

Efecto de las Condiciones de Pretratamiento de la Macroalga *Dictyota Dichotoma* sobre
la Producción de Azúcares Reductores

Karen Melissa Hernandez Barrientos

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniera Química

Directora

Ana Blandino Garrido

Dra. Ingeniería Química

Co- director

Luis Javier López Giraldo

Dr. Química Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Facultas de Ingenierías Fisicoquímicas

Universidad de Cádiz

Universidad Industrial de Santander

Bucaramanga

2021

Tabla de Contenido

| | Pág |
|---|------------|
| Introducción..... | 13 |
| 1. Objetivos..... | 15 |
| 1.1 Objetivo General | 15 |
| 1.2 Objetivos Específicos | 15 |
| 2. Estado del Arte | 16 |
| 2.1 Macroalgas..... | 16 |
| 2.2 Pretratamiento e Hidrólisis de la Biomasa Algal | 19 |
| 2.3 Bioproductos | 20 |
| 3. Descripción Metodológica..... | 22 |
| 3.1 Acondicionamiento de la Biomasa..... | 22 |
| 3.2 Pretratamiento | 23 |
| 3.3 Hidrólisis Enzimática | 24 |
| 3.4 Medida de los Azúcares Reductores | 25 |
| 3.5 Medida de la Glucosa | 27 |
| 3.6 Actividad Enzimática Celulasa | 29 |
| 3.7 Rendimiento de la Hidrólisis Enzimática | 30 |
| 3.8 Productividad de la Hidrólisis Enzimática | 32 |
| 4. Análisis y Resultados | 33 |
| 4.1 Pretratamiento | 33 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Hidrólisis Enzimática | 36 |
| 4.3 Análisis de la Cantidad de Glucosa Obtenida..... | 43 |
| 5. Conclusiones y Recomendaciones | 44 |
| Referencias Bibliográficas..... | 46 |

Lista de Tablas

| | Pág |
|---|------------|
| Tabla 1. Rendimiento en diferentes tipos de alga | 17 |
| Tabla 2. Distribución del tamaño de partícula | 23 |
| Tabla 3. Composición de la biomasa algal | 32 |
| Tabla 4. Rendimiento y productividad de cada condición de hidrólisis evaluada | 42 |

Lista de Imágenes

| | Pág |
|--|------------|
| Imagen 1. Esquema de acondicionamiento y pretratamiento del alga | 24 |
| Imagen 2. Microplaca de análisis DNS | 27 |
| Imagen 3. Comparación visual entre las texturas de biomasa algal pretratada..... | 35 |

Lista de Gráficas

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Efecto de la concentración de HCL y el tiempo sobre los azúcares reductores determinados mediante el DNS | 34 |
| Gráfica 2. Efecto del pretratamiento sobre los azúcares reductores en la hidrólisis..... | 37 |
| Gráfica 3. Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.1N | 38 |
| Gráfica 4. Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.2N | 39 |
| Gráfica 5. Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.5N | 40 |
| Gráfica 6. Concentración de azúcares reductores totales después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática..... | 41 |
| Gráfica 7. Efecto de la concentración de ácido y el tiempo sobre la cantidad total de glucosa obtenida | 44 |

Glosario

Actividad enzimática: La actividad expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el volumen de reacción.

Bioproductos: Son aquellos productos que derivan total o parcialmente de materiales de origen biológico, excluidos los materiales incrustados en formaciones geológicas y/o fosilizados.

Dictyota Dichotoma: Es un alga de la clase Phaeophyceae (alga parda).

Hidrólisis: Es una reacción química entre una molécula de agua y otra macromolécula, en la cual la molécula de agua se divide y rompe uno o más enlaces químicos y sus átomos pasan a formar unión de otra especie química.

Insoluble: Que no puede ser disuelto ni diluido.

Macroalga: La macroalga es un tipo de alga marina de tamaño macroscópico, multicelulares en general y por lo tanto se diferencia de las microalgas, las cuales son de tamaño microscópico y son unicelulares. Las macroalgas son muchas veces algas de tipo marrón o rojo que se encuentran entre otros tipos de alga, como el alga verde.

pH: Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa. El pH indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en determinadas disoluciones.

Polihidroxicanohatos: son poliésteres lineales producidos en la naturaleza por la acción de las bacterias por fermentación del azúcar o lípidos. Las bacterias los producen como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía.

Polímeros: Un polímero es una sustancia compuesta por grandes moléculas, o macromoléculas formadas por la unión mediante enlaces covalentes de una o más unidades simples llamadas monómeros.

Pretratamiento: Método eficaz para romper la pared celular y acceder a los polímeros complejos en las algas.

Resumen

Título: Efecto de las Condiciones de Pretratamiento de la Macroalga *Dictyota Dichotoma* sobre la Producción de Azúcares Reductores*

Autor: Karen Melissa Hernandez Barrientos**

Palabras Clave: Macroalgas, azúcares reductores, pretratamiento.

Dictyota Dichotoma, es un alga parda considerada como una materia prima adecuada para la producción de azúcares reductores, ya que este tipo de algas son conocidas por sus polisacáridos naturales que se utilizan ampliamente en los campos de la tecnología de los alimentos, la biotecnología, la microbiología e incluso la medicina (Kim, Chae-Hwan, & Sung-Wan, 2015). Este estudio analiza la producción de azúcares reductores resultado de la hidrólisis enzimática del alga pretratada químicamente variando las concentraciones de ácido y tiempo de contacto. A la condición de 0.5N de HCl y 20 min, utilizando una relación sólido-líquido de 4.3% (p/v) de biomasa algal, se produjo la mayor cantidad de azúcares reductores con un total de 0.382 g/ g alga (10.43 g/L) de los cuales 0.135 g glucosa/ g alga (3.06 g/L) son de y una productividad en la hidrólisis enzimática de 18.64 mg/g*h. Los resultados obtenidos han permitido determinar que se consiguen mayores rendimientos del proceso cuando las condiciones son menos drásticas, es decir, a mayor concentración de ácido empleada es necesario un menor tiempo de contacto, de lo contrario aumenta la posibilidad de que aparezcan subproductos inhibidores que pueden afectar las siguientes etapas del proceso o los posibles usos de los hidrolizados (Wu & Jane-Yii, 2014).

* Trabajo de Grado

**Pregrado presencial. Ingeniería Química. Director: Ana Blandino Garrido. Dra. Ingeniería Química. Codirector: Luis Javier López. Dr. Química, bioquímica y ciencia de los alimentos.

Abstract

Title: Effect of Pretreatment Conditions of the Macroalga *Dictyota Dichotoma* on the Production of Reducing Sugars*

Autor: Karen Melissa Hernandez Barrientos**

Key Words: Macroalgae, reducing sugars, pre-treatment.

Dictyota Dichotoma is a brown algae considered as a suitable raw material for the production of reducing sugars, since this type of algae is known for its natural polysaccharides that are widely used in the fields of food technology, biotechnology, microbiology and even medicine (Kim, Chae-Hwan, & Sung-Wan, 2015). This study analyzes the production of reducing sugars resulting from enzymatic hydrolysis of chemically pretreated algae by varying acid concentrations and contact time. At the condition of 0.5N HCl and 20 min, using a solid-liquid ratio of 4.3% (w/v) of algal biomass, the highest amount of reducing sugars was produced with a total of 0.382 g/ g algae (10.43 g/L) of which 0.135 g glucose/ g algae (3.06 g/L) and a productivity in the enzymatic hydrolysis of 18.64 mg/g*h. The results obtained have allowed determining that higher yields of the process are achieved when the conditions are less drastic, i.e., the higher the acid concentration used, the shorter the contact time, otherwise the possibility of the appearance of inhibitory by-products that may affect the following stages of the process or the possible uses of the hydrolysates increases (Wu & Jane-Yii, 2014).

* Degree Work

** Chemical Engineering. Director: Ana Blandino Garrido. Ph.D. Chemical Engineering. Co-director: Luis Javier López. Dr. Chemistry, Biochemistry and Food Science.

Introducción

La inminente necesidad de transición a una bioeconomía circular basada en la valorización de materias primas de biomasa renovable, se alinean perfectamente con varias metas de los objetivos de desarrollo sostenible. Además, el consumo mundial de plástico presenta un valor aproximado de 400 millones de toneladas por año con una enorme tendencia alcista, generando acumulación y contaminación en el medio ambiente, la tierra y los océanos debido a su difícil degradación (De Souza Machado & Kloas, 2017). En consecuencia, se están buscando nuevas formas de producir bioplásticos usando azúcares provenientes de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos que sean abundantes y fácilmente acopiables.

Por tal razón, las fuentes de carbono no convencionales como las macroalgas son una de las biomazas más interesantes y económicas debido a su presencia en casi todos los ecosistemas, su alto contenido de carbohidratos y su bajo porcentaje de lignina, que permite convertir la biomasa en azúcares simples usando tratamientos físicos, químicos o mixtos. De igual forma, el uso de ellas contribuye a solventar el problema medioambiental que supone una acumulación excesiva de estas en los océanos, que provoca turbidez, agotamiento del oxígeno disuelto en el agua y daño de corales, entre otros (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxitirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*, 2017) (Borines & De león, Producción de bioetanol a partir de macroalga *Sargassum* spp., 2013).

Entre los numerosos pretratamientos que se pueden aplicar a la biomasa algal, los más frecuentemente referenciados en la bibliografía son el calentamiento por microondas, el hidrotérmico en autoclave, hidrólisis química y sonicación. Si bien, la hidrólisis ácida se usa ampliamente en aplicaciones industriales debido a su bajo costo, la hidrólisis enzimática

proporciona una alta producción de bioazúcar en condiciones suaves de operación (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*, 2017). Por lo tanto, para acceder a los beneficios de ambos métodos y alcanzar mejores resultados se realizó inicialmente un pretratamiento químico analizando el efecto de la concentración de ácido (0.1N, 0.2N y 0.5N HCl) y el tiempo de contacto (20, 30 y 60 min) con el fin de modificar la estructura de la pared de la biomasa y hacer que los polisacáridos internos estén más disponibles para la siguiente etapa de hidrólisis enzimática, en la cual se utilizó una dosis de 117.46 [FPU/g biomasa] del preparado enzimático comercial Cellic CTec 2, Novozyme Corp.

Finalmente, la medida de la concentración máxima de azúcares reductores y glucosa en los hidrolizados obtenidos a partir de la biomasa pretratada a las diferentes condiciones mencionadas, permitirá seleccionar cuál es la más adecuada para ser usada en posteriores procesos de producción de bioplásticos o bioproductos de interés.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el proceso del pretratamiento químico de la biomasa algal sobre el rendimiento en la producción de azúcares reductores.

1.2 Objetivos Específicos

Determinar las condiciones de pretratamiento de la biomasa algal que favorecen la producción de azúcares reductores y glucosa. Asimismo, establecer el tiempo de hidrólisis que maximiza la producción de azúcares reductores y glucosa. Finalmente, analizar la facultad que tiene la biomasa algal para producir azúcares reductores que posteriormente se utilizarán para la síntesis de bioproductos de interés.

2. Estado del Arte

2.1 Macroalgas

Las algas marinas han recibido gran atención en los últimos años debido a su alta concentración de polisacáridos, bajo contenido de lípidos, su riqueza natural en minerales, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas. Este grupo heterogéneo de plantas se puede clasificar en algas pardas (Phaeophyta), algas rojas (Rhodophyta) o algas verdes (Chlorophyta), dependiendo de sus nutrientes y composición química (Gupta & Abu-Ghannam, 2011) (Peinado, Girón, & Koutsidis, 2014).

Las algas rojas son las más abundantes, sus polisacáridos específicos son agar, carragenina, lignina y celulosa en menor proporción. Estas obtienen su color característico de los pigmentos fotosintéticos ficoeritrina, ficocianina y se encuentran en las zonas litoral y nerítica del océano. Por otro lado, las algas verdes deben su color a que contienen clorofila A, B y se encuentran en zonas poco profundas del océano para absorber una mayor cantidad de luz. Sus polisacáridos son ulvano, almidón, manano y celulosa (T. M. Thompson, 2019).

Las algas pardas le deben su color al pigmento de xantofila y fucoxantina, son especies ricas en fibra soluble y yodo, sus principales polisacáridos son alginato, fucoidano, celulosa y laminaria. Son utilizadas principalmente como agentes espesantes y gelificantes para diferentes

aplicaciones industriales, incluido el uso en alimentos (Peinado, Girón, & Koutsidis, 2014). De esta especie las más investigadas a escala laboratorio han sido *Sargassum* sp, *Sargasum fulvellum* y *Laminaria japonica* obteniéndose los rendimientos mostrados en la Tabla 1, En donde (AR) hace referencia a los azúcares reductores y (GL) a la glucosa.

Tabla 1

Rendimiento en diferentes tipos de alga

| ALGA | PRETRATAMIEN | RENDIMIEN | REFERENC |
|-------|--|--|--|
| | TO | TO | IA |
| m spp | 10% de carga de biomasa (p/v) en 4% (p/v) H ₂ SO ₄ , 115 ° C, 1.5 h, 35 Tamaño de malla Tyler. | 120 mg / g biomasa (AR) 40 mg/ g biomasa (GL) | (Borines & De león, Producción de bioetanol a partir de macroalga <i>sargassum</i> spp., 2013) |
| m sp | 10% de carga de biomasa (p/v) en H ₂ SO ₄ 0.15N, 121 °C, 15 min, 50 tamaños de malla. | 200.8 mg/g biomasa (AR) 49.98 mg/g biomasa (GL) | (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas |

| | | | | |
|--------------------|--|------------------------|--|---|
| | | | | pardas para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando Cupriavidus necator, (2017) |
| Sargasum fulvellum | 10% de carga de biomasa (p/v) en HCl 0.1N, 121°C, 15 min, <0.5 cm de tamaño de partícula | 59.6 mg/g biomasa (GL) | | (Kim, Jung, Chang, & Lee, 2011) |
| Laminaria japonica | 18% de carga de biomasa (p / v) en 0.1N HCl, 121 ° C, 15 min | 69.8 mg/g biomasa (GL) | | (Kim, Jung, Chang, & Lee, 2011) |

Nota. Rendimiento de azúcares reductores y glucosa en diferentes tipos de alga encontrados en la bibliografía.

Los anteriores estudios demostraron que mediante el proceso combinado de hidrólisis ácida y enzimática usando enzimas como laminarasas, alginasas y mezclas comerciales de celulasas, se lograron buenos rendimientos, reiterando el potencial de las algas pardas como fuente de biomasa en la obtención de azúcares monoméricos para la elaboración de productos bioquímicos.

2.2 Pretratamiento e Hidrólisis de la Biomasa Algal

El pretratamiento de la biomasa se realiza con el fin de facilitar el acceso de las enzimas en la etapa de hidrólisis a los azúcares complejos que están estructuralmente restringidos. Generalmente una estrategia de pretratamiento eficiente incluye romper los polímeros de la pared celular del alga para poder acceder a los polímeros constituyentes como la celulosa y después romper los enlaces de hidrógeno en la celulosa cristalina, así, finalmente aumentar la porosidad y el área de superficie para la posterior hidrólisis enzimática (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*, 2017). Algunos de los pretratamientos estudiados han sido hidrólisis ácida, explosión de vapor, oxidación alcalina húmeda o el uso de “disolventes verdes” como líquidos iónicos (Ravanal, Pezoa-Conte, & Salazar, 2016).

En efecto, el pretratamiento con ácido emplea generalmente ácido clorhídrico y ácido sulfúrico en concentraciones de 1 a 10% (v/v), utilizando temperaturas moderadas que se encuentran en el rango de 100 °C -150°C. Además, este tipo de pretratamiento es ampliamente usado porque ofrece bajos costos y altos rendimientos. Sin embargo, se debe tener sumo cuidado en las condiciones de reacción como la temperatura, la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis debido a que cuanto más severas son ellas, aparecen los subproductos de descomposición de azúcares como furfural, 5-hidrometilfurfural (5-HMF) y ácido levulínico, los cuales son conocidos inhibidores en procesos de fermentación que buscan producir etanol (Kim, Chae-Hwan, & Sung-Wan, 2015).

Por último, en la hidrólisis enzimática las enzimas hidrolasas actúan como catalizadores biológicos de la reacción de hidrólisis de los hidratos de carbono para la obtención de azúcares fermentables. Se prefiere el uso de enzimas en la sacarificación de estos polisacáridos, ya que el proceso se puede realizar en condiciones suaves evitando la aparición de subproductos no deseados y reduciendo la posible contaminación ambiental (Ravanel, Pezoa-Conte, & Salazar, 2016).

2.3 Bioproductos

Las algas se han convertido durante siglos en un recurso valioso como herramienta de investigación en microbiología, así como en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Faiqah , Helmi, & Mohd Rafein , 2014). Esta biomasa no solo desempeña un papel ecológico clave en los ecosistemas costeros, sino que, a través de enfoques de cultivo sostenible también pueden tener el potencial de abordar varias de las metas de los objetivos de desarrollo sostenible.

Uno de ellos, la producción mundial de bioetanol, que alcanzó más de 51 millones de litros en el 2007 y el 70% del etanol se produjo principalmente a través de maíz y caña de azúcar, induciendo a la competencia por los recursos energéticos y de alimentos en el mercado global. Por tal razón, a pesar de que la investigación en biorrefinerías de algas todavía está en su infancia en comparación con las biorrefinerías de cultivos y lignocelulósicas que utilizan

plantas terrestres, las algas son potencialmente más adecuadas para los procesos debido a sus grandes rendimientos de biomasa, tasas de crecimiento rápidas y ausencia de necesidad de medios terrestres para su cultivo. María Cristina Ravanal et. al (Ravanal, Pezoa-Conte, & Salazar, 2016) reportaron que usando un pretratamiento con 2% de H₂SO₄ durante una hora y sacarificación con celulasas y alginasas, liberaron 68.4% en peso de glucosa (55.74 ± 0.05 mg glucosa / g de alga) del contenido máximo de monosacáridos del alga parda *M. pyrifera*. Además, se han publicado diversos artículos dirigidos a la clasificación taxonómica, medio ambiente del hábitat, capacidad de reserva de carbono y capacidad de hidrólisis de las algas, con el fin de convertir los carbohidratos de esta biomasa en biomateriales y bioenergía (G. Roesijadi, S.B. Jones, & L.J. Snowden-Swan, 2010; Kyung A, Seong-Rin, & Yoori, Potencial de las macroalgas como materia prima para la biorrefinería, 2013).

Por otro lado, los hidrolizados provenientes de la biomasa algal pueden ser usados también para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA'S), un grupo de polímeros biodegradables sintetizados por microorganismos (MO), este sirve como el carbono y los compuestos de almacenamiento de energía de los MO en respuesta al estrés ambiental (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*, 2017). Se ha desarrollado como un material polimérico biodegradable y de base biológica para una vida sostenible debido a sus propiedades similares con los plásticos sintéticos y sus propiedades ecológicas superiores, pueden ser de cadena corta, media o mixtos en función de la longitud de cadena de carbono en su monómero (Chia, Ooi, Sika, Tsuge, & Sudesh, 2010).

El tipo de polihidroxialcanoato más investigado es el poli 3-hidroxi butirato (PHB), este es rígido, quebradizo, tiene un alto grado de cristalinidad y su temperatura de fusión está cerca de su temperatura de descomposición. En consecuencia, se han dirigido múltiples estudios hacia el desarrollo de nuevos monómeros y formación de copolímeros con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y físicas (Chia, Ooi, Sika, Tsuge, & Sudesh, 2010; SerraCosta, LoboMiranda, & Grequede Morais, 2019; Hua Tiang, Min Fey, & Manoj , 2020).

3. Descripción Metodológica

3.1 Acondicionamiento de la Biomasa

La biomasa algal se recolectó de los depósitos de algas en la playa El Carmen de Barbate (Cádiz), de arribazones constituidos principalmente por el alga *Dictyota dichotoma*. Posteriormente se sometió a lavado usando agua de grifo con el objetivo de reducir la salinidad y la cantidad de arena que contiene, para esto, se llenaron los tanques contenedores de las algas dejando que el agua rebosara y se prolongó el lavado hasta que la conductividad del agua en los tanques se igualara a la conductividad del agua del grifo (aproximadamente 24h); partiendo de una conductividad de 32000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y finalizando con 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Después, se secaron durante 48h a temperatura ambiente en el invernadero del Campus de Puerto Real, extendiéndose sobre papel de filtro con el objetivo de evitar que la humedad quedase en el interior de ellas. Finalmente, la reducción de tamaño se realizó

usando un molino rotatorio a 10000 rpm sin tamiz. Tras la molienda, el alga acondicionada fue tamizada para conocer su distribución de tamaños de partícula (Tabla 2.) y se usó el alga molida sin tamizar con el fin de aprovechar toda la biomasa.

Tabla 2

Distribución del tamaño de partícula.

| Tamaño de partícula (mm) | Porcentaje (%) |
|--------------------------|----------------|
| $2 > \phi > 1.5$ | 50.6 |
| $1.5 > \phi > 1$ | 24 |
| $1 > \phi > 0.75$ | 12.4 |
| $0.75 > \phi > 0.5$ | 7.6 |
| $0.5 > \phi > 0.25$ | 5.4 |

Nota. En la izquierda se refleja el porcentaje de alga que se encuentra entre los respectivos tamaños de partícula después del tamizado.

3.2 Pretratamiento

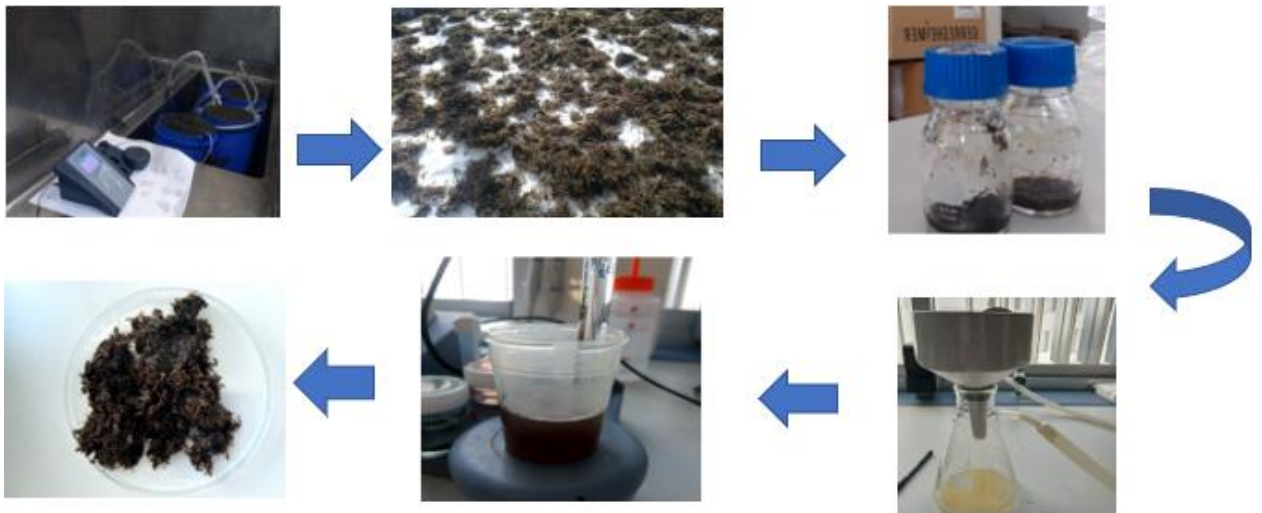
Con la intención de comparar el efecto del tiempo y la concentración de ácido sobre la producción de azúcares reductores (AR) se realizó el pretratamiento por triplicado usando ácido clorhídrico (HCl) variando las concentraciones en 0.1N; 0.2N y 0.5N con tiempos de 20, 30 y 60 min, además, de un blanco sin ácido.

En la imagen 1 se muestran los pasos del pretratamiento, el cual inició preparando 3g de biomasa en 70 mL de disolución (4.29% p/v) empleando botellas Pyrex de 250 mL

en un autoclave a 121 °C. Una vez terminado el ciclo, la biomasa algal es filtrada por vacío con un embudo Büchner y un matraz Kitasato. Al líquido resultante se le midió el pH y se elevó con micro perlas de hidróxido de sodio hasta aproximadamente un valor de 5 para realizar el análisis de AR con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El alga pretratada es lavada nuevamente con agua de grifo con el fin de disminuir la acidez y es secada en una estufa a 40 °C durante 24 h para su posterior hidrólisis enzimática.

Imagen 1

Esquema de acondicionamiento y pretratamiento del alga.



Nota. El proceso de acondicionamiento inicia con el lavado de las algas, seguido por el secado para su posterior pretratamiento, filtración y corrección de pH, finalmente la biomasa es secada y preparada para la siguiente etapa de hidrólisis.

3.3 Hidrólisis Enzimática

En esta parte del proceso se emplea para hidrólisis de la biomasa algal el preparado enzimático comercial Cellic CTec 2, Novozyme Corp, compuesto por enzimas celulasas,

β glucosidasa y hemicelulasas, y condiciones de operación óptimas que oscilaron en un rango de temperatura entre 45-50 °C y un rango de pH entre 5.0-5.5. Con base en esto y teniendo en cuenta los resultados reportados por otros autores en la bibliografía se realizó la hidrólisis a 50 °C, pH de 5 y velocidad de agitación de 150 rpm.

El procedimiento se llevó a cabo esterilizando en el autoclave a 121°C durante 20 minutos, una suspensión 1g de alga pretratada en 45mL de disolución tampón fosfato 0.05 M, pH 5 en matraces Erlenmeyer de 100 mL. Una vez esterilizados y enfriados a temperatura ambiente, se añadieron 117.46 FPU/g biomasa (6 g enzimas/g celulosa) y se agitó manualmente durante unos pocos minutos para así obtener la primera muestra en tiempo 0h. Posteriormente se incubaron los matraces en las condiciones óptimas del preparado enzimático en un incubador orbital y se tomaron 500 μ L de muestra a las 4h, 6h, 8h, 24h y 48h, con el fin de llevar un seguimiento y posterior análisis tanto de azúcares reductores como de concentración de glucosa obtenida.

3.4 Medida de los Azúcares Reductores

El análisis de la concentración de azúcares reductores se hizo mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en microplacas (ver la imagen 2). En el cual, se produce una reacción entre los azúcares reductores presentes en la muestra y el DNS, haciendo que este último se reduzca a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, tornando a un color rojizo-anaranjado dependiendo de la cantidad de azúcar presente. Una vez terminada la reacción se lee la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Para esto, fue necesario preparar una disolución del reactivo DNS disolviendo en 250 mL de agua destilada a 80 °C, 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Cuando la disolución se enfrió, se añadieron 100 mL de una disolución de NaOH 2N y 150 g de tartrato de sodio y potasio. Finalmente se aforó con agua destilada para alcanzar un volumen final de 500 mL. Asimismo, se tomaron 500 µL de muestra en microtubos Eppendorf y fueron almacenados a -20 °C hasta el momento del análisis. Durante la primera etapa del pretratamiento dicha muestra se tomó del líquido filtrado después de haber aumentado su valor de pH a 5, mientras que en la etapa de la hidrólisis se tomaron las muestras cada determinado tiempo como se explicó anteriormente.

EL procedimiento se realizó empleando una microplaca que consta de 96 pocillos con una capacidad de 340 µL, hecha a base de un material resistente que soporta los 105 °C, temperatura a la que ocurre la reacción entre el DNS y los azúcares reductores. Para ello, se descongelaron las muestras y se llevaron a la centrífuga durante 10 minutos a una velocidad de 10000 rpm, del líquido sobrenadante se tomaron 25 µL y se depositaron en cada pocillo de la microplaca junto con 25 µL de reactivo DNS. Una vez mezclados se llevó al termo bloque previamente calentado a 105 °C en donde permaneció durante 10 minutos mientras ocurre la reacción. Pasado este tiempo, fue llevado al congelador durante aproximadamente 5 minutos con el fin de parar la reacción y; seguidamente se completó cada pocillo con 250 µL de agua destilada. Finalmente es llevada al espectrofotómetro de microplacas y se leyó la absorbancia a 540 nm.

Asimismo, en cada análisis se construyó un blanco con agua destilada y una recta de calibrado como resultado del ajuste lineal de los datos obtenidos de absorbancia a 540

nm, usando concentraciones conocidas de glucosa como 0.25 g/L; 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L; 2 g/L; 4 g/L y 5 g/L, llamadas disoluciones patrón. De esta manera y con ayuda del programa GEN 5 se obtuvo la concentración de azúcares reductores en cada muestra.

Imagen 2

Microplaca de análisis DNS.



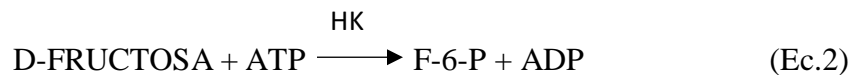
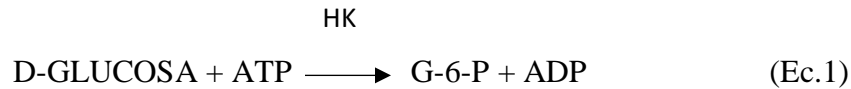
Nota. Lo colores más oscuros indican mayor cantidad de azúcares reductores.

3.5 Medida de la Glucosa

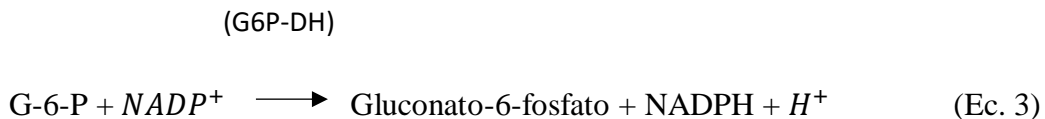
La concentración de glucosa se estimó mediante el protocolo de ensayo en microplaca, usando el kit enzimático comercial D-Fructosa and D-Glucosa de la compañía MEGAZYME.

El principio del método se basa en que D- glucosa y D- fructosa son fosforiladas por la enzima hexoquinasa (HK) en presencia adenosín trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato

(G-6-P) y fructosa-6-fosfato (F-6-P) con la formación simultanea de adenosín difosfato (ADP) (Ec. 1),(Ec.2).



En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la G-6-P es oxidada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$) a gluconato-6-fosfato y la formación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) (Ec.3).



La cantidad de NADPH formada en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa. Es el NADPH el que se mide por la absorbancia a 340 nm.

El procedimiento consiste en agregar a cada pocillo de la microplaca 0.200 mL de agua destilada con 0.010 mL de muestra, 0.010 mL de solución buffer (pH 7.6) y 0.010 mL de solución ($NADP^+/ATP$). Se mezcla y se lee la absorbancia a 340 nm para obtener los

valores de A_1 . Después, se agregan 0.002 mL de la solución (HK/G6P-DH) y se lee nuevamente la absorbancia para obtener los valores de A_2 .

Finalmente se halla el contenido de glucosa usando la (Ec.4) en la cual V , representa el volumen final en cada pocillo [mL], W es el peso molecular, ϵ es el coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm ($6300 \frac{l}{mol*cm}$), d hace referencia al recorrido de luz [cm] y v es el volumen de muestra [mL].

$$c = \frac{v*W}{\epsilon*d*v} * \Delta A_{D-glucosa} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\Delta A_{D-glucosa} = (A_2 - A_1) \quad (\text{Ec.5})$$

3.6 Actividad Enzimática Celulasa

La actividad enzimática del cóctel utilizado en la hidrólisis se midió siguiendo el protocolo establecido por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Baker, 2008). Se empleó como sustrato el papel de filtro 50 mg Whatman No1, en tiras de 1x6 cm, junto con dos diluciones del cóctel enzimático utilizando como medio para las reacciones tampón citrato 0.05 M pH 4.8. Estas, se llevaron a cabo en tubos de ensayo y se prepararon a las siguientes condiciones:

-Blanco reactivo: contiene 1.5 mL de tampón citrato.

-Blanco enzimas: contiene 1 mL de disolución tampón y 0.5 mL de la enzima diluida.

-Blanco sustrato: incluye 50 mg del papel de filtro enrollado en el fondo y se añadió 1.5 mL de disolución tampón.

-Patrones de glucosa: contiene 1 mL de disolución tampón y 0.5 mL de patrón. Estos patrones se prepararon con concentraciones de glucosa desde 0.25 a 5 g/L.

-Medida de actividad enzimática: a estos tubos se añadió 50 mg de papel de filtro, 1 mL de disolución tampón y 0.5 mL de enzima diluida. Se prepararon por triplicado con las dos diluciones de enzimas preparadas.

Antes de añadir la dilución de enzima, los tubos fueron precalentados a 50 °C en un baño durante 5 min. Una vez añadida la enzima, los tubos fueron incubados a 50 °C durante 1 h. Para determinar la concentración de azúcares producidos se empleó el método del DNS, añadiendo 3 mL de DNS a cada tubo e incubándolos a 105 °C durante 10 min para que se llevara a cabo la reacción entre los azúcares reductores y el DNS. A continuación, los tubos se enfriaron y se añadieron 250 µL de agua destilada; finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm.

3.7 Rendimiento de la Hidrólisis Enzimática

El rendimiento del proceso es el porcentaje de azúcares reductores (AR) obtenidos de los polisacáridos hidrolizables presentes en las algas. Este, se calculó a partir de los AR obtenidos por gramo de biomasa seca en la etapa de pretratamiento más los de la etapa de

hidrólisis y el contenido en peso seco de fucoidano, laminarina, alginatos y celulosa por gramo de biomasa seca (Ec. 6).

$$Y_H = \frac{AR}{(C+F+L+A) \cdot 1,1} \cdot 100 \quad (\text{Ec.6})$$

Donde:

- AR: gramos de azúcares reductores obtenidos por gramo de biomasa algal seca [g/g].
- C: gramos de celulosa por gramo de biomasa algal seca [g/g].
- F: gramos de fucoidano por gramo de biomasa algal seca [g/g].
- L: gramos de laminarina por gramo de biomasa algal seca [g/g].
- A: gramos de alginatos por gramo de biomasa algal seca [g/g].
- 1,1: factor de corrección de polisacárido a monosacárido.

Los datos del contenido en peso seco de fucoidano, laminarina, alginatos y celulosa por gramo de biomasa seca se obtuvieron a partir de la composición de fibra de la biomasa algal (Tabla 3.). Asimismo, de acuerdo con el estudio realizado por Gómez-Ordoñez et al. 2010 (E. Gómez-Ordóñez, 2010), la fracción ácido detergente (FAD), en el caso de las algas pardas, está constituida principalmente por fucoidano, laminarina y alginatos. La fracción lignina ácido detergente (LAD) está constituida mayoritariamente por celulosa, algunos residuos de ácido urónico procedentes del alginato y lignina Klason y finalmente la fracción neutro detergente (FND) proporciona una medida sobre el contenido en proteínas de la muestra.

Para los cálculos del rendimiento del proceso, se ha considerado como polisacáridos potencialmente hidrolizables, a la suma de las fracciones FAD y LAD, formadas por fucoidano, laminarina, alginatos y celulosa, que supone aproximadamente un 25% (p/p) del alga seca.

Tabla 3

Composición de la biomasa algal.

| Composición % peso seco (p/p) | |
|--|-------|
| Fibra ácido detergente (FAD) | 18.46 |
| Lignina ácido detergente (LAD) | 6.59 |
| Fracción no extraíble pero calcinable | 6.46 |
| Fibra neutro detergente (FND) | 57.66 |
| Sales insolubles, diatomas, silicatos | 10.88 |

3.8 Productividad de la Hidrólisis Enzimática

La productividad de la etapa de hidrólisis es la cantidad total de azúcares reductores (AR) obtenidos por gramo de biomasa algal entre el tiempo que tarda el

proceso en llegar a la estabilidad, es decir, el tiempo en el que la cantidad de AR obtenidos empieza a mantener una tendencia casi constante.

$$PR = \frac{mAR}{t} \quad (\text{Ec. 7})$$

- PR: productividad de la etapa de hidrólisis [mg/g·h].
- mAR: miligramos de azúcares reductores obtenidos por gramo de biomasa algal seca [mg/g].
- t: tiempo de incubación de la hidrólisis enzimática [h].

4. Análisis y Resultados

4.1 Pretratamiento

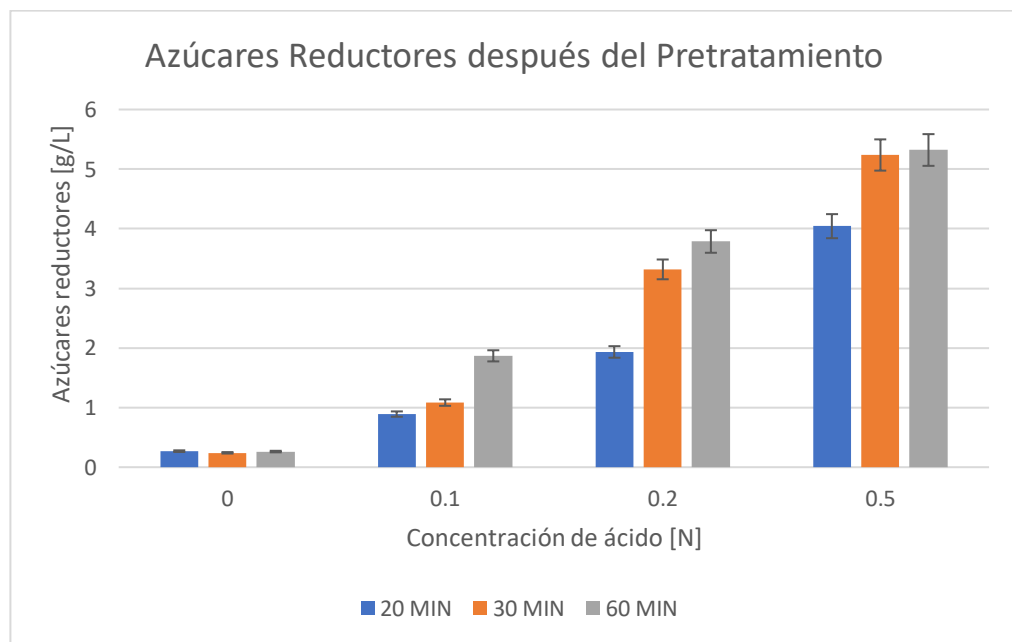
Se realizó el pretratamiento ácido del alga *Dictyota dichotoma* para la producción de azúcares reductores (AR) modificando la concentración de ácido clorhídrico (HCl) y el tiempo que permanecía en el autoclave, sin variaciones de presión ni temperatura entre los experimentos.

La gráfica 1. muestra el efecto del tiempo y la concentración de ácido usada sobre la producción de AR, usando la suspensión de biomasa algal al 4.29% con ácido 0.1 N, 0.2 N y 0.5 N con tiempos de 20, 30 y 60 min. Como se indicó anteriormente, la suspensión pretratada se centrifugó para separar el sólido pretratado del efluente líquido. Para la

medida de los azúcares se debió corregir el pH del efluente líquido debido a que el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se comporta como sal en medios básicos y neutros, por lo tanto, es soluble, sin embargo, en medios ácidos ocurre una protonación y se precipita, evitando así que se pueda realizar el análisis satisfactoriamente (Gonzalez-Lucas, 2016). Por lo tanto, la concentración de azúcares reductores representada en la Gráfica 1. Corresponde con los azúcares que se han solubilizado en el efluente líquido tras el pretratamiento.

Gráfica 1

Efecto de la concentración de HCL y el tiempo sobre los azúcares reductores determinados mediante el DNS.



Nota. La gráfica representa los azúcares reductores que se han solubilizado en el efluente líquido tras el pretratamiento.

La cantidad máxima de azúcar reductor se obtuvo con la concentración de 0.5N a 30 min y 60 min, siendo estas 5.237 g/L y 5.321g/L respectivamente. Cuanto más aumenta el tiempo y la concentración, es decir, cuanto más drástica es la condición utilizada, el pH es más bajo y el alga pretratada es más difícil de manipular en las siguientes etapas porque tiene una textura mucho más espesa y menos compacta como se muestra en la imagen 3. Las tres fueron imágenes tomadas del alga con un mismo tiempo de contacto (60 min), a la izquierda la biomasa tratada con menor concentración de ácido (0.1 N), aumentando hacia la derecha la concentración de ácido (0.2 N y 0.5 N) respectivamente.

Imagen 3

Comparación visual entre las texturas de biomasa algal pretratada.



Nota. Las imágenes muestran la biomasa pretratada una vez terminado el pretratamiento con diferentes concentraciones de ácido.

Por otro lado, Kupiainen y col. (2010) (Kim, Chae-Hwan, & Sung-Wan, 2015) sugirieron que los iones de hidrógeno son un factor importante para reducir o aumentar la formación de azúcares reductores (AR), ya que los protones en la molécula de ácido participarán en las reacciones de descomposición como catalizador, es decir, a mayor

cantidad de iones, mayor cantidad de azúcar. Asimismo, a un menor valor de pH mayor es la concentración de protones, por lo tanto, mayor será la concentración de AR obtenida.

Azizi et al. (Azizi, Najafpour, & Younesi, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*, 2017) realizaron un estudio usando concentraciones de ácido de 0.05 N, 0.1 N, 0.15, 0.3 N, 0.5 N y 1 N, y encontraron que con concentración de ácido mayor de 0.5 N disminuía notoriamente la cantidad de azúcares reductores obtenidos y era necesaria una mayor cantidad del agente neutralizante en el siguiente paso del proceso. Por tal razón, la mayoría de los estudios reportados en la bibliografía se realizan con concentraciones hasta de 0.5 N, se tiene mayor economía, seguridad y prevención de reacciones secundarias en el proceso.

4.2 Hidrólisis Enzimática

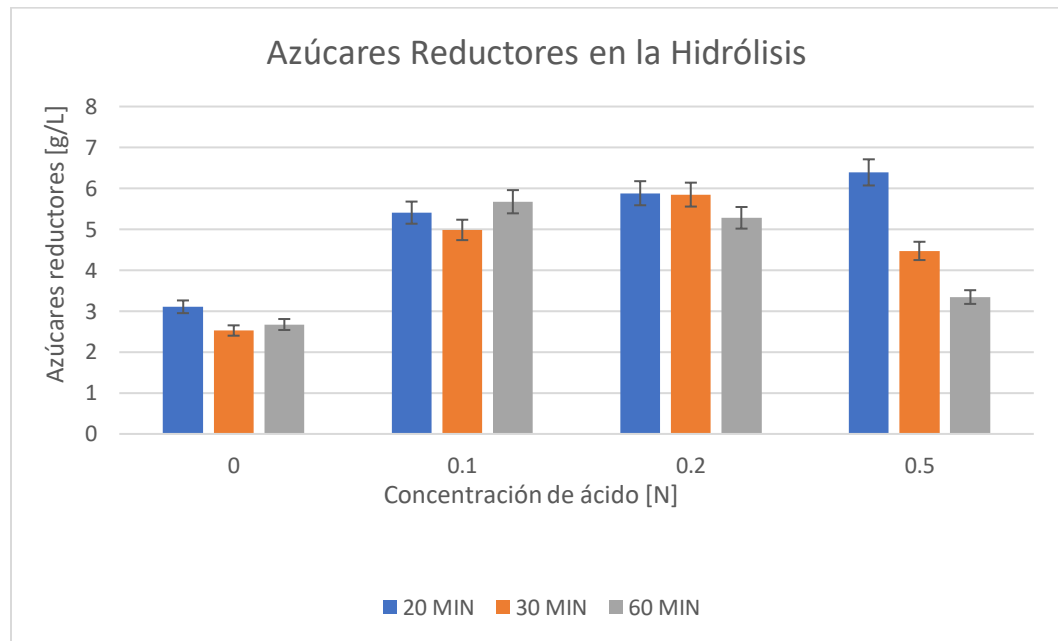
Las enzimas de la hidrólisis actúan principalmente degradando los tejidos de las algas y rompiendo las paredes celulares y los complejos materiales de almacenamiento interior que no se rompen durante el pretratamiento químico (Faiqah , Helmi, & Mohd Rafein , 2014)

La hidrólisis enzimática se realizó con 1g de alga pretratada, una vez lavada y seca, en 45 mL de tampón fosfato y se añadieron 344 μ L (117.46 FPU/g biomasa) de preparado enzimático. Cabe mencionar que todo el material utilizado durante las 48h de proceso fue previamente esterilizado para evitar posibles contaminaciones. La Gráfica 2. recoge los

resultados del contenido de AR analizados con DNS una vez terminado todo el proceso (48h).

Gráfica 2

Efecto del pretratamiento sobre los azúcares reductores en la hidrólisis.



Nota. La gráfica representa el efecto de la concentración de ácido y el tiempo sobre la producción de azúcares reductores después de 48 h de hidrólisis.

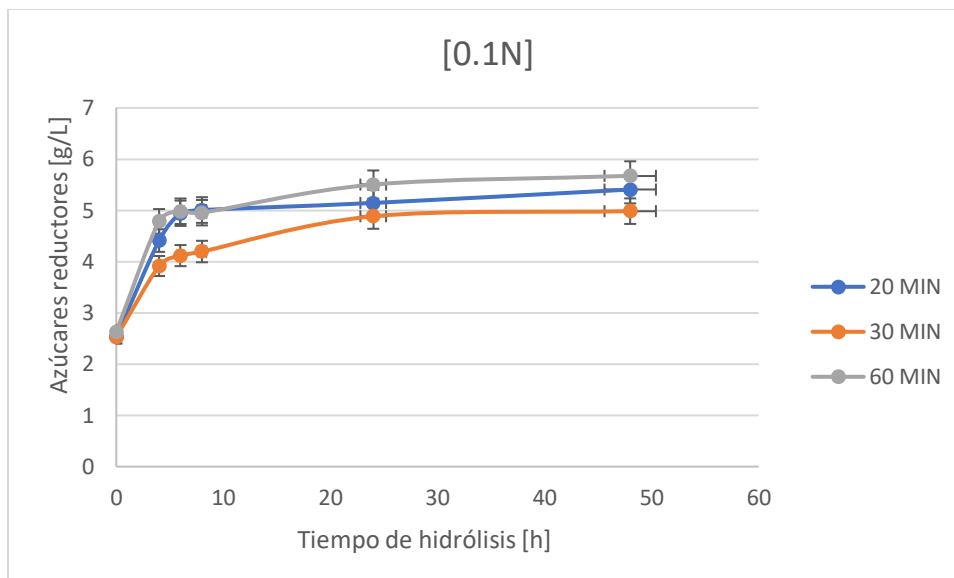
La cantidad máxima de AR se obtuvo a partir del experimento realizado con HCl 0.5 N y 20 min de pretratamiento, alcanzando una concentración de 6.391 g/L. Contrario a lo que podía esperarse después de la medida de los azúcares reductores de los efluentes líquidos obtenidos en el pretratamiento, donde se alcanzaron los mayores rendimientos con ácido 0.5N a 30 y 60 min, en los hidrolizados enzimáticos de la biomasa algal pretratada a esas condiciones no se lograron los mejores resultados. Esto puede ocasionarse debido a

que a pesar de que la biomasa pretratada fue lavada antes del proceso de hidrólisis, posiblemente aún seguía conservando restos de ácido y un pH bajo que no es compatible con el pH óptimo de la enzima empleada, afectando a su vez la actividad enzimática. Generalmente, cuanto más severas son las condiciones de reacción utilizadas en el pretratamiento químico, más probabilidad hay de que aparezcan subproductos inhibidores para una posterior fermentación como el ácido levulínico, furfural y 5-hidrometilfurfural (5-HMF) y menos azúcares (Faiqah , Helmi, & Mohd Rafein , 2014) (Wu & Jane-Yii, 2014).

Por otro lado, las siguientes gráficas muestran la evolución de los azúcares reductores producidos durante las 48 h de hidrólisis enzimática del alga pretratada en las diferentes condiciones ensayadas. En ellas se puede observar cómo en casi todos los ensayos se alcanza la máxima producción de AR a las 24 h de hidrólisis y a partir de ahí se mantiene una tendencia casi constante.

Gráfica 3

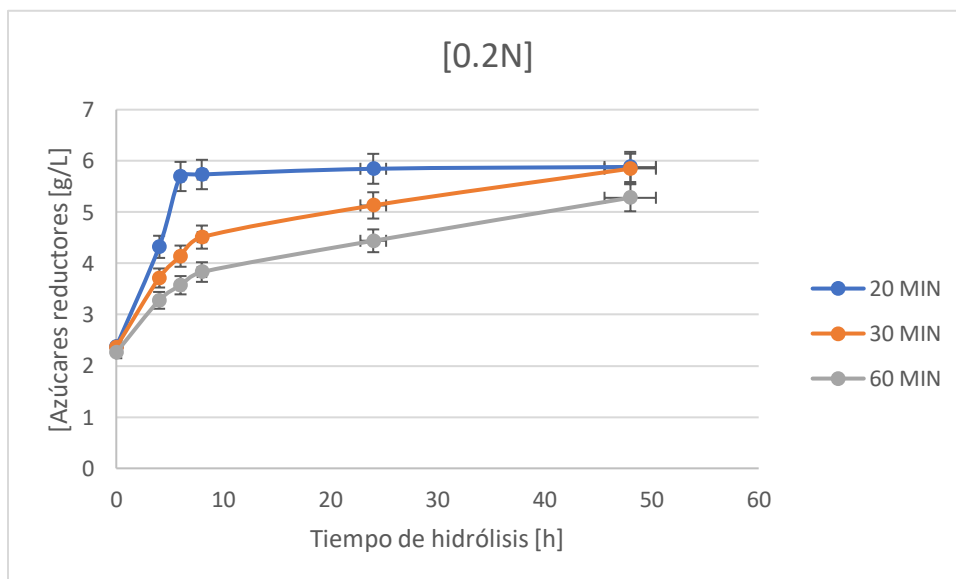
Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.1N.



Nota. La gráfica representa la evolución de los azúcares reductores durante las 48h de hidrólisis enzimática.

Gráfica 4

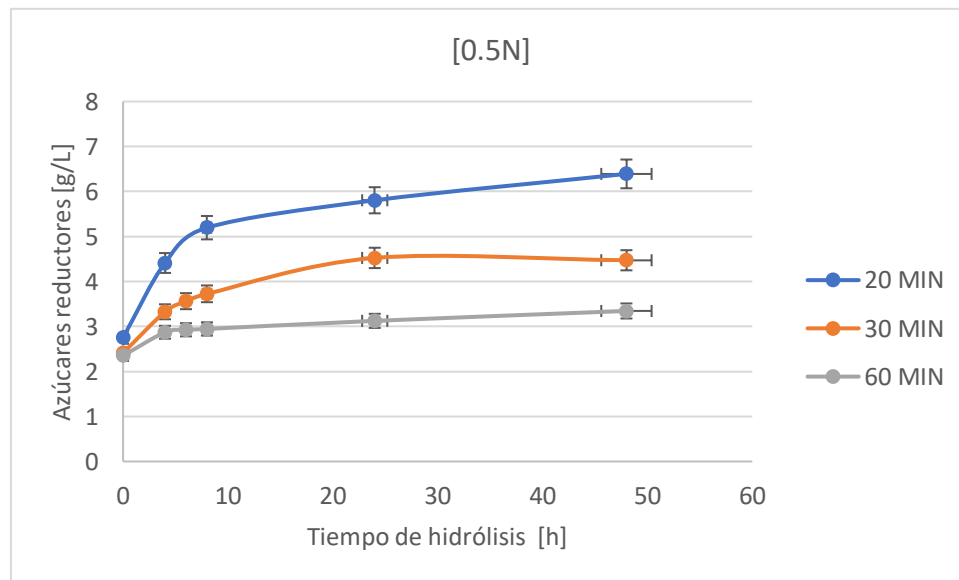
Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.2N.



Nota. La gráfica representa la evolución de los azúcares reductores durante las 48h de hidrólisis enzimática.

Gráfica 5

Evolución de los azúcares reductores con los diferentes tiempos usados durante el pretratamiento y concentración de HCl 0.5N.



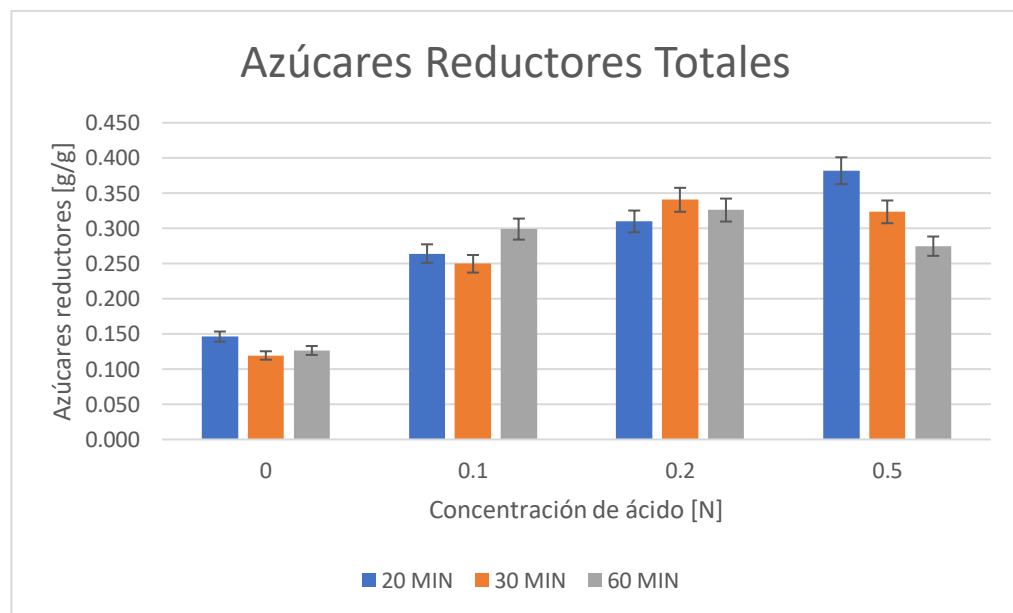
Nota. La gráfica representa la evolución de los azúcares reductores durante las 48h de hidrólisis enzimática.

En ellas también se observa que, para la máxima concentración de ácido usada, a medida que aumenta la severidad en la condición estudiada, es decir, mayor tiempo en el autoclave durante el pretratamiento, se obtienen menos azúcares al final de la hidrólisis. Dicho efecto podría indicar que se está produciendo mayor cantidad de inhibidores ya que Lenihan. P et al. (P.Lenihan, A.Orozco, E.O'Neill, & M.N.M.Ahmad, 2010) encontraron que a medida que aumenta la concentración de ácido y el tiempo en el pretratamiento,

aumenta la velocidad de reacción y se alcanza la máxima concentración de azúcares de forma más rápida. Sin embargo, conforme la reacción continua se aumenta también la velocidad de descomposición del azúcar, lo que resulta en un rendimiento final de azúcares muy disminuido al final del período de reacción comparado con los demás ensayos. Por lo tanto, la concentración de ácido ejerce un efecto importante sobre la velocidad de reacción tanto para la producción como para la descomposición del azúcar. A medida que aumenta la concentración de ácido, la velocidad para ambos se vuelve más rápida (P.Lenihan, A.Orozco, E.O'Neill, & M.N.M.Ahmad, 2010).

Gráfica 6

Concentración de azúcares reductores totales después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática.



Nota. Efecto del pretratamiento sobre las concentraciones totales de azúcares reductores obtenidas.

En la gráfica 6 se representan las concentraciones totales de AR (azúcares medidos en el efluente líquido generado en el pretratamiento más los generados en la hidrólisis enzimática del alga pretratada) en las distintas condiciones de pretratamiento ensayadas. Se observa que la mejor condición de pretratamiento es HCl 0.5 N con un tiempo de reacción de 20 minutos, logrando una concentración final de AR de 0.382 g/ g alga (10.434 g/L). A pesar de que esta no brindó el contenido más alto de azúcar al finalizar el pretratamiento sí dio los mejores resultados al finalizar la hidrólisis; lo que indica que, al ser una condición con bastante concentración de HCl, pero poco tiempo de reacción (20 min) se logra aumentar la accesibilidad de las enzimas a los polisacáridos constituyentes del alga en la siguiente etapa de hidrólisis enzimática. De esta forma se facilita la conversión de los polisacáridos en azúcares simples (Kim, Chae-Hwan, & Sung-Wan, 2015).

En la Tabla 4. se muestra la productividad de la hidrólisis y el rendimiento total de los azúcares obtenidos del pretratamiento y la hidrólisis enzimática.

Tabla 4

Rendimiento y productividad de cada condición de hidrólisis evaluada.

| 20 MIN | | | |
|----------------|---------------|------------------|---------------------------|
| [ÁCIDO] [N] | [AR] [g/L] | % RENDIMIENTO | PRODUCTIVIDAD [mg/g*h] |
| 0 | 3.376 | 53.02 | 9.06 |
| 0.1 | 6.298 | 95.85 | 15.77 |
| 0.2 | 7.815 | 112.43 | 17.16 |

| | | | |
|---------------|--------|--------|-------|
| 0.5 | 10.434 | 138.61 | 18.64 |
| 30 MIN | | | |
| 0 | 2.768 | 43.31 | 7.37 |
| 0.1 | 6.069 | 90.59 | 14.54 |
| 0.2 | 9.166 | 123.60 | 17.06 |
| 0.5 | 9.709 | 117.38 | 13.04 |
| 60 MIN | | | |
| 0 | 2.936 | 45.89 | 7.80 |
| 0.1 | 7.542 | 108.48 | 16.55 |
| 0.2 | 9.067 | 118.30 | 15.40 |
| 0.5 | 8.666 | 99.68 | 9.76 |

Nota. El rendimiento y la productividad están basados en 24h de hidrólisis (el tiempo en el que se alcanzó la mayor concentración de azúcares).

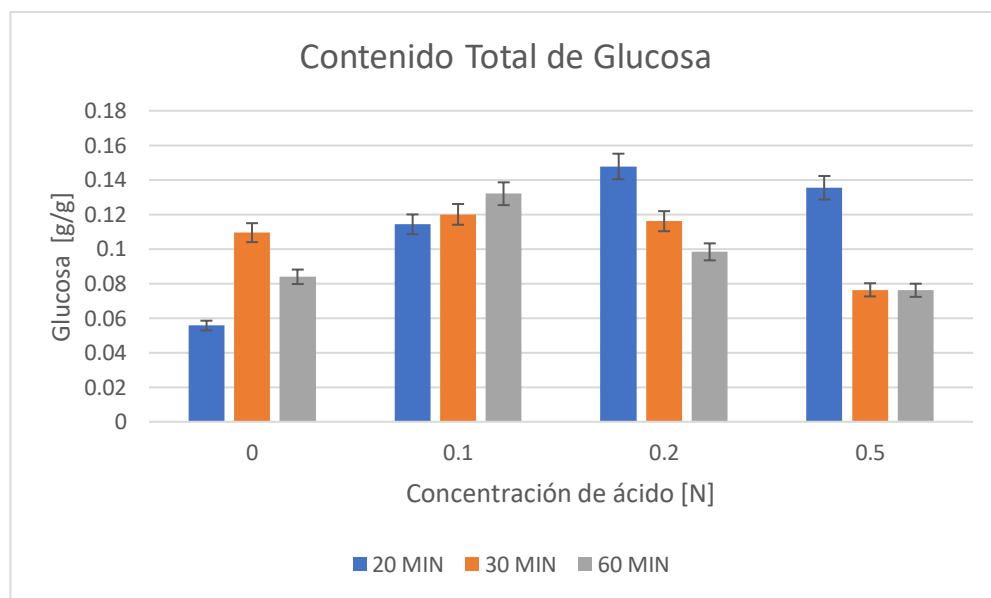
4.3 Análisis de la Cantidad de Glucosa Obtenida

La Gráfica 7. muestra el efecto de la concentración de ácido y el tiempo sobre la cantidad total de glucosa producida al final de todo el proceso, es decir, la suma de la concentración obtenida del pretratamiento y la hidrólisis enzimática. Las condiciones evaluadas que presentan los valores más altos son 0.2N y 0.5N con un tiempo de 20 minutos, logrando así 0.147 g glucosa/ g alga (3.291 g/L) y 0.135 g glucosa/ g alga (3.064 g/L) respectivamente. Al igual que ocurre en análisis de azúcares reductores, las condiciones más severas evaluadas muestran mejores rendimientos cuando se hace la medición del líquido sobrenadante una vez finalizado el pretatamiento y corregido el pH,

pero disminuye notoriamente al final de la hidrólisis. En consecuencia, se puede inferir que cuanto más drástica es la condición evaluada, la mayoría de los azúcares se liberan durante el pretratamiento y permanecen en el líquido filtrado, por lo que la biomasa pretratada libera menor cantidad en la siguiente etapa.

Gráfica 7

Efecto de la concentración de ácido y el tiempo sobre la cantidad total de glucosa obtenida.



Nota. Efecto de la concentración de ácido sobre la producción total de glucosa, es decir, la suma de la concentración obtenida tras el pretratamiento más la obtenida tras la hidrólisis enzimática.

5. Conclusiones y Recomendaciones

Una vez finalizado el proyecto, se recomienda el uso del pretratamiento hidrotérmico con ácido frente al pretratamiento hidrotérmico para la biomasa algal, ya que se obtiene una mayor cantidad de azúcares reductores cuando se emplean disoluciones de HCl en vez de agua. Así, en el pretratamiento realizado con agua con un tiempo de reacción de 20 min se logró una

concentración total de azúcares reductores de 0.146 g/ g alga (3.107 g/L), que es significativamente menor las obtenidas cuando se emplean disoluciones de ácido.

Se llega a la conclusión de que la mejor condición de pretratamiento para la biomasa del presente estudio fue con una concentración HCl 0.5 N y un tiempo de reacción en el autoclave de 20 min. Con esta, se obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores totales 0.382 g/ g alga (10.434 g/L) y una alta concentración de glucosa 0.135 g glucosa/ g alga (3.064 g/L).

Durante el proceso de hidrólisis enzimática la concentración máxima de azúcares se alcanza aproximadamente a las 24h, a partir de ahí se mantiene una tendencia casi constante cuando se utilizan condiciones moderadas de pretratamiento. Por el contrario, a condiciones más drásticas el proceso puede tardar más tiempo en estabilizarse y de igual forma disminuir la cantidad de azúcares obtenidos.

Para futuros pretratamientos químicos se recomienda eliminar las condiciones extremas de experimentación, es decir, altas concentraciones de ácido y altos tiempos de reacción. Finalmente, una vez más se ratifica la facultad del alga como una potencial fuente de carbono para producir azúcares reductores que podrán usarse posteriormente en la obtención de diferentes productos por vía fermentativa, como polihidroxicarboxilatos, o bioetanol, entre otros.

Referencias Bibliográficas

- Azizi, N., Najafpour, G., & Younesi, H. (2017). Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxi butirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 1029-1040.
- Azizi, N., Najafpour, G., & Younesi, H. (2017). Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática de algas pardas para la producción de polihidroxi butirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator*. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 101, 1029-1040.
- Baker, B. A. (2008). Measurement of Cellulase Activities.
- Borines, M., & De león, R. (2013). Producción de bioetanol a partir de macroalga *sargassum* spp. *Tecnología bioambiental*, 22-29.
- Borines, M., De león, R., & Cuello, J. (2013). Producción de bioetanol a partir de macroalga *sargassum* spp. *Tecnología bioambiental*, 138, 22-29.
- Chia, K.-H., Ooi, T.-F., Sika, A., Tsuge, T., & Sudesh, K. (2010). Biosíntesis y caracterización de nuevos polímeros de polihidroxi alcanoato con alta propiedad elástica por el transformador *Cupriavidus necator* PHB - 4. *Degradación de polímeros y estabilidad*, 2226-2232.
- De Souza Machado, A., & Kloas, W. (2017). Los microplásticos como una amenaza emergente para los ecosistemas terrestres. *Global change biology*, 1405-1416.
- E. Gómez-Ordóñez, A. J.-E. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 2289-2294.
- Faiqah, A.-R., Helmi, W., & Mohd Rafein, Z. (2014). Producción de azúcares de alto rendimiento a partir de *Kappaphycus alvarezii* utilizando métodos combinados de hidrólisis química y enzimática. *food hydrocolloids*, 42, 309-315.
- G. Roesijadi, S.B. Jones, & L.J. Snowden-Swan. (2010). *Macroalgae as a Biomass, Feedstock: A Preliminary Analysis*. Springfield.
- Gonzalez-Lucas, D. (2016). ¿Why is the DNS reagent precipitating when acidic sample is added? 15-18.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Potencial bioactivo y posibles efectos sobre la salud de las algas marrones comestibles. *Tendencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 315-326.
- Hua Tiang, T., Min Fey, C., & Manoj, L. (2020). Evaluation of BP-M-CPF4 polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil using *Cupriavidus necator* transformants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 250-257.

- Kim, N.-J., Jung, K., Chang, H. N., & Lee, P. (2011). Producción de etanol a partir de hidrolizados de algas marinas utilizando *Escherichia coli* KO11. *Tecnología bioambiental*, 102(16), 7466-7469.
- Kim, S. W., Chae-Hwan, H., & Sung-Wan, J. (2015). Producción de alto rendimiento de biosazúcares de *Gracilaria verrucosa* mediante procesos de hidrólisis ácida y enzimática. *Science Direct*, 634-641.
- Kyung A, J., Seong-Rin, L., & Yoori, K. (2013). Potencial de las macroalgas como materia prima para la biorrefinería. *Science Direct*, 182-190.
- Kyung A, J., Seong-Rin, L., & Yoori, K. (2013). Potencial de las macroalgas como materia prima para la biorrefinería. *Bioresource Technology*, 182-190.
- P.Lenihan, A.Orozco, E.O'Neill, & M.N.M.Ahmad. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *chemical engineering journal*, 395-403.
- Peinado, I., Girón, J., & Koutsidis. (2014). Composición química, actividad antioxidante y evaluación sensorial de cinco especies diferentes de algas marrones comestibles. *Food Research International*, 36-44.
- Ravanal, M., Pezoa-Conte, R., & Salazar, O. (2016). Comparison of different types of pretreatment and enzymatic saccharification of *Macrocystis pyrifera* for the production of biofuel. *Algal Research*, 13, 141-147.
- SerraCosta, S., LoboMiranda, A., & Grequede Morais, M. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 536-547.
- T. M. Thompson, B. R. (2019). Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Processing Technology*.
- Wu, F.-C., & Jane-Yii, W. (2014). Hidrólisis secuencial ácida y enzimática in situ y producción de bioetanol a partir de biomasa de *Gracilaria*. *Science Direct*, 123-131.