

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE
CARBOHIDRATOS DE MICROALGAS APARTIR DE UNA SOLUCIÓN
ACIDIFICADA DE HIPOCLORITO DE SODIO**

**OMAR AUGUSTO AVILA JAIMES
ANDREA LORENA VALCÁRCEL PINZÓN**

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

2014

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE
CARBOHIDRATOS DE MICROALGAS APARTIR DE UNA SOLUCIÓN
ACIDIFICADA DE HIPOCLORITO DE SODIO**

**OMAR AUGUSTO AVILA JAIMES
ANDREA LORENA VALCÁRCEL PINZÓN**

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

Director

**CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA
Ingeniero Químico M.Sc**

Codirector

**JANETH BIBIANA GARCIA MARTINEZ
Ingeniera Química**

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

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS, a mis padres NIEVES AMPARO JAIMES PINTO y OMAR AVILA FIGUEROA, a mis familiares, Jorge Jaimes y Mariela Jaimes porque hicieron parte del desarrollo, apoyo y motivación de este logro alcanzado en mi vida; además agradezco a los profesores:

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CIDES.

M. Sc CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA por su respaldo como director del proyecto

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su orientación, comprensión y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto

JANETH BIBIANA GARCIA MARTINEZ, por su enseñanza, ayuda y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales

OMAR AUGUSTO AVILA JAIMES

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por sus infinitas bendiciones, a mis padres RAMIRO VALCÁRCEL SANDOVAL y LUZ AMPARO PINZÓN GÓMEZ, por su esfuerzo, apoyo y por ser mi mayor motivación para salir adelante cada día; además agradezco a los profesores:

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CIDES.

M. Sc CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA, por la oportunidad de realizar nuestro trabajo de grado, por toda su colaboración y por su respaldo como director del proyecto.

ING. JANETH BIBIANA GARCIA MARTINEZ, por su enseñanza, dedicación, ayuda y orientación durante la ejecución de este 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.

ANDREA LORENA VALCÁRCEL PINZÓN

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	9
1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA	18
1.1 Metodología experimental.....	18
1.2 Métodos de cultivo.....	19
1.3 Producción de vinazas.....	19
1.4 Cultivo en vinazas.....	20
1.5 Extracción de carbohidratos.....	21
1.6 Balance de masa.....	21
1.7 Biseño experimental.....	22
1.8 Cuantificación de carbohidratos.....	22
2. ANÁLISIS Y RESULTADOS	23
2.1 Balance de masa.....	24
2.2 Análisis estadístico.....	25
2.2.1 Análisis para la extracción de carbohidratos.....	25
3. CONCLUSIONES	30
4. RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño Experimental	22
Tabla 2. Porcentaje de biomasa solubilizada para cada experimento.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Obtención de Biomasa	18
Figura 2.	Proceso de extracción	18
Figura 3.	Balance de masa.....	18
Figura 4.	Porcentaje de monosacaridos extraídos en cada experimento	23
Figura 5.	Diagrama de Pareto para la extracción de Carbohidratos totales	26
Figura 6.	Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa Vs Temperatura, Tiempo= 4 h	27
Figura 7.	Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Tiempo Vs Temperatura, Solvente/biomasa = 80mL/g	27
Figura 8.	Comparación de los diferentes métodos para la extracción de carbohidratos	28
Figura 9.	Comparación de eficiencias de extracción a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio	29

RESUMEN

TITULO: DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE MICROALGAS APARTIR DE UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE HIPOCLORITO DE SODIO.*

AUTORES: OMAR AUGUSTO AVILA JAIMES, ANDREA LORENA VALCARCEL PINZON**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, microorganismos, extracción, carbohidratos, biomasa.

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos autótrofos, son la fuente más valiosa para el futuro en la producción de biocombustibles e insumos para la industria en general. La ventaja de estos microorganismos es su rápido crecimiento y tiempos cortos de generación, sin embargo hay un alto consumo de energía para la extracción de los metabolitos, debido a esto se piensa muy poco en la extracción a escala industrial para la producción de biocombustibles u otros productos derivados de la biomasa, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar la extracción de carbohidratos mediante el uso de una solución acidificada de hipoclorito de sodio (NaClO).

En el trabajo realizado se analizó el efecto de la temperatura, relación solvente/biomasa y tiempo para la selectividad en cuanto a la extracción de carbohidratos, El diseño realizado está basado en composición central, no factorial 3^3 de 15 experimentos utilizando el software STATISTICA.

Se encontró que para la mejor extracción de carbohidratos las condiciones fueron a temperatura 70 °C, relación solvente/biomasa 80 ml/g y tiempo 4h, la eficiencia que se logró bajo estas condiciones fueron del 13,45%.

Analizando el cambio de concentración de la solución de hipoclorito se observaron en los resultados el incremento de extracción de carbohidratos, a medida que incrementa la concentración, comparando también los resultados de las eficiencias de extracción a las mejores condiciones con los trabajos de NaOH y clorito, no fue muy eficiente debido a su baja estabilidad, el hipoclorito es un agente oxidante muy fuerte, reacciona con muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, es uno de los oxoaniones de cloro menos estables.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: M.Sc. Crisostomo Barajas Ferreira. Co-Director: Ing, Janet Bibiana García Martínez.

ABSTRACT

TITLE: DESIGN METHODOLOGY FOR CARBOHYDRATE EXTRACTION FROM MICROALGAE BY USING ACIDIFIED SOLUTION OF SODIUM HYPOCHLORITE.*

AUTHORS: OMAR AUGUSTO AVILA JAIMES, ANDREA LORENA VALCARCEL PINZON**

KEYWORDS: Microalgae, Microorganisms, Extraction, Carbohydrate, Biomass

Microalgae are single-celled photosynthetic and autotrophic microorganisms that constitute the most valuable source for biofuel production and synthesis of reagents for general industry. The advantage of those microorganisms is their fast growth rate and short doubling time. However, metabolite extraction leads to a high level of energy consumption. Owing to the stated above, industrial-scale production of biofuel and biomass by-products have not been thought or carried out. Assessing carbohydrate extraction using acidified solution of sodium hypochlorite was the main objective of this thesis.

Temperature effects, solvent/biomass ratio and time of selectivity to extract carbohydrates were analyzed. The methodology performed is based on a central composite design, a no-factorial experiment 3^3 containing 15 experimental runs by using STATISTICA software.

The optimal carbohydrate extraction conditions were obtained at 70°C, a solvent/biomass ratio of 80 ml/g during 4 hours. Under these experimental conditions, process efficiency of 13,45% was attained.

Besides, the increase of carbohydrate extraction after changing hypochlorite concentrations was studied. It was observed that as solvent concentration was increasing, the extraction process did it in the same way. Likewise, comparing outcomes at best conditions with previous thesis based on NaOH and chlorite as solvent, a lower efficiency was observed due to hypochlorite's low stability. Hypochlorite is such a strong oxidant agent and reacts with a vast number of organic and inorganic compounds, but it is one of the most unstable chlorine oxyanion.

* Graduation Project

** Physical- Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering . Departament. Director: M. Sc. Crisostomo Barajas Ferreira. Co-director: Ing, Janeth Bibiana García Martínez.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son la materia prima renovable más prometedora para la producción de biocombustibles, la industria farmacéutica y alimentaria, debido a sus altas tasas de crecimiento y tiempos cortos de generación, eficiente captura de dióxido de carbono (Chen et al 2013) y otros gases de efecto invernadero, lo que reduce la emisión de dichos gases a la atmósfera (Harun et al 2011). Además las microalgas pueden ser cultivadas en tierras no cultivables y con agua no potable, evitando así los problemas de competencia por el uso del suelo y de agua dulce (Hsin et al 2012).

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, posee un alto contenido de clorofilas, proteínas, vitaminas y muchos carotenoides, tales como luteína, β -carotenoides y astaxantina (Cheng et al 2011). Es una de las cepas microalgales más utilizadas a nivel comercial, principalmente en las industrias alimentarias y nutricionales (Harun et al 2010). Las microalgas además no generan contaminación adicional cuando se cosecha la biomasa y permite el reciclaje eficiente de los nutrientes (Travieso et al 2008).

Algunas especies de microalgas crecen en las corrientes de agua de mar y aguas residuales. Estas no sólo pueden crecer fotosintéticamente, sino también mediante el uso de sustratos orgánicos para la biosíntesis

El uso de Microalgas para el tratamiento de aguas residuales tanto domésticas como industriales y agroindustriales ha sido objeto de estudio durante varias décadas. La habilidad de estas para asimilar nitrógeno inorgánico y convertirlo en biomasa es considerada como un método efectivo para la desintoxicación de compuestos nitrogenados.

El cultivo de microalgas en agua residuales permite el tratamiento de estas aguas y la producción de biomasa microalgal, la cual puede luego ser explotada para la obtención de proteínas y aditivos alimenticios (para acuicultura, consumo animal y humano) (Jimenez-Perez et al., 2004), obtención de biogás y combustibles, obtención de fertilizantes, acondicionadores de suelos y otros productos de alto valor agregado.

Las vinazas son aguas residuales subproducto del proceso del bioetanol se generan en altos volúmenes (entre 9 y 14 litros por litro de etanol producido), según Travieso et al., (2008), se caracterizan por poseer un fuerte olor, bajo pH, color marrón oscuro, una alta demanda química de oxígeno DQO (80,000 - 100,000) mg/L, al igual que una alta demanda bioquímica de oxígeno DBO (40,000 - 50,000) mg/L; además contienen altas cantidades de materia orgánica y nutrientes como nitrógeno (1,660- 4,200) mg/l, fósforo (225 - 3,038) mg/L y potasio (1,900 – 17,475) mg/L (Singh, Patel 2012).

Uno de los usos de la vinaza generada es la eliminación como residuos industriales, por lo que es sujeto a la biodegradación aeróbica o anaeróbica, dependiendo de los microorganismos aplicados (Krzywonos et al 2010). Una gran variedad de estudios confirman la capacidad de las microalgas para remover sustancias fosforiladas (Aslan, Kapdan 2006), y de asimilar nitrógeno inorgánico dentro de su biomasa, convirtiéndose en una gran opción para la biorremediación de aguas residuales (An et al. 2003), ya que conociendo los metabolitos que la componen es posible desarrollar una valoración integral de la biomasa y de este modo poder aprovecharlos correctamente bajo un proceso denominado biorefinería (González-Delgado, Kafarov 2011).

La biomasa puede ser convertida en energía por métodos biológicos o termoquímicos. La conversión biológica incluye la fermentación de los componentes biodegradables para producir vectores energéticos como el

bioetanol, biobutanol, biohidrógeno y biogás, también la extracción de aceites para la producción de biodiesel. El bioetanol es producido mediante la fermentación de azúcares disponibles de la biomasa, se sabe que los carbohidratos complejos son atrapados en la pared celular de microalgas que pueden liberarse, este se convierte en azúcares más simples para que los microorganismos utilizados puedan extraer de forma más sencilla los carbohidratos y demás aminoácidos para una mejor producción de bioetanol (Harun et al., 2011).

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 plástidos como material de reserva (almidón), o en la pared celular (celulosa, pectina y polisacáridos sulfatados) (Chen et al 2013).

En contraste con los materiales lignocelulósicos, la sacarificación de los carbohidratos basados en microalgas es mucho más fácil, sin la necesidad de usar energía o productos químicos que consumen los procesos de pre-tratamiento, ya que estos carbohidratos se componen principalmente de almidón y la celulosa sin lignina. Por otra parte, los carbohidratos a base de microalgas contienen principalmente hexosa.

Sin embargo se presentan dificultades en la extracción debido al pequeño tamaño celular y/o a paredes celulares resistentes, por lo cual se hace necesario pre-tratar la biomasa para mejorar las eficiencias de extracción. El pre-tratamiento de la biomasa es una de las etapas más importantes y costosas en el proceso, ya que permite reducir la cristalinidad de la biomasa y aumentar el área de contacto con el fin de mejorar la digestibilidad del sustrato (Reyes y Ayala 2014). El pre-tratamiento biológico implica la utilización de microbios y enzimas para degradar la biomasa a fin de liberar los azúcares fermentables (Harun et al 2011).

Los productos químicos comúnmente aplicados en el proceso de pre - tratamiento son bien ácidos (ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) o alcalinos (cal e hidróxido de sodio), que son sustancias químicas industriales cotidianas que llevan un mínimo de toxicidad en sus concentraciones aplicadas. Nguyen et al., (2009), informó de hasta 58% en peso de la liberación de glucosa y de ~ 29% en peso (g etanol / g microalgas) el rendimiento de etanol después de pre-tratamiento de biomasa *Chlamydomonas reinhardtii* con ácido sulfúrico al 3% a 110 ° C durante 15 a 20 min de tiempo de reacción, esto demuestra la posibilidad y el potencial de aplicar ácido en el pre-tratamiento de la biomasa de microalgas (Harun et al 2011).

Los rendimientos con hidróxido de sodio y con clorito de sodio según los estudios realizados en el laboratorio de biomasa del grupo CIDES- UIS muestran que: para el experimento con hidróxido de sodio (NaOH), las mayores eficiencias de extracción de ambos metabolitos(carbohidratos y proteínas) se obtienen en una prueba en la que se solubiliza un 98% de las proteínas iniciales y un 74% de los carbohidratos iniciales, por otro lado en otra prueba se solubilizan un 85% de las proteínas iniciales y un 95% de los carbohidratos iniciales(Ayala & Reyes, 2014). Para el clorito de sodio los resultados obtenidos se aprecia que en la mejor extracción de carbohidratos se obtienen hasta 1,6109 g de carbohidratos/g de biomasa y rendimiento del 80,5%. (Beleño & Villamizar, 2013). Las eficiencias de extracción mostradas anteriormente son muy buenas, pero debido a su bajo costo se trabajará con hipoclorito de sodio para este proyecto.

El objetivo de este estudio es extraer la mayor cantidad de carbohidratos (fructosa, glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa) contenidos en la biomasa microalgal a partir del cultivo en Vinazas, aplicando un diseño de experimentos a diferentes condiciones de temperatura, relación biomasa/solvente y tiempo, utilizando una solución acidificada de hipoclorito de sodio.

1. DESCRIPCIÓN METODOLOGICA

Se evaluó el efecto de las variables más influyentes en la extracción de carbohidratos (temperatura, tiempo, relación biomasa/solvente) mediante un diseño experimental, seguido del procedimiento ilustrado en la figura 1. Finalmente se realiza un análisis estadístico a los resultados obtenidos y se presentan en análisis y resultados.

1.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura 1. Obtención de Biomasa

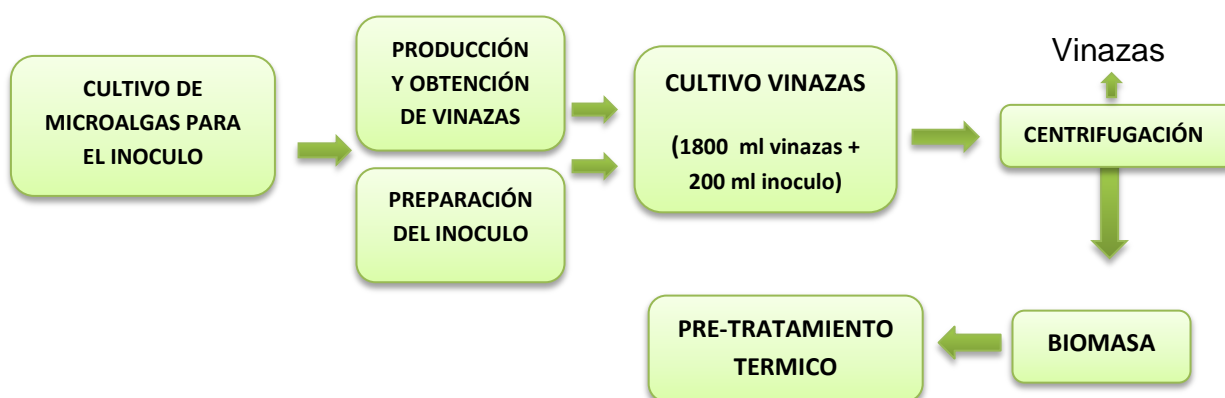


Figura 2. Proceso de extracción

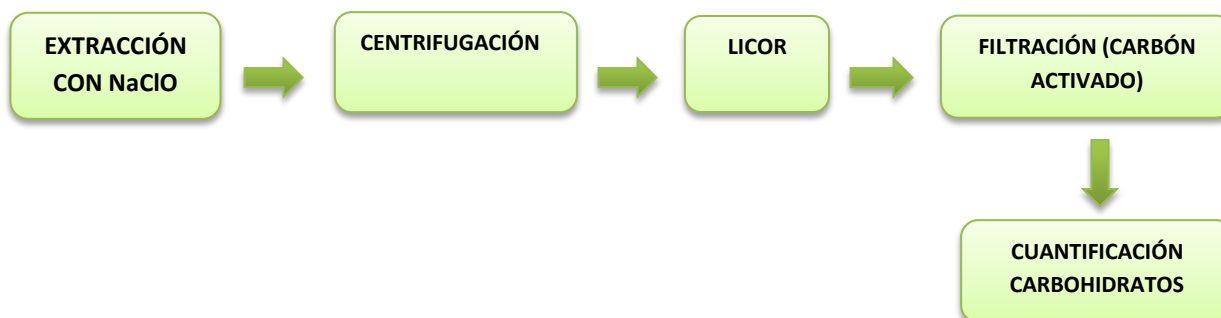
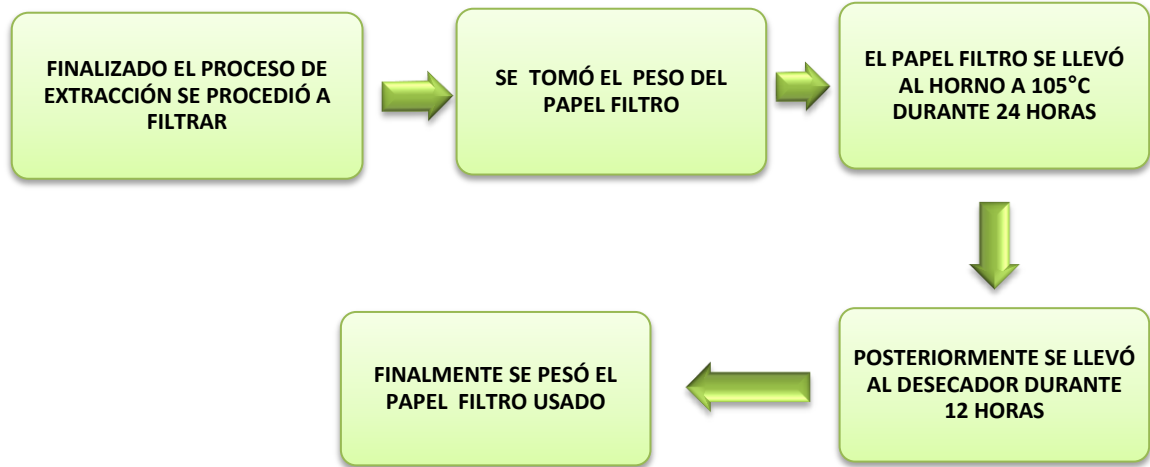


Figura 3. Balance de masa



1.2 MÉTODOS DE CULTIVO

Chlorella vulgaris UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L es: Macronutrientes 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 ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

1.3 PRODUCCIÓN DE VINAZAS

La vinaza utilizada fue obtenida a partir de melaza fermentada mediante evaporación sin recirculación en el laboratorio de procesos de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

Para la fermentación se diluyen 45 Kg de melaza comercial en 151 litros de agua hasta alcanzar aproximadamente 18° Brix, esta mezcla será pasteurizada a una temperatura de 80°C durante 1 hora, posteriormente se enfría hasta los 40°C y se ajusta el pH a 4,2 mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado (95%). El inóculo será preparado utilizando 20 litros de la mezcla y adicionando Cloruro de amonio (144g), sulfato de magnesio (24g), urea (24g) y Roca fosfórica (10g), utilizados para la activación de 500g de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan). El inóculo se añade al tanque con la melaza diluida y será aireada por una hora. La fermentación se lleva a cabo durante 3 días. Transcurrido el tiempo se evaporará el mosto a 94 °C en dos etapas, cada una de aproximadamente 2 horas

1.4 CULTIVO EN VINAZAS

El inoculo utilizado es de 200 ml de *C. vulgaris* UTEX 1803, los cuales fueron mezclados con 1800 ml de vinaza en reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm de altura, dichos reactores fueron conectados a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire constante de 2 L/min y condiciones de temperatura de 25 C° ± 2C° sin control de PH. Debido a la oscuridad de las vinazas que impide el paso de la luz homogéneamente en todo el reactor, se recubrieron los reactores para evitar posibles ruidos en las mediciones por procesos fotosintéticos permitiendo un ciclo de oscuridad de 24 horas. Después de 18 días la biomasa producida fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos, luego se secó a 105°C durante 24 horas. Para mejorar la manejabilidad de esta se sometió a homogenización de tamaño de partícula mediante un mortero, se guardó en bolsas plásticas hasta el momento de su uso.

1.5 EXTRACCION DE CARBOHIDRATOS

Para la extracción de los carbohidratos se tomó 5 g de esta biomasa seca, se adicionó la solución acidificada de hipoclorito de sodio agitándose con el fin de hacer una mezcla homogénea. Luego se procedió a colocar el recipiente de reacción en el baño de maría (MEMMERT) a determinadas condiciones de temperatura y tiempo dadas por el diseño experimental mostrado en la tabla 1, a excepción de la prueba 13 cuya condición de temperatura es de 103,5 °C (Esta se realizó en planchas de calentamiento utilizando aceite mineral). Una vez transcurrido el tiempo, el recipiente se sacó del baño de maría, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos y el extracto obtenido se llevó a un proceso de filtración por carbón activado, obteniendo finalmente el licor al cual se le realizó cuantificación de carbohidratos.

Se realizó original y replica de cada prueba con el objetivo de garantizar la veracidad de los datos.

1.6 BALANCE DE MASA

Para cuantificar la biomasa residual, una vez terminado el proceso de extracción se procedió a filtrar, para esto se tomó el peso del papel filtro (munktell diámetro de 110 mm y diámetro de poro 2 micras) libre de humedad, se envió por 24 horas a horno a 105 °C, posteriormente se llevó al desecador por 12 horas 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.

1.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del diseño experimental se utilizó el software STATISTIC 7.0. El diseño realizado está basado en composición central, no factorial 3^3 de 15 experimentos con replica (Tabla 1), éste fue realizado para evaluar el efecto de la variable relación biomasa/solvente (40, 80 y 120 ml solvente/g biomasa), tiempo (2, 4 y 6 horas) y temperatura (50, 70 y 90 °C).

Tabla 1. Diseño Experimental

PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Relación Bio/Ste (ml/g)	40	40	120	120	40	40	120	120	80	13	146	80	80	80	80
Temperatura (°C)	50	90	50	90	50	90	50	90	70	70	70	36	103,5	40	70
Tiempo (h)	2	6	6	2	6	2	2	6	4	4	4	4	4	0,65	7,35

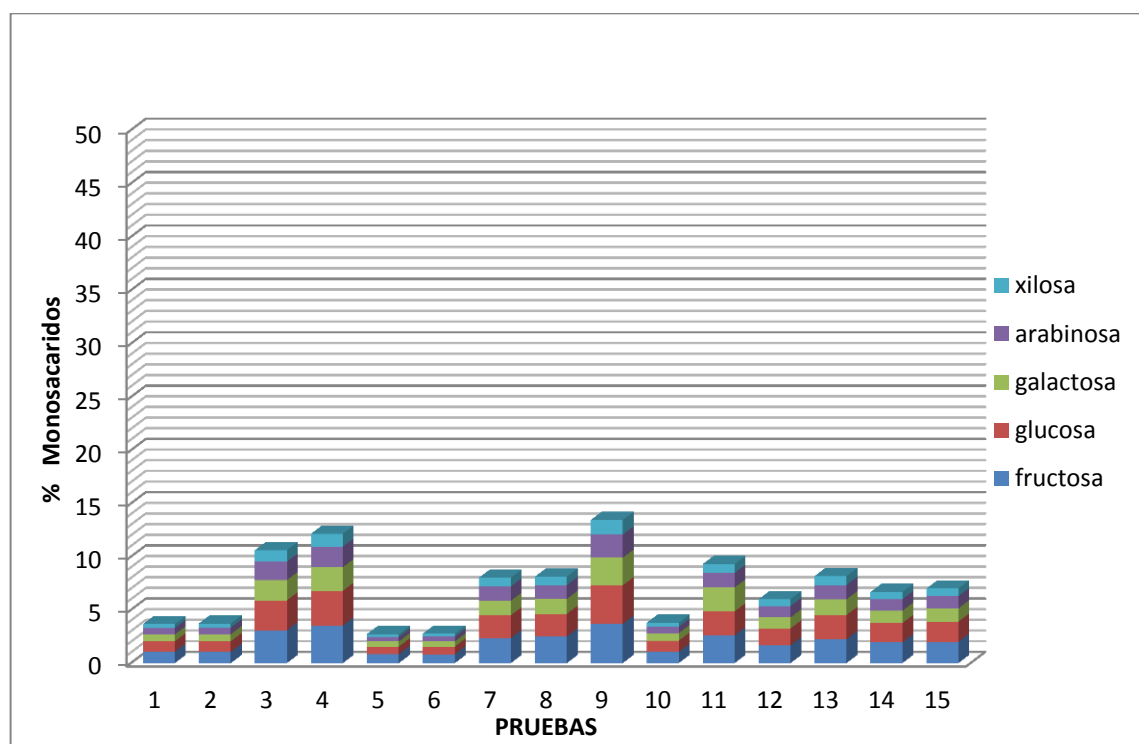
1.8 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), este determina los diferentes carbohidratos presentes en la muestra. Se tomó 1mL de cada extracto y a estos se les adicionaron 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico al 95% de pureza. Por último se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a longitudes de onda de 490, 485, 487 y 480 nm para identificar Fructosa, glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa respectivamente.

2. ANÁLISIS Y RESULTADOS

RESULTADOS: En la figura 4 se presentan los porcentajes de extracción de carbohidratos obtenidos, donde se observa que la mayor eficiencia de extracción se obtiene de la prueba número 9 a condiciones de temperatura de 70 °C, relación solvente/biomasa 80 mL/g con tiempo de duración 4h con un 13,45 %, lo cual corresponde a un 0,2691g de carbohidratos/g de biomasa. Los monosacáridos con mayor extracción en la biomasa son la fructosa y la glucosa con porcentajes de extracción entre 2,3-3.7% a diferencia de estos monosacáridos la xilosa presente los más bajos porcentajes de extracción.

Figura 4. Porcentaje de monosacáridos extraídos en cada experimento



2.1 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 el porcentaje de biomasa solubilizada de carbohidratos presentes en 5 gramos de biomasa seca (ver anexo A). Para esto se aplica la siguiente ecuación:

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

Donde la biomasa inicial se obtiene a partir del diseño de experimentos descrito en la Tabla 1. La biomasa solubilizada, es la diferencia entre la biomasa inicial y la biomasa residual. El porcentaje de solubilización de carbohidratos se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \mathbf{Solubilización\ carbohidratos} = \frac{\mathbf{g\ Carbohidrato\ solubilizado}}{\mathbf{g\ biomasa\ solubilizada}} * \mathbf{100} \quad (2)$$

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de biomasa solubilizada en cada prueba. Se observa que los mayores porcentajes de solubilización de carbohidratos se dan en las pruebas 8, 9 y 10, de estas la mejor extracción es la prueba 9 debido a que el porcentaje de biomasa solubilizada es mayor. 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 2. Porcentaje de biomasa solubilizada para cada experimento

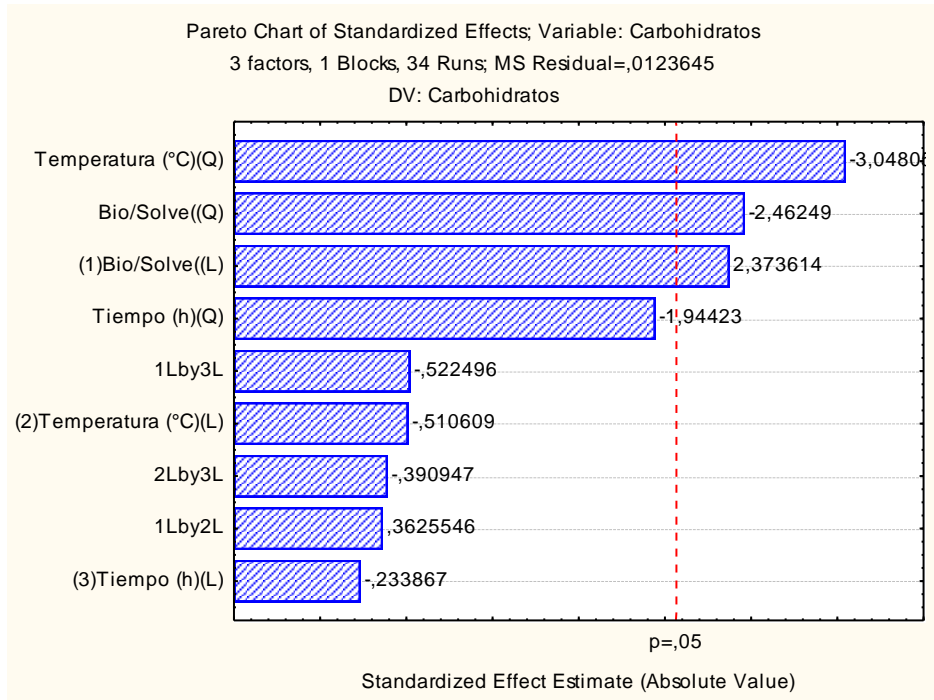
PRUEBAS	%Biomasa solubilizada	% Solubilización carbohidratos	%Perdidas Biomasa
1	63	2,35	37
2	49	3,04	51
3	64	6,68	36
4	66	7,38	34
5	37	2,95	63
6	60	1,85	40
7	45	7,20	55
8	61	5,38	39
9	63	8,27	37
10	9	17,93	91
11	39	8,67	61
12	47	5,14	53
13	55	6,00	45
14	41	6,54	59
15	45	6,31	55

2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.2.1 Análisis para la extracción de carbohidratos

Empleando el software STATISTICA 7.0 se realizaron los diagramas de Pareto y las superficies de respuesta que permiten observar el efecto que tienen las variables tiempo, relación biomasa/solvente y temperatura en el proceso de extracción de carbohidratos.

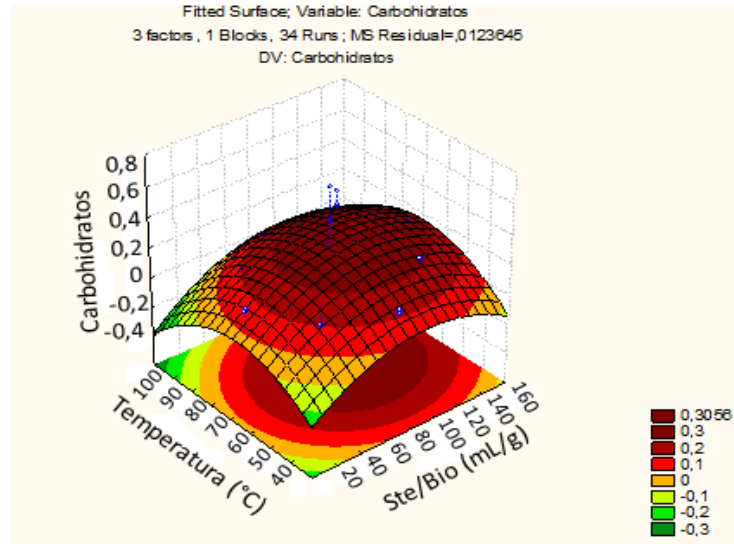
Figura 5. Diagrama de Pareto para la extracción de Carbohidratos Totales



Las variables más significativas son aquellas que pasen el umbral (línea roja punteada), en este caso y de manera positiva es la temperatura y la relación biomasa/solvente, el tiempo pese a no ser significativa, puede representar variaciones importantes en la extracción al aumentar su valor. (Figura 5). Para ello, se visualizan las superficies de respuesta más representativas para obtener predicciones de las mejores condiciones de extracción de carbohidratos.

La superficie de respuesta de la extracción (Figura 6) muestra que para un tiempo constante de 4h, la mayor extracción de carbohidratos se ve en un rango de temperatura entre 70-75°C y relación biomasa/solvente entre 80-85 mL/g.

Figura 6. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa Vs Temperatura, Tiempo= 4 h



En la superficie de respuesta mostrada en la Figura 8 se observa que la mayor extracción se da en un rango de temperatura 70-75 °C y tiempo entre 3,5-4 horas.

Figura 7. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Tiempo Vs Temperatura, Solvente/biomasa = 80mL/g

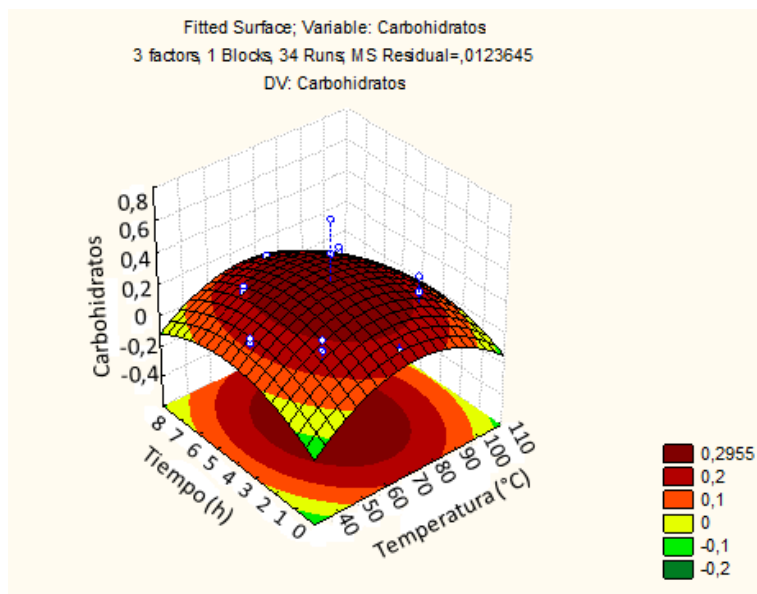
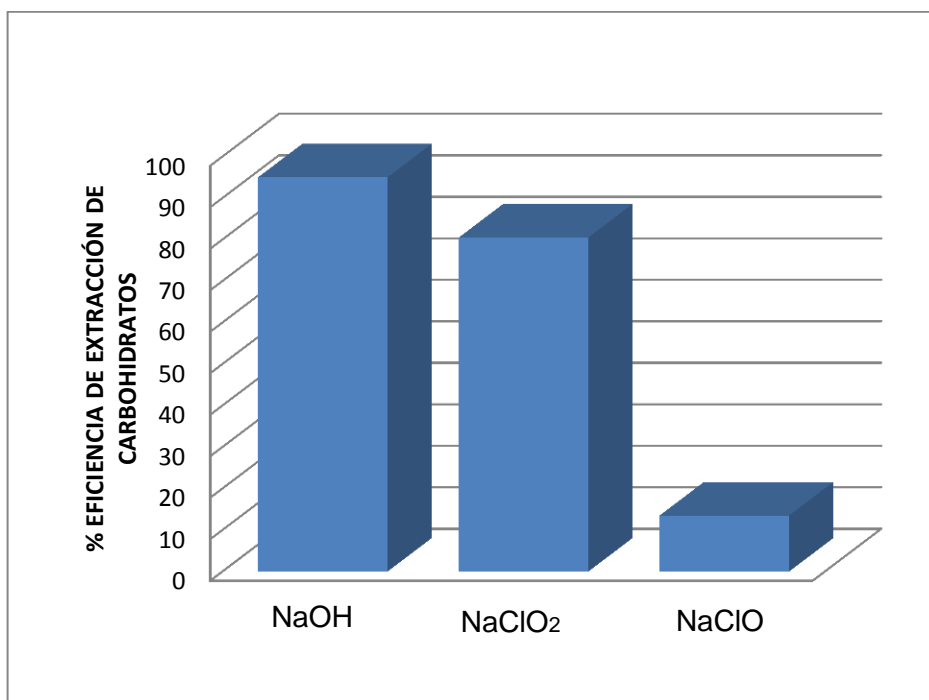


Figura 8. Comparación de los diferentes métodos para la extracción de carbohidratos

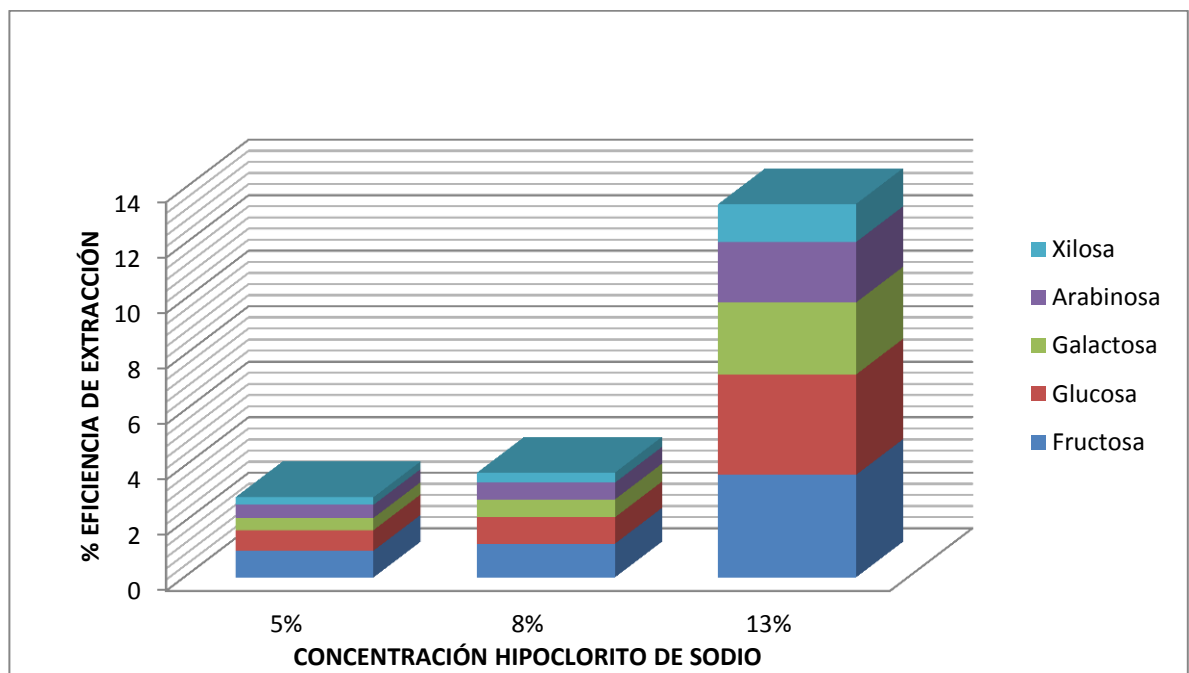


Al comparar los resultados obtenidos en propuestas anteriores de solución NaOH y Clorito de sodio, en la figura 9 se observa que para el tratamiento alcalino (solución con NaOH) obtuvieron un porcentaje de extracción de carbohidratos correspondientes al 95 % realizado en dos extracciones, las condiciones de operación fueron: temperatura 55°C, Molaridad 3.673, relación biomasa/solvente 30 ml/ g. También muestra que para el clorito de sodio obtuvieron una eficiencia del 80,5% la mejor extracción de carbohidratos ocurre a una temperatura de 70 °C, relación solvente/biomasa de 80 mL/g durante 4h, obteniendo hasta 1,6109 g de carbohidratos/g de biomasa 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.

Debido a su baja estabilidad, el hipoclorito es un agente oxidante muy fuerte, reacciona con muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, es uno de los oxoaniones de cloro menos estables., sólo existen en disolución, y no existen en forma pura, Al calentar un hipoclorito, se degrada en una mezcla de cloruro, oxígeno y otros oxoaniones de cloro (clorato, clorito)

Debido a que los resultados obtenidos no son muy eficientes, se realizaron otras pruebas a condiciones de temperatura 70°C, relación biomasa/solvente 80mL/g y tiempo 4h, variando la concentración del hipoclorito de sodio y los resultados se muestran en la figura (8), donde se observa que a medida que aumenta la concentración se extrae mayor cantidad de carbohidratos.

Figura 9. Comparación de eficiencias de extracción a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio



3. CONCLUSIONES

La metodología utilizada no es viable al compararse con otros métodos de extracción de carbohidratos ya que el hipoclorito de sodio es un agente oxidante muy fuerte e inestable a altas temperaturas.

El análisis estadístico de los resultados mostró que trabajando con biomasa seca (pre-tratada a 105°C por 24 h), la mayor cantidad de carbohidratos (monosacáridos) se extraen a las siguientes condiciones: a) relación biomasa/solvente 80ml/g. b) temperatura 70 °C. c) tiempo 4h.

Analizando los datos estadísticos reportados, nos muestra que a una menor relación biomasa/solvente se alcanza una mayor extracción de los carbohidratos teniendo en cuenta la temperatura en un rango de 70 – 75 °C.

A medida que se realizan pruebas aumentando la concentración de hipoclorito se extrae una mayor cantidad de carbohidratos, los monosacáridos extraídos en mayor proporción son la fructosa y la glucosa.

4. RECOMENDACIONES

Realizar los tratamientos propuestos a diferentes intervalos de temperatura para la biomasa húmeda con el fin de evaluar el comportamiento de la temperatura en la biomasa para la cuantificación de metabolitos.

Se recomienda involucrar otras variables como la concentración de la solución de hipoclorito para la extracción de carbohidratos con el fin de analizar y evaluar el efecto que pueda ocasionar en la extracción de los metabolitos.

BIBLIOGRAFIA

- Aslan, S & Kapdan, I.K. (2003). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering.*, 28,(1), 64-70
- Ayala, E.G. & Reyes, O.J. (2014). Evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.
- Beleño, S.Y. & Villamizar J.X. (2013). Mejoramiento de la extracción de carbohidratos presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 utilizando una solución acidificada de clorito de sodio
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., F.-W. Bai, F.-W. & Chang, J.-S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal.*, 78, 1-10.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Labavitch, J.M. & VanderGheynst, J.S. (2011). The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Process Biochemistry.*, 46, 1927–1933
- Dubois, M., Gilles, K., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry.*, 3(28), 350-356
- González- Delgado, A.D., & KAFAROV, V.(2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *Ct&f - ciencia, tecnología y futuro.*, 4(4), 5-22.
- Harun, R. & Danquah, M.K. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry.*, 46,(1), 304–309.

Harun, R., Danquah, M.K. & Forde, G.M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (2), 199–203.

Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A. & Chang, J.-S (2012). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*.

Krzywonos, M., Cibis, E., Ryznar-Luty, A., Miskiewicz, T. & Borowiak, D. (2010). Aerobic biodegradation of wheat stillage (distillery wastewater) at an elevated temperature-Effect of solids separation. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 1–6.

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

Singh, N.K. & patel, D.B. (2012). Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. *[Anónimo] Farming for Food and Water Security*. Springer., 83-109.

Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F. & Rincón, B. (2008). Assessment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater, *Environmental Technology*., 29(9), 985 – 992.

Singh., Nirbhay K. & Patel. D.B. (2012). Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. Department of Microbiology, C.P. College of Agriculture, S.D.A.U. S.K. Nagar, Palanpur, Gujarat 385506, India.

cellulose degree of polymerization. *Bioresource Technology*, 101, 7410–7415.

Hubbell, C. A., & Ragauskas, A. J. (2010). Effect of acid-chlorite delignification on