como celulosa y polisacáridos solubles) y en los plastidos (principalmente como almidón) [14] para este proceso de disrupción celular se han desarrollado diferentes métodos dependiendo de la composición de la pared celular y de los productos a obtener, estos métodos pueden estar basados en acción mecánica (autoclave y homogeneizadores) y química (reacciones acidas, básicas y enzimáticas) [15,16]. La hidrólisis enzimática en combinación con un pretratamiento termoquímico puede dar un alto rendimiento de azúcares solubles (75-95 %), sin embargo el alto coste de las enzimas y el tiempo de reacción largo (2-3 días) han obstaculizado su aplicación [17]. Por otro lado la hidrólisis ácida se lleva a cabo normalmente mediante la adición de ácido concentrado [18, 19]. Aunque la recuperación de azúcar de este método es tan alta como 90%, los peligros de la manipulación de ácidos concentrados y las complejidades de reciclaje de ellos han limitado su aplicación. Por lo tanto, son deseables métodos alternativos [20] como la hidrólisis organosolv [21] en la extracción de carbohidratos para la producción de bioetanol.

De acuerdo con lo anterior el objetivo principal de esta investigación es evaluar a escala laboratorio cual es la mejor ruta para la extracción de carbohidratos con fines de producción de biocombustibles, desarrollando el método experimental de prueba y error teniendo como variables la temperatura y el tiempo.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Figura 1. Diagrama metodología



1.1 Microalga y medio de cultivo

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en g/L está distribuida de la siguiente manera : macronutrientes NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$), NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$) con una relación de 10ml de macronutriente/l de cultivo y micronutrientes $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-6}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$) con una relación de 1ml de micronutriente/l de cultivo.

Para el cultivo del inóculo del tratamiento de control se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14cm y 35cm de altura con un

volumen del cultivo de 2500 mL. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 ml/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 conservándose el volumen este cultivo con un suministro de agua destilada de manera casi diaria.

1.2 Obtención y Caracterización de vinazas

Las vinazas utilizadas fueron obtenidas como residuo 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 (UIS).

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, posteriormente, 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, esta, utilizada como sustrato para el crecimiento de *C. vulgaris* UTEX 1803.

Una vez obtenidas las vinazas, los principales nutrientes (Nitrógeno Total, Sodio, Potasio y Fosforo), Carbono orgánico total, Grado alcohólico, azúcares totales y sólidos totales fueron cuantificados utilizando métodos consignados en el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater .

1.3 Cultivo en bioreactores

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14cm y 35cm de altura con un volumen de 2500 ml, el volumen de cultivo es de 2000 mL distribuidos de la siguiente manera: 1400 mL de vinaza y 600 mL de inóculo microalgal. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 mL/min durante las 24 horas del día 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 impiden el paso de luz homogéneamente en todo el reactor, se determinó recubrir los reactores para impedir en su totalidad el paso de luz y así evitar posibles ruidos en la medición por procesos fotosintéticos, permitiendo así un ciclo de oscuridad de 24 horas. El tiempo de cultivo fue de 18 días para todos los bioreactores.

1.4 Cuantificación de Biomasa

Cada 2 días se tomó una muestra de 10 mL de cada uno de los reactores, se centrifugó a 3600 rpm durante 15 minutos y se retiró el sobrenadante, el pellet fue re-suspendido en 10 mL de agua destilada y centrifugada una vez más. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en agua destilada; una vez agregada el agua, la muestra se filtró utilizando filtros de celulosa de $1 \mu\text{m}$ previamente pesados. Los filtros con la muestras fueron llevados a horno a 105°C

durante 24 horas y luego en un desecador hasta alcanzar peso constante determinando la cantidad de masa existente.

1.5 Recuperación de Biomasa

Cumplido el tiempo de cultivo la biomasa producida se recuperó mediante centrifugación, con la centrífuga (320R Heittich Zentrifugen) a una velocidad de 3600 rpm por 15 min.

1.6 Pre-tratamiento térmico con tiempo variable

La biomasa obtenida fue sometida a un tratamiento térmico variando tanto el tiempo de exposición como la temperatura (Tabla 1).

Tabla 1. Temperatura y tiempo de pretratamiento

Temperatura (°C)		Tiempo (h)			
105	1	8	16	24	
75					

1.7 Organosolv

Se prepararon 100 mL de solvente (3,2mL metanol, 3,2mL ácido sulfúrico, 93,6mL agua), metanol al 3,32 % v/v y ácido sulfúrico 0,6M como catalizador, en reactores de vol. 300mL con dimensiones de 5,5 cm de diámetro interno y 14 cm de altura. Seguidamente se adicionó la biomasa pre-tratada térmicamente y sellados, por último se llevó a una autoclave (All american) a 15 psi y 121°C durante un período de reacción de 4 horas, [22] cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

1.8 Filtración y neutralización

La biomasa y el licor (sobrenadante) provenientes de la hidrólisis se separaron mediante filtración al vacío con papel filtro (1µm). Con el fin de detener la reacción y evitar la degradación de carbohidratos por la presencia de ácidos el licor se neutralizó con carbonato de calcio (CaCO₃).

Para eliminar el color oscuro del licor, se pasó por un lecho de carbón y así evitar ruido que puede ocasionarse en la posterior cuantificación de azúcares.

1.9 Cuantificación de Azúcares

Para la medición de carbohidratos en la biomasa, se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico [23]. Al pellet de biomasa se le adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico al 95.5%. Finalmente, cada una de estas muestras fue transferida a las celdas colorimétricas y se midió la absorbancia a 480nm 485nm 488nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa Fructosa, Galactosa y Glucosa respectivamente.

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las vinazas contienen principalmente materia orgánica, potasio, azufre, magnesio, nitrógeno y calcio, además de colorantes fenólicos, caramelo y melanoidina que le dan su color oscuro característico; pero esta composición varía según su procedencia [24].

En la Tabla 2 se muestra la composición de las vinazas utilizadas para el cultivo de la microalga, este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales (LQCI) de la UIS.

Tabla 2. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña

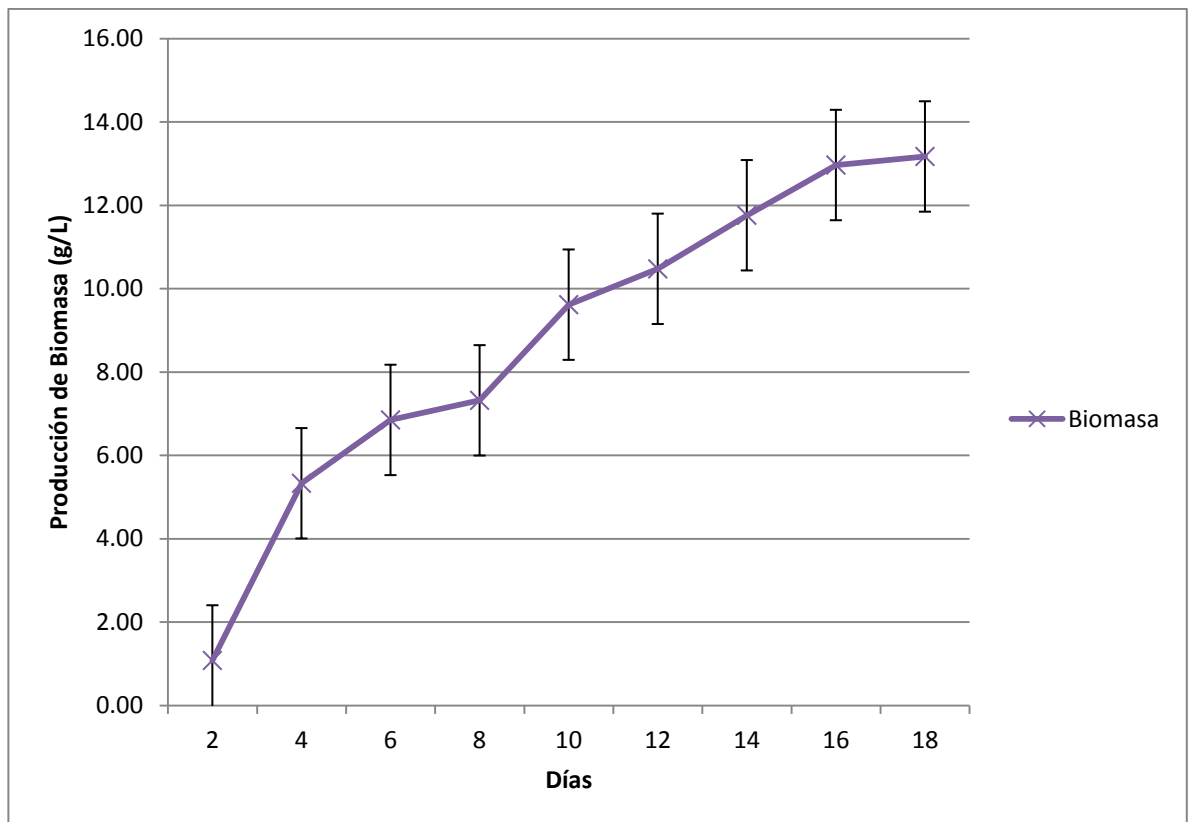
CARACTERIZACIÓN VINAZAS	
Fósforo (g P/L)	0,055 – 0,057
Potasio (g K/L)	24,60 – 24,62
Sodio (g Na/L)	0,57 – 0,58
Nitrógeno total (g N/L)	2,32 – 2,38
Carbono Orgánico Total (g/L)	2,13 – 2,14
Grado alcohólico (%V/V)	0,07-0,05
Azúcares totales (%)	11,3-11,5
Sólidos totales (%)	12,7-12,4

En la Figura 2 se muestran los resultados de producción de biomasa, donde se aprecia que después de 18 días de cultivo la concentración de biomasa fue de 13,2 g/L con una productividad de 0,73 g/L*d.

Teniendo en cuenta que la concentración en el día 16 es 12,97 g/L y en el día 18 es 13,2 g/L, se observa que los valores no tienen variación significativa. Por tal razón se decide que el tiempo de cultivo de producción de biomasa debe ser de 16 días obteniendo una productividad de 0,81g/L*d, para no incurrir en gastos energéticos innecesarios.

Comparando estos datos con los obtenidos por Scragg *et al* [25] en un cultivo de *C. vulgaris* por inanición de nitrógeno bajo las condiciones óptimas, la mayor producción de la biomasa fue de 0,52 g de biomasa/L y una productividad de 0,037 g/L*d.

Figura 2. Diagrama metodología



Con el fin de determinar la cantidad exacta de biomasa en base seca a utilizar en cada una de las muestras y sus respectivas replicas para el pre tratamiento térmico, para la posterior cuantificación de azúcares y determinar la eficiencia del método se determinó la humedad relativa por medio de los lineamientos de la norma NREL/TP-42621 (Anexo). En la tabla 3 se muestran los resultados.

Tabla 3. Humedad relativa de la biomasa en el pre tratamiento térmico

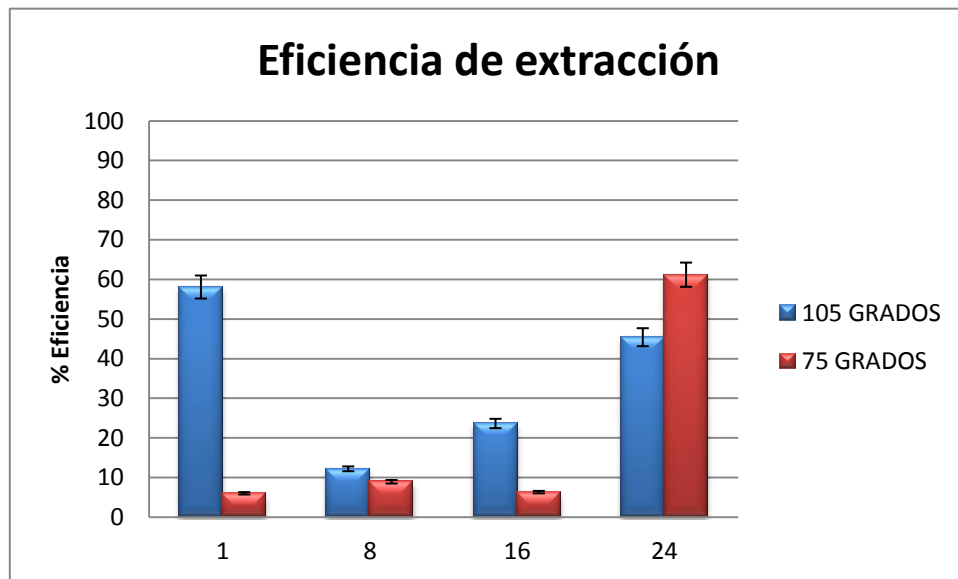
Temperatura °C	Tiempo (h)	Humedad relativa (%)	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)
105	1	60	5	2
	8	5	10	9
	16	0	10	10
	24	0	8	8
75	1	61	15	6
	8	10	9	8
	16	5	9	9
	24	5	9	9

La eficiencia del proceso se muestra en la figura 3 donde se aprecia que el pre tratamiento térmico que presenta mayor eficiencia es el de 75°C con un tiempo de secado de 24 h, seguido por el de temperatura de 105°C con un tiempo de secado de 1 h, el cual presenta una eficiencia considerable, se observa que es mejor debido a que el tiempo de secado de la biomasa es menor y los gastos energéticos serían mínimos, esto se debe específicamente a la relación de biomasa seca/solvente. Para este caso en particular la relación fue de 2 gramos de biomasa seca/100 mL de solvente es decir la biomasa al ser tan reducida, el área de contacto con el solvente es mayor favoreciendo el proceso de ruptura.

El efecto observado de la concentración de microalgas en la velocidad de hidrólisis y el rendimiento de esta, muestra que la hidrólisis disminuyó con el aumento de la concentración de microalgas demostrado por Fu *et al.* [26]. Las razones eran posiblemente debido a la creciente resistencia de transferencia de masa con alta concentración de sustrato Chen *et al.* [27] y la inhibición del producto final [28]. En el caso de la biomasa pre-tratada a 105°C y 24 h la cantidad de agua contenida en ésta es casi nula por tanto el área de contacto es

reducida y no permite una miscibilidad factible del metanol para la extracción de los azúcares, por tal motivo no se realizó pre tratamiento a temperaturas superiores, tampoco se hizo pre tratamiento a temperaturas inferiores a 75°C debido a que el porcentaje de humedad sería mayor, aunque se provocaría un buen esparcimiento del metanol sobre toda la biomasa, al ser tan grande la cantidad de agua la concentración de ácido y de metanol disminuyen en la mezcla, generando una menor miscibilidad entre el ácido, el agua y la biomasa, limitando la reacción de hidrólisis al igual que la extracción de azúcares. Zhou *et al.* [29] demostraron que variaciones en las concentraciones de los reactivos pueden provocar cambios en la cantidad de azúcares liberados mejorando o empeorando el resultado de reacción y la extracción de éstos.

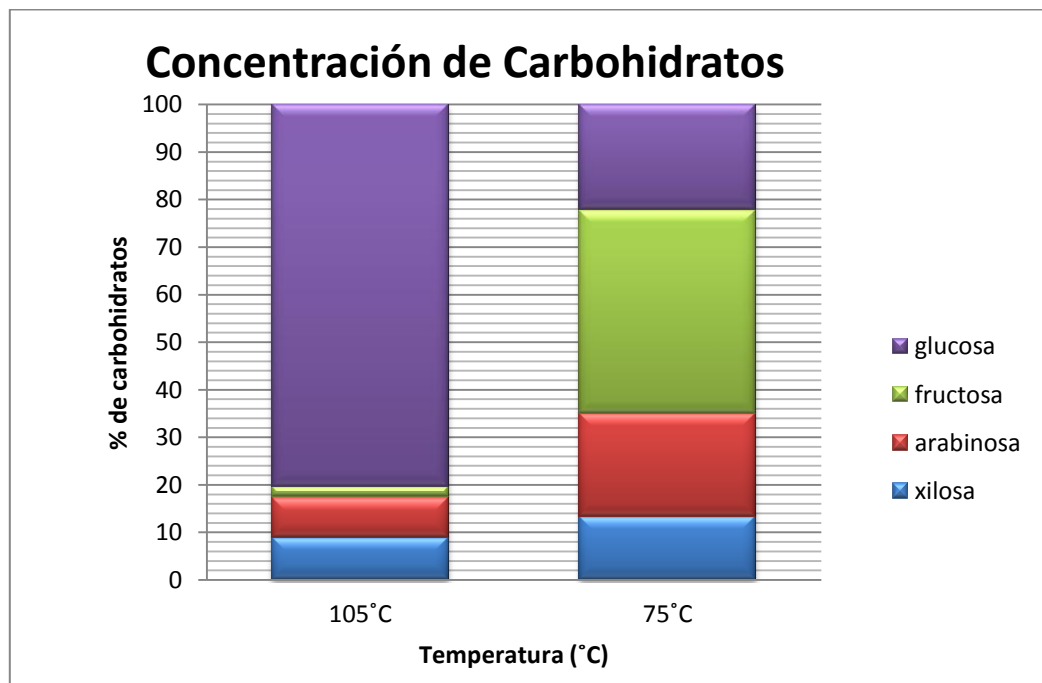
Figura 3. Eficiencia de extracción de carbohidratos



El porcentaje total de azúcares obtenidos en el pre-tratamiento a 105°C con tiempo de secado de 1 h es del 20% muestran que la glucosa presenta la mayor concentración con un 16,32%, seguida de la xilosa con una cantidad del 1,83% el valor restante se compone de carbohidratos fermentables tales como 1,70% y

0,45% de arabinosa y fructosa respectivamente. (Figura 5). Esto se debe a que la pared celular del alga, está conformada en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y almidón, los cuales al degradarse generan glucosa; en el pre-tratamiento a 75 °C con tiempo de secado de 24 h el porcentaje total de azúcares obtenidos es de 21% en donde la glucosa presenta un 4,76%, fructosa un 9,13%, 4,64 arabinosa y 2,86% xilosa. Trabajos como el de Zhou *et al.* [30] presentan un extracción de azúcares totales de 6,77% (glucosa: 4,40%; xilosa y arabinosa: 2,37%) en presencia de HCl.

Figura 4. Porcentaje concentración de carbohidratos.



CONCLUSIONES

Se desarrolló una ruta de extracción de carbohidratos para *Chlorella vulgaris* y se encontró que el pretratamiento térmico a 105°C con un tiempo de secado de 1 hora con una relación de 2 gramos de biomasa seca/100 mL de solvente permite obtener hasta 0,20 g de azúcares/g de biomasa.

El método organosolv tiene una alta selectividad por los carbohidratos, logrando extraer hasta un 61,17%

Se plantean las vinazas como un medio de cultivo eficiente para la producción de biomasa de microalgas con miras a la producción de bioetanol.

RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto de la relación biomasa/solvente sobre la eficiencia de extracción de carbohidratos mediante hidrólisis organosolv.

Implementar los resultados en la simulación del proceso y evaluar la viabilidad del método a escalas superiores del nivel laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. M. Gavrilescu, Y. Chisti, « Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry,» *Biotechnology Advances* 23, 471–499, 2005.
- [2]. C. Ahedo y J. Barrera, «Mercado de energías renovables en España,» cap II pag 14, 2008.
- [3]. Y. Chisti, «Biodiesel from microalgae beats bioethanol» *Trends in Biotechnology*. 26(3): 126-131, 2011.
- [4]. H. Amaro, A. Guedes, y F. Malcata, «Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel» *Applied Energy* 88(10): 3402–3410, 2011.
- [5]. Y. Chisti, «Biodiesel from microalgae,» *Biotechnology Advances*. 25(3): 294-306., 2007.
- [6]. A. Demirbas «Political, economic and environmental impacts of biofuels. A review» 86 S 108- S 117, 2009.
- [7]. L. Brennan, y P. Owende, «Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products» *Renew. Sust. Energ.* 14(2): 557–577, 2010.
- [8]. A. González y V. Kafarov, «Microalgae based biorefinery: issues to consider,» *CT&F - Ciencia, tecnología y futuro*, vol. 4, nº 4, pp. 5-22, 2011.
- [9]. M. Gama, L. Beatriz «Biología, biogénesis y microorganismos,» segunda edición, pag 64, 2004.
- [10]. A. Carlsson, J. Van Beilen, R. Möller y D. Clayton, «Micro-and macroalgae: Utility for industrial applications,» *CPL Press* , pp. 1-82, 2007.
- [11]. J. Rojan, G. Anisha, M. Nampoothiri y A. Pandey, «Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 186-193, 2011.

- [12]. M.T. Nguyen, S.P. Choi, J. Lee, S.J. Sim, «Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production,» *J. Microbiol-Biotechnol.* 19, 161–166, 2009.
- [13]. X. Wang, X. Liu, G. Wang, «Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation,» *J. Integr. Plant Biol.* 53 (3), 246–252, 2011.
- [14]. C. Chen, X. Zhao, H. Yen, S. Ho, C. Cheng, D. Lee, F. Bai, J. Chang «Microalgae-based carbohydrates for biofuel production,» *Biochemical Engineering Journal* 78, 2013.
- [15]. T. Mata, A. Matins, N. Caetano, «Microalgae for biodiesel production and other applications: a review: processing and components extraction,» Elsevier: *renewable and sustainable energy reviews.* Vol 14; 217-232, 2010.
- [16]. Molina, Acien y Robles. «Downstream processing of cell-mass and products,» *Biotechnology and applied phycology.oxford: Blackwell science* p. 215-251, 2004.
- [17]. Y. Zhang, J. Cui, L. Lynd, L. Kuang, «A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure,» *Biomacromolecules* 7 (2), 644–648, 2006.
- [18]. Q. Xiang, Y. Lee, P. Pettersson, R. Torget, 2003. «Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of alpha-cellulose,» *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105–108, 505–514.
- [19]. M. Harmer, A. Fan, A. Liauw, R. Kumar, «A new route to high yield sugars from biomass: phosphoric-sulfuric acid,» *Chem. Commun.* (43), 6610–6612, 2009.
- [20]. N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch, «Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass,» *Bioresour. Technol.* 96 (6), 673–686, 2005.

- [21]. A. Meza, A. Sepúlveda, «Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales,» Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010.
- [22] Meza, A. P., Sepúlveda, A. J. (2010). Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.
- [23]. M. DuBois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, «Fred Smith Journal: Analytical Chemistry - ANAL CHEM,» vol. 28, no. 3, pp. 350-356, 1956.
- [24]. N. Singh, D. Patel, «Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. In: Lichtfouse, E. (Ed.), Farming for Food and Water Security,» Springer Netherlands. 83-109, 2012.
- [25]. A. Scragg, A. Lilman, S. Shales, « Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium,» *Enzyme Microb. Technol*, 27 pp 631-635, 2000.
- [26]. C. Fu, T. Hung-Chieh, J. Chen, C. Do, W. Teng «Hydrolysis of the cell walls of microalgae to produce reducing sugar and lipid extraction,» pp 10-11, 2013
- [27]. M. Chen, J. Zhao, L. Xia «Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars,» *Carbohydrate Polymers*, 71 , pp 411-415, 2008.
- [28] J. Szczodrak «Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol,» *Biotechnología y Bioingeniería*, 32, pp 771-776, 1988.

[29]. N. Zhou, Y. Zhang, Wu Xiabin, X. Gong, Q. Wang, «Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂,» *Bioresour Technol.* 102(21):10158-10161, 2011.

[30]. N. Zhou, Y. Zhang, W. Xiaobin, Xiaowu Gong, Qinhong Wang, Hydrolysis of biomass *Chlorella* fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂, 2013.

BIBLIOGRAFÍA

Ahedo C., Barrera J. «Mercado de energías renovables en España,» cap II pag 14, 2008.

Amaro H., Guedes A. Malcata F. «Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel» *Applied Energy* 88(10): 3402–3410, 2011.

Brennan L., Owende P. «Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products» *Renew. Sust. Energ.* 14(2): 557–577, 2010.

Carlsson A., Van Beilen J., Möller R., Clayton D. «Micro-and macroalgae: Utility for industrial applications,» *CPL Press* , pp. 1-82, 2007.

Chen M., Zhao X., Yen H, Ho S., Cheng C., Lee D., Bai J. Chang «Microalgae-based carbohydrates for biofuel production,» *Biochemical Engineering Journal* 78, 2013.

Chen M., Zhao J., Xia L. «Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars,» *Carbohydrate Polymers*, 71 , pp 411-415, 2008.

Chisti Y. «Biodiesel from microalgae,» *Biotechnology Advances.* 25(3): 294-306., 2007.

Chisti Y. «Biodiesel from microalgae beats bioethanol» *Trends in Biotechnology.* 26(3): 126-131, 2011.

Demirbas A. «Political, economic and environmental impacts of biofuels. A review» 86 S 108- S 117, 2009.

Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., «Fred Smith Journal: Analytical Chemistry - ANAL CHEM,» vol. 28, no. 3, pp. 350-356, 1956.

- Fu C., Hung-Chieh T., Chen J., Do C., Teng W. «Hydrolysis of the cell walls of microalgae to produce reducing sugar and lipid extraction,» pp 10-11, 2013
- Gama M., Beatriz L. «Biología, biogenesis y microorganismos,» segunda edición, pag 64, 2004.
- Gavrilescu M., Chisti Y. « Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry,» *Biotechnology Advances* 23, 471–499, 2005.
- González A., Kafarov V. «Microalgae based biorefinery: issues to consider,» *CT&F - Ciencia, tecnología y futuro*, vol. 4, nº 4, pp. 5-22, 2011.
- Harmer M., Fan A., Liauw A., Kumar R., «A new route to high yield sugars from biomass: phosphoric-sulfuric acid,» *Chem. Commun.* (43), 6610–6612, 2009.
- Mata T. Martins A., Caetano N., «Microalgae for biodiesel production and other applications: a review: processing and components extraction,» Elsevier: *renewable and sustainable energy reviews*. Vol 14; 217-232, 2010.
- Meza A., Sepúlveda A., «Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales,» Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010.
- Meza A., Sepúlveda A., (2010). Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.
- Molina, Acien, Robles. «Downstream processing of cell-mass and products,» *Biotechnology and applied phycology*. oxford: Blackwell science p. 215-251, 2004.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y., Holtzapple M., Ladisch M., «Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass,» *Bioresour. Technol.* 96 (6), 673–686, 2005.

Nguyen M.T., Choi S.P., Lee J., Sim S.J «Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production,» *J. Microbiol-Biotechnol.* 19, 161–166, 2009.

Rojan J. Anisha, G. Nampoothiri M. Pandey, y A. «Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 186-193, 2011.

Scragg A., lilman A., Shales S., « Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium,» *Enzyme Microb. Technol.*, 27 pp 631-635, 2000.

Singh N., Patel D. «Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. In: Lichtfouse E. (Ed.), *Farming for Food and Water Security*,» Springer Netherlands. 83-109, 2012.

Szczodrak J. «Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol,» *Biotechnología y Bioingeniería*, 32, pp 771-776, 1988.

Wang X., Liu X., Wang G. «Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation,» *J. Integr. Plant Biol.* 53 (3), 246–252, 2011.

Xiang Q., Lee Y., Pettersson P., Torget R., 2003. «Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of alpha-cellulose,» *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105–108, 505– 514.

Zhang Y., Cui J., Lynd L., Kuang L., «A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure,» *Biomacromolecules* 7 (2), 644–648, 2006.

Zhou N., Zhang Y., Xiabin W., Gong X., Wang Q. «Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂,» *Bioresour Technol.* 102(21):10158-10161, 2011.

Zhou N., Zhang Y., Xiaobin W., Xiao W., Qinhong W. Hydrolysis of biomass
Chlorella fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂, 2013.

ANEXO

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN BIOMASA PROCEDIMIENTO ANALÍTICO EN EL LABORATORIO (LAP-NREL) (NREL/TP-510-42621)

Las muestras de biomasa pueden contener humedad en cantidades grandes y variantes, las cuales pueden cambiar rápidamente cuando son expuestas al aire. Para ser válidos, los resultados de análisis químicos son comúnmente reportados en pesos sobre base seca. El procedimiento utilizado se basó en la norma NREL/TP-510-42621) y se presenta aquí un resumen del procedimiento.

1. Se pesaron y posteriormente se secaron los recipientes contenedores vacíos en un horno secador a 105 °C durante por lo menos 4 horas. Se pesó y registró el peso seco de los contenedores con 0.1g de exactitud.
2. Se pesaron cerca de 1g de muestra dentro del contenedor y se registró este peso.
3. Se lleva la muestra al horno a 105°C por mínimo 4 horas, se retira y se deja enfriar en un desecador. Se pesa el desecador con la muestra y se registran los valores.
4. Se introduce la muestra de nuevo en el horno a 105°C y se seca hasta peso constante. El peso constante es definido como un cambio de $\pm 0.1\%$ en el porcentaje de sólidos después de una hora de recalentamiento de la muestra.
5. Cálculos.

El porcentaje de humedad se puede calcular con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \left(\frac{W_{\text{contenedor+muestra}} - W_{\text{contenedor seco}}}{W_{\text{muestra inicial}}} * 100 \right)$$