

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE BIOMASA DE *Chlorella*
vulgaris PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES**

JAVIER ENRIQUE SÁNCHEZ URIBE

VÍCTOR HUGO VELASCO CASTILLO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

BUCARAMANGA

2013

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES

JAVIER ENRIQUE SÁNCHEZ URIBE

VÍCTOR HUGO VELASCO CASTILLO

**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 FISCOQUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

DEDICATORIAS

A JEHOVÁ.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud y fortaleza para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Carolina.

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Silverio.

Por los ejemplos de coraje, perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre y por darme una segunda oportunidad.

A mi esposa Diana.

Por su apoyo incondicional, compañía, ayuda, consejos, por su amor.

A mi hermano Jairo.

Por sus consejos porque aprendí muchas cosas importantes en la vida, por su apoyo.

A mis amigos Cristian C. Marmolejo Ch., Didier A. Gutiérrez L., Edinsson Castro, Paola Ariza, por compartir día a día momentos importantes, por su colaboración en todo este proceso educativo.

A mi compañero de trabajo de grado Víctor H. Velasco Castillo, por las duras y las maduras que pasamos y por seguir adelante a pesar de que las cosas se colocaron difíciles en último momento.

Javier Enrique Sánchez Uribe

A lo único que tengo, lo único que temo perder y lo que más quiero... mi familia, para ustedes es éste trabajo, doy gracias a la vida por tenerlos conmigo los amo.

VÍCTOR HUGO VELASCO CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como director del proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente trabajo.

QUÍMICA NATALIA, por su ayuda, disposición y comprensión, y préstamos de equipos durante la ejecución de las etapas del proyecto.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO guías en el laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su enseñanza, ayuda y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su atención y colaboración.

DON WILSON Y MARIO de la papelería Canaan que gracias a ellos no faltó las fotocopias como material de estudio.

A los profesores de ingeniería química por sus consejos y colaboración y a todas aquellas personas que hicieron parte en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	21
2.1 Obtención/Caracterización de vinazas.....	21
2.2 Cultivo en bioreactores	23
2.3 Cuantificación de Biomasa	24
2.4 Pretratamiento térmico.....	24
2.5 Hidrólisis	25
2.5.1 Método Organosolv	25
2.5.2 Método de hidrólisis ácida	25
2.5.3 Filtración y neutralización	26
2.5.4 Cuantificación de Azúcares.....	26
Fuente: los autores.	27
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	28
4. CONCLUSIONES.....	36
5. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña....	22
Tabla 2. Temperatura y tiempo de pretratamiento.....	24
Tabla 3. Métodos de hidrólisis para las diferentes muestras y réplicas de biomasa pretratada térmicamente a diferentes temperaturas.....	25
Tabla 4. Tipos de azúcares con sus respectivas longitudes de onda.....	27
Tabla 5. Humedad para la biomasa de cada uno de los pretratamientos térmicos.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Descripción del desarrollo experimental	23
Figura 2. Producción de biomasa en función del tiempo	28
Figura 3 Total de azúcares liberados para la biomasa pretratada para los dos métodos de hidrólisis	30
Figura 4. Porcentaje de azúcares fermentables liberados por el método Organosolv para cada uno de los pretratamientos	32
Figura 5. Porcentaje de azúcares liberados por el método de hidrólisis ácida para cada uno de los pretratamientos.....	32
Figura 6. Cantidad promedio del tipo de azúcares liberados por el método Organosolv a 75°C.....	33
Figura 7. Diagrama de proceso del escenario planteado.....	34

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO. DETERMINACIÓN DE SOLIDOS TOTALES EN BIOMASA PROCEDIMIENTO ANALÍTICO EN EL LABORATORIO (LAP-NREL) (NREL/TP-510-42621).....	41
--	----

RESUMEN

TITULO: EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO DE BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES.

AUTORES: JAVIER ENRIQUE SÁNCHEZ URIBE, VÍCTOR HUGO VELASCO CASTILLO.

PALABRAS CLAVE: microalga, pretratamiento, disrupción celular, azúcares fermentables.

Las microalgas son microorganismos con un gran potencial, ya que contienen grandes cantidades de metabolitos para la elaboración de productos de mayor valor agregado. 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 liberación de dichos compuestos.

En este trabajo se analizó el efecto del pretratamiento térmico a la biomasa de *Chlorella vulgaris* para la obtención de azúcares fermentables utilizando tres temperaturas diferentes (105, 75, 25 °C); el tiempo de cultivo de microalga fue realizado en bioreactores tipo airlift con ausencia total de luz por 16 días, usando como sustrato vinazas producidas en la elaboración de bioetanol; posteriormente, se realizó el proceso de disrupción celular por medio de hidrólisis Organosolv e hidrólisis ácida con el fin de liberar los azúcares fermentables. Se obtuvo una mayor cantidad de azucares para una biomasa pretratada a una temperatura de 75°C hasta 0,165g de azúcares fermentables/g de biomasa por el método Organosolv y 0,128g de azúcares fermentables/g de biomasa por el método de hidrólisis ácida, principalmente glucosa; la cuantificación de azúcares se realizó por medio del método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico. Los principales efectos sobre la biomasa pretratada térmicamente para la liberación de azúcares son la humedad y la alteración de la pared celular, mejorando los métodos de disrupción celular y la obtención de azúcares.

La utilización de microorganismos presenta un buen panorama para la elaboración de bioetanol a partir de azúcares de microalga, ya que planteando un escenario de una destiladora de 100 m³/día etanol al 96% de pureza se obtendrían hasta 1300 m³/día de vinazas como sustrato para biomasa de *C. vulgaris*, en la cual se obtendría una gran cantidad de azúcares para la elaboración de aproximadamente 1600 litros de bioetanol diarios.

*Trabajo de grado

**Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directores: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. MSc. Crisóstomo Barajas Ferreira. Codirector: Biólogo: Andrés Fernando Barajas.

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF THERMAL PRETREATMENT OF BIOMASS OF *Chlorella vulgaris* FOR OBTAINING FERMENTABLE SUGARS.

AUTHORS: JAVIER ENRIQUE SÁNCHEZ URIBE, VICTOR HUGO CASTILLO VELASCO.

KEYWORDS: microalgae, pretreatment, cell disruption, fermentable sugars.

Microalgae are microorganisms with great potential because they contain large amounts of metabolites for the production of higher value-added products such as bioethanol. 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, the effect of heat pretreatment to the biomass of *Chlorella vulgaris* for obtaining fermentable sugars using three different temperatures (105°C, 75°C, 25°C) was analyzed. The time of culturing microalgae was performed in bioreactors type airlift, with total absence of light for 16 days, using as substrate stillage produced in the manufacture of bioethanol from sugarcane molasses; subsequently, the *Organosolv* cell disruption process via hydrolysis and acid hydrolysis was performed in order to release fermentable sugars. As a the result, a greater amount of sugar for a pretreated biomass was obtained at a temperature of 75°C to 0.165g of fermentable sugars/g biomass by the *Organosolv* method, and 0.128g of fermentable sugars/g biomass by acid hydrolysis method, mainly glucose; sugars quantification was performed by the colorimetric method phenol-sulfuric acid. The main effects on the thermally pretreated biomass sugars are releasing moisture and disruption of the cell wall, improving methods of cell disruption and the production of sugars.

The usage of microorganisms presents a good overview for the production of bioethanol from microalgae sugars since posing a distillery scene of a 100 m³/day ethanol at a 96% of purity, it could be obtained up to 1300 m³/day of vinasse as substrate for *C. vulgaris* biomass, obtaining, in that way, a large amount of sugars for the production of approximately 1600 liters of bioethanol daily.

* Graduation Project

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

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles se ha catalogado como insostenible debido al cambio constante en el precio del petróleo, inestabilidad política en países productores y la emergente preocupación sobre el cambio del clima global el cual es asociado a la quema de estos combustibles [1] Además, el veloz aumento en la población mundial y el crecimiento de nuevas economías que han llevado a un incremento global en el uso de energía [2, 3] lo cual ha obligado a la búsqueda de nuevas formas de energía que además sean amigables con el medio ambiente para disminuir los impactos negativos sobre él.

Los biocombustibles producen menores emisiones de dióxido de carbono benceno y otros contaminantes [4] y son generados a partir de biomasa que es uno de los recursos renovables más prometedores para su elaboración; ha sido estimado que ésta podría proveer cerca de un 25% de los requerimientos mundiales de energía, además de ser fuente de diferentes productos para la industria farmacéutica y de alimentos [5]. Existen diferentes tipos de biocombustibles dependiendo del origen de la biomasa usada para su producción entre los cuales se encuentran los de primera, segunda y tercera generación. En la última categoría se encuentran las microalgas [6], que poseen características atractivas para su utilización en comparación de otro tipo de biomasa.

Entre las ventajas de la utilización de microalgas se encuentran su alta velocidad de crecimiento y tiempos cortos de generación, requerimientos mínimos de utilización de tierras cultivables, no necesitan herbicidas ni pesticidas para su cuidado, no compiten con la producción de alimentos, porque tienen la capacidad de crecer en condiciones que no son adecuadas para los cultivos tradicionales pues son acuáticas [7]; además de que son de 6 a 12 veces más eficientes produciendo biomasa en comparación con los cultivos terrestres [8]; convierten el

CO₂ en biomasa por lo que disminuyen las concentraciones de este gas en la atmósfera, no contienen azufre, no son tóxicos, son altamente biodegradables y pueden usar los nutrientes de aguas residuales como fuente de alimento [3], de modo que pueden ser una alternativa al tratamiento de aguas, lo cual representa un gran problema de contaminación hoy en día.

El tratamiento de aguas con microorganismos es un proceso ecoamigable, barato, que no genera contaminación secundaria y puede llevar a cabo una completa mineralización de los compuestos presentes en el agua [6], que se diferencia de los tradicionales métodos físico-químicos para el tratamiento de aguas los cuales son costosos, requieren grandes cantidades de energía, son insostenibles, perjudiciales para el medio ambiente y tienen tendencia a generar intermedios tóxicos aumentando el problema de contaminación [9].

La liberación de aguas residuales en cuerpos de agua, conlleva un gran problema, pues produce diversos cambios en éstos, el mayor efecto de la liberación de agua residual rica en compuestos orgánicos e inorgánicos tal como fosfatos y nitratos es la eutrofización [3]. Un ejemplo de esto son los efluentes generados en las destilerías de producción de etanol a partir de caña de azúcar (vinazas) que en algunos casos, son descargados directamente sobre ríos o lagos y en otros sobre piscinas de tratamiento antes de ser liberados a diferentes cuerpos de agua. Se ha estimado que cerca del 61% de la producción mundial de etanol proviene de los cultivos de azúcar [10].

Las destilerías de etanol son consideradas como una de las industrias más contaminantes ya que genera altos volúmenes de vinazas (entre 9 y 14 litros por litro de etanol producido) [11], que son caracterizadas por un bajo pH, fuerte olor, color marrón oscuro, una alta demanda química de oxígeno DQO (80000 - 100000 mg/l), al igual que una alta demanda bioquímica de oxígeno DBO (40000 - 50000 mg/l); además contienen altas cantidades de materia orgánica y nutrientes como nitrógeno (1660- 4200 mg/l), fósforo (225 - 3038 mg/l) y potasio (1900 – 17475

mg/l), su color bloquea la filtración de los rayos de sol dificultando la fotosíntesis de la flora acuática nativa, por lo tanto deteriora la calidad del agua y es perjudicial para la existencia de vida en ella [12, 10]; se ha estimado que la producción de vinazas en la industria de alcohol equivale a la contaminación generada por una población de 1000 habitantes [11]; Por estas razones es imperativo el tratamiento de este efluente [13].

Hasta la década de 1970, las vinazas se utilizaban para producir alimentos evaporándolas y principalmente como fertilizante. Por ejemplo, en Brasil, la vinaza se utilizaba en la siembra de caña de azúcar debido a su alto contenido de nitrógeno, fósforo y materia orgánica, para aumentar la productividad de los cultivos. Sin embargo esto conducía a la contaminación de aguas subterráneas [14], además en estudios recientes se ha determinado que al descargar las vinazas directamente sobre la tierra provoca cambios en la estructura del suelo y el desarrollo de los cultivos se ve seriamente afectado [11].

El tratamiento de las vinazas por medio de microalgas presenta un gran potencial, ya que disminuye el problema de contaminación del agua, sirve como sustrato para el crecimiento de la biomasa y aprovecha ésta misma en la obtención de otros productos como bioetanol [15]. Es bien conocido que hay carbohidratos complejos atrapados en la pared celular de la microalga, que pueden liberarse y convertirse en azúcares más simples de manera que otros microorganismos los consuman para la producción de bioetanol [16]. Por ejemplo se ha demostrado que *Chlorella sp* contiene altos contenidos de carbohidratos especialmente *Chlorella vulgaris*, la cual puede tener entre 37% y 55% (p/p) de carbohidratos de su peso seco dependiendo de diferentes factores de crecimiento [2].

Para aprovechar el contenido en carbohidratos, es necesario realizar un proceso de disrupción celular de manera que la pared celular del alga sea destruida con el fin de liberarlos [17], pero antes de eso se deben realizar una serie de

pretratamientos que mejoran el proceso de extracción estos son procesos cruciales, porque son esenciales para la liberación de los azúcares fermentables. Sin embargo ya que los procesos de pretratamiento contribuyen significativamente en el costo de la obtención de azúcares, el protocolo de pretratamiento debe ser seleccionado para hacer el proceso de producción de bioetanol económicamente atractivo. Un eficiente pretratamiento debe ser simple de aplicar, energéticamente eficiente, tener un costo bajo y no generar la degradación de los azúcares [16].

Varios tipos de pretratamientos e hidrólisis se han realizado a diferentes cepas con el fin de mejorar la liberación de los metabolitos contenidos en ellas. Por ejemplo: *Zhou et al.* [7] demostraron que variaciones en las concentraciones de los reactivos pueden provocar cambios en la cantidad de azúcares liberados aumentando o disminuyendo el resultado de reacción y la extracción de éstos. En los experimentos realizados con diferentes concentraciones de reactivos para la hidrólisis con biomasa de *Chlorella* la liberación de azúcares en presencia de 2% de HCl y 2,5% de MgCl₂ el rendimiento de la liberación de azúcares fue de 83,47%, pero variando esas cantidades el rendimiento cambiaba a valores muy pequeños, esos rendimientos tan altos en la obtención de azúcares hacen muy atractiva la utilización de microalgas para su utilización para la producción de bioetanol; sin embargo el método utilizado en éste estudio utiliza grandes cantidades de energía; *Miranda et al.* [17] encontraron que al pretratar térmicamente a *Scenedesmus obliquus* el agua removida por los microporos de la celulosa en la pared celular pueden causar cambios irreversibles en su estructura, creando zonas amorfas, en las que la tensión entre las fibras se reduce provocando elasticidad en ellas, lo cual provoca que sea más susceptible al ataque por ácidos; los resultados obtenidos para varios tipos de ruptura celular fueron mayores las cantidades de azúcares liberados con biomasa deshidratada en comparación a la biomasa húmeda.

Para la extracción de un metabolito en especial, la utilización de un solvente específico provoca cambios en el rendimiento tanto de la reacción como de la

extracción para biomasa húmeda, ya que de la naturaleza del agente extractor va depender si el agua inhibe o no la acción del solvente; en el estudio realizado por *Magota et al.* [20] se encontró que para la extracción de hidrocarburos de *Botryococcus braunii* con hexano en biomasa húmeda el efecto del contenido de agua en la célula disminuye la acción extractora del hexano por ser una sustancia apolar inhibiendo el efecto del solvente.

Alrededor del mundo se han realizado diferentes estudios utilizando diferentes cepas de microalgas, buscando las mejores condiciones de crecimiento, pretratamientos y métodos de disrupción celular para obtener altas cantidades de metabolitos presentes en las microalgas. Para el caso sin embargo el efecto de la temperatura en el pretratamiento de la *C. vulgaris* cultivada utilizando como sustratos los efluentes de la industria del bioetanol no ha sido reportado. Se sabe que la temperatura tiene efecto en la extracción de azúcares como lo reporta *Nguyen et al* [23], por esto, el objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de la temperatura en el secado de biomasa de *Chlorella vulgaris* en la obtención de azúcares fermentables para la producción de bioetanol utilizando métodos de disrupción celular (Hidrólisis Organosolv e hidrólisis ácida) con condiciones preestablecidas como las óptimas para la extracción de metabolitos para diferentes tipos de cepas por parte del CIDES.

2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

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

Para el cultivo 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 2000 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 considerándose este cultivo como

2.1 Obtención/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 utilizada como sustrato para el crecimiento de *C. vulgaris*.

En la Tabla 1 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.

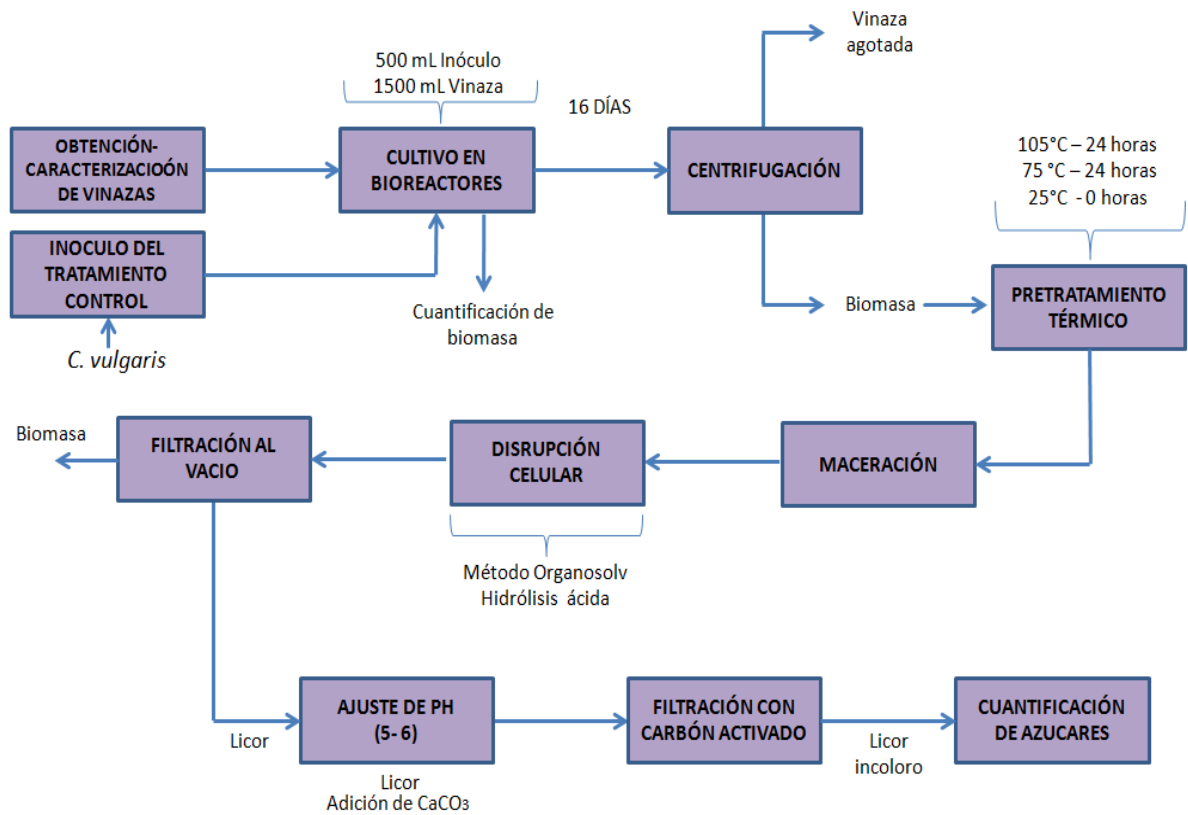
Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña.

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

Fuente: (LQCI)

En la Figura 1 se muestra el procedimiento experimental realizado en el desarrollo de este proyecto.

Figura 1: Descripción del desarrollo experimental.



Fuente: los autores.

2.2 Cultivo en bioreactores

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14cm y 35cm de altura con un volumen del cultivo de 2000 mL distribuidos así: 1500 mL de vinaza y 500 mL de inóculo del tratamiento de control. 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 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sin control de pH. Debido al color oscuro de las vinazas que impiden el paso de luz homogéneamente en todo el reactor, se recubrieron los reactores con papel para impedir en su totalidad el paso de luz y así evitar posibles ruidos en la medición por procesos fotosintéticos permitiendo un ciclo de oscuridad de 24h generando

las condiciones para el crecimiento heterótrofo del alga. El tiempo de cultivo fue de 16 días para todos los bioreactores.

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

2.3 Cuantificación de Biomasa

Para las mediciones de concentración de biomasa cada 2 días se tomó una muestra de 10 mL de cada reactor, se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos y retiró el sobrenadante, el pellet fue re-suspendido en 10 mL de agua destilada, posteriormente filtrado con filtros de celulosa de 1 μm 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.

2.4 Pretratamiento térmico

La biomasa obtenida se dividió en tres partes y cada una fue sometida a un tratamiento térmico con condiciones específicas en un horno (Binder), de la siguiente manera:

Tabla 2. Temperatura y tiempo de pretratamiento.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
105	24
75	24
25	0

Fuente: los autores.

Nota: La biomasa a 25°C fue centrifugada e inmediatamente llevada a los dos procesos de hidrólisis.

Para la biomasa tratada térmicamente (105 y 75°C), se redujo de tamaño de partícula mediante un mortero, aumentando así el área de contacto de la biomasa y mejorando su manejabilidad en el proceso de hidrólisis.

2.5 Hidrólisis

Se realizó el proceso de hidrólisis a la biomasa por medio de dos métodos; usando dos réplicas por cada muestra mediante los siguientes experimentos:

Tabla 3. Métodos de hidrólisis para las diferentes muestras y réplicas de biomasa pretratada térmicamente a diferentes temperaturas.

Método de hidrólisis	Pretratamiento térmico biomasa (°C)
<i>Organosolv metanol-ácido</i>	105
	75
	25
<i>Hidrólisis ácida</i>	105
	75
	25

Fuente: los autores.

2.5.1 Método Organosolv

Se pesaron 10 g de biomasa pretratada térmicamente (105, 75 y 25°C) para cada muestra y cada réplica respectivamente, seguidamente se prepararon 100 mL (3,32mL metanol, 3,29mL ácido sulfúrico, 93,39mL agua) de solvente metanol al 3,32 %v/v y 0.6M de ácido sulfúrico como catalizador; después se procedió a realizar la mezcla y se llevó a una autoclave (All american) a 15 psi y 121°C durante un período de reacción de 4 horas [18].

2.5.2 Método de hidrólisis ácida

Se pesaron 10 g de biomasa pretratada térmicamente (105, 75 y 25°C) para cada muestra y cada réplica respectivamente, seguidamente se prepararon 100 mL

(4,14mL HCl, 95,86mL agua) de solvente HCl 0,5M, para la hidrólisis de cada una de las muestras y réplicas; después se procedió a realizar la mezcla en un vaso de precipitado y se agitó en una placa de agitación magnética (WiseStir MSH-20D) a 500 rpm y 25°C durante un período de reacción de 2 horas [24].

2.5.3 Filtración y neutralización

La biomasa y el licor provenientes de cada una de las hidrólisis se separaron mediante filtración al vacío usando una bomba de vacío (ROCKER 400) y papel filtro (Schleicher & Schuell, tamaño de poro 1µm).

El licor se neutralizó con carbonato de calcio (CaCO₃) con el fin de detener la reacción y evitar la degradación de carbohidratos; la biomasa separada se lavó con agua destilada con el fin de eliminar el contenido de ácido aún presente y según la Norma NREL/TP-510-42621, se secó en un horno a 105°C durante 12 horas para la posterior cuantificación de azúcares [18].

El licor neutralizado se pasó por un lecho de carbón activado (Riedel-de Haën), con el fin de eliminar el color marrón oscuro de éste y así evitar el ruido en la posterior cuantificación de azúcares, que puede ocasionarse por el color del licor y por la técnica utilizada en la cuantificación de los azúcares.

2.5.4 Cuantificación de Azúcares

Para cuantificar los azúcares presentes se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico. Primero se tomó 1mL de muestra al cual se le adicionó 2,5 mL de ácido sulfúrico al 97% y 0,5 mL de fenol al 5%, se homogenizó la muestra y se procedió a medir en el espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300 Merck) a longitudes de onda de 480, 487 y 490nm respectivamente, para determinar las cantidades de glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y fructosa presentes tanto en el licor como en la biomasa [19]. En la Tabla 4 se muestran los tipos de azúcares con sus respectivas longitudes de onda.

Tabla 4. Tipos de azúcares con sus respectivas longitudes de onda

TIPO DE AZÚCAR	LONGITUD DE ONDA (nm)
Glucosa	480
Xilosa	480
Arabinosa	480
Galactosa	487
Fructuosa	490

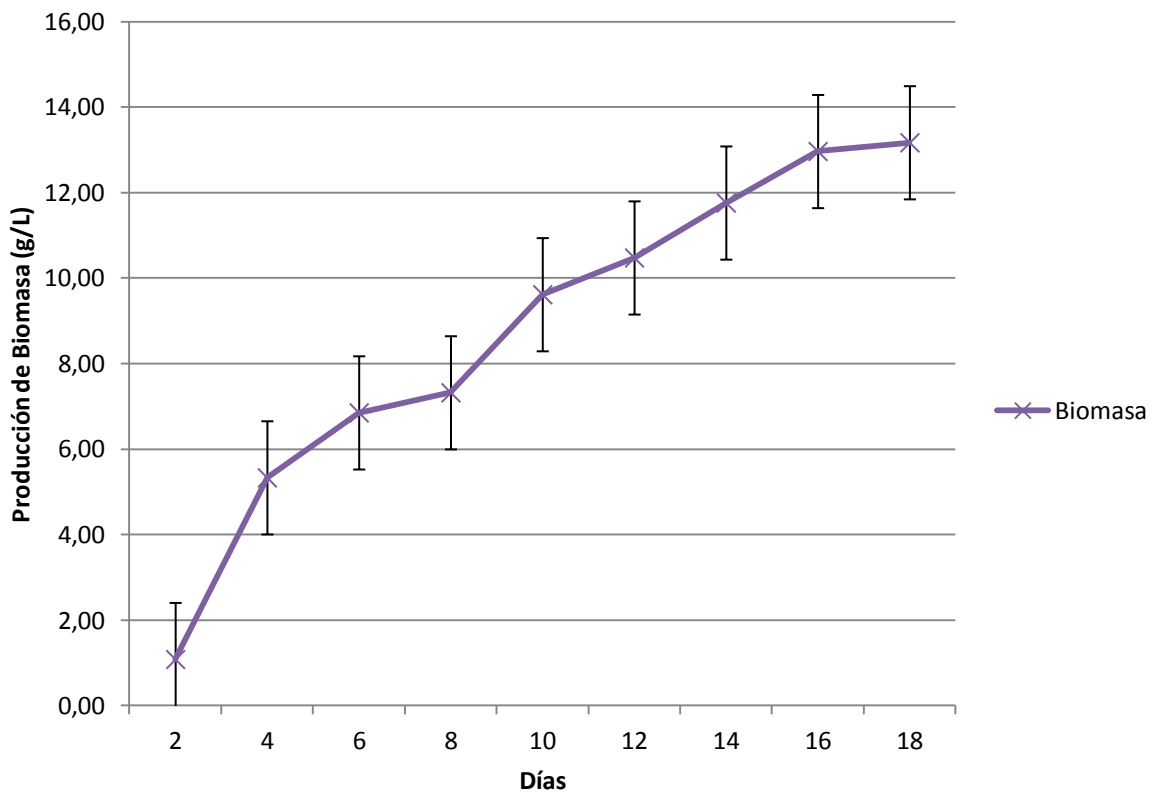
Fuente: los autores.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

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 para no incurrir en gastos energéticos innecesarios.

Figura 2. Producción de biomasa en función del tiempo.



Fuente: los autores.

Para mantener la cantidad de microalga constante en cada una de las muestras y réplicas se determinó la humedad de la biomasa para cada uno de los

pretratamientos térmicos por medio de los lineamientos de la norma NREL/TP-42621 (Anexo). En la Tabla 5 se muestran los resultados.

Tabla 5. Humedad para la biomasa de cada uno de los pretratamientos térmicos.

Temperatura del Pretatamiento (°C)	Humedad aprox (%)	Biomasa para disrupción (g)
105	0	10
75	8	12,5
25	70	33,33

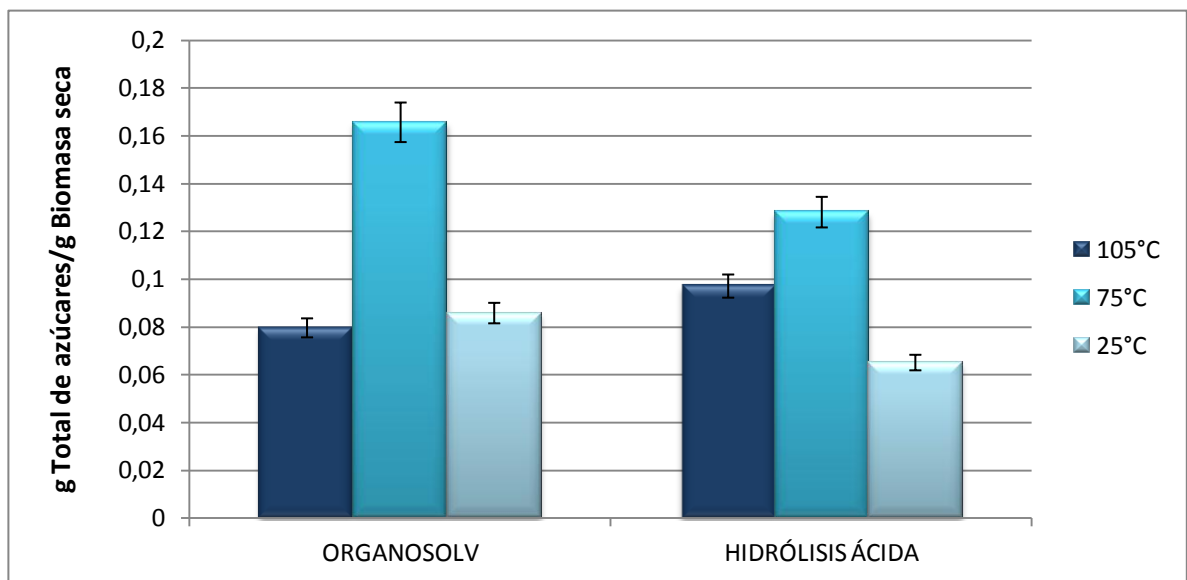
Fuente: los autores.

Los resultados para las diferentes hidrólisis se presentan en la Figura 3; donde se aprecia que en la hidrólisis por el método Organosolv la mayor liberación de azúcares fermentables ocurre a una temperatura de pretratamiento de 75°C, donde se liberan hasta 0,165g de azúcares/g de biomasa seca, seguida por la biomasa de 25 y 105°C respectivamente; igualmente para la hidrólisis ácida, la mayor cantidad de azúcares liberados, se da para el pretratamiento a 75°C, donde se liberan hasta 0,128g de azúcares/g de biomasa seca; seguida por la de 105 y la de 25°C, cambiando de comportamiento en este caso de un método a otro para estas dos temperaturas; la diferencia entre las cantidades extraídas a 75°C por los dos métodos de hidrólisis no aparentan ser significativas (aproximadamente 0,037g de azúcares/g de biomasa seca); en términos generales se puede observar que la disrupción por el método de hidrólisis ácida es mejor, debido a que se da en menor tiempo, utilizando menor cantidad de reactivos y un consumo energético mucho menor.

En cuanto al análisis de los resultados arrojados por el método Organosolv para los pretratamientos a 105°C y a 75°C se puede notar que, aunque a la biomasa para cada caso tiene zonas amorfas, la liberación de azúcares obtenida por la

biomasa pretratada a 75°C es mayor lo cual se debe a que la humedad contenida en la biomasa mejora el área de contacto para la reacción de hidrólisis y además ayuda a la miscibilidad del metanol para la extracción de los azúcares, siendo en este caso mayor; en el caso de la biomasa pretratada a 25°C el exceso de agua contenido en ésta provoca un buen esparcimiento del metanol sobre toda la biomasa, pero al ser tan grande la cantidad de agua la concentración del ácido y del metanol disminuyen en la mezcla produciendo un menor contacto entre ácido, el agua y la biomasa disminuyendo la reacción de hidrólisis al igual que la extracción de azúcares.

Figura 3. Total de azúcares liberados para la biomasa pretratada para los dos métodos de hidrólisis.



Fuente: los autores.

El comportamiento que tiene la liberación de los azúcares está relacionada con la temperatura del pretratamiento y con esto la humedad de la biomasa. Según los resultados obtenidos, la biomasa debe contener una humedad relativamente baja para permitir una mayor liberación de azúcares; de manera que ésta no debe estar totalmente deshidratada (pretratamiento 105°C) ni contener altas cantidades de

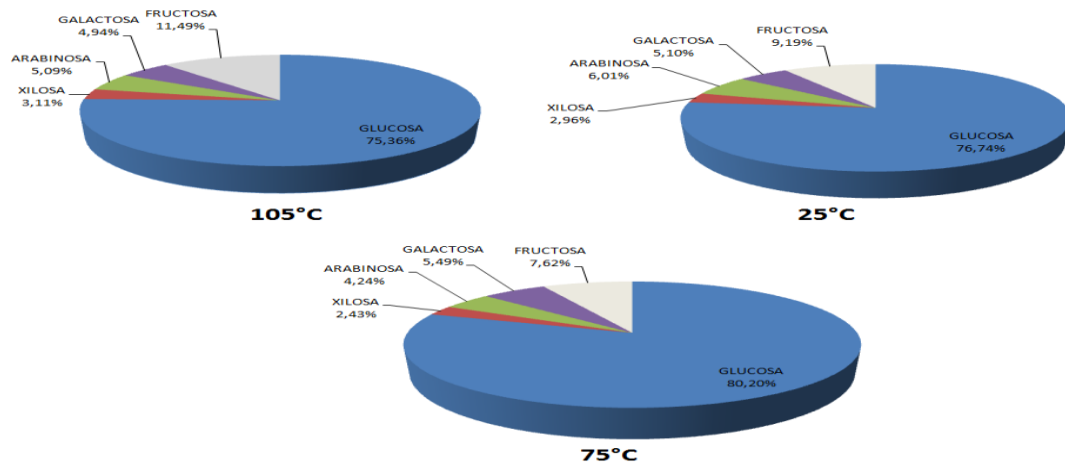
humedad (pretratamiento 25°C), pues el efecto de los ácidos y el solvente sobre la célula será diferente para cada uno de los métodos de disrupción.

Para la hidrólisis ácida de la biomasa pretratada a 25°C, el contenido de agua es tan alto que al usar el ácido para el proceso de disrupción la concentración de éste disminuye considerablemente haciendo que el contacto entre el ácido y la biomasa sea mucho menor, provocado que el rendimiento de la reacción y por ende la liberación de azúcares sea baja; mientras que para la biomasa pretratada a 75°C al ser tan baja la cantidad de humedad la concentración del ácido es casi constante y al ocurrir la disrupción la cantidad de agua en la biomasa mejora la reacción; finalmente para el pretratamiento a 105°C al no existir presencia de agua, la concentración del ácido será alta haciendo que el rendimiento del proceso de disrupción sea alto. En sí el efecto de la humedad en la biomasa, el solvente y el ácido utilizados para cada método de hidrólisis juegan un papel importante en la reacción de producción de azúcares fermentables y en la posterior extracción de estos; como se puede apreciar en la hidrólisis Organosolv estos tres parámetros juegan un papel importante en la reacción y la extracción; en la hidrólisis ácida es más importante el efecto de la humedad y la concentración de los reactivos.

Los valores de glucosa obtenidos fueron de hasta 81% tanto para Organosolv (Figura 4) como para hidrólisis ácida (Figura 5). El segundo carbohidrato en mayor proporción presente es la fructosa con una cantidad de entre 8 y 12% para los dos métodos, el resto se compone (cerca del 13%) de carbohidratos fermentables tales como galactosa, arabinosa y xilosa.

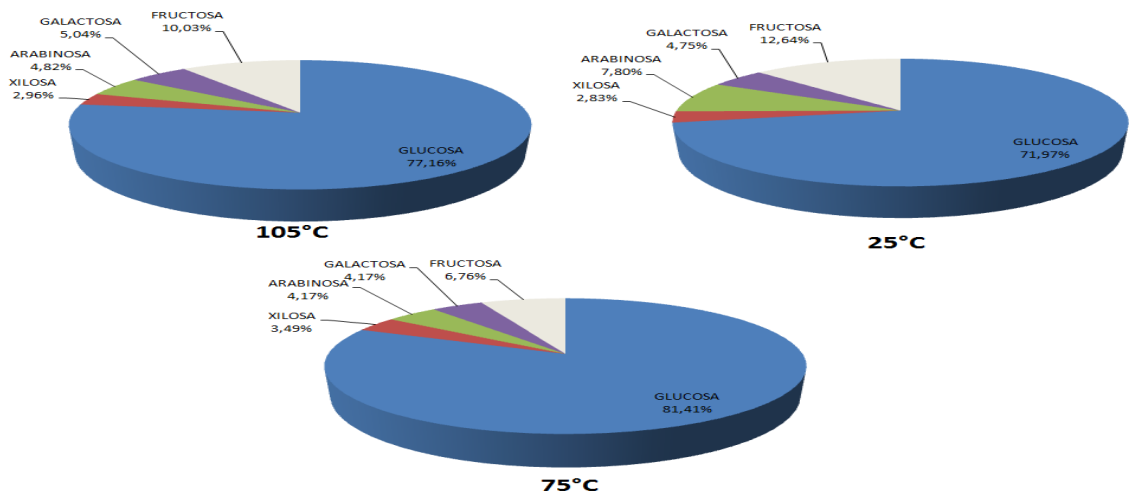
Dentro de los carbohidratos liberados mediante los dos métodos de hidrólisis la glucosa es el más alto, debido primordialmente a la composición de la pared celular del alga, que está conformada en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y almidón, los cuales al degradarse generan éste monosacárido.

Figura 4. Porcentaje de azúcares fermentables liberados por el método Organosolv para cada uno de los pretratamientos.



Fuente: los autores.

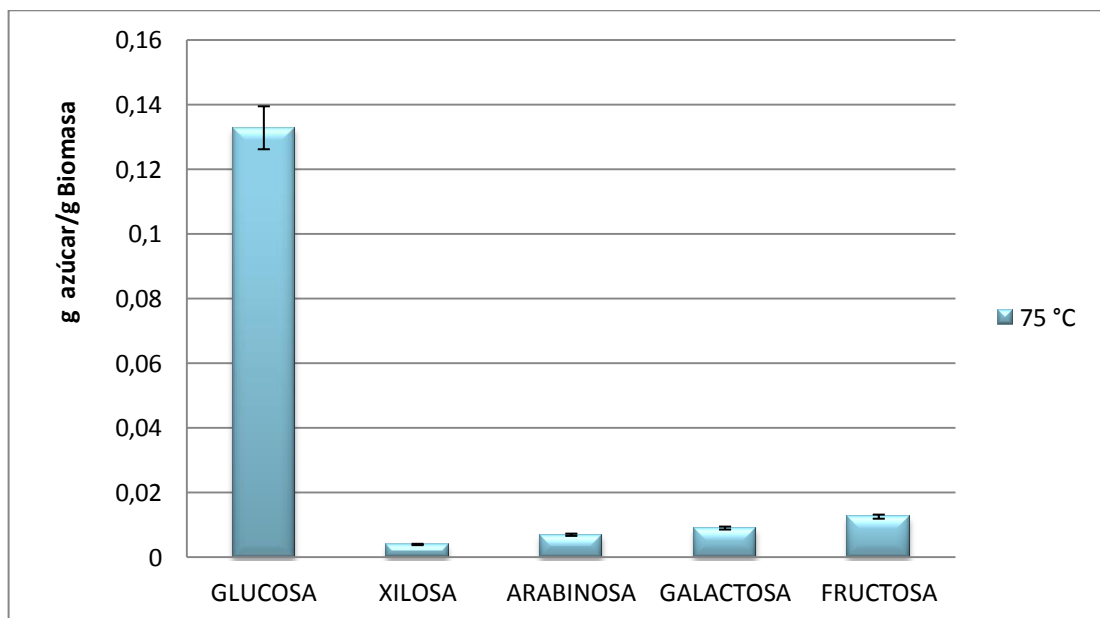
Figura 5. Porcentaje de azúcares liberados por el método de hidrólisis ácida para cada uno de los pretratamientos.



Fuente: los autores.

En la figura 6 se dan los valores obtenidos de glucosa, xilosa, galactosa y fructosa para la hidrólisis Organosolv a 75°C los cuales son: 0,132g glucosa/g biomasa, 0,004g xilosa/g biomasa, 0,0091g galactosa/g biomasa y 0,012g fructosa/g biomasa; comparados con los obtenidos por *Lee et al.*[21] realizando métodos de disrupción diferentes y con biomasa seca para *C. vulgaris* dieron: 0,14g glucosa/g biomasa, 0,04g xilosa/g biomasa, 0,031g galactosa/ g biomasa y 0,06 g fructosa/ g biomasa; se puede afirmar que aunque los contenidos de glucosa son similares el resto de azúcares varían de manera significativa haciendo que el rendimiento de los azúcares liberados a 75°C por el método Organosolv sea aproximadamente 10% menor de los extraídos por el método comparado; cabe resaltar que las condiciones por el método Organosolv no son las mejores para este tipo de biomasa, es decir se deben buscar las mejores condiciones para realizar la disrupción y la extracción de los azúcares.

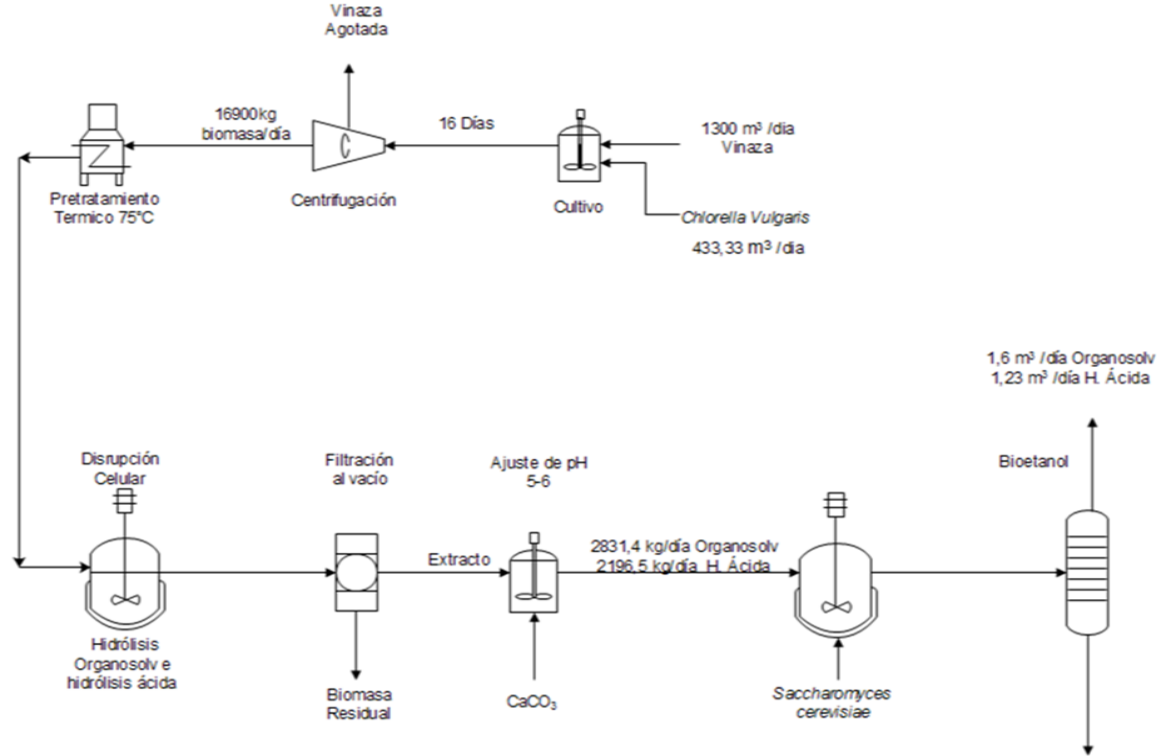
Figura 6. Cantidad promedio del tipo de azúcares liberados por el método Organosolv a 75°C.



Fuente: los autores.

A partir de los resultados de producción de biomasa y la cantidad de carbohidratos obtenibles por medio de los procesos de hidrólisis, es posible plantear las vinazas como un medio de cultivo eficiente para la producción de biomasa de microalgas con miras a la producción de bioetanol. Planteando un escenario donde una destilería produjera 100 m³ de alcohol 96% por día, la descarga de vinazas sería de aproximadamente 1300 m³, a partir de los datos obtenidos en este trabajo, la productividad diaria de biomasa de *C. vulgaris* utilizando toda la vinaza obtenida en este escenario sería de 17160 kg/d con una obtención de azúcares fermentables de 2831,4 kg/d por Organosolv y 2196,5 kg/d por hidrólisis ácida; si se fermentarán todos los azúcares obtenidos mediante la metodología desarrollada por *Scholz et al.* [22] se obtendrían 1245,6 kg/d (1,6 m³/d) de etanol para Organosolv y 966,5 kg/d (1,23 m³/d) de etanol para hidrólisis ácida. Teniendo en cuenta los valores obtenidos de etanol para el escenario planteado se podría aumentar la producción diaria de etanol en 1,6%; aunque el este valor no aparenta ser significativo, es importante recordar que proviene de la valorización de la vinaza. El proceso descrito anteriormente se ilustra en la Figura 7.

Figura 7. Diagrama de proceso del escenario planteado.



Fuente: los autores.

4. CONCLUSIONES

1. El efecto del pretratamiento térmico está relacionada con la humedad de la biomasa obteniéndose a 75°C una mayor la cantidad de azúcares fermentables, tanto por el método Organosolv como por la hidrólisis ácida, llegando a obtener hasta 0,165 g de azúcares/g de biomasa y 0,128 g de azúcares/g de biomasa para cada uno respectivamente.
2. La hidrólisis ácida presenta un mejor panorama para la disrupción celular de la *C. vulgaris* pues aunque su rendimiento es un poco inferior respecto al método Organosolv, las condiciones de reacción (25°C y 1 atm) requieren bajos consumos de energía, haciendo más atractivo este procedimiento a la hora de producir azúcares fermentables.
3. La obtención de azúcares fermentables para producción de bioetanol, usando vinazas como sustrato tiene un gran potencial, ya que se pueden extraer cantidades considerables. (2831,4kg/d Organosolv, 2196,5kg/d hidrólisis ácida).

5. RECOMENDACIONES

1. Definir un diseño de experimentos de manera que se encuentre la temperatura y el tiempo de pretratamiento óptimo para alcanzar un mayor rendimiento en la obtención de azúcares fermentables.
2. Buscar un solvente apropiado para aumentar el rendimiento de la extracción en la hidrólisis ácida de manera que pueda liberar mayor cantidad de azúcares fermentables.
3. Variar la concentración de reactivos en los métodos de hidrólisis utilizados (Organosolv e hidrólisis ácida) para la disrupción celular y poder mejorar la extracción de azúcares fermentables.

BIBLIOGRAFÍA

Christenson, L., Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*. 29, 686-702.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.

Guo, H., Daroch, M., Liu L., Qui,G., Shu,G., Guangyi, W. (2013). Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. *Bioresource Technology*. 127, 422–428.

Haruna, R., Danquaha, M. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* . 46, 304-309.

Ho, S., Huang, S., Chen, Ch., Hasunuma,T., Kondo,K,. Chang, J. (2012). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology* .64, 878-888.

Jerez, S. J., Rueda, L. V., Alfonso, L. Y., Barajas, A. F. Barajas, C., Kafarov, V. (2012)Production of microalgae carbohydrates for biofuels by modification of carbon/nitrogen ratio on lab-scale. *CT&F*.8, 103-116.

Lee, S., Oh. Y., Kim, D., Kwon,D., Lee, Ch., Lee, J. (2011). Converting Carbohydrates Extracted from Marine Algae into Ethanol Using Various Ethanolic *Escherichia coli* Strains. *Appl Biochem Biotechnol* .164, 878-888.

Liu, J., Junchao, H. Jiang Y. Chen F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*. 107, 393-398.

Magota A., Saga K., Okada, S., Atobe, S., Imou K. (2012). Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*. 123,195-198.

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.

Miranda J.R., Passarinho, P.C., Gouvei, L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 104 ,342-348.

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 Microbiology and Biotechnology*. 19, 161-166.

Nirbhay, K.S., 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.

Peñaranda, R., Sepúlveda, K., (2011). Evaluación y comparación de rutas para la obtención de monosacáridos y lípidos a escala laboratorio de la microalga *Navicula* sp. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Rawat, I., Ranjith R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88, 3411-3424.

Rojan, J., Anisha, G.S., Madhavan, K., Ashok, P. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 102, 186-193.

Satyawali, Y., Balakrishnan, M. (2008). Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*. 86, 481-497.

Scholz, M., Riley, M.R., Cuello, J.L., (2013). Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. biomass and bioenergy. 8, 59-65.

Sui, Z., Gizaw, Y., Miller, J. N. (2010). Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*. *Carbohydrate Polymers*. 2012.03.062.

Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F. and 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, 985-992.

Valderrama, L., Del Campo, C., Rodríguez, C., Luz E. de- Bashana, Yoav Bashan. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*. 36, 4185–4192.

Yen, H., Hub, I., Chen, Ch., Ho, S., Lee, D., Chang, J. (2012). Microalgae based biorefinery from biofuels to natural products. *Bioresource Technology*. 135, 166-174.

Zhou, N., Zhang, Y., Wua, X., Gong, X., Wang, Q. (2011) Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. *Bioresource Technology*. 102, 10158-10161.

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.

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