



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Evaluación del potencial de producción de
biocombustibles a partir de microalgas.**

Autor:

Sanz Castrodeza, Esther

Tutor:

**Coca Sanz, Mónica
Ingeniería Química y TMA**

Cotutor:

**García Cubero, María Teresa
Ingeniería Química y TMA**

Valladolid, Julio 2016.



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN

El bioetanol es un biocombustible que puede ser producido a partir de la fermentación de los azúcares producidos a partir de las microalgas. *Spirulina maxima* es una cianobacteria que cultivada en condiciones de estrés de nutrientes es capaz de acumular altas concentraciones de carbohidratos. El azúcar mayoritario (97%) en *Spirulina maxima* es glucosa.

Los azúcares fermentables se liberan de manera eficiente mediante procesos de hidrólisis. En este trabajo se comparan pretratamientos ácidos y la combinación de pretratamientos térmicos y enzimáticos. Las condiciones que mejores resultados arrojan son hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 1% v/v durante 45 min e hidrólisis térmica durante 30 min seguida de hidrólisis enzimática con amilasas.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de fermentar la glucosa producida a bioetanol.

Se presenta una comparación en cuanto a consumos energéticos de ambos procesos de sacarificación y fermentación. El proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación presenta los mejores resultados.

Palabras clave: Bioetanol, microalga, *Spirulina maxima*, hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida.



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ABSTRACT

Bioethanol is a biofuel that can be produced from the fermentation of sugars produced from microalgae. *Spirulina maxima* is a cyanobacteria that cultivated under nutrient stress conditions is able to accumulate high concentrations of carbohydrates. Glucose is the main sugar (97%) in *Spirulina maxima*.

Fermentable sugars are released efficiently by hydrolysis processes. In this work, acid pretreatments and the combination of thermal and enzymatic pretreatments are compared. The best results were produced after acid hydrolysis with H₂SO₄ 1% v/v for 45 min and thermal hydrolysis for 30 followed by enzymatic hydrolysis with amylases.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was capable of fermenting the glucose produced bioethanol.

A comparison in terms of energy consumption for both processes of saccharification and fermentation is presented. The process of acid hydrolysis and subsequent fermentation showed lower energy consumption.

Keywords: Bioethanol, microalgae, *Spirulina maxima*, enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis.



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. Introducción.....	9
1.1. Producción de biocombustibles.	11
1.2. Biocombustibles a partir de microalgas	17
1.3. Bioetanol a partir de microalgas	21
1.3.1. Estrategias de acumulación de carbohidratos	25
1.3.2. Proceso de producción de bioetanol a partir de microalgas	26
1.3.3. Bioetanol a partir de <i>Spirulina sp.</i>	32
2. Objetivos	35
3. Bases de diseño: ensayos a escala laboratorio de cultivo, hidrólisis y fermentación de <i>Spirulina maxima</i>	39
3.1. Materiales y métodos.....	41
3.1.1. Mantenimiento del alga.....	41
3.1.2. Operación en fotobiorreactores	42
3.1.3. Recogida del alga y conservación.....	46
3.1.4. Hidrólisis y fermentación	46
3.1.5. Métodos analíticos.....	49
3.1.5.1. Concentración de biomasa	49
3.1.5.2. Concentración de carbohidratos	49
3.1.5.3. Concentración de proteínas.....	49
3.1.5.4. Intensidad de luz.....	50
3.1.5.5. pH.....	50
3.1.5.6. Separación de la biomasa de microalgas	50
3.1.5.7. Análisis de HPLC de las muestras de hidrólisis y fermentación	51
3.2. Resultados experimentales	51
3.2.1. Influencia de la concentración inicial de fósforo en la concentración de biomasa y la composición de <i>Spirulina maxima</i>	52
3.2.2. Influencia de la concentración de nitrógeno en los medios de cultivo de <i>Spirulina maxima</i> y composición de la biomasa.	54
3.2.3. Hidrólisis ácida	56



3.2.4.	Hidrólisis enzimática	65
4.	Proceso de producción de bioetanol a partir de <i>Spirulina maxima</i>	71
4.1.	Diagramas de proceso.....	74
4.1.1.	Cultivo y concentración de <i>Spirulina maxima</i>	74
4.1.2.	Hidrólisis ácida y fermentación	75
4.1.3.	Hidrólisis enzimática y fermentación	77
4.2.	Cultivo y concentración de <i>Spirulina maxima</i>	79
4.3.	Hidrólisis ácida y fermentación.....	85
4.3.1.	Comparación del proceso de hidrólisis ácida con 3% w/w y 7,5% w/w de biomasa seca	85
4.3.2.	Integración del proceso de hidrólisis ácida y fermentación	88
4.4.	Hidrólisis enzimática y fermentación.....	91
4.5.	Comparación global de los procesos.....	96
5.	Conclusiones.....	99
6.	Bibliografía	103
7.	Anexos	113
7.1.	Anexo I: Balances de materia y de energía	115
7.2.	Anexo II: Integración energética.....	122



1. Introducción



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



El deterioro del medio ambiente y el aumento de la demanda de combustibles fósiles están provocando una presión para la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías de biocombustibles. Desde la reunión de Kyoto en 1997, el objetivo ha sido disminuir las emisiones de CO₂ y otros gases de efecto invernadero (GEI) [1].

Los combustibles fósiles son aquellos procedentes de biomasa acumuladas durante millones de años y que se han ido transformando en compuestos de gran contenido energético.

El consumo de estos combustibles fósiles se ha incrementado un 50% en las últimas dos décadas fruto de la rápida industrialización de las economías emergentes, que representan el 80% del aumento global del consumo de energía. Según el informe de la *BP Statistical Review of World Energy* de Junio de 2014, del total de la energía producida a nivel mundial durante el año 2013, el 83% procedía de combustibles fósiles (petróleo 32%, gas natural 24% y carbón 30%), mientras que un 4% tenía su origen en energía nuclear, un 7% en energía hidráulica, un 2% en energías renovables (fotovoltaica y eólica) y un 1% biocombustibles [2].

1.1. Producción de biocombustibles.

El modelo energético actual, basado en un porcentaje alto en el petróleo y en otros combustibles fósiles, empieza a estar caduco. Los problemas derivados de su uso; como el impacto ambiental negativo debido a las emisiones de GEI, la inestabilidad de los precios, el progresivo agotamiento de las reservas y los conflictos geopolíticos, han provocado en los últimos años una carrera por buscar fuentes de energías alternativas y renovables que reduzcan la dependencia del petróleo [3].

El Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE) define las energías renovables como los recursos limpios e inagotables que proporciona la naturaleza y que tienen un impacto mínimo y siempre reversible [4]. Las principales energías renovables son: energía solar, energía eólica, energía hidráulica, energía de la biomasa (materia orgánica), energía geotérmica (calor de las capas internas de la tierra) y energía oceánica [5].

La Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), utiliza la definición de la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 para catalogar la “biomasa” como “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización” [6].

La Figura 1.1 muestra las posibles fuentes de biomasa.

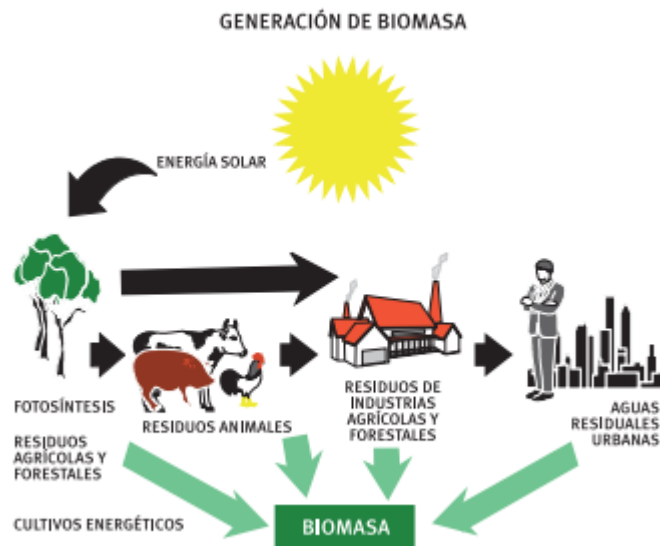


Figura 1.1: Posibles orígenes biológicos para la generación de biomasa [6].

Biocombustible es el término empleado para denominar a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos producidos de forma directa o indirecta a partir de biomasa, por lo tanto se trata de una fuente renovable de energía. Los biocombustibles son alcoholes, éteres, ésteres y otros compuestos químicos obtenidos a partir de biomasa (normalmente cultivos vegetales o residuos derivados de estos). Su producción está suscitando un



gran interés a nivel internacional, ya que son muchos los biocombustibles que pueden ser obtenidos de la biomasa, destacando entre ellos el biodiesel, bioetanol, biobutanol y biogás. El uso de biocombustibles juega un papel crucial a la hora de evitar una dependencia excesiva de los combustibles fósiles, permitiendo asegurar el abastecimiento de combustibles de una forma sostenida en el tiempo. Además, los biocombustibles promueven una mayor sostenibilidad, ya que todo el CO₂ emitido a la atmósfera como consecuencia de su combustión ha sido previamente capturado en forma de biomasa [7].

Los biocombustibles ofrecen muchos beneficios asociados con la seguridad energética, la mayor estabilidad económica y la reducción de emisiones GEI [8].

Según el origen de la biomasa, los biocombustibles pueden ser clasificados como de **primera, segunda, tercera o cuarta generación**.

Biocombustibles de primera generación

Las principales materias primas para la producción de biocombustibles de primera generación son la caña de azúcar, remolacha, maíz y soja. Mediante la fermentación de los azúcares de la caña de azúcar se obtiene bioetanol, y con la digestión anaerobia de la biomasa se obtiene biogás, mientras que con la transesterificación de los aceites obtenidos de las semillas de plantas oleaginosas se obtiene biodiesel [8].

Ventajas

- Se parte de cultivos establecidos y disponibles en prácticamente todo el mundo.
- Existe tecnología para su transformación y es muy sencillo.



Inconvenientes y conflictos

- Se debería destinar la totalidad de la superficie cultivable para poder sustituir el uso de combustibles fósiles, por lo que no habría cosechas destinadas a la alimentación.
- Uso intensivo del suelo, que compromete su conservación.
- Grandes necesidades de agua y fertilizantes, que agotarían este recurso básico para la vida del planeta.
- Disminución de la biodiversidad, con desaparición de zonas boscosas o selváticas para destinarlas a plantaciones intensivas.
- Conflicto ético moral: cosechas para comida o para combustibles.

Biocombustibles de segunda generación

Los combustibles de segunda generación también se conocen con el nombre de biocombustibles avanzados. Lo que les diferencia de los de primera generación es el hecho de que la materia prima usada para su producción no son cosechas que pueden destinarse para alimentación en primera instancia. También se diferencian en que se cultivan aprovechando áreas marginales improductivas en cultivos para alimentación y que no se requiere agua o fertilizantes para su cultivo.

Las fuentes principales de los biocombustibles de segunda generación contienen gran cantidad de lignina y celulosa, por lo que se necesitan procesos previos a la fermentación de los azúcares para su extracción e hidrólisis: conversión termoquímica (gasificación, pirolisis o torrefactado) y conversión bioquímica [9].

Ventajas

- No compiten con la producción de alimentos.



- Aunque se requieren grandes extensiones de cultivo para la obtención de la biomasa de partida, en una misma cosecha se puede destinar por ejemplo, el grano a alimentación, y los residuos (tallos, hojas, cascarillas...) a la producción de biocombustible.
- Se pueden aprovechar otras especies no destinadas a producción de alimentos: distintas especies de gramíneas, jatropha (*Jatropha curcas*), etc.

Inconvenientes

- Requieren una tecnología más compleja para su obtención, lo que en muchos casos aumenta el coste hasta hacerlos más caros que los combustibles fósiles.

Biocombustibles de tercera generación

El término “tercera generación” se refiere a los biocombustibles obtenidos a partir de algas o microalgas. Por ello también se les conoce como **oleoalgal, oilgae o algaeoleum** [9].

Anteriormente, los biocombustibles obtenidos de las algas quedaban englobados en los de segunda generación, pero visto los rendimientos superiores obtenidos, se ha considerado apropiado crear un grupo específico para ellos. Las algas producen un aceite que se refina fácilmente en diésel o incluso en ciertos componentes de la gasolina.

Ventajas

- El CO₂ que se emite durante la combustión es el mismo que se ha acumulado durante la fotosíntesis.
- Gran rendimiento por unidad de superficie.
- No tienen porqué ser producidas en terrenos destinados a la agricultura.



- Pueden generar gran diversidad de combustibles: gasolina, biodiesel, etanol, butanol, metano, aceite vegetal, etc.

Inconvenientes

- Normalmente, la producción de algas necesita condiciones muy controladas de temperatura y pH.
- El crecimiento de microalgas requiere el consumo de nitrógeno y fósforo, que se está convirtiendo, este último, en un recurso escaso y que entraría en conflicto con la fertilización para la producción de alimentos.
- Mayores costes de producción en comparación con otras alternativas de producción de biocombustibles.

Biocombustibles de cuarta generación

Los biocombustibles de cuarta generación llevan la tercera generación un paso más allá. La clave es la captación y almacenamiento de carbono (CAC), tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología de proceso. La materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia de proceso, sino que se diseña para captar más dióxido de carbono, a medida que el cultivo crece. Los métodos de proceso se combinan con tecnologías de captación y almacenamiento de carbono con el objetivo último de almacenar el CO₂ generado en formaciones geológicas.

Como materia prima se utilizan microalgas y bacterias que pueden **manipularse genéticamente** para su adaptación al proceso [10].

De esta manera, se cree que los biocombustibles de cuarta generación contribuyen más a reducir las emisiones de GEI, porque son más neutros o incluso negativos en carbono si se comparan con los biocombustibles de las otras generaciones. Los biocombustibles de cuarta generación encarnan el concepto de «bioenergía con almacenamiento de carbono» [11].



La **Tabla 1.1** resume las diferentes materias primas que se utilizan en generación de biocombustibles, así como los tipos de biocombustibles que se obtienen.

Tipos de biocombustibles	Materia prima	Tipo de biocombustible
Primera generación	Azúcar, almidón, aceites vegetales, grasas animales, etc.	Bio-alcoholes, aceites vegetales, biodiesel, syngas, biogás.
Segunda generación	Cultivos no alimenticios, paja de cereales, madera, residuos sólidos, cultivos energéticos.	Bio-alcoholes, biodiesel, biohidrógeno, diesel procedente de maderas, biogás.
Tercera generación	Algas, árboles bajos en lignina	Bio-alcoholes, biodiesel, biogás, biohidrógeno.
Cuarta generación	Algas y bacterias modificadas genéticamente.	Bio-alcoholes, biodiesel

Tabla 1.1: Clasificación de los biocombustibles en base al sistema de producción [10].

1.2. *Biocombustibles a partir de microalgas*

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes. Se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40.000 especies, aunque se estima que existen más de 100.000 especies [13].

Las microalgas pueden constituir una alternativa viable a los combustibles fósiles, ya que son especialmente adecuadas por ser un sumidero de CO₂, por sus altos rendimientos productivos y por la posibilidad de acumular, potencialmente, altas concentraciones de carbohidratos y lípidos mediante la generación de situaciones de estrés abiótico (privación de determinados nutrientes, estrés lumínico, cambios de temperatura, etc.) [12].



Sin embargo, el uso de microalgas para producir biocombustibles también tiene una serie de desventajas que dificultan su escalabilidad:

- Son organismos relativamente poco conocidos y con un comportamiento muy variable según la especie empleada [14].
- Su producción requiere de formación cualificada y conocimientos técnicos complejos [15].
- Generalmente es necesario recoger, concentrar y secar la biomasa, por lo que se incurre en fuertes costes [16].
- El proceso completo de producción de biocombustibles a partir de microalgas conlleva importantes costes (en el año 2008 se estimó que el precio de 1 litro de biodiesel de microalgas tenía un coste 14,5 veces superior a 1 litro de petrodiesel) [17].

No obstante, se espera que el desarrollo de esta tecnología conlleve una disminución de los costes de producción de 10-15 veces en los próximos 20 años [18]. En la actualidad, la mayor parte de la investigación está encaminada a maximizar la producción de algas [19-21] y a acumular determinados carbohidratos y lípidos para producir biocombustibles [22,23], así como a la minimización de los costes de producción y extracción [16].

A partir de las microalgas se pueden obtener diversos biocombustibles entre los que cabe destacar biodiesel, bioetanol, biometanol, biobutanol y biogás [24-26]. Una de las principales características de las microalgas es su gran variabilidad bioquímica (contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos) no solo a nivel de especie, sino en función de las condiciones de cultivo. Existen especies que tienen concentraciones de carbohidratos menores del 20% (*Spirulina platensis*), mientras que otras superan el 60% (*Spirogyra sp.*). Del mismo modo ocurre referente a la concentración de lípidos, pudiéndose encontrar especies como *Chlorella pyrenoidosa* que contiene un 3% de lípidos y otras como *Chlorella vulgaris* que pueden superar el 55%.

La **Tabla 1.2** resume los datos relativos a la composición (proteínas, carbohidratos y lípidos) de diferentes especies de microalgas.



Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Arthrospira maxima</i>	61-71	13-16	6-7
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella sorokiniana</i>	45-55	18-38	15-35
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12	14-56
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Isochrysis sp.</i>	41-58	18-21	25-33
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9 14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10 17	12-14
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9

Tabla 1.2: Composición general de diferentes microalgas (% peso seco) [27,28].

Cuando las microalgas son cultivadas en condiciones sub o supraóptimas (condiciones de estrés) reaccionan mediante cambios metabólicos que atienden a una estrategia para hacer frente a estas condiciones ambientales adversas [29]. Estos cambios dinámicos en el medio provocan una modificación de la composición tanto a nivel macromolecular (proteínas, carbohidratos y lípidos) como a nivel de producción de metabolitos secundarios (síntesis de vitaminas, hormonas, sustancias antioxidantes, antibióticos, etc.), produciéndose mayoritariamente una acumulación de lípidos [23,30] o carbohidratos [22,31], que pueden ser empleados por la industria para la producción de biocombustibles.

A continuación se describen las principales características del biodiesel, biometanol, biobutanol y biogás, principales biocombustibles obtenidos a partir de las microalgas. En este trabajo se describirá con más detalle la producción de bioetanol a partir de microalgas en los siguientes apartados.

El biodiesel es un biocombustible producido a partir de materias primas renovables, como los aceites vegetales, que se puede utilizar en los motores diésel. Químicamente son ésteres de alquilo, de metilo y de etilo, con cadenas largas de ácidos grasos. Estas cadenas, al estar oxigenadas, le otorgan al motor una combustión mucho más limpia. Este biocombustible puede



utilizarse puro, o en mezclas de diferentes concentraciones con el diésel obtenido del petróleo [32].

El biobutanol es un biocombustible de gran interés por su parecido excepcional a la gasolina. El octanaje es similar al de la gasolina pero menor que el octanaje del etanol y el metanol. De hecho, tienen la misma densidad energética y mejor perfil de emisiones. Hoy en día, hay varias empresas que se dedican a su fabricación a escala comercial a partir de maíz y se está convirtiendo en el biocombustible más popular, por encima del etanol, ya que no implica realizar cambios en el motor para su uso y no produce daños en el motor [9].

El biometanol es utilizado como combustible, principalmente al mezclarlo con gasolina. El biometanol se produce a partir del gas de síntesis procedente de la gasificación de la biomasa. Es altamente tóxico y su poder calorífico es menor que el de la gasolina y el bioetanol. El biometanol es un combustible alternativo para motores de combustión interna, ya sea en combinación con la gasolina o puro. Producir biometanol es más barato que producir bioetanol. [33].

La **Tabla 1.3** compara las principales características de la gasolina y los biocombustibles descritos.

Combustible	Densidad Energética	Proporción de Mezcla Aire - Combustible	Energía Específica	Calor de Vaporización	RON*	MON**
Gasolina	32 MJ/L	14.6	2.9 MJ/kg aire	0.36 MJ/kg	91-99	81-89
Butanol	29.2 MJ/L	11.1	3.2 MJ/kg aire	0.43 MJ/kg	96	78
Etanol	19.6 MJ/L	9.0	3.0 MJ/kg aire	0.92 MJ/kg	107	89
Metanol	16 MJ/L	6.4	3.1 MJ/kg aire	1.2 MJ/kg	106	92

Tabla 1.3: Comparación de las características de los principales combustibles [34].

*RON: Research Octane Number (Octanaje medio de laboratorio).

*MON: Motor Octane Numbre (Octanaje de motor estático).



El biogás es un gas producido por la fermentación de la materia orgánica en condiciones anaerobias. También puede producirse por la gasificación de la biomasa. El uso de biomasa microalgal como sustrato para producir biogás mediante digestión anaerobia se remonta a finales de los años cincuenta. El biogás está compuesto principalmente por metano (55-80%), CO₂ (20-45%) y trazas de otros elementos. EL poder calorífico del biogás es 5,3 MJ/kg aire. Puede ser empleado para la generación de electricidad y calor en motores de combustión [74].

1.3. Bioetanol a partir de microalgas

Entre los biocombustibles el más destacado es el bioetanol. Es uno de los biocombustibles que se está considerando como un posible sustituto de los combustibles fósiles convencionales. El bioetanol emite la misma cantidad de CO₂ durante la combustión que el CO₂ que se ha acumulado durante la fotosíntesis y lo que se libera durante la degradación natural de la biomasa. Las investigaciones en biotecnología se han dirigido a la identificación de especies adecuadas de biomasa que puedan proporcionar bioetanol, sin competir con los cultivos destinados a la alimentación humana. Una nueva alternativa para obtener azúcares fermentables son las microalgas, algas y cianobacterias [12].

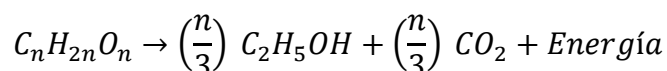
El bioetanol tiene algunas desventajas, como por ejemplo, una baja densidad energética, es volátil y debido a la corrosión que produce, el bioetanol presenta dificultades en el transporte. Es tóxico para los microorganismos y produce emisiones de NOx un poco mayores que las de la gasolina [35].

La **Tabla 1.4** recoge las principales características del bioetanol.

Formula	C ₂ H ₅ OH
Estado de agregación	Líquido
Apariencia	Incoloro
Densidad	789 kg/m ³
Masa molar	46,07 g/mol
Punto de fusión	158,9 K
Punto de ebullición	351,6 K
Temperatura crítica	514 K
Presión crítica	63 atm
Viscosidad	1,074 mPas
Acidez (pKa)	15,9
Solubilidad en agua	Miscible
Densidad energética	19,6 MJ/L
Proporción de mezcla aire- combustible	9
Energía específica	3,0 MJ/kg air
Calor de vaporización	0,92 MJ/kg
RON	107
MON	89
Punto de inflamación	286 K
Temperatura de autoignición	636 K
Límite de explosividad	3,3 a 19 %

Tabla 1.4: Características del bioetanol [36].

El bioetanol es un combustible producido a partir de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa, siguiendo la ecuación:



Para la producción de bioetanol, generalmente se emplean biomásas ricas en azúcares, almidón o celulosa que deben ser previamente sacarificadas. Posteriormente, el microorganismo transforma los azúcares fermentables en etanol y libera CO₂. El bioetanol se separa del medio de fermentación mediante un proceso de destilación, obteniéndose por una parte el biocombustible, y por otra la torta que contiene la biomasa resultante. Este residuo puede ser posteriormente valorizado ya que tiene un contenido elevado en lípidos o proteínas [37].



Saccharomyces cerevisiae es el organismo más empleado para producir bioetanol a escala industrial debido a su fácil manejo y a que es capaz de metabolizar los principales azúcares de seis carbonos, como la glucosa, y también la sacarosa. Sin embargo, una parte importante de los monómeros que se liberan durante la hidrólisis de las algas no pueden ser metabolizados por *S. cerevisiae*, por lo que los rendimientos de producción de etanol pueden ser reducidos. Por esta razón, cada vez se están empleando con mayor frecuencia otros microorganismos capaces de fermentar una mayor variedad de azúcares, como *Pichia stipitis*, *Zimomonas mobilis* o *Saccharomyces bayanus* y cepas modificadas de *Escherichia coli* [38-40].

Se estima que a partir de una hectárea de terreno cultivada con algas se podrían producir entre 46.000 y 140.000 litros de bioetanol al año [41]. Sin embargo, actualmente existe una importante diferencia entre la producción teórica y la real. En general, bajo condiciones óptimas de cultivo donde las microalgas crecen de forma exponencial, las microalgas no acumulan grandes concentraciones de carbohidratos (15-20%) salvo ciertas especies como *Spyrogyra sp.* (33-64%), *Scenedesmus dimorphus* (21-52%) o *Porphyridium cruentum* (40-57% en peso seco) [38]. Se requiere modificar las condiciones de cultivo e imponer situaciones de estrés metabólico para favorecer la acumulación de carbohidratos en las algas.

Una de las principales ventajas del uso de microalgas frente a otras materias primas de origen lignocelulósico es la ausencia de lignina, facilitando el pretratamiento [42].

Las microalgas son una fuente de biomasa muy interesante, ya que pueden ser recolectadas de las aguas naturales y no requieren de tierra o agua limpia para su cultivo. La biomasa de las microalgas crece muy rápido y se puede cosechar durante todo el año. Las microalgas convierten la energía solar y el dióxido de carbono en polisacáridos de forma más eficiente que las plantas y son capaces de transformar compuestos inorgánicos en materiales orgánicos, lo que hace de las microalgas una fuente potencial para la producción de bioetanol de tercera y cuarta generación [35,43].

Las especies de microalgas que se han utilizado para producir bioetanol son *Chlorococcum* sp, *Chlamydomonas perinuglata*, *Chlorococcum infusioinum* [44-47], *Scenedesmus obliquus* [48], *Chlamydomonas reinhardtii* [49], *Chlorella vulgaris* [31], *Chlorella homosphaera* y *Chlorella zofingiensis* [50], *Spirulina* *Arthrospira platensis* [51], *Spirogyra* [52]. *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus almeriensis* y *Nannochloropsis gaditana* [53].

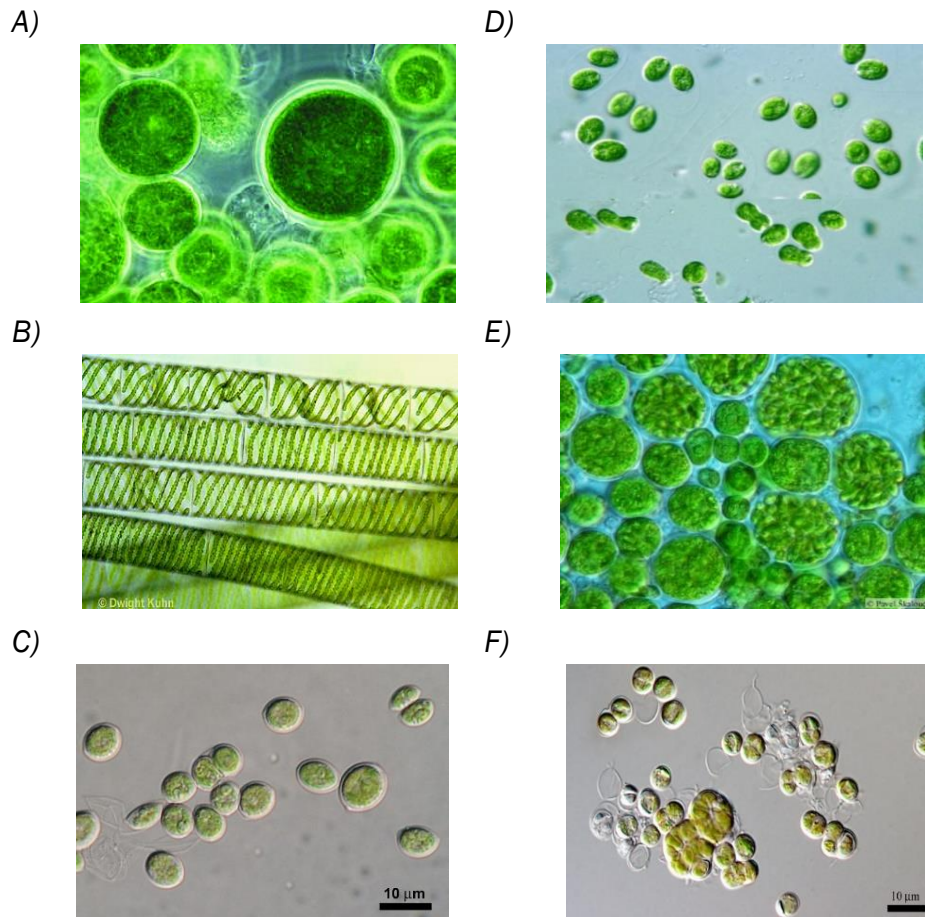


Figura 1.2: Microalgas al microscopio. A) *Chlorella vulgaris*, B) *Spirogyra*, C) *Scenedesmus almeriensis*, D) *Chlamydomonas reinhardtii*, E) *Chlorococcum infusioinum*, F) *Chlorella homosphaera*.



1.3.1. Estrategias de acumulación de carbohidratos

Cuando se utilizan microalgas como materia prima para la obtención de bioetanol es necesario cultivar biomasa rica en carbohidratos. Puesto que las microalgas producen principalmente proteínas (50-70% del peso seco) es necesario forzar a las microalgas a acumular carbohidratos mediante la modificación de las condiciones de cultivo. Varios estudios han demostrado que para acumular en las microalgas carbohidratos, se requieren condiciones de estrés de nutrientes. Las condiciones de estrés se pueden producir mediante la reducción de la cantidad de nutrientes que limitan el crecimiento de las algas (fosforo y nitrógeno). Este estrés de nutrientes hace que la célula del alga no sea capaz de dividirse, ya que no tiene los nutrientes necesarios y por lo tanto las algas empiezan a acumular **azúcares y lípidos** [54].

El fósforo se considera el nutriente más importante que limita el crecimiento de las algas [55]. En condiciones de estrés de nutrientes se han encontrado varias especies de microalgas que acumulan mayor cantidad de carbohidratos y a la vez menor cantidad de proteínas. Markou et al. [56,57] han demostrado que *Arthrospira (Spirulina) platensis* puede aumentar la concentración de carbohidratos bajo la inanición de fósforo. Según otras investigaciones, la limitación de nitrógeno aumenta la acumulación de azúcares en el microalga *Scenedesmus obliquus* [48]. Scholz et al. [49] ha informado de efectos similares en *Chlamydomonas reinhardtii*.

La intensidad de la luz también afecta a la composición de nutrientes de las algas. Según trabajos publicados, se produce un aumento de la concentración de carbohidratos en *Spirulina sp.* cuando hay exceso de luz y deficiencia de nitrógeno [58]. Ho et al. [19] publicaron que existe un aumento de la concentración de carbohidratos en el microalga *Scenedesmus obliquus* cuando se aumenta la intensidad de luz.

Cuando el microalga está en condiciones de estrés de nutrientes, el crecimiento de las algas es más lento y existe la posibilidad de que en lugar de acumular carbohidratos se puedan acumular lípidos [58].



1.3.2. Proceso de producción de bioetanol a partir de microalgas

En las microalgas, una parte considerable de los carbohidratos se encuentran formando parte de la pared celular [48], mientras que otra parte se encuentra en el interior celular en forma de gránulos de almidón dentro de vacuolas. Debido a que la pared celular de las microalgas es, en general, difícilmente hidrolizable por los microorganismos fermentadores, no es posible realizar una fermentación directa de la biomasa, sino que es necesario llevar a cabo un pretratamiento previo para romper las paredes celulares y sacarificar los carbohidratos [45].

Para poder acceder al interior celular y fermentar estos carbohidratos se emplean principalmente dos estrategias [59,60]:

- Hidrólisis de los carbohidratos y posterior fermentación (Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)).
- Fermentación directa de la biomasa añadiendo enzimas hidrolíticas (Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)).

A continuación se explica el fundamento de las etapas de hidrólisis de carbohidratos y fermentación.

Hidrólisis

Para la obtención de bioetanol interesa hidrolizar los polisacáridos. Los polisacáridos son biomoléculas formadas por la unión de monosacáridos que están unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. Se encuentran en la pared celular de las microalgas.



Los disacáridos pueden descomponerse mediante la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. Durante la hidrólisis de polisacáridos, tales como almidón y celulosa, se forman monosacáridos fermentables, como la glucosa.

La hidrólisis de microalgas se puede hacer con enzimas extraídas de organismos, ácidos y bases.

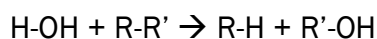
Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un proceso en el que un ácido prótico cataliza la escisión de un enlace químico a través de una reacción de sustitución nucleófila, con la adición de agua.

La hidrólisis ácida es fácil, barata y rápida. La desventaja es que la hidrólisis ácida crea sustancias no deseadas que pueden inhibir el proceso de fermentación tales como ácidos débiles (ácido acético) y, en menor concentración, productos derivados de la lignina [61].

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, según la siguiente reacción:



Las enzimas actúan de acuerdo con los mismos principios generales que los demás catalizadores: aumentan la velocidad de las reacciones químicas combinándose transitoriamente con los reactivos de manera que estos alcanzan un estado de transición con una energía de activación menor que el de la reacción no catalizada.



Según las biomoléculas que degradan, las hidrolasas se clasifican en: nucleasas, glucosidasas, lipasas, proteasas, fosfatasas, sulfatasas y fosfolipasa [62].

Como el etanol se produce a partir de glucosa, las enzimas que se utilizan son las glucosidasas. Las enzimas de sacarificación se utilizan para la producción de azúcares fermentables a partir de almidón [63].

La hidrólisis enzimática necesita más tiempo de reacción que la hidrólisis ácida, pero la falta de compuestos inhibidores ayuda a la levadura a fermentar la glucosa obtenida de manera más eficiente. En la hidrólisis enzimática las enzimas facilitan la escisión del enlace molecular mediante la adición de agua. El pretratamiento ácido es menos viable ambientalmente que la hidrólisis enzimática, porque se necesita una gran cantidad de productos químicos (ácidos) para llevar a cabo la hidrólisis.

Las principales enzimas que hidrolizan los polisacáridos de las microalgas son amilasas y celulasas. Las enzimas que se van a utilizar en este trabajo son amilasas (Liquozyme SC DS y Spirizyme Fuel), ambas donadas por Novozymes (Dinamarca).

Liquozyme SC DS (Novozymes)

Liquozyme SC DS es una enzima de tipo alfa-amilasa. Se utiliza para el proceso de licuefacción de las microalgas. Es altamente eficaz en la conversión del almidón proporcionando una alta producción de etanol. La dosis necesaria depende del tipo de proceso, las condiciones de reacción y la **composición del alga** [64].

Las características de este enzima son:

- Reducción de la viscosidad: Superior.
- Rango de pH: 5,0 – 6,0
- Rango de temperatura: 82 – 86°C
- Intervalo de dosificación (% en peso de enzima): 0.013 – 0.025.



Spirizyme Fuel (Novozymes)

Spirizyme Fuel es una enzima de tipo glucosamilasa que se utiliza en la industria para la producción de etanol. Esta enzima produce glucosa rápidamente con un alto rendimiento de etanol [65].

Los beneficios de la enzima Spirizyme Fuel en el proceso de sacarificación son:

- Amplio intervalo de operación de pH entre 3,5 y 5,5, para una mayor flexibilidad del proceso.
- Actividad constante y reproducible en el tiempo.
- Una generación rápida de glucosa, asegura una fermentación rápida y la producción de etanol.

Otros métodos de hidrólisis

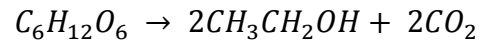
La hidrólisis alcalina es la manera menos efectiva de realizar la hidrólisis de microalgas. En la hidrólisis alcalina el nucleófilo reactivo es un ion hidróxido, como el NaOH. El pre-tratamiento alcalino produce grandes cambios en la estructura y la accesibilidad de los carbohidratos en la pared celular, que permite la liberación de azúcar en el medio acuoso. Algunos estudios también informan acerca de otros métodos de pretratamiento físico para romper las paredes celulares y liberar los azúcares. Tales métodos son, ultrasonidos, bead beating, calor, homogeneización de alta presión y microondas [53,66].

Fermentación

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere oxígeno, y el producto final es un compuesto orgánico. La fermentación típica es llevada a cabo por levaduras, aunque también algunos metazoos y protistas son capaces de realizarla.

La fermentación alcohólica es un proceso en el que los azúcares se transforman en alcohol por la acción de levadura o bacterias.

A continuación, se muestra la reacción de la fermentación a partir de glucosa:

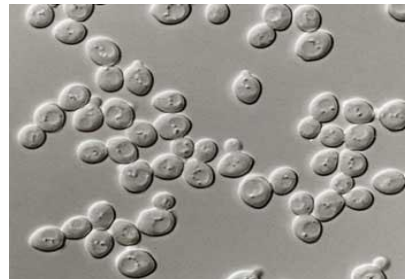


Las levaduras son organismos unicelulares que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras. Son lo que se denominan organismos anaerobios facultativos, es decir, pueden desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno. Existen diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentran principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulaspota* y *Zymomonas mobilis* [67].

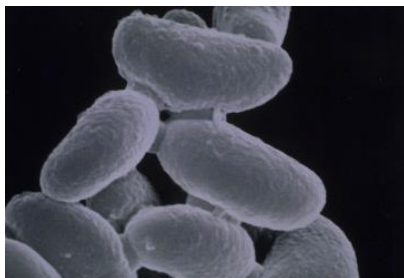
A)



C)



B)



D)



Figura 1.3: Levaduras al microscopio. A) *Saccharomyces cerevisiae*, B) *Kluyveromyces fragilis*, C) *Torulaspota*, D) *Zymomonas mobilis*.

En la bibliografía se han encontrado diferentes referencias a la producción de bioetanol a partir de microalgas, algunas de las cuales se reseñan a continuación.



Según trabajos publicados por Harun y Danquah [46], el rendimiento de recuperación de glucosa a partir de *Chlorococcum sp.* fue del 64,2% mediante hidrólisis enzimática con celulasas obtenidas a partir del hongo *Trichoderma reesei*. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: 40°C, pH 4,8 y la carga de biomasa de alga de 10 g/L.

Choi et al. [68] realizaron fermentaciones con la levadura *S. cerevisiae* después de hidrolizar el microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Se obtuvo 235 mg de etanol fermentado a partir de 1,0 g de biomasa de algas pretratada por las enzimas α -amilasa procedentes de *B. licheniformis* y amilo glucosidasa a partir de *Aspergillus niger*. El rendimiento de la glucosa obtenida a partir del pretratamiento enzimático fue del 23,5%.

Ho et al. [31] hidrolizó *Chlorella vulgaris* con endogluconasas, β -glucosidasa y amilasas. Se obtuvo un rendimiento de glucosa del 90% después de tres días de hidrólisis. La hidrólisis con ácido sulfúrico condujo a un rendimiento de glucosa del 100% cuando la concentración de ácido fue del 2%. Con una concentración de ácido del 1% el rendimiento fue del 96%. La fermentación con *Z.mobilis* obtuvo una concentración de 4,27 g/L de etanol.

Markou et al. [51] llevaron a cabo hidrólisis de *Spirulina (Arthrospira) platensis* con cuatro ácidos diferentes: H₂SO₄, HNO₃, HCl y H₃PO₄ a temperaturas entre 40-100°C. El mayor rendimiento de azúcares reductores se obtuvo con 2.5N HNO₃ durante 90 min a 80°C. Los rendimientos de etanol más altos ($\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{biomas}}}$) se obtuvieron a partir de hidrolizados correspondientes al tratamiento con H₂SO₄ (16,27%) y HNO₃, (16,32%) ambos ácidos con 0,5 N de concentración. La levadura *S. cerevisiae* se adaptó a la salinidad del medio antes de la fermentación.

Scholz et al. [49] usaron ácido sulfúrico para hidrolizar *Chlamydomonas reinhardtii*, de forma que el 64% del almidón fue hidrolizado a glucosa. La fermentación se realizó con la levadura *S. cerevisiae*. El coeficiente de rendimiento observado de la glucosa a etanol fue de 0,44 (g/g).



Miranda et al. [48] realizaron hidrólisis de *Schemedesmus obliquus* con ácido sulfúrico (2N) para producir azúcares obteniendo una recuperación de azúcares del 95,6%.

El pretratamiento alcalino se llevó a cabo por primera vez por Harun y Danquah [46] con el alga *Chorococcum infusionum*. El rendimiento de glucosa obtenido fue 350,13 mg/g. Las condiciones de operación fueron: 0,75% w/v de NaOH a 120 °C y 30 minutos.

Harun et al. [45] fermentaron hidrolizados del microalga *Chlorococum* sp. obtenidos mediante la extracción supercrítica de los lípidos. La levadura utilizada en la fermentación fue *Saccharomyces bayanus*. Se alcanzó una concentración máxima de etanol de 3,83 g/L.

En experimentos de hidrólisis ácida de *Chorococcum infusionum* realizada por Harun y Danquah [47], la concentración más alta de bioetanol fue 7,20 g/L correspondiente al pretratamiento con 15 g/L de microalgas, a 140 °C y 1% (v/v) de ácido sulfúrico durante 25 min.

1.3.3. Bioetanol a partir de *Spirulina* sp.

Spirulina sp. es una cianobacteria comúnmente considerada como una microalga por su estructura filamentosa. Pertenece al grupo de las cianobacterias no heterocísticas del género de las Oscillatoriaceae. Se considera como un tricoma helicoidal de forma cilíndrica e inmóvil, cuya reproducción se realiza por ruptura intracelular. Su talla oscila entre 13 y 25 micras.

La asimilación del CO₂ se hace a través del ciclo de Calvin, con formación de glucógeno como material de reserva. *Spirulina* es capaz de realizar la fotosíntesis oxigénica y de fijar el nitrógeno del medio. Puede crecer en medios minerales que tengan CO₂ como fuente de carbono y desechos nitrogenados (urea) como fuente de nitrógeno [69].



El cultivo de *Spirulina* se realiza comercialmente en estanques que pueden ser a cielo abierto o con cubiertas tipo invernadero. El cultivo en estanques abiertos se caracteriza por la baja producción por unidad de área y la no uniformidad de la calidad del producto. Una mejora considerable es la colocación de cubiertas, ya que se cultiva en un ambiente controlado, protegido de la polución y con posibilidad de acondicionamiento térmico. El cultivo en fotobiorreactores se reduce a casos muy puntuales ya que tiene unos costes excesivos [70].

Cuando se quiere su cultivo a escala industrial, es necesario controlar las siguientes variables:

- *Temperatura*: El crecimiento de *Spirulina* se produce entre 25-40°C, siendo el rango de mayor producción entre 35-40°C.
- *Alcalinidad del medio*: los mejores resultados se obtienen con valores de pH entre 9-11.
- *Radiación*: la mayor producción se da entre 30-50 klux.
- *Salinidad*: entre 1500-5250 g/m³ en un estanque con 15 cm de profundidad.
- *Agitación*: se recomienda una velocidad de 30 cm/s.

En los últimos años la producción de *Spirulina sp.* como suplemento alimenticio ha ido en aumento. Cada vez es más la industrialización de esta especie por su fácil producción, rápido crecimiento y se puede producir en cualquier parte del mundo por su adaptación a condiciones climatológicas extremas. Es por eso que puede ser utilizada para producir bioetanol, sin competir con los cultivos destinados para consumo humano, presentando una gran ventaja en comparación con las biomásas tradicionales para la obtención de biocombustibles. *Spirulina sp.* presenta en su composición química una concentración cercana al 20% de azúcares, entre los que se encuentran azúcares fermentables que hacen de ésta un candidato potencial para la producción de biocombustibles [71,72].

Para aumentar significativamente la acumulación de carbohidratos de *Spirulina sp.* se cultiva en medios con limitación de fósforo, llegando a alcanzar un 60-65% de carbohidratos en la biomasa seca. Además, la biomasa de *Spirulina* cultivada en limitación de nutrientes muestra una capacidad de biofloculación rápida, característica que facilita la recolección de la biomasa [56].

Para obtener bioetanol a partir de *Spirulina sp.*, primero la biomasa debe ser pretratada, de manera que los carbohidratos pasan a ser azúcares fermentables. Un posible método de pretatamiento es la hidrólisis térmica-ácida. La concentración de ácido y la concentración de sal resultante de los hidrolizados pueden afectar a la producción de bioetanol [51].

Markou et al. [51] realizaron hidrólisis de *Spirulina sp.* con H_2SO_4 y HNO_3 , ambos ácidos con 0,5 N de concentración. La fermentación se realizó con la levadura *S. cerevisiae* previamente adaptada a medios salinos, llegando a obtener un rendimiento de bioetanol del $16 \text{ g}_{\text{etanol}}/100 \text{ g}_{\text{biomasa}}$.

Según estudios realizados, a medida que se aumenta la concentración celular de la levadura *S. cerevisiae* se incrementa la producción de bioetanol. Se ha investigado la fermentación de *Spirulina sp.* pretratada con HCl 2M. La fermentación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 30°C, concentración celular de $1 \cdot 10^{10}$ cel/mL y 60 g/L de azúcares provenientes de la biomasa. El mayor rendimiento de producción de bioetanol que se obtuvo fue 0,51 g etanol/g glucosa [73].



Figura 1.4: *Spirulina maxima* al microscopio.



2. Objetivos



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



El objetivo global del presente Trabajo Fin de Grado es estudiar la producción de bioetanol a partir de microalgas, en concreto a partir de *Spirulina maxima*. Para ello se plantea una primera etapa de estudio experimental, con el objetivo de obtener información sobre el cultivo del microalga, rendimientos, conversiones y parámetros óptimos de operación. En una segunda fase del trabajo, se abordará el análisis del proceso de hidrólisis y fermentación a bioetanol determinando las necesidades materiales y energéticas.

Los objetivos específicos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Estudiar la influencia de la concentración de nutrientes (fósforo y nitrógeno) en el medio de cultivo, en la concentración de biomasa y la composición de *Spirulina maxima*.
- Comparar diferentes métodos de hidrólisis (hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática) y condiciones de operación (concentración de ácido, tiempo de reacción) para optimizar el proceso de liberación de azúcares fermentables a partir de *Spirulina maxima*.
- Comprobar si los azúcares fermentables extraídos de *Spirulina maxima* pueden transformarse en bioetanol a partir de la fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con buenos rendimientos.
- Determinar las necesidades energéticas y de consumo de materias primas del proceso de producción de bioetanol a partir de *Spirulina maxima*, utilizando hidrólisis ácida y enzimática como procesos de sacarificación y posterior fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



3. Bases de diseño: ensayos a escala laboratorio de cultivo, hidrólisis y fermentación de Spirulina maxima



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



A continuación, se presentan los resultados de los experimentos realizados y que servirán de base para el desarrollo de este trabajo. Se explica con detenimiento los materiales y métodos utilizados para el crecimiento de *Spirulina maxima*, recogida del microalga y conservación. También se detalla los materiales y métodos utilizados para la recuperación de carbohidratos fermentables mediante hidrólisis (ácida y enzimática) y posterior fermentación a etanol con *Saccharomyces cerevisiae*.

Este trabajo experimental se realizó en el transcurso de las prácticas en empresa en el Centro de Tecnología Azucarera de la Universidad de Valladolid.

3.1. *Materiales y métodos*

3.1.1. *Mantenimiento del alga*

El microalga utilizado en el estudio es *Spirulina maxima* (SAG 49.88) procedente de la Universidad de Gottingen, Alemania. Este microalga se mantuvo a una temperatura de 28-30°C en medio de cultivo Schlösser, con una intensidad de luz de 40-50 $\mu\text{mol fotones}/(\text{m}^2\text{s})$ durante 16 horas/día (8 h de periodo de oscuridad). Esta intensidad de luz se proporciona con lámparas fluorescentes de luz fría de la casa comercial Osram modelo L 18W/865 Lumilux.

La composición del medio Schlösser es 13,60 g/L NaHCO_3 ; 4,03 g/L Na_2CO_3 ; 0,50 g/L K_2HPO_4 ; 2,50 g/L NaNO_3 ; 1,00 g/L K_2SO_4 ; 1,00 g/L NaCl ; 0,20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con los siguientes micronutrientes 6 mL de disolución de metal (PIV) y 1 mL de solución de micronutrientes CHU. La solución PIV se compone de 97 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 41 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5 mg ZnCl_2 ; 2 mg $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 4 mg $\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La solución CHU consiste en 50 mg Na_2EDTA ; 618 mg H_3BO_3 ; 19,6 mg de



$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 44,0 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20,0 mg $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 12,6 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 12,6 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

El pH del medio de cultivo es 9,3. El microalga se mantiene en erlenmeyers de 250 mL cubiertos con tapones de algodón que permiten el intercambio de gases. Estos matraces tienen que estar agitados continuamente. El agitador (P Selecta Vibromatic) se ajusta a 75 rpm aproximadamente. Los cultivos de *S. maxima* se iluminan con lámparas fluorescentes de luz fría. Los cultivos se preparan cada 20 días a partir de medio Schlösser fresco y un 10% v/v de inóculo de *Spirulina*.

3.1.2. Operación en fotobiorreactores

Preparación de inóculo

Los reactores se tienen que inocular con *Spirulina maxima*. El volumen del inóculo tiene que ser el 10% del volumen total del reactor. Antes del arranque del reactor, los inóculos se adaptan progresivamente a una baja concentración de nutrientes mediante el mantenimiento del inóculo en un medio Schlösser deficitario en fósforo y nitrógeno, con una concentración de 0,05 g/L de K_2HPO_4 (10 mg/L de P) y 1,5 g/L de NaNO_3 (247 mg/L de N), que corresponde al 10% de la concentración de fósforo y el 60% de la concentración de nitrógeno del medio Schlösser. Este inóculo se prepara 7 días antes de la puesta en marcha de los reactores. Los inóculos se iluminan con lámparas fluorescentes de luz fría con una intensidad de 50 μmol fotones/(m^2s) durante 16 horas/día y se agitan a 75 rpm. La temperatura fue de 28-30°C. El matraz que contiene *S. maxima* se cubre con un tapón de algodón que permite el intercambio de gases.

Se han utilizado dos tipos de fotobiorreactores: fotobiorreactores de tanque agitado y columnas de burbujeo.



Operación en fotobiorreactor de tanque agitado

Para estudiar la influencia de la concentración de fósforo inicial se cultivó *S. maxima* en un fotobiorreactor de vidrio agitado mecánicamente con un volumen de trabajo de 2 L. Este fotobiorreactor tiene un diámetro interno de 12 cm y 17 cm de altura. La intensidad de luz con la que se ilumina es 40–50 μmol fotones/(m^2s) durante 16 horas/día que proporcionan lámparas fluorescentes de luz fría colocadas alrededor del fotobiorreactor, procedentes de la casa comercial OSRAM modelo L 36W/765 Lumilux.

Se estudió el efecto de la concentración inicial de fósforo en el crecimiento de biomasa y composición en carbohidratos, mediante el ajuste de la concentración de K_2HPO_4 del medio Schlösser. Se analizaron tres concentraciones de fósforo iniciales diferentes:

- **Ensayo A:** 0,05 g/L K_2HPO_4 (10 mg P/L), que corresponde al 10% de la concentración de fósforo del medio Schlösser.
- **Ensayo B:** 0,025 g/L K_2HPO_4 (5 mg P/L), que corresponde al 5% de la concentración de fósforo del medio Schlösser.
- **Ensayo C:** 0,01 g/L K_2HPO_4 (2 mg P/L), que corresponde al 2% de la concentración de fósforo del medio Schlösser.

El tiempo de cultivo fue de 14 días. Todos los experimentos y análisis se realizaron por duplicado.



Figura 3.1: Fotobiorreactor de tanque agitado.

Operación en columnas de burbujeo

Para el cultivo a mayor escala del microalga se utilizan cuatro fotobiorreactores de burbujeo transparentes de metacrilato, que están cerrados para evitar la contaminación exterior pero tienen conexiones para la entrada de gas de burbujeo, salida de gases y toma de muestra. El volumen de trabajo de cada fotobiorreactor es de 5 L. Los fotobiorreactores tienen un diámetro interno de 10 cm y una altura de 70 cm. La intensidad media con la que se iluminan son $48 \mu\text{mol foton}/(\text{m}^2\text{s})$ durante 16 horas/día que proporcionan lámparas fluorescentes de luz fría (OSRAM L 36W/765 Lumilux), situadas a ambos lados de los fotobiorreactores. Los cultivos se airean y agitan mediante aire filtrado que proporcionan bombas de aire.

Los fotobiorreactores operan en discontinuo, con diferentes composiciones del medio de cultivo para tener información de su influencia en el crecimiento de la biomasa. Se realizaron dos ensayos modificando la composición del medio:

- **Ensayo con medio A**, que contiene medio Schlösser modificado, con una concentración de fósforo de 0,01 g/L de K_2HPO_4 (2 mg/L de P) y 2,50 g/L de $NaNO_3$ (400 mg/L de N), que corresponde al 2% de la concentración de fósforo y el 100% de la concentración de nitrógeno en el medio Schlösser, con micronutrientes, todo ello disuelto en agua del grifo.
- **Ensayo con medio B**, que contiene medio Schlösser modificado, con una concentración de fósforo de 0,01 g/L de K_2HPO_4 (2 mg/L de P) y 1,25 g/L de $NaNO_3$ (200 mg/L de N), que corresponde al 2% de la concentración de fósforo y el 50% de la concentración de nitrógeno en el medio Schlösser, con micronutrientes, todo ello disuelto en agua del grifo.

Se toman muestras cada 2 días para medir el pH, la concentración de biomasa y el contenido de carbohidratos.



Figura 3.2: Fotobiorreactor en discontinuo.



3.1.3. *Recogida del alga y conservación.*

Los ensayos en los fotobiorreactores operan en ciclos de 9-12 días para conseguir que la concentración de microalgas en el medio de cultivo sea máxima. Cuando se acaban los ciclos, la biomasa producida se separa del medio mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 4 minutos a 4°C con la centrifugadora Thermo Scientific SORVALL LEGEND RT+. Una vez centrifugada la biomasa se seca en estufa a 60°C.

Después la biomasa seca obtenida se congela a -18°C y se tamiza para recoger la fracción < 500 µm antes de su uso en los ensayos posteriores de hidrólisis y fermentación.

3.1.4. *Hidrólisis y fermentación*

Los ensayos de hidrólisis y fermentación se han realizado con la biomasa cultivada en déficit de nutrientes. Se ha comparado la eficacia de la hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática como procesos para liberar azúcares fermentables para su posterior fermentación a etanol con *S. cerevisiae*.

Los ensayos realizados combinaron:

- Hidrólisis ácida + fermentación.
- Hidrólisis térmica + hidrólisis enzimática + fermentación.

Experimentos de hidrólisis ácida

Los experimentos se llevan a cabo con un 3% en peso (w/w) de biomasa seca. Los experimentos se realizaron mediante el uso de ácido sulfúrico a diferentes concentraciones, que fueron 0,5%, 1%, 2% en volumen (v/v) a 121°C. Para cada concentración de ácido sulfúrico, los experimentos se efectúan durante 15, 30 y 45 min en autoclave.



Todos los experimentos se realizan por duplicado. Después de la hidrólisis ácida se toman muestras para analizar la glucosa liberada, así como otros compuestos que pueden aparecer durante el proceso tales como ácidos orgánicos.

Una vez realizado estos experimentos, se escogieron las condiciones que ofrecen mayor rendimiento de liberación de azúcares, y se plantearon ensayos con diferente porcentaje en peso de biomasa seca (%w/w) para tener información sobre la influencia del porcentaje de biomasa en la liberación de azúcares y posterior fermentación a etanol.

Experimentos de hidrólisis térmica e hidrólisis enzimática

Los experimentos se llevan a cabo con un 3% en peso (w/w) de biomasa seca suspendida en agua. Antes de la hidrólisis enzimática, se realiza una hidrólisis térmica preliminar a 121°C a diferentes tiempos, 0, 15, 30 y 45 minutos, para favorecer la acción de las enzimas. El ensayo con 0 min de hidrólisis térmica corresponde a un control para determinar la eficacia del proceso sin pretratamiento térmico previo.

Las enzimas utilizadas fueron Liquozyme SC DS y Spirizyme Fuel, donadas por Novozymes (Dinamarca). Después de la hidrólisis térmica, el pH de la mezcla fue 6,8, por lo que es necesario ajustar el pH hasta 5,5. Para ajustar el pH se utiliza ácido sulfúrico al 1% v/v. La primera enzima que se utiliza fue Liquozyme SC DS. La hidrólisis se realiza añadiendo 0,01 g/g_{MS} de la enzima y manteniendo la temperatura a 80°C durante 2h. Después de enfriar la solución, se añade 0,01 g/g_{MS} de Spirizyme Fuel. Los matraces se colocan en un incubador orbital a 50°C, con una agitación de 175 rpm durante 24h.

Todos los experimentos se realizan por triplicado. Después de la hidrólisis enzimática se toman muestras para analizar la glucosa producida, así como otros compuestos que pueden aparecer durante el proceso actuando como inhibidores en la fermentación.



Fermentación

El proceso de fermentación se realiza en las mismas condiciones para todos los ensayos realizados (hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática). Al comienzo de la fermentación y después de la fermentación se toman muestras para analizar la concentración de glucosa, etanol y otros productos de fermentación.

La levadura utilizada para la fermentación fue *Saccharomyces cerevisiae*, levadura comercial concentrada. La fermentación se lleva a cabo a pH 4.

En primer lugar se prepara el inóculo de levadura. El medio de crecimiento de la levadura contiene 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona de soja y 10 g/L de glucosa. Se preparan dos matraces con 150 mL del medio de crecimiento para preparar los inóculos. El matraz se cubre con un tapón de algodón y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. El caldo se enfría y se inocula en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles con la levadura comercial. La levadura se coloca en un incubador orbital a una temperatura de 30°C, con una agitación de 175 rpm durante 24h.

Después de las hidrólisis, los matraces que contienen el hidrolizado se enfrían y se mide el pH. Los experimentos de hidrólisis ácida tienen un pH cercano a 1, por lo que es necesario ajustarlo hasta pH 4. Para ello se utiliza una solución de NaOH 6M. Los experimentos de hidrólisis enzimática tienen un pH final alrededor de 4 por lo que no hace falta ajustar el pH. Una vez ajustado el pH a 4, todos los matraces se inoculan con la levadura en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles. El volumen de inóculo que se añade es 1 mL/30 mL totales (3% del volumen total). Los matraces se tapan con un tapón de goma que tiene una aguja para liberar los gases que se producen durante la fermentación. La fermentación se realiza en un incubador orbital a 30°C, con una agitación de 175 rpm durante 24 horas.



3.1.5. Métodos analíticos

3.1.5.1. Concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determina mediante el peso de la biomasa seca. Las muestras de 10 mL se filtran a través de filtros de fibra de vidrio de 0,45 μm y se lavan con 100 mL de agua Milli-Q para eliminar las sales que contiene la biomasa. El filtro se seca en estufa a 100°C hasta pesada constante.

3.1.5.2. Concentración de carbohidratos

La concentración de carbohidratos en la biomasa se analiza por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento). Antes del análisis, las muestras de microalgas fueron pretratadas mediante hidrólisis térmica y ácida. Se pesa 0,1 g de biomasa seca en un erlenmeyer de 50 mL de volumen. Se añade 1 mL de ácido sulfúrico con una concentración del 72%. Los matraces se cubren con papel de aluminio y se mantienen en un incubador orbital a 30°C durante 30 min. Pasados los 30 minutos, se añaden 28 mL de agua Milli-Q y se vuelven a tapar con papel de aluminio. Los erlenmeyer se introducen en autoclave a 121° durante 59 min. Las muestras se filtran con filtros de nylon 0,2 μm y se analizan por HPLC como se indica más adelante.

3.1.5.3. Concentración de proteínas

El contenido en proteínas de *Spirulina maxima* se analiza de acuerdo al método de Kjeldahl con un factor de conversión de 5,95 [75]. Se pesa 0,1 g de biomasa seca y se añaden 25 mL de agua Milli-Q. Se introducen el catalizador y 6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se someten a digestión durante 60 minutos a 370°C.



Se utiliza el destilador automático KjeFlex K-360 para añadir NaOH y H₂O y recoger el destilado sobre disolución de concentración conocida de ácido bórico. Después de la destilación las muestras se valoran con H₂SO₄. Se añade ácido sulfúrico hasta que el color cambia de verde a púrpura. La cantidad de ácido sulfúrico consumido sirve para determinar la concentración de proteínas.

3.1.5.4. Intensidad de luz

La intensidad de luz de cada fotobiorreactor se mide mediante un medidor de luz (LI-COR LI-250A). Las mediciones se llevan a cabo en diferentes puntos del fotobiorreactor para obtener un valor medio de intensidad de iluminación.

3.1.5.5. pH

Los valores de pH en los fotobiorreactores se miden regularmente. También se miden los valores de pH entre las diferentes etapas de los experimentos durante la hidrólisis y la fermentación. El pHmetro fue calibrado antes de las mediciones. El medidor de pH utilizado fue de la marca Crison pH-metro basic 20+.

3.1.5.6. Separación de la biomasa de microalgas

La biomasa se separa mediante centrifugación con la centrífuga Thermo Scientific SORVALL LEYENDA RT+. Los parámetros de centrifugación fueron: 4°C durante 4 min a 10000 rpm.



3.1.5.7. Análisis de HPLC de las muestras de hidrólisis y fermentación

Durante los experimentos realizados, se toman muestras (1,5 mL) entre las diferentes etapas de hidrólisis y fermentación para analizar azúcares, etanol y otros compuestos que pueden aparecer durante el proceso. Las muestras se toman después de la hidrólisis, después de la inoculación con la levadura y después de la fermentación. Se preparan patrones para realizar una curva de calibración, y tanto los patrones como las muestras se analizan mediante HPLC.

Los patrones de la curva de calibración se preparan a partir de diluciones de una solución madre. La solución madre se prepara a partir de los siguientes reactivos: 0,6 g de glucosa, 0,6 g de etanol, 0,6 g de metanol, 0,6 g etanol, 0,6 g glicerol, 0,6 g ácido láctico y 0,6 g de ácido acético en 100 mL totales de disolución. Las concentraciones de las diluciones fueron 6 g/L, 3 g/L, 1,2 g/L, 0,6 g/L, 0,3 g/L.

Las muestras se filtran con un filtro de nylon de 0,2 μm . Debido al alcance del HPLC, las muestras tomadas antes de la fermentación se tienen que diluir en proporción 1/3. La columna que se utiliza es Aminex HPX-87 H de Biorad, con un detector basado en la medición del índice de refracción (Waters 2414). Las condiciones de HPLC fueron: flujo 0,6 mL/min, temperatura de columna 60°C y volumen de inyección 20 μL .

3.2. Resultados experimentales

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados en cuanto a crecimiento del microalga y ensayos de hidrólisis y fermentación.



3.2.1. Influencia de la concentración inicial de fósforo en la concentración de biomasa y la composición de *Spirulina maxima*

En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración inicial de fósforo en el medio en la composición del microalga en cuanto a contenido en carbohidratos.

Esta concentración inicial de fósforo en el medio Schlösser se fijó en 10 mg/L, 5 mg/L y 2 mg/L.

La **Tabla 3.1** recoge los resultados obtenidos de concentración de biomasa y composición de carbohidratos, después de 14 días de cultivo de *Spirulina* en medio Schlösser con la concentración de fósforo inicial indicada.

	10 mg P/L	5 mg P/L	2 mg P/L
Concentración de biomasa (g/L)	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Carbohidratos (%w/w)	49 ± 5	51 ± 4	62 ± 1
Productividad de carbohidratos (mg/(L·d))	63	73	76

Tabla 3.1: Resultados obtenidos en cada uno de los medios deficitarios en fósforo, después de 14 días de cultivo.

A la vista de los resultados, no se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones de biomasa cultivada en cada medio. La concentración de *Spirulina maxima* en el medio que contiene 2 mg/L de fósforo fue ligeramente inferior (1,7 ± 0,2 g/L). Estos resultados fueron los que se esperaban, ya que según estudios realizados por Dragone et al. [22] el crecimiento de la biomasa es menor en condiciones de estrés de nutrientes.

La mayor concentración de biomasa se obtuvo en el medio modificado de forma que la concentración fuera 5 mg/L de fósforo. Esta concentración fue 2 ± 0,3 g/L.

La **Figura 3.3** compara la composición de *Spirulina* cultivada en cada uno de los medios deficitarios en fósforo, después de 14 días de cultivo.

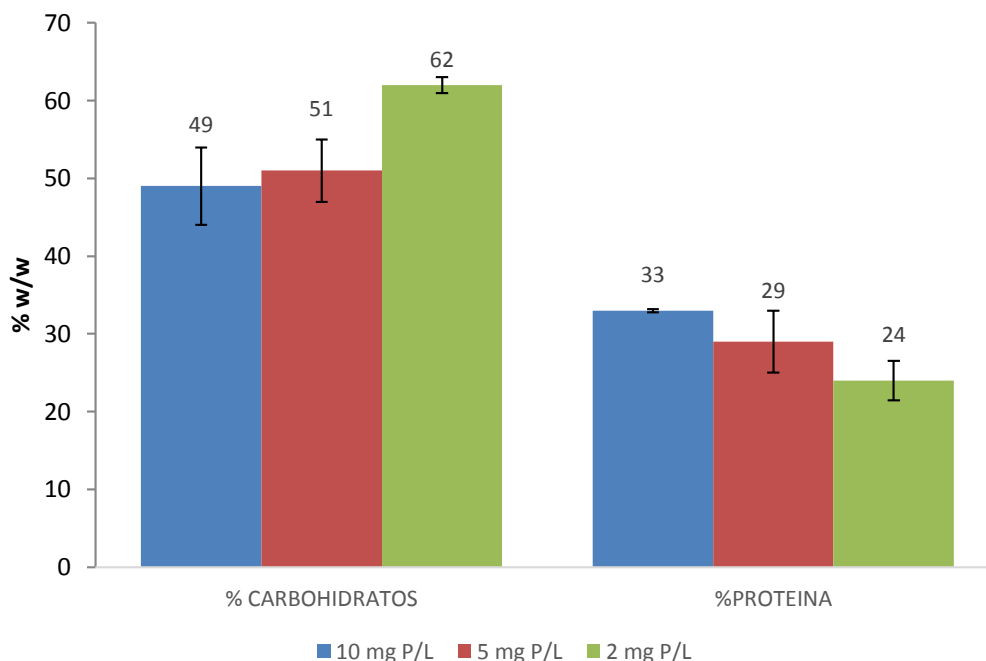


Figura 3.3: Composición de *S. maxima* en cada medio deficitario en fósforo, expresado en %w/w de biomasa seca.

La *Spirulina* cultivada en el medio más deficitario en fósforo (2 mg/L) acumuló la mayor concentración de azúcares. La concentración de carbohidratos acumulados después de 14 de cultivo en el medio con 2 mg/L de fósforo fue $62 \pm 1\%$, en el medio con 5 mg/L de fósforo se obtuvo una concentración de $51 \pm 4\%$ y en el medio con 10 mg/L de fósforo la concentración de azúcares fue $49 \pm 5\%$. Paralelamente, el contenido en proteína disminuye al disminuir la concentración inicial de fósforo en el medio.

Los valores de pH aumentaron desde 9,08 hasta 11,26. El pH aumenta a medida que aumenta la concentración de biomasa. No hubo diferencia estadística en los valores de pH de los diferentes medios de cultivo.

El medio Schlösser modificado de forma que contuviera una concentración inicial de 2 mg/L de fósforo fue elegido para cultivar *S. maxima* en los fotobiorreactores de burbujeo, ya que fue el experimento que conduce a una mayor concentración de carbohidratos en la biomasa. El 97% de esos carbohidratos están en forma de glucosa, monosacárido fácilmente fermentable.

3.2.2. *Influencia de la concentración de nitrógeno en los medios de cultivo de Spirulina maxima y composición de la biomasa.*

En este trabajo también se estudió cómo afecta a la concentración de *Spirulina maxima* la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. La concentración de nitrógeno se redujo al 50% en el medio B. La modificación se realizó por la disminución de la concentración de NaNO_3 de 2,5 g/L hasta 1,25 g/L.

La **Figura 3.4** representa la concentración de *S. maxima* cultivada en el medio A (2 mg P/L, 400 mg N/L) y el medio B (2 mg P/L, 200 mg N/L).

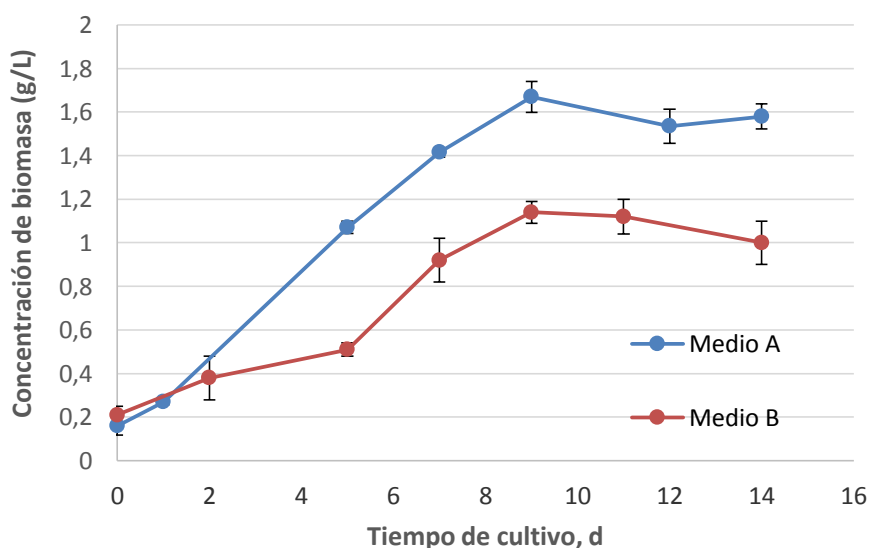


Figura 3.4: Concentración de *S. maxima* en los fotobiorreactores.

Según estudios realizados por Dragone et al. [22], la concentración de biomasa de microalgas disminuye cuando el medio tiene deficiencia de nitrógeno. En estos ensayos se observa un comportamiento similar. Las concentraciones más altas de *S. maxima* se obtienen el noveno día de cultivo. Estas concentraciones fueron menores en el medio B. La concentración máxima de biomasa en el medio B fue $1,14 \pm 0,1$ g/L, mientras que la concentración máxima de biomasa en el medio A fue $1,6 \pm 0,1$ g/L.

La **Figura 3.5** representa la composición de *Spirulina maxima* después de 9 días de cultivo en el medio A y en el medio B.

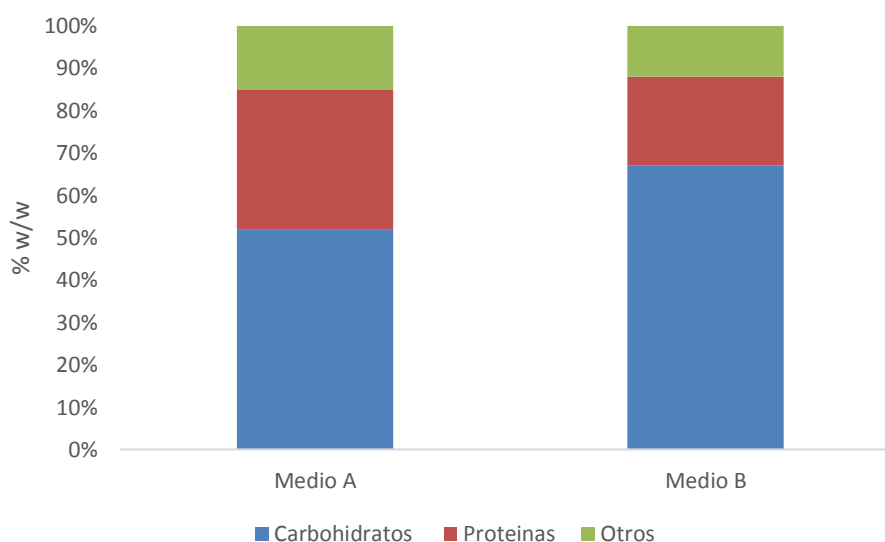


Figura 3.5: Composición de *Spirulina maxima*.

La concentración de carbohidratos de *S. maxima* cultivada en el medio con déficit de nitrógeno es mayor. El porcentaje de carbohidratos fue $67 \pm 3\%$, fundamentalmente debido a la presencia de polímeros de glucosa, con una productividad, correspondiente a 9 días de cultivo, de 85 mg carbohidratos/(L·d). La productividad en el medio A fue 108 mg carbohidratos/(L·d). La disminución de nitrógeno en los medios de cultivo aumentó la concentración de carbohidratos, pero disminuyó la concentración de biomasa, por lo que la productividad también disminuye.

Los valores de pH durante el cultivo del microalga varían desde 9,34 hasta 10,89 en el medio A y de 9,45 hasta 11,06 en el medio B.

Ho et al. [31] estudiaron el deficit de nitrógeno en la acumulación de carbohidratos en el microalga *Chlorella vulgaris* alcanzando el valor más alto de carbohidratos (54,4%) el tercer día de cultivo.

3.2.3. Hidrólisis ácida

La *Spirulina maxima* utilizada en los experimentos de hidrólisis y fermentación se cultivó en medio Schlösser modificado para tener 2 mg/L de fósforo y 400 mg/L de nitrógeno.

La **Figura 3.6** muestra la composición media de *S. maxima* utilizada en los experimentos.

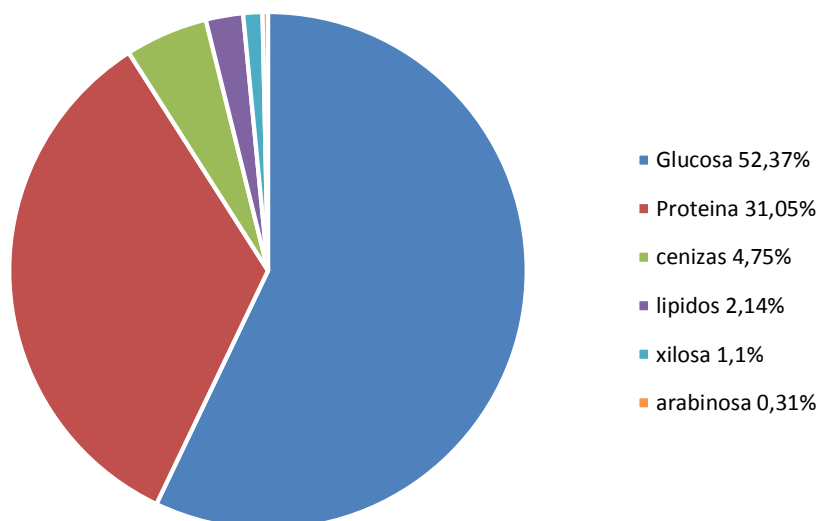


Figura 3.6: Composición de *S. maxima* utilizada en los experimentos de hidrólisis y fermentación.



Como se ha indicado antes, la glucosa es el monosacárido mayoritario en los hidrolizados de caracterización, representado el 97% de los carbohidratos totales en *S. maxima*. La levadura *S. Cerevisiae* es capaz de fermentar la glucosa a etanol. La concentración de glucosa potencial en *Spirulina* fue 52,37%.

Al concluir la hidrólisis ácida o enzimática, sabiendo la concentración de glucosa que se ha liberado al medio, se puede calcular el porcentaje de recuperación de glucosa (RG). La recuperación de glucosa se define como la cantidad de glucosa liberada entre la glucosa potencial acumulada en el alga y determinada en la caracterización (0,52 g glucosa/g MS)

$$\%RG = \frac{(g \text{ glucosa liberada})/L}{(g \text{ microalga})/L * \frac{\text{glucosa potencial alga}}{g \text{ alga}}} * 100$$

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante las hidrólisis ácidas a diferentes tiempos y concentraciones de ácido. Todos estos experimentos son para un 3% w/w de biomasa seca.

	% H2SO4 (v/v)	0,5		
	Tiempo (min)	15	30	45
	% w/w	3	3	3
Final hidrólisis ácida	Glucosa (g/L)	4,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2	9,5 ± 0,5
	% RG	26 ± 9	31 ± 3	57 ± 2
	Ac. Acético (g/L)	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Final fermentación	Glucosa (g/L)	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,005
	Glicerol (g/L)	0,04 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,0
	Metanol (g/L)	0,2 ± 0,06	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,01
	Etanol (g/L)	2,4 ± 0,04	3,1 ± 1,3	5,0 ± 0,1
g etanol/ kg alga		80	103	167

Tabla 3.2: Resultados de la hidrólisis ácida 0.5 % v/v y 3% w/w.



	% H ₂ SO ₄ (v/v)	1		
	Tiempo (min)	15	30	45
	% w/w	3	3	3
Final hidrólisis ácida	Glucosa (g/L)	12,6 ± 2,	12,4 ± 1,5	19 ± 0,7
	% RG	62 ± 1	76 ± 12	100 ± 0,1
	Ac. Acético (g/L)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Final fermentación	Glucosa (g/L)	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0
	Glicerol (g/L)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,05
	Metanol (g/L)	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	Etanol (g/L)	4,3 ± 0,7	5,1 ± 0,2	7,2 ± 0,3
g etanol/ kg alga		143	170	240

Tabla 3.3: Resultados de la hidrólisis ácida 1 % v/v y 3% w/w.

	% H ₂ SO ₄ (v/v)	2		
	Tiempo (min)	15	30	45
	% w/w	3	3	3
Final hidrólisis ácida	Glucosa (g/L)	17,2 ± 1,1	18,5 ± 1,2	18,9 ± 0,4
	% RG	91 ± 1	98 ± 3	100 ± 3
	Ac. Acético (g/L)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Final fermentación	Glucosa (g/L)	0,1 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,2 ± 0,01
	Glicerol (g/L)	1 ± 0,1	1,2 ± 0,01	1,1 ± 0,1
	Metanol (g/L)	0,4 ± 0,1	0,01 ± 0,00	0,2 ± 0,01
	Etanol (g/L)	6,4 ± 0,3	6,8 ± 0,2	6,2 ± 0,5
g etanol/ kg alga		212	227	207

Tabla 3.4: Resultados de la hidrólisis ácida 2 % v/v y 3% w/w.

La **Figura 3.7** compara los resultados en cuanto a RG (%) de los ensayos de hidrólisis ácidas.

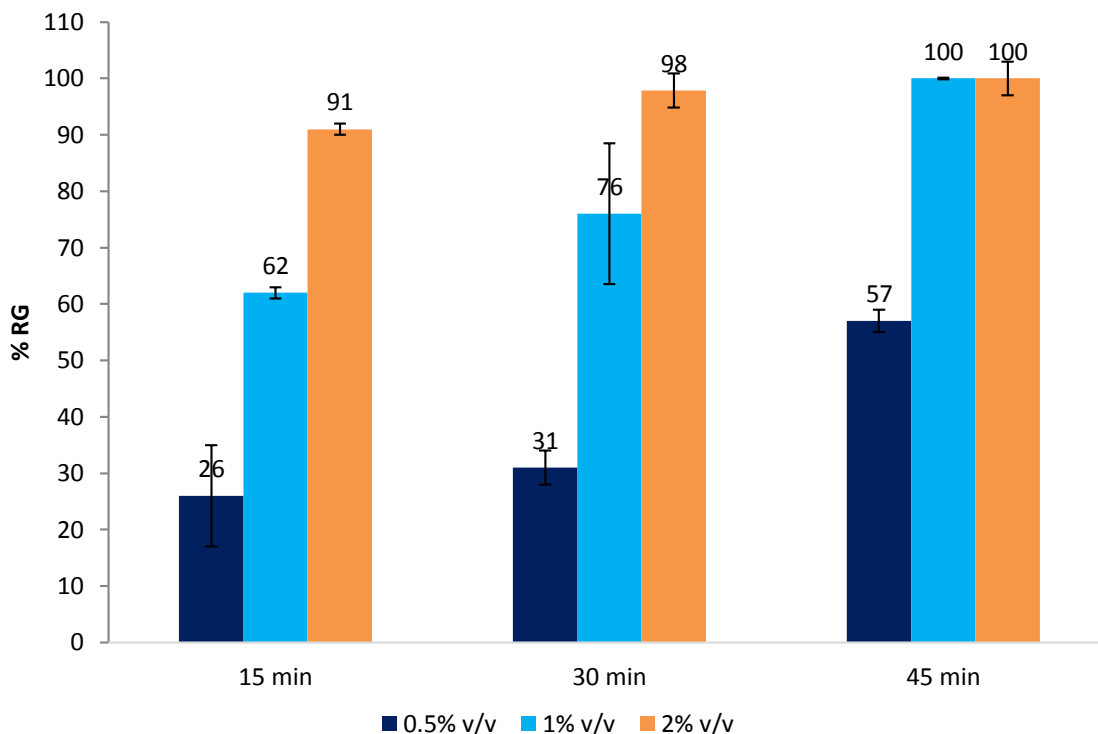


Figura 3.7: RG (%) de los ensayos de hidrólisis ácida.

Se observa que a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, aumenta la cantidad de glucosa que se puede recuperar, lo que significa que la concentración de monosacáridos liberados al medio aumenta. Los valores más altos obtenidos correspondieron al experimento con 1% v/v de H₂SO₄ durante 45 min con una concentración de glucosa en los hidrolizados de 19 g/L, y en el experimento al 2% v/v durante 45 min con una concentración de glucosa de 18,9 g/L, ambos con una RG del 100%.

Miranda et al. [48] lograron una RG del 95,6% hidrolizando el alga *Scendesmus obliquus* con H₂SO₄ (2N) durante 30 min. Ho et al. [31] hidrolizaron *Chlorella vulgaris* con ácido sulfúrico al 2% v/v obteniendo una RG casi del 100%. En estos resultados bibliográficos, del total de los carbohidratos liberados a partir del microalga *Scendesmus obliquus*, el 46% correspondía a glucosa mientras que de los carbohidratos liberados del microalga *Chlorella vulgaris*, el 70,8% fue glucosa, el 13,8% xilosa y el 7,7% maltosa.

De los carbohidratos liberados a partir de *Spirulina maxima* en este TFG, el 97% fue glucosa, lo cual es una ventaja para la fermentación alcohólica mediante *S. cerevisiae*.

La **Figura 3.8** representa la concentración de etanol (g/L) al finalizar la fermentación.

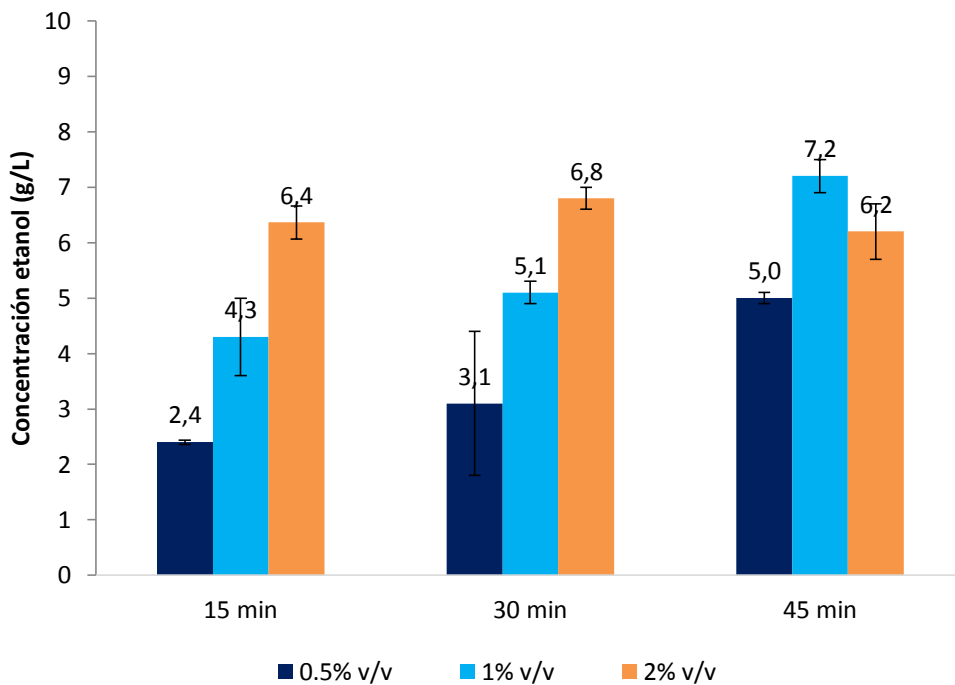


Figura 3.8: Concentración de etanol (g/L) al finalizar la fermentación de cada experimento realizado en hidrólisis ácida.

A medida que aumenta el tiempo de hidrólisis ácida aumenta la concentración de etanol, debido a que se favorece la producción de azúcares fermentables, a excepción del experimento realizado con una concentración de ácido del 2% v/v, ya que la concentración más alta de etanol se obtiene con un tiempo de hidrólisis de 30 min. Esto pudo ser debido a la formación de compuestos inhibidores que pueden interferir en la fermentación. La concentración máxima que se obtiene fue de 7,2 g/L de etanol que corresponde al experimento realizado con 1% v/v de ácido durante 45 minutos.

Se han calculado los coeficientes de rendimiento de etanol (Y_{PS}). El Y_{PS} se calcula a partir del cociente entre la concentración de etanol producido y la concentración de glucosa consumida. La **Figura 3.9** muestra los rendimientos de etanol.

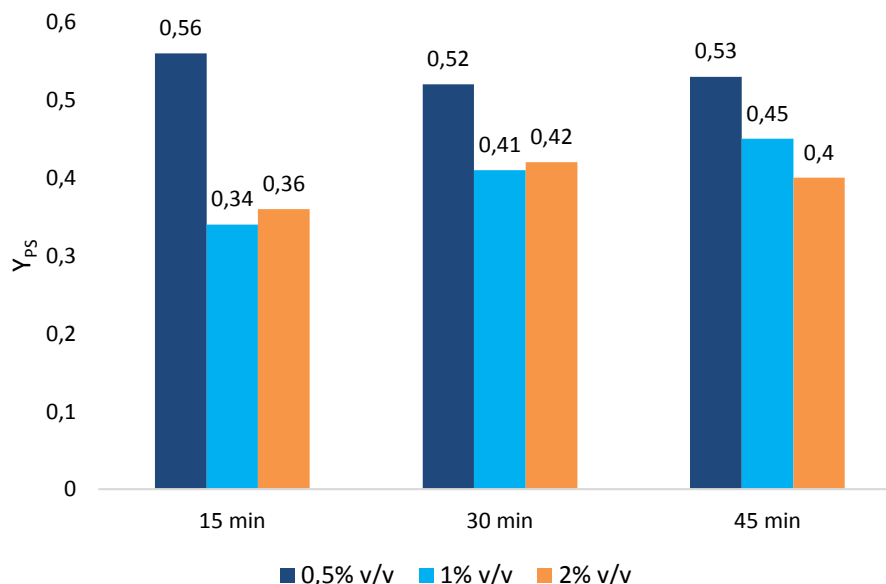


Figura 3.9: Coeficientes de rendimiento de etanol (Y_{PS}) de cada experimento realizado en hidrólisis ácida.

Se observa que los coeficientes de Y_{PS} mayores se obtienen en los experimentos realizados con 0,5% v/v H_2SO_4 . El coeficiente más alto fue 0,56. Esto pudo ser debido a que al trabajar con más concentración de ácido, es necesario añadir más sal para ajustar el pH, lo que puede influir en el posterior proceso de fermentación.

Markou et al [29] obtuvieron rendimientos de $0,3 \pm 0,02$ y $0,52 \pm 0,03$ g etanol/g glucosa después de la hidrólisis de *Spirulina platensis* con ácido sulfúrico de concentración 1 N y 0,5 N respectivamente.

En la **Figura 3.10** se analiza el rendimiento global de cada proceso expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

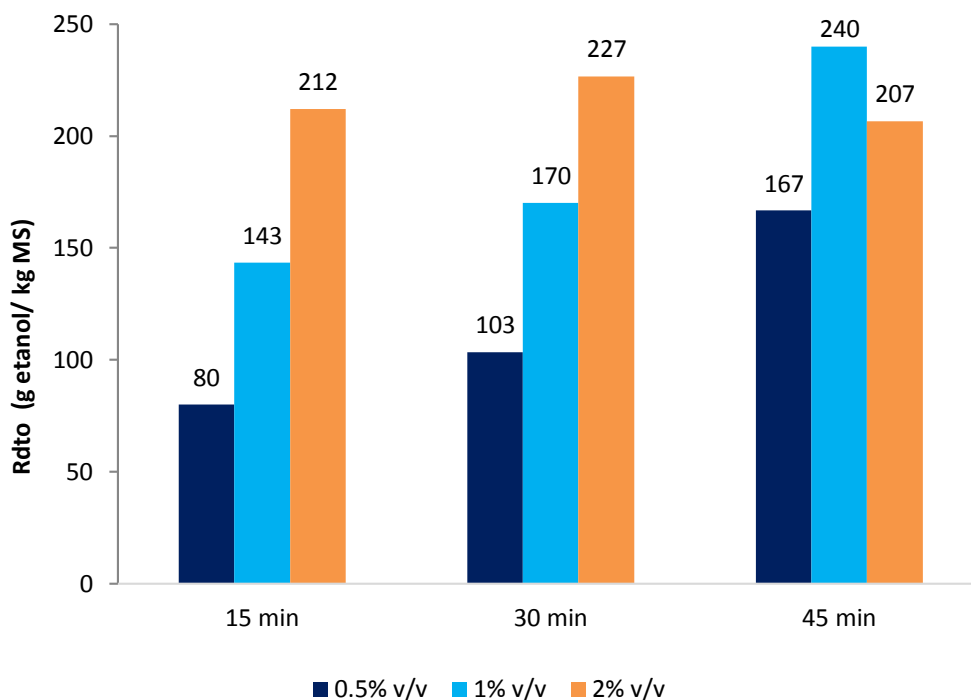


Figura 3.10: Rendimiento global del proceso expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

El rendimiento global del proceso se calcula a partir de los g de etanol producidos entre los kg de biomasa seca utilizada. A medida que aumenta el tiempo de la hidrólisis ácida, el rendimiento global del proceso aumenta, a excepción de los experimentos realizados con 2% v/v de H_2SO_4 , cuyos rendimientos son del mismo orden para los tres tiempos de hidrólisis. El mayor rendimiento global fue 240 g_{EtOH}/kg_{MS} que corresponde al experimento realizado con 1% v/v de H_2SO_4 durante 45 min.

Markou et al [29] obtuvieron rendimientos globales de $0,16 \pm 0,01$ g_{EtOH}/g_{MS} después de la hidrólisis con H_2SO_4 0,5 N con una concentración de 1,3% w/w de biomasa seca de *Spirulina platensis*.

Por lo tanto, los resultados experimentales que se obtienen en este trabajo concuerdan con las investigaciones e incluso son superiores.

A la vista de los resultados, podemos concluir que el experimento que ofrece los mejores resultados corresponde a las siguientes condiciones: 3%

w/w de biomasa seca, 1% v/v de H₂SO₄ y 45 minutos de tiempo de hidrólisis. Con estas condiciones se realizan experimentos con distinto porcentaje en peso de biomasa seca. Los resultados se representan en la **Tabla 3.5**.

	% H ₂ SO ₄ (v/v)	1			
	Tiempo (min)	45			
	% w/w	3	5	7,5	10
Final hidrólisis ácida	Glucosa (g/L)	19 ± 0,7	21,1 ± 0,7	21,5 ± 0,6	27,1 ± 0,6
	% RG	100 ± 0,2	78 ± 2	54 ± 7	50 ± 3
	Ac. Acético (g/L)	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,8 ± 0,01	0,7 ± 0,1
Final fermentación	Glucosa (g/L)	0,01 ± 0,0	0 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,1 ± 0,02
	Glicerol (g/L)	0,5 ± 0,05	0,8 ± 0,04	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	Metanol (g/L)	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2
	Etanol (g/L)	7,2 ± 0,3	8,9 ± 1	11,1 ± 0,4	13,6 ± 0,5
g etanol/ kg alga		240	178	148	136

Tabla 3.5: Resultados de la hidrólisis ácida 1% v/v durante 45 min con diferente porcentaje en peso de biomasa seca.

La **Figura 3.11** compara los resultados en cuanto a RG (%) de los ensayos realizados al 1%v/v durante 45 minutos con distinto porcentaje en peso de biomasa seca.

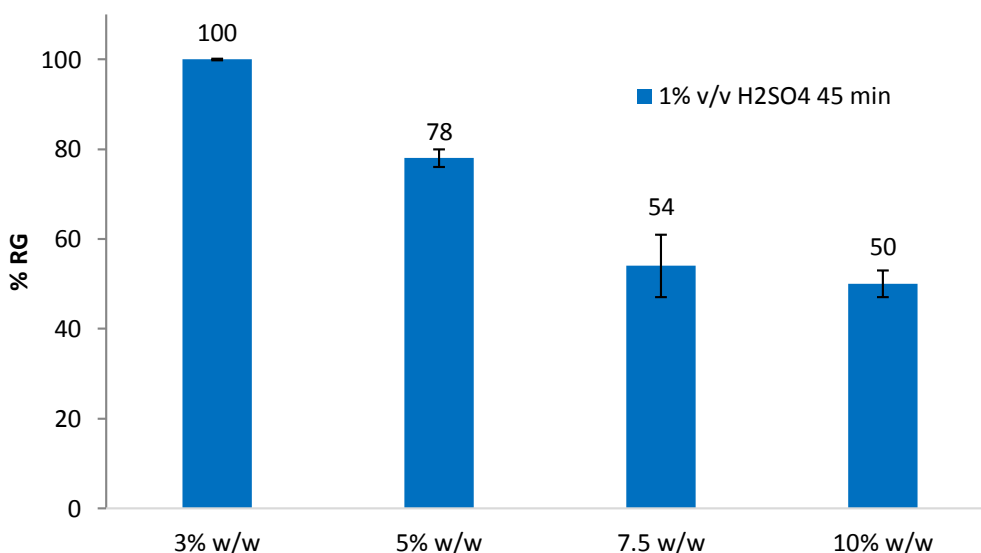


Figura 3.11: Influencia del porcentaje de materia seca en el rendimiento de recuperación de glucosa. Pretratamiento mediante hidrólisis ácida 1% v/v H₂SO₄ durante 45 min.

Se observa que a medida que aumenta el porcentaje en peso de biomasa seca, la recuperación de glucosa es menor, aunque la concentración de glucosa liberada al medio aumenta, llegando a pasar de una RG del 100%, con una concentración de 19 g/L, correspondiente al ensayo con un 3% w/w, a una RG del 50%, con una concentración de 27,1 g/L, en el ensayo con un 10% w/w de biomasa seca.

La **Figura 3.12** representa la concentración de etanol (g/L) al finalizar la fermentación.

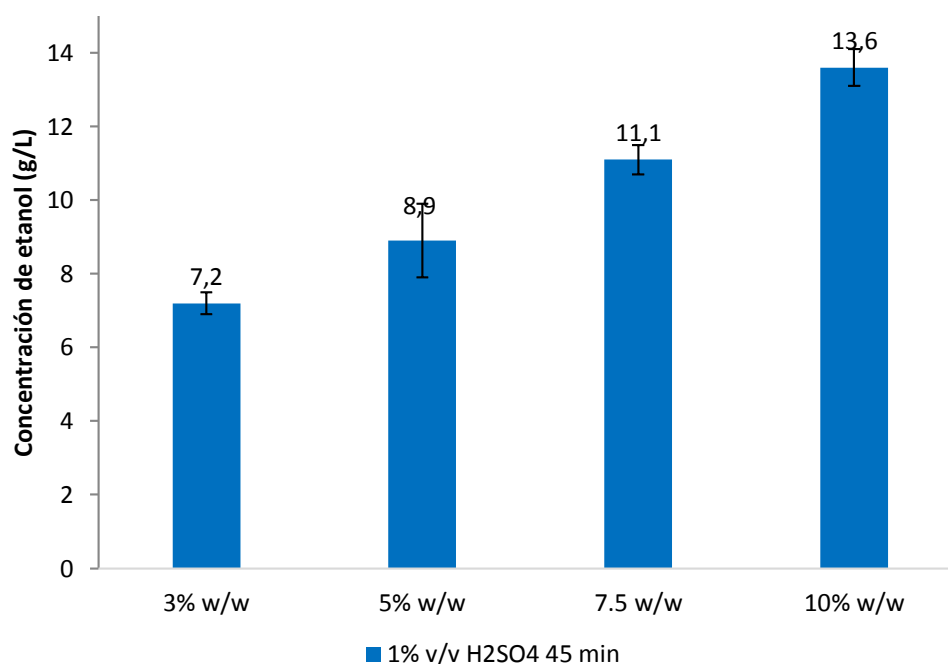


Figura 3.12: Influencia del porcentaje de materia seca en la concentración de etanol (g/L). Pretratamiento mediante hidrólisis ácida al 1% v/v H₂SO₄ durante 45 min.

A medida que aumenta el porcentaje en peso de biomasa seca, aumenta la concentración de etanol, ya que al finalizar la hidrólisis ácida la concentración de azúcares fermentables es mayor. La mayor concentración de etanol se obtiene en el experimento realizado con un 10% w/w, llegando a obtener 13,6 g/L de etanol.

En la **Figura 3.13** se analiza el rendimiento global de cada experimento de este apartado expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

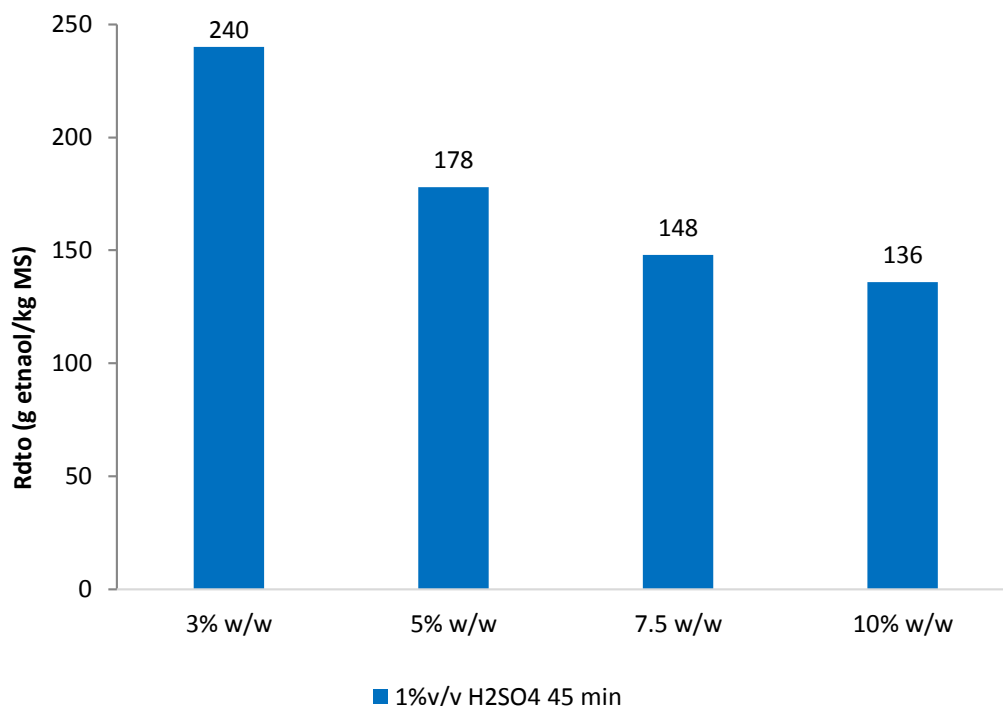


Figura 3.13: Rendimiento global del proceso expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

El rendimiento global del proceso disminuye a medida que se incrementa el porcentaje de biomasa seca en los experimentos, pasando de un rendimiento de 240 $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ para un 3% w/w, hasta 136 $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ para un 10% w/w. El rendimiento global se reduce prácticamente a la mitad.

3.2.4. Hidrólisis enzimática

En este apartado se exponen los resultados obtenidos de las hidrólisis enzimáticas realizadas en el laboratorio. La **Tabla 3.6** recoge los resultados obtenidos.

Hidrolisis térmica	Tiempo (min)	0	15	30	45
	% w/w biomasa	3	3	3	3
Final Hidrólisis enzimática	Glucosa (g/L)	3,9 ± 0,6	12,7 ± 2,4	15,7 ± 1,1	15,4 ± 0,1
	% RG	22 ± 10	76 ± 8	95 ± 5	97 ± 1
	Ac. Acético (g/L)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	1 ± 0,1	0,6 ± 0,04
Final fermentación	Glucosa (g/L)	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
	Glicerol (g/L)	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,04
	Metanol (g/L)	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1 ± 0,1
	Etanol (g/L)	1,7 ± 0,2	4,4 ± 0,5	6,9 ± 0,4	7,5 ± 0,5
Y _{ps}		0,43	0,35	0,40	0,48
g etanol/ Kg alga		55	147	230	250

Tabla 3.6: Resultados de las hidrólisis enzimáticas.

La Figura 3.14 compara los resultados en cuanto a RG (%) de los ensayos de hidrólisis enzimática.

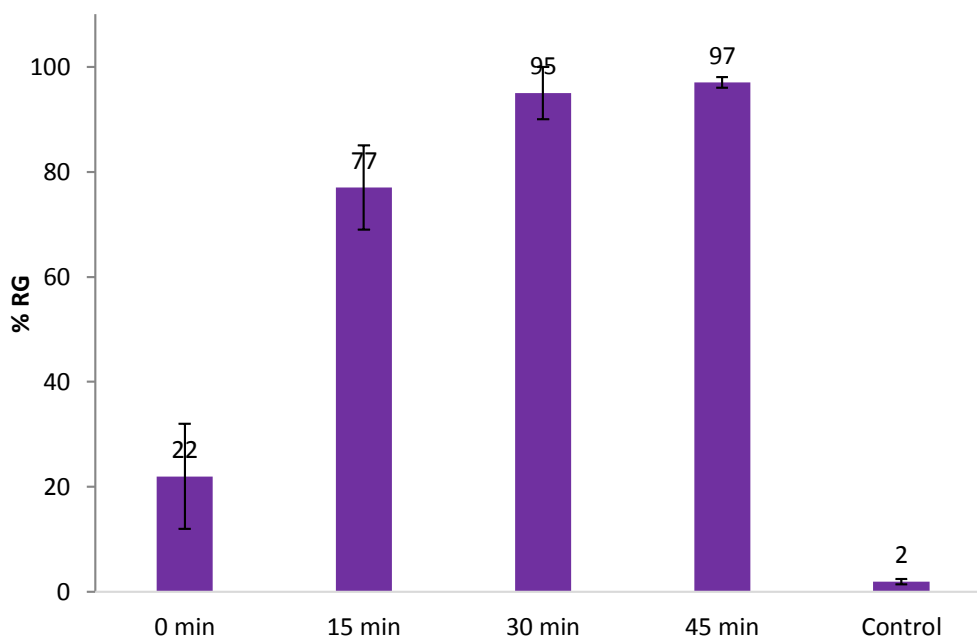


Figura 3.14: RG (%) de cada experimento realizado con hidrólisis enzimática.

A la vista de los resultados, a medida que aumenta el tiempo de la hidrólisis térmica que se realiza antes de la hidrólisis enzimática, el rendimiento de recuperación de glucosa al finalizar la hidrólisis enzimática es mayor, debido a que cuanto mayor es el tiempo de hidrólisis térmica, se favorece la acción de las enzimas a la hora de liberar los azúcares



fermentables. Después de 45 min de hidrólisis térmica se consiguió una RG del 97%.

En comparación con resultados bibliográficos, Ho et al. [31] hidrolizaron *Chlorella vulgaris* al 2% w/w de biomasa seca con amilasas obteniendo una RG del 90% y una concentración de glucosa en los hidrolizados de 7,8 g/L.

Se realiza un ensayo control para estudiar si existe liberación de glucosa y producción de etanol, cuando no actúa ninguna enzima. El ensayo control consiste en realizar una hidrólisis térmica durante 30 min, pero sin añadir las enzimas utilizadas en este trabajo. Como se puede observar, el ensayo control no es capaz de liberar monosacáridos al medio puesto que la RG fue del 2%.

También se realiza otro control sin hidrólisis térmica, añadiendo directamente las enzimas. En este caso, la recuperación de glucosa fue del 22%, lo que indica que es necesario un pretratamiento térmico previo que rompa las paredes celulares y favorezca la acción de las enzimas.

La **Figura 3.15** representa la concentración de etanol (g/L) al concluir la fermentación.

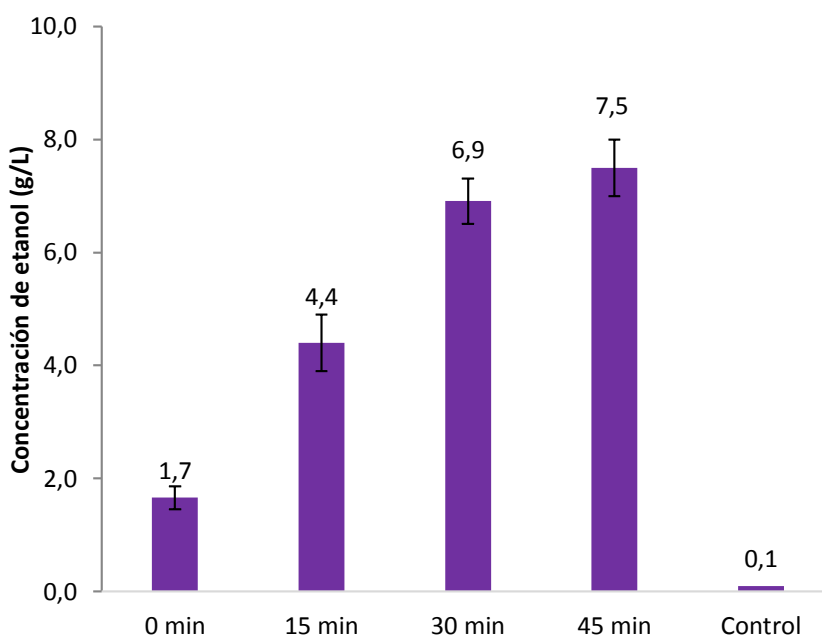


Figura 3.15: Concentración de etanol (g/L) al finalizar la fermentación de cada experimento realizado en hidrólisis enzimática.

A medida que aumenta el tiempo de la hidrólisis térmica aumenta la concentración de etanol, debido a que después de las hidrólisis enzimáticas existe mayor concentración de azúcares fermentables. Se obtuvo una concentración máxima de etanol de 7,5 g/L para un tiempo de hidrólisis térmica de 45 min.

En el ensayo control (sólo hidrólisis térmica), puesto que apenas se liberaron azúcares fermentables, la concentración de etanol después de la fermentación fue prácticamente cero.

Se han calculado los coeficientes de rendimientos de etanol (Y_{PS}). Los valores de los Y_{PS} están incluidos en la **Tabla 3.6**. En los experimentos realizados con enzimas el coeficiente más alto fue 0,48 correspondiente al pretratamiento mediante hidrólisis térmica durante 45 min.

En la **Figura 3.16** se analiza el rendimiento global del proceso expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

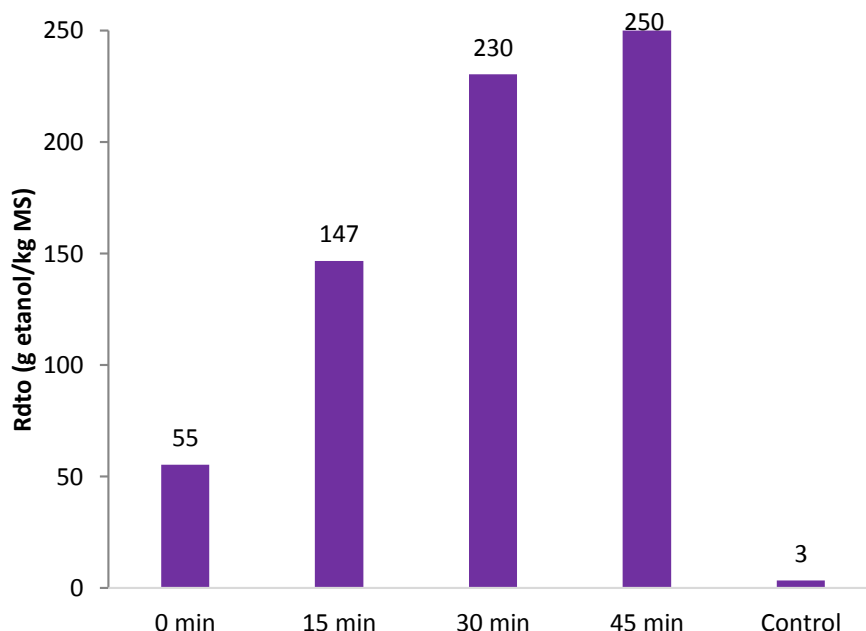


Figura 3.16: Rendimiento global del proceso expresado en g de etanol producido por cada kg de biomasa seca.

A medida que aumenta la duración de la hidrólisis térmica, aumenta el rendimiento global del proceso, llegando a obtenerse 250 g_{EtOH}/kg_{MS} en la hidrólisis térmica de 45 min, similar a la obtenida en hidrólisis ácida (1% v/v) durante 45 min.

El rendimiento del ensayo control fue 3 g_{EtOH}/kg_{MS} debido a que no se libera glucosa después de las hidrólisis, por lo que la levadura *S. cerevisiae* no produce etanol.

Ho et al. [31] obtuvo un rendimiento de 0,23 g_{EtOH}/g_{MS} en experimentos realizados con hidrólisis enzimática del microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Utilizaron enzimas del tipo amilasas.

No se han encontrado datos en bibliografía acerca de experimentos realizados con hidrólisis enzimática del microalga *S. maxima*.



Para concluir y a la vista de los resultados globales obtenidos, las condiciones de operación que conducen a mejores resultados son:

- Hidrólisis ácida con 1% v/v de H_2SO_4 durante 45 min y concentración de biomasa seca del 3% w/w.
- Hidrólisis térmica (30 min) seguida de hidrólisis enzimática con amilasas con una concentración de biomasa seca del 3% w/w.

Estas condiciones de operación son las que se utilizarán como referencia en el siguiente apartado con la finalidad de calcular el consumo energético del proceso de producción de bioetanol a partir de *Spirulina maxima*.



4. Proceso de producción de bioetanol a partir de Spirulina maxima



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



En este apartado, se comparan las necesidades energéticas y de consumo de materias primas de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática para obtener bioetanol a partir de *Spirulina maxima*. También se estudia la posibilidad de recuperación de energía dentro de cada proceso mediante la aplicación de herramientas de integración energética.

Para el proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación de la biomasa se han considerado las condiciones de operación que arrojan los mejores resultados en los ensayos realizados y que fueron: 3% w/w de biomasa seca, 1% v/v de H_2SO_4 y 45 minutos de hidrólisis ácida. Con estas condiciones se consigue una concentración de glucosa de 19 g/L, recuperación de glucosa (RG) del 100%, concentración de etanol de 7,2 g/L y un rendimiento global del proceso de 240 g_{EtOH}/kg_{MS}.

Para el proceso combinado de hidrólisis térmica e hidrólisis enzimática con amilasas y posterior fermentación se tomó como referencia las condiciones observadas como óptimas en los ensayos llevados a cabo y que fueron: 3% w/w de biomasa seca y 30 min de hidrólisis térmica. Con estas condiciones se consigue una concentración de glucosa de 15,7 g/L, RG del 95%, concentración de etanol de 6,9 g/L y un rendimiento global del proceso de 230 g_{EtOH}/kg_{MS}.

Se analizó también como varían las necesidades energéticas y de consumo de materias primas cuando se aumenta la concentración de biomasa, del 3% al 7,5% w/w, en la corriente de alimentación del proceso de hidrólisis ácida.

Para calcular las necesidades energéticas y de consumo de materias primas de los procesos de hidrólisis y fermentación se utiliza 10 kg/h de biomasa seca como base de cálculo. Asimismo, se calculan las necesidades energéticas y de consumo de materias primas para cultivar 10 kg/h de *S. maxima* en columnas de burbujeo.

4.1. Diagramas de proceso

A continuación se muestran los diagramas de bloques para el cultivo y concentración de biomasa y de los procesos de hidrólisis y fermentación. Además, se incluye una descripción general de cada proceso.

4.1.1. Cultivo y concentración de *Spirulina maxima*

La **Figura 4.1** representa el diagrama de bloques para el cultivo y concentración de *S. maxima*.

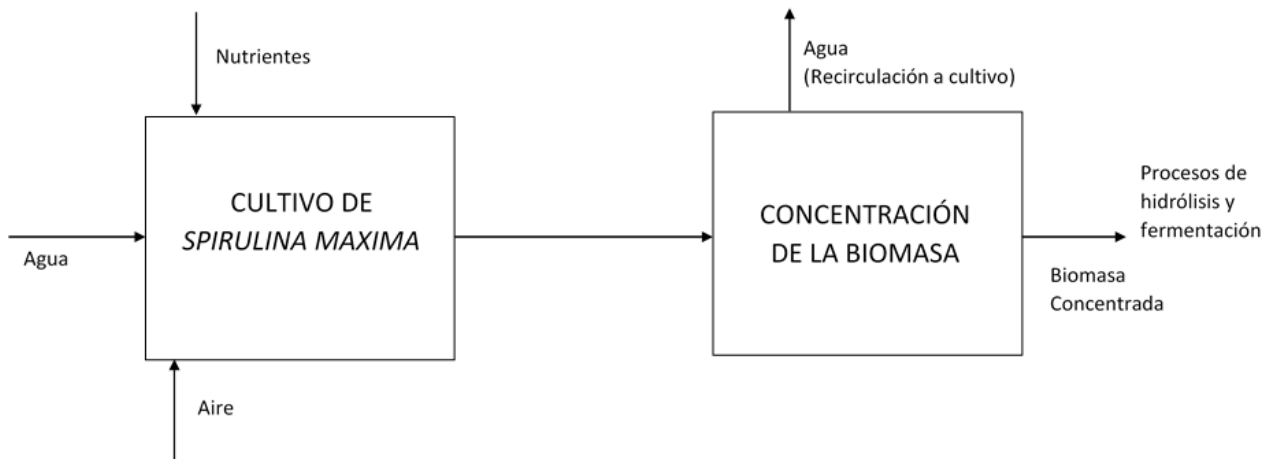


Figura 4.1: Diagrama de bloques para el cultivo y concentración de biomasa.

La *S. maxima* que se va a utilizar para evaluar las necesidades energéticas y de consumo de materias primas de los procesos de hidrólisis y fermentación, se tiene que cultivar en columnas de burbujeo utilizando como medio de cultivo el medio Schlösser modificado para tener 2 mg/L de fósforo inicial. El cultivo de la biomasa dura 9 días, llegando a alcanzar una concentración de 1,6 g/L.

Para realizar los procesos de hidrólisis y fermentación se necesita una concentración de 30 g/L de biomasa, por lo que es necesario concentrar la *S. maxima*. El agua retirada de la corriente se puede reutilizar en el cultivo del microalga.

4.1.2. Hidrólisis ácida y fermentación

La **Figura 4.2** representa el diagrama de bloques del proceso de hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 1% v/v durante 45 min y posterior fermentación del hidrolizado a bioetanol.

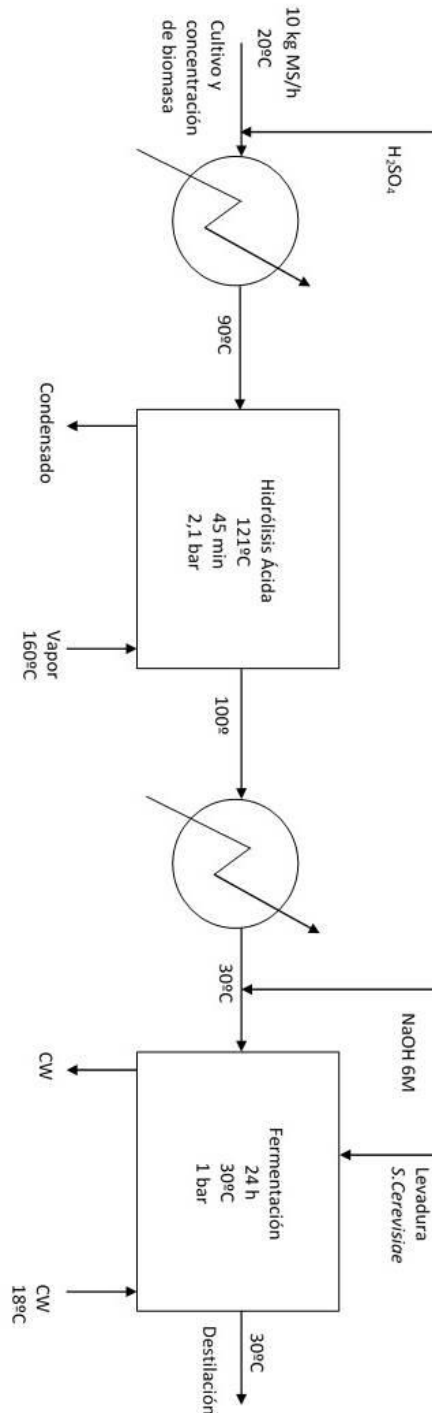


Figura 4.2: Diagrama de bloques de hidrólisis ácida y fermentación de *S. maxima*.



Para el proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación, se considera que la alimentación está compuesta por 10 kg/h de *S. maxima* suspendida en agua. Se añade el suficiente H_2SO_4 para tener una disolución al 1% v/v. Esta corriente se encuentra a 20°C y 1 bar.

Antes de que se lleve a cabo la hidrólisis ácida, se tiene que realizar el precalentamiento de la corriente de alimentación. Este precalentamiento consiste en calentar la corriente desde 20°C hasta 90°C. Para calentar la corriente se utiliza vapor saturado a 100°C. Una vez que se tiene la corriente de alimentación a 90°C, se introduce en el equipo donde se realiza la hidrólisis ácida.

Los parámetros de operación para realizar la hidrólisis ácida son: 121°C, durante 45 min a 2,1 bar. El equipo trabaja a la presión de saturación del líquido. Se tiene que calentar la corriente desde 90°C hasta 121°C, y mantener esta temperatura durante el tiempo de pretratamiento (45 min). Para calentar y mantener la temperatura se aporta vapor saturado indirecto a 160°C.

El equipo descarga la corriente a 1 bar y 100°C. Esta corriente se tiene que enfriar hasta 30°C antes de que se realice la fermentación. Para enfriar la corriente en el intercambiador de calor, se utiliza agua de refrigeración a 25°C. Cuando la temperatura de la corriente es 30°C, se necesita ajustar el pH. El pH de la corriente es 1 y se tiene que ajustar hasta pH 4 para la fermentación. Para ello se utiliza una disolución de NaOH 6M.

Los parámetros de la fermentación son: 30°C, durante 24 h a 1 bar. Para que la fermentación se lleve a cabo se tiene que inocular 3% v/v (v inóculo/v reactor) de la levadura *S. cerevisiae*. El caldo de fermentación tiene que estar agitado durante las 24 h. Para esta agitación se emplean dos agitadores mecánicos. Para que la temperatura del caldo de fermentación se mantenga durante 24h a 30°C se requiere agua de refrigeración en el encamisado del equipo. Una vez finalizada la fermentación la corriente se destilaría para separar el etanol producido del resto de componentes de la corriente, pero esta parte del proceso no se ha considerado en el TFG.

4.1.3. Hidrólisis enzimática y fermentación

La **Figura 4.3** representa el diagrama de bloques correspondiente al proceso de hidrólisis enzimática y posterior fermentación de *S. maxima*.

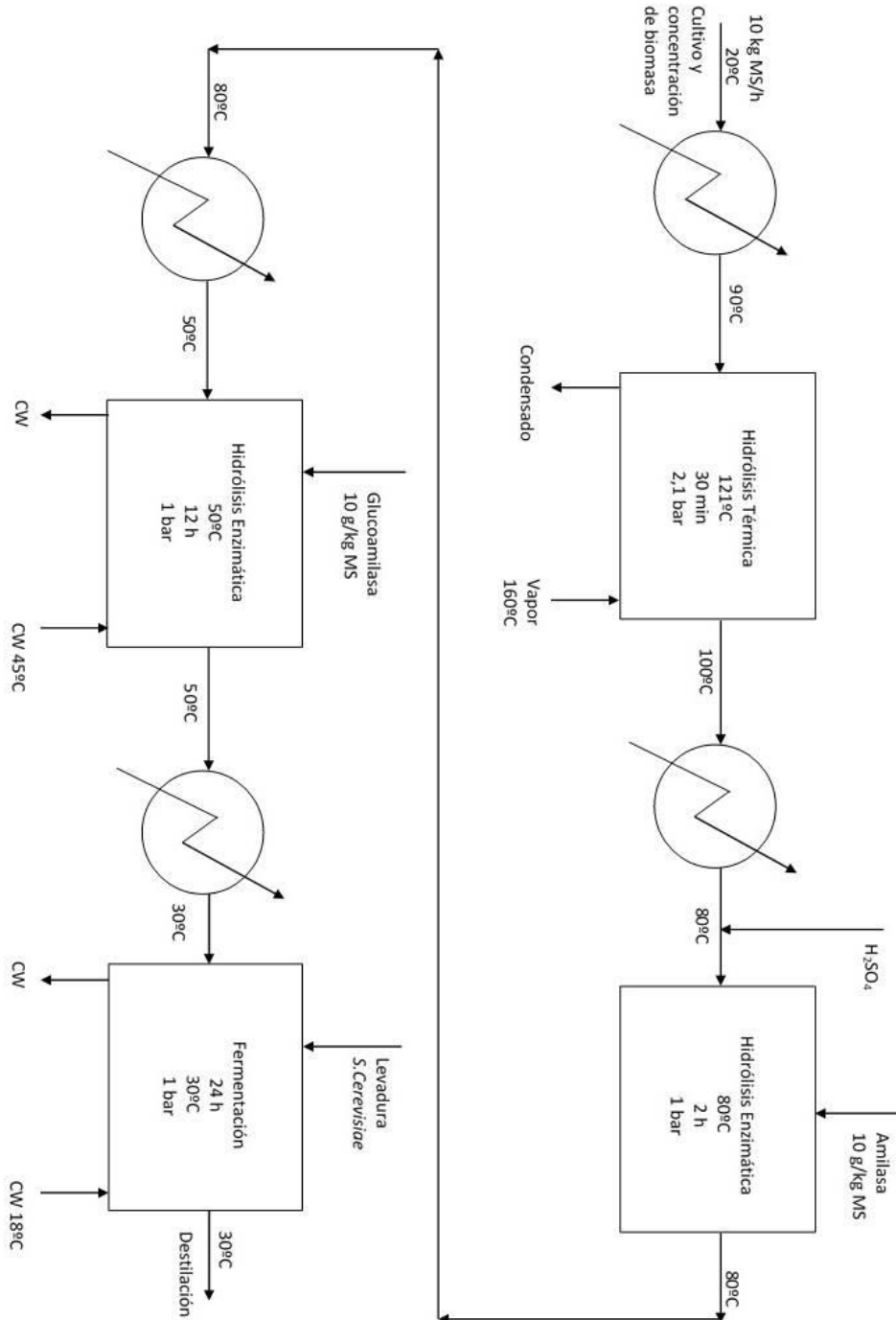


Figura 4.3: Diagrama de bloques de hidrólisis enzimática y fermentación de *S. maxima*.



La alimentación del proceso de hidrólisis térmica y enzimática está compuesta por una disolución con un 3% w/w de biomasa. El flujo másico de la alimentación es 333,3 kg/h, a una temperatura de 20°C y 1 bar. Esta alimentación está compuesta por 10 kg/h de *S. maxima* suspendida en agua.

Antes de realizar la hidrólisis térmica, se tiene que precalentar la corriente de alimentación. Este precalentamiento consiste en aumentar la temperatura de la corriente de alimentación hasta 90°C. Para ello se utiliza vapor saturado a 100°C. Una vez que se tiene la corriente de alimentación a 90°C, se introduce en el equipo donde se lleva a cabo la hidrólisis térmica.

Los parámetros para realizar la hidrólisis térmica son: 121°C, durante 30 min a 2,1 bar. El equipo tiene que calentar la corriente desde 90°C hasta 121°C, y mantener esta temperatura durante el tiempo de pretratamiento (30 min). Para calentar y mantener la temperatura se aporta vapor saturado indirecto a 160°C.

El equipo descarga la corriente a 1 bar y 100°C. Esta corriente se tiene que enfriar hasta 80°C antes de que se realice la primera hidrólisis enzimática. Cuando la temperatura de la corriente es 80°C, se ajusta el pH desde 6,8 hasta pH 5,5. Para ajustar el pH se añade una disolución de H₂SO₄ al 2% v/v.

Los parámetros de la primera hidrólisis enzimática con amilasas son: 80°C, durante 2 h a 1 bar. Para que la hidrólisis se lleve a cabo se tiene que añadir 10 g/kg MS de la enzima Liquozyme SC DS. El caldo de hidrólisis tiene que estar agitado durante las 2 h. El equipo deberá estar aislado térmicamente para que se mantenga la temperatura durante el tiempo de hidrólisis.

La corriente a la salida de la primera hidrólisis enzimática se encuentra a 80°C y se tiene que enfriar hasta 50°C antes de que se lleve a cabo la segunda hidrólisis enzimática con glucoamilasas.



En los experimentos realizados en el laboratorio, los parámetros de operación de la segunda etapa de hidrólisis enzimática fueron: 50°C, durante 24 h a 1 bar. Según investigaciones publicadas, el tiempo de hidrólisis se puede reducir a 12 h [65]. De esta forma, los parámetros de operación de esta segunda etapa de hidrólisis enzimática serán: 50°C, durante 12 h a 1 bar. Para que la hidrólisis se lleve a cabo se tiene que añadir 10 g/kg MS de la enzima Spirizyme Fuel. El caldo de hidrólisis tiene que estar agitado durante las 12 h. Para mantener la agitación se emplean dos agitadores mecánicos que proporcionan una potencia mecánica al líquido. Para retirar esta energía se utiliza agua a 45°C que circula por el encamisado del equipo.

La corriente a la salida de la segunda hidrólisis enzimática se encuentra a 50°C y se tiene que enfriar hasta 30°C para realizar la fermentación. Para ello se utiliza agua de refrigeración.

Los parámetros de la fermentación son: 30°C, durante 24 h a 1 bar. Para que la fermentación se lleve a cabo se tiene que inocular 3% v/v de la levadura *S. cerevisiae*. El caldo de fermentación tiene que estar agitado durante las 24 h. Para esta agitación se emplean dos agitadores mecánicos. La temperatura del caldo de fermentación se debe mantener durante 24h a 30°C, para ello se utiliza un flujo de agua a 18°C por el encamisado del equipo. Una vez finalizada la fermentación la corriente se destilaría para separar el etanol producido del resto de componentes de la corriente pero, como se ha indicado antes, esta etapa no se abordará en el TFG.

4.2. *Cultivo y concentración de Spirulina maxima*

Los balances energéticos y de consumo de materias primas se han realizado considerando como base de cálculo 10 kg/h de alga. En este apartado se estimarán los costes de cultivo y concentración de la biomasa.



Según los resultados descritos en el apartado 3.2.1, la mayor concentración de biomasa se obtendría en el medio Schlösser modificado para tener 2 mg/L de fósforo (medio A). El cultivo del microalga dura 9 días.

Puesto que la concentración de biomasa fue 1,6 g/L, para cultivar 10 kg/h de biomasa seca, se necesitan 1350 m³ de medio Schlösser modificado. La **Tabla 4.1** contiene las necesidades de consumo de reactivos que se necesitan para preparar este medio de cultivo.

Sales		
NaHCO ₃	13,6	kg/m ³ cultivo
Na ₂ CO ₃	4,03	kg/m ³ cultivo
K ₂ HPO ₄	0,01	kg/m ³ cultivo
NaNO ₃	2,5	kg/m ³ cultivo
K ₂ SO ₄	1	kg/m ³ cultivo
NaCl	1	kg/m ³ cultivo
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	kg/m ³ cultivo
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	kg/m ³ cultivo
Micronutrientes		
PIV	6	L/m ³ cultivo
CHU	1	L/m ³ cultivo

Tabla 4.1: Necesidades de consumo de reactivos en el medio de cultivo

El cultivo se realiza en columnas de burbujeo verticales. Este tipo de biorreactores se emplean para llevar a cabo reacciones heterogéneas gas-líquido o gas-sólido. Carecen de un sistema de agitación mecánica para mezclar el caldo de cultivo, la mezcla la realiza el gas que expulsa un eyector de gas en el fondo. Las dimensiones típicas de relación altura-diámetro de estas columnas están comprendidas entre 2 y 5.

Las columnas de burbujeo que se utilizan para el cultivo de *S. maxima* tienen un diámetro interno de 1 m y una altura de 5 m. El volumen de trabajo de cada biorreactor será 3,9 m³, por lo que se necesitarían 344 columnas para cultivar la cantidad necesaria del microalga. Estos biorreactores ocuparían una superficie de 275 m².

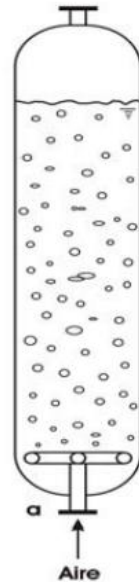


Figura 4.4: Columna de burbujeo.

A la salida de los biorreactores la concentración de biomasa es 1,6 g/L, pero para realizar los procesos de hidrólisis y fermentación, se necesita concentrar hasta 30 g/L de biomasa por lo que es necesario retirar cierta cantidad de agua. Se necesita retirar de la corriente un total de 1278 m³ (5,9 m³/h), que corresponde al 95% del medio de cultivo total. El agua que se retira de la corriente principal para concentrar la biomasa, se puede reutilizar para el cultivo del microalga.

Para concentrar la biomasa se pueden utilizar diferentes alternativas como ultrafiltración y centrifugación. Se ha buscado en bibliografía descripción y características de equipos comerciales de ultrafiltración y centrifugación.

La ultrafiltración es un proceso de filtración por membranas en la que la presión hidrostática fuerza al líquido contra la membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el líquido y los sólidos de bajo peso molecular atraviesan la membrana [76].



La ultrafiltración presenta las siguientes ventajas e inconvenientes:

Ventajas

- Proceso “no destructivo” de la materia, debido a su principio de operación y a que no existe cambio de fase.
- Bajos costes de energía en comparación con otros equipos de separación ya que opera a presiones menores.
- Utilización en procesos continuos y discontinuos.

Inconvenientes

- Disminución lenta del flujo de filtración con el tiempo, debido a la polarización de la concentración y a la obstrucción de los poros de la membrana.
- Estos equipos crean una presión osmótica, cuya magnitud origina una disminución de la permeabilidad de la membrana, por lo que se requiere mayor área de superficie para una planta dada que otro equipo de separación.
- Alto coste inicial de capital y de mantenimiento.

Se ha buscado información sobre las características de los equipos de ultrafiltración. En concreto, se presentan los datos de un equipo de ultrafiltración de la casa comercial SHANDONG EQUIPMENT:

- Caudal máximo: 10 m³/h.
- Presión máxima: 1,5 bares.
- Eficacia: $\geq 80\%$.
- Superficie activa de membrana: 31,7 m².
- **Potencia motor: 10 kW.**



Figura 4.5: Equipo de ultrafiltración.

La centrifugación es un proceso por el cual se separan sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de la fuerza centrífuga. Los componentes más densos se desplazan fuera del eje de rotación, mientras que los componentes menos densos de la mezcla se desplazan hacia el eje de rotación [76].

La centrifugación presenta las siguientes ventajas e inconvenientes:

Ventajas

- Proceso “no destructivo” de la materia, debido a su principio de operación y a que no existe cambio de fase.
- Bajos costes de mantenimiento.
- En el mismo ciclo de separación de los sólidos y los líquidos, los sólidos pueden ser lavados, realizando dos operaciones en un solo paso.

Inconvenientes

- No se puede utilizar para separar sólidos de líquidos con densidades parecidas.
- Alto coste inicial de capital y operacional.

Se ha buscado información sobre las características de los equipos de centrifugación. En concreto, se presentan los datos de una centrifuga de discos de la casa comercial FLOTTWEG son:

- Caudal máximo: 15 m³/h.
- Presión máxima: 5 bares.
- Velocidad máxima: 4000 rpm.
- Eficacia: > 90%.
- **Potencia motor: 18,5 kW.**

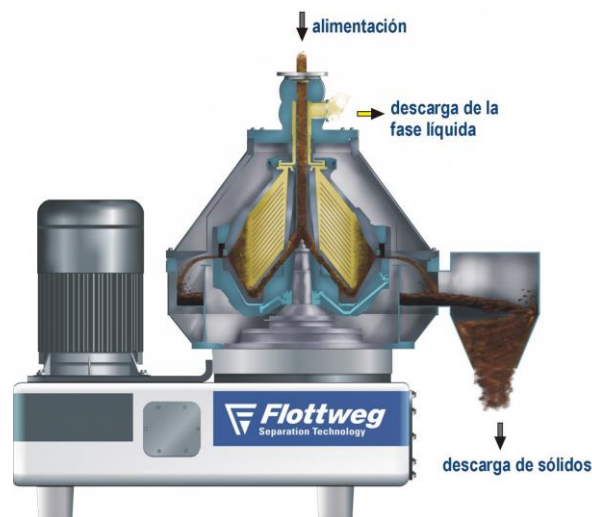


Figura 4.6: Centrifuga de discos.

Según las características descritas de ambos equipos, las necesidades energéticas son muy similares, por lo que se escoge como equipo para la concentración de la biomasa la centrífuga de discos debido a que sus costes de mantenimiento son menores, puesto que no contiene membrana que se pueda saturar como en la ultrafiltración y además la centrífuga presenta una mayor eficacia de separación.

4.3. Hidrólisis ácida y fermentación

El análisis del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación para obtener bioetanol a partir de *Spirulina maxima* se realizó con un 3% w/w y un 7,5% w/w de biomasa seca, para analizar como varían las necesidades energéticas y de consumo de materias primas cuando se aumenta la concentración de biomasa en la corriente de alimentación del proceso.

4.3.1. Comparación del proceso de hidrólisis ácida con 3% w/w y 7,5% w/w de biomasa seca

Las necesidades energéticas y de consumo de materias primas del proceso de hidrólisis y fermentación se calculan a partir de 10 kg/h de biomasa seca como base de cálculo.

En primer lugar, se comparan las necesidades energéticas del proceso de hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 1% v/v y posterior fermentación para una concentración de *S. maxima* del 3% w/w y del 7,5% w/w. Esta comparación se recoge en la **Tabla 4.2**.

Necesidades energéticas			
	3% w/w	7,5% w/w	
Calentamiento	39,3	15,7	kW
	3,9	1,6	kW/kg alga
Enfriamiento	63,1	19,2	kW
	6,3	1,9	kW/kg alga
Total	102,5	35,0	kW
	10,2	3,5	kW/kg alga

Tabla 4.2: Comparación de las necesidades energéticas del proceso de hidrólisis ácida (1% v/v H_2SO_4) y fermentación para una concentración de *S. maxima* del 3% w/w y del 7,5% w/w.



En estos procesos, se necesita aportar energía en forma de vapor, energía de refrigeración y potencia de agitación. La **Tabla 4.3** recoge las necesidades energéticas referidas a la potencia consumida del proceso considerando un 3% w/w y un 7,5% w/w de biomasa seca.

Potencia consumida			
	3% w/w	7,5% w/w	
Energía vapor	12,1	4,9	kW
	1,2	0,5	kW/kg alga
Energía agua refrigeración	35,9	8,3	kW
	3,6	0,8	kW/kg alga
Potencia agitación	31,6	6,6	kW
	3,2	0,7	kW/kg alga

Tabla 4.3: Comparación de las potencias consumidas en los procesos de hidrólisis ácida (1% v/v H₂SO₄) y fermentación con diferente concentración de *S. maxima* en la alimentación.

La **Tabla 4.4** compara las necesidades de materias primas y servicios (vapor, agua de refrigeración, ácido sulfúrico y sosa) del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación considerando diferentes concentraciones de biomasa seca en la alimentación: 3% w/w y 7,5% w/w.

Consumo de materias primas y servicios			
	3% w/w	7,5% w/w	
Vapor	21,0	8,4	kg vapor/h
	2,1	0,8	kg vapor/kg alga
Agua refrigeración	3868,5	897,6	kg agua refrig./h
	386,9	89,8	kg agua refrig./kg alga
H ₂ SO ₄ comercial (96%)	0,6	0,2	kg H ₂ SO ₄ /kg alga
	0,3	0,1	L H ₂ SO ₄ /kg alga
NaOH comercial (97%)	0,3	0,1	kg NaOH/kg alga
	0,2	0,04	L NaOH/kg alga

Tabla 4.4: Comparación de las necesidades de consumo de materias primas y servicios del proceso de hidrólisis ácida (1% v/v H₂SO₄) y fermentación para una concentración de *S. maxima* del 3% w/w y del 7,5% w/w.



En el transcurso del proceso se produce glucosa durante la hidrólisis ácida y etanol y CO₂ durante la fermentación. La **Tabla 4.5** recoge la concentración de glucosa, etanol y CO₂ producidos expresados en kg/kg biomasa seca y la energía que se podría obtener del etanol teniendo en cuenta su poder calorífico (8,45 kW etanol/kg etanol).

	3% w/w	7,5% w/w	
Glucosa	19,00	21,50	kg glucosa/m ³
	0,63	0,29	kg glucosa/kg alga
Etanol	7,20	11,10	kg glucosa/m ³
	0,24	0,15	kg etanol/kg alga
	2,03	1,25	kW etanol/kg alga
CO2	0,32	0,14	kg CO2/kg alga

Tabla 4.5: Comparación de los productos obtenidos en los proceso de hidrólisis ácida (1% v/v H₂SO₄) y fermentación.

A la vista de los resultados, cuando el proceso se realiza con un 7,5% w/w de biomasa seca el flujo másico de alimentación se reduce un 60%, ya que la alimentación está más concentrada. Esta reducción del flujo másico conlleva que todas las necesidades energéticas y de consumo de materias primas y servicios disminuyan también un 60% aproximadamente.

Al igual que se disminuye las necesidades energéticas, disminuye la producción de los compuestos de interés (glucosa y etanol), pasando de 0,63 kg glucosa/kg MS y 0,24 kg etanol/kg MS en el proceso con un 3%w/w de biomasa seca, a 0,29 kg glucosa/kg MS y 0,15 kg etanol/kg MS en el proceso con un 7,5% w/w de biomasa seca. La producción de glucosa se reduce un 54% y la producción de etanol un 38%.

Los balances de materia y energía detallados se encuentran en el Anexo I.



4.3.2. Integración del proceso de hidrólisis ácida y fermentación

Una vez analizadas las necesidades energéticas y de consumo de materias primas del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación para obtener bioetanol a partir de *S. maxima*, se estudia la posibilidad de recuperación de energía dentro del proceso mediante la aplicación de herramientas de integración energética.

Para realizar la recuperación de energía dentro del proceso se identifican las corrientes frías y calientes del proceso, la energía que consumen estas corrientes tanto para enfriarlas como para calentarlas y se dibujan las curvas compuestas para conocer cómo integrar los equipos dentro del proceso. La integración energética que se realiza en este trabajo solo tiene en cuenta los intercambiadores de calor, los equipos de reacción no se integran.

En primer lugar, se identifican las corrientes frías y calientes del proceso y la energía que se necesita retirar o aportar, respectivamente. La **Tabla 4.6** recoge dichas corrientes y la energía intercambiada, para el proceso correspondiente a un 3% w/w de biomasa seca y para el proceso realizado con un 7,5% w/w de biomasa seca.

Corrientes del proceso		3% w/w	7,5% w/w
	T° entrada (°C)	T° salida (°C)	Energía (kW)
Corriente caliente	100	30	27,2
Corriente fría	20	90	10,9

Tabla 4.6: Corrientes frías y calientes del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación a bioetanol a partir de *S. maxima*.

Una vez conocidas cuales son las corrientes fría y caliente del proceso, se dibujan las curvas compuestas. Para ello hay que fijar una variación de temperatura mínima (ΔT_{\min}) que corresponde a la mínima variación de temperatura que debe existir entre la corriente de entrada que circula por los tubos y la corriente de salida que circula por la carcasa del intercambiador. Para este proceso se escoge una ΔT_{\min} de 10°C.

La figura correspondiente a las curvas compuestas se encuentra en el Anexo II.

En el proceso de hidrólisis ácida y fermentación se recupera energía dentro del proceso si la corriente a la salida del equipo de hidrólisis ácida a 100°C se utiliza para calentar la corriente de alimentación a 20°C. De esta forma las necesidades energéticas disminuyen. Las necesidades energéticas después de la integración se muestran en la **Tabla 4.7**.

Necesidades energéticas			
	3% w/w	7,5% w/w	
Calentamiento	12,1	4,9	kW
	1,2	0,5	kW/kg alga
Enfriamiento	35,9	8,3	kW
	3,6	0,8	kW/kg alga
Total	48,1	13,2	kW
	4,8	1,3	kW/kg alga

Tabla 4.7: Comparación de las necesidades energéticas del proceso, una vez integrado energéticamente, de hidrólisis ácida (1% v/v H₂SO₄) y fermentación para una concentración de *S.maxima* del 3% w/w y del 7,5% w/w.

Cuando se realiza la recuperación energética dentro del proceso de hidrólisis ácida con una concentración de biomasa en la alimentación del 3% w/w, se recuperan 54,4 kW, es decir, un 53% de las necesidades globales. Asimismo, para el proceso con un 7,5% w/w de biomasa se recuperan 21,8 kW, un 62% de las necesidades globales.

La **Figura 4.7** representa el diagrama de bloques del proceso de hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 1% v/v y posterior fermentación integrado energéticamente.

Los balances de materia y energía detallados se encuentran en el Anexo I.

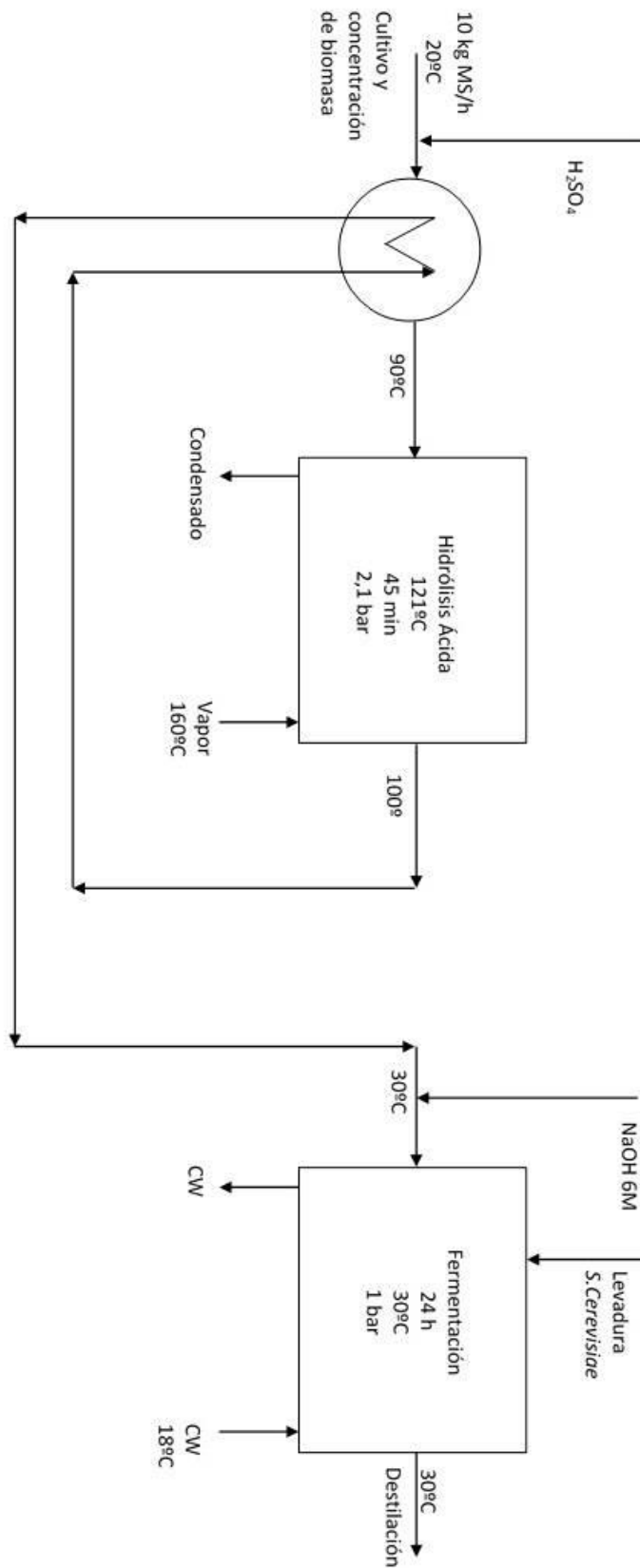


Figura 4.7: Diagrama de bloques del proceso de hidrólisis ácida y fermentación de *S. maxima*, integrado energéticamente.

4.4. Hidrólisis enzimática y fermentación.

Los balances del proceso de hidrólisis térmica, hidrólisis enzimática y posterior fermentación para obtener bioetanol a partir de *Spirulina maxima*, se han realizado considerando una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 3% w/w.

En este apartado, se analizan las necesidades energéticas del proceso con y sin integración energética, así como las necesidades de consumo de materias primas, tomando como base de cálculo 10 kg/h de biomasa seca.

En primer lugar, se calculan los consumos de materias primas y servicios (vapor, agua de refrigeración, ácido sulfúrico y enzimas) para llevar a cabo el proceso. Estos consumos se recogen en la **Tabla 4.8**.

Consumo de materias primas y servicios		
Vapor	21,0	kg vapor/h
	2,1	kg vapor/kg alga
Agua refrigeración	4862,1	kg agua refrig./h
	486,2	kg agua refrig./kg alga
H2SO4 2% v/v	0,33	L disol. H ₂ SO ₄ 2%/kg alga
H2SO4 comercial (96%)	0,01	kg H ₂ SO ₄ /kg alga
	6,68E-03	L H ₂ SO ₄ /kg alga
Enzima 1	10	g enzima 1/kg alga
Enzima 2	10	g enzima 2/kg alga

Tabla 4.8: Necesidades de consumo de materias primas y servicios del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación de *S. maxima*.

Para llevar a cabo el proceso que se está describiendo en este apartado, es necesario aportar energía en forma de vapor, en forma de agua de refrigeración y en forma de potencia de agitación. La **Tabla 4.9** recoge las necesidades energéticas referidas a la potencia consumida en el proceso.

Potencia consumida		
Energía vapor	12,1	kW
	1,2	kW/kg alga
Energía agua refrigeración	45,2	kW
	4,5	kW/kg alga
Potencia agitación	41,0	kW
	4,1	kW/kg alga

Tabla 4.9: Potencia consumida en el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación a bioetanol a partir de *S. maxima*.

Durante el proceso se produce glucosa durante la hidrólisis enzimática y etanol y CO₂ durante la fermentación. La **Tabla 4.10** recoge la concentración de glucosa, etanol y CO₂ producidos expresados en kg/kg biomasa seca y la energía que se podría obtener del etanol teniendo en cuenta su poder calorífico.

Glucosa	15,7	kg glucosa/m ³
	0,53	kg glucosa/kg alga
Etanol	6,9	kg glucosa/m ³
	0,23	kg etanol/kg alga
	1,95	kW etanol/kg alga
CO ₂	0,26	kg CO ₂ /kg alga

Tabla 4.10: Productos obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática y fermentación.

Por último, se estudia la posibilidad de recuperación de energía dentro del proceso mediante la aplicación de herramientas de integración energética. Dicha integración energética se realiza de la misma forma que para el proceso de hidrólisis ácida y fermentación.

En primer lugar, se debe conocer cuáles son las corrientes frías y calientes del proceso, así como la energía que consumen estas corrientes. La **Tabla 4.11** recoge dichas corrientes y la energía intercambiada, para el proceso combinado de hidrólisis térmica y enzimática.

Corrientes del proceso			
	T° entrada (°C)	T° salida (°C)	Energía (kW)
Corrientes Calientes	100	80	7,7
	80	50	11,7
	50	30	7,8
Corriente fría	20	90	27,2

Tabla 4.11: Corrientes frías y calientes del proceso de hidrólisis enzimática y posterior fermentación a bioetanol a partir de *S. maxima*.

Una vez conocidas cuales son las corrientes fría y caliente del proceso, se dibujan las curvas compuestas. Para ello hay que fijar una variación de temperatura mínima (ΔT_{\min}). Para este proceso se escoge una ΔT_{\min} de 10°C.

La figura correspondiente a las curvas compuestas se encuentra en el Anexo II.

En el proceso de hidrólisis térmica, hidrólisis enzimática y fermentación se recupera energía dentro del proceso de la siguiente forma:

- La corriente a la salida de la segunda hidrólisis enzimática a 50°C se enfría hasta 30°C con la corriente de alimentación a 20°C. Esta corriente se calienta hasta 40°C. El calor intercambiado es 7,7 kW.
- La corriente a la salida de la primera hidrólisis enzimática a 80°C se enfría hasta 50°C con la corriente de alimentación ya calentada hasta 40°C. Esta corriente de alimentación se calienta hasta 70°C. Se intercambian 11,7 kW.
- La corriente a la salida de la hidrólisis térmica a 100°C se enfría hasta 80°C con la corriente de alimentación calentada hasta 70°C. El calor intercambiado es 7,8 kW.

De esta forma las necesidades energéticas disminuyen. La **Tabla 4.12** compara las necesidades energéticas de este proceso con y sin integración energética.



	Sin integración	Con integración	
Calentamiento	39,3	12,1	kW
	3,9	1,2	kW/kg alga
Enfriamiento	72,4	45,2	kW
	7,2	4,5	kW/kg alga
Total	111,7	57,3	kW
	11,2	5,7	kW/kg alga

Tabla 4.12: Comparación de las necesidades energéticas del proceso, con y sin integración energética, de hidrólisis enzimática y fermentación.

Cuando se realiza la recuperación energética dentro de este proceso se recuperan 54,4 kW, es decir, un 49% de las necesidades energéticas globales.

Los balances de materia y energía detallados se encuentran en el Anexo I.

La **Figura 4.8** representa el diagrama de bloques del proceso de hidrólisis térmica y enzimática y posterior fermentación integrado energéticamente.

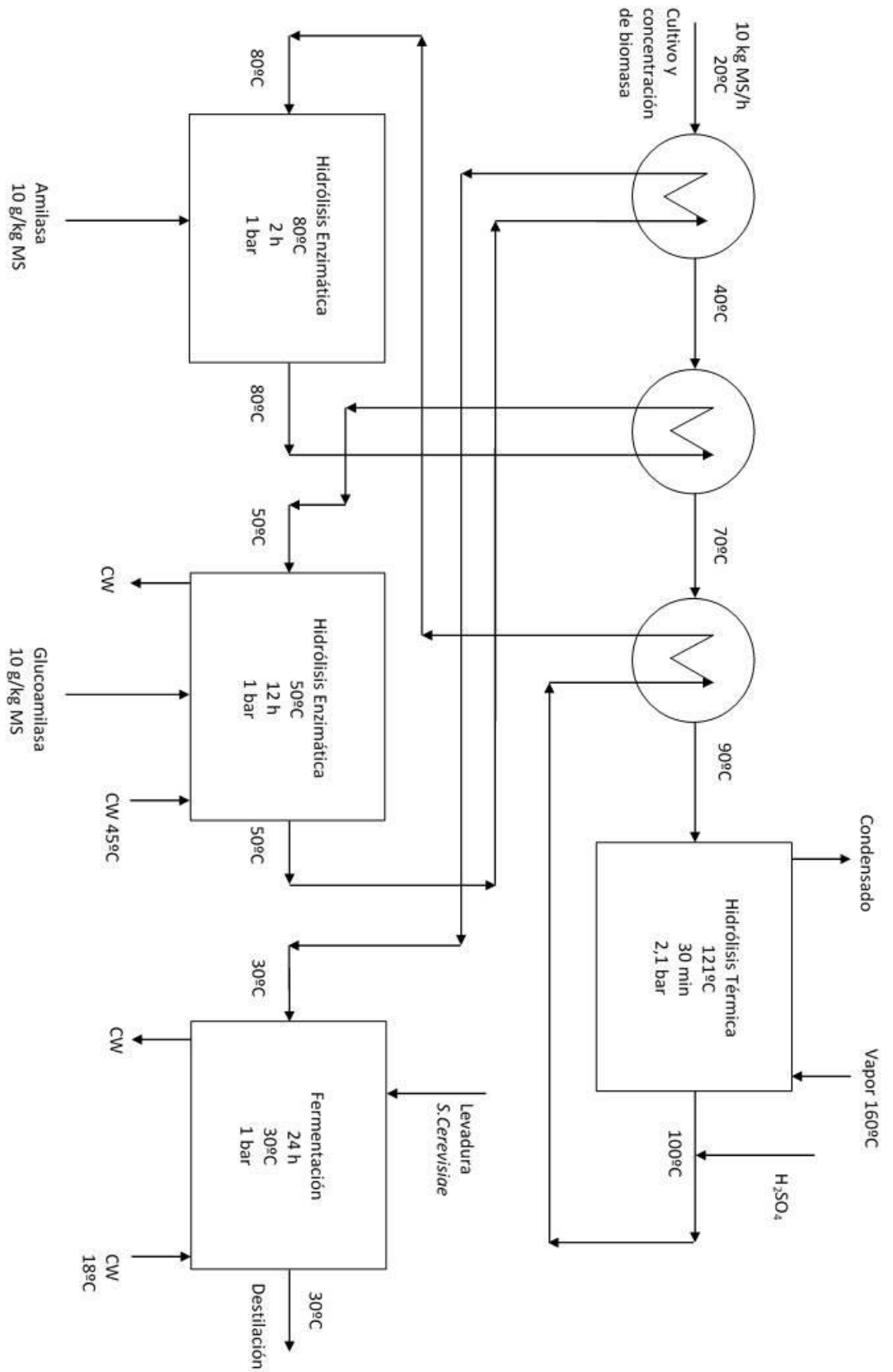


Figura 4.8: Diagrama de bloques del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación de *S. maxima*, integrado energéticamente.

4.5. Comparación global de los procesos.

Para finalizar este apartado, se realiza una comparación entre los tres procesos descritos:

- Hidrólisis ácida (HA) y fermentación con una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 3% w/w.
- Hidrólisis ácida y fermentación con una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 7,5% w/w.
- Hidrólisis térmica (HT), hidrólisis enzimática (HE) y fermentación con una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 3% w/w.

La **Tabla 4.13** compara las principales necesidades energéticas y de consumo de materias primas, así como la cantidad de etanol producido en cada proceso descrito a lo largo del apartado 4.

	HA 3% w/w	HA 7,5% w/w	HT+HE 3% w/w	
Producción etanol	0,24	0,15	0,23	kg/kg alga
	2,0	1,3	2,0	kW EtOH/kg alga
Consumos energéticos	4,8	1,3	5,7	kW/kg alga
	0,39	0,09	0,49	m ³ CW/kg alga
	2,1	0,8	2,1	kg vapor/kg alga
Consumo de agua de cultivo	0,03	0,01	0,03	m ³ /kg alga

Tabla 4.13: Comparación global de las principales necesidades energéticas y de materias primas, así como la cantidad de etanol producido.

A la vista de los resultados, comparando los consumos energéticos de los procesos de hidrólisis ácida con un 3% w/w de biomasa y el proceso combinado de hidrólisis térmica e hidrólisis enzimática, el proceso de hidrólisis ácida requiere menos energía, puesto que en el proceso de hidrólisis enzimática hay un equipo de reacción más que consume energía, el equipo de la segunda hidrólisis enzimática, que requiere potencia de agitación.



Además, el coste de materiales de la hidrólisis ácida es menor que el de la hidrólisis térmica y enzimática debido a que es más barato el ácido sulfúrico comercial que las enzimas utilizadas.

Por otro lado, como ya se comentaba en el apartado 4.3, las necesidades energéticas y de consumo de materias primas para el proceso de hidrólisis ácida y fermentación realizado con 7,5% w/w de biomasa son menores (alrededor de un 60%) debido a que la biomasa está más concentrada. Como se puede observar, aparte de disminuir los consumos, disminuye la producción de etanol (alrededor de un 38%).

Debido a todo lo expuesto en este apartado, el proceso de hidrólisis ácida de *S. maxima* y posterior fermentación a bioetanol es el proceso que muestra mejores rendimientos, tanto económicos, en cuanto a consumos materiales y energéticos como en rendimiento de producción de bioetanol.



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



5. Conclusiones



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



A continuación se presentan las principales conclusiones del presente Trabajo Fin de Grado, en relación con los objetivos inicialmente planteados.

En relación con el cultivo del microalga:

- *Spirulina maxima* resultó ser una cianobacteria que cultivada en estrés de nutrientes, es capaz de acumular una gran cantidad de carbohidratos.
- La reducción de la concentración de fósforo inicial en el medio de cultivo hasta 2 mg/L resultó ser la mejor manera de aumentar los carbohidratos sin disminuir significativamente la concentración de biomasa. Se obtuvo una concentración de biomasa de $1,7 \pm 0,2$ g/L, y una concentración de azúcares del $62 \pm 1\%$ después de 9 días de cultivo de *Spirulina maxima* en un medio con 2 mg/L de fósforo inicial.
- La reducción de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo disminuye la producción de biomasa pero favorece la acumulación de carbohidratos. Para un medio de cultivo deficitario en fósforo y nitrógeno (2 mg/L de P y 200 mg/L de N) se obtuvo una concentración de carbohidratos del $67 \pm 3\%$.

En relación con los ensayos de sacarificación y fermentación:

- Para la hidrólisis ácida y posterior fermentación de la biomasa, las condiciones de operación que arrojaron los mejores resultados fueron: 3% w/w de biomasa seca, 1% v/v de H₂SO₄ y 45 minutos de hidrólisis ácida. Con estas condiciones se obtuvo una concentración de glucosa en el hidrolizado de 19 g/L, recuperación de glucosa (RG) del 100%, concentración de etanol de 7,2 g/L y un rendimiento global del proceso de 240 g_{EtOH}/kg_{MS}.
- Con el proceso de hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 1% v/v y 45 minutos, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de biomasa seca. A medida que aumentaba el porcentaje en peso de la biomasa, la concentración de glucosa y de etanol fueron mayores, pero la recuperación de glucosa y el rendimiento



total del proceso menores en comparación con el proceso llevado a cabo con el 3% w/w de biomasa seca, llegando a obtenerse para el ensayo con 10% w/w una concentración de glucosa en el hidrolizado de 27,1 g/L, RG del 50%, concentración de etanol de 13,6 g/L y un rendimiento global del proceso de 136 g_{EtOH}/kg_{MS}.

- Para los ensayos combinados de hidrólisis térmica e hidrólisis enzimática y posterior fermentación, las condiciones observadas como óptimas fueron: 3% w/w de biomasa seca y 30 min de hidrólisis térmica. Con estas condiciones se consigue una concentración de glucosa en el hidrolizado de 15,7 g/L, RG del 95%, concentración de etanol de 6,9 g/L y un rendimiento global del proceso de 230 g_{EtOH}/kg_{MS}.

Respecto al estudio de las necesidades energéticas y materiales del proceso:

- El proceso de hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 1% v/v durante 45 min y posterior fermentación con *S. cerevisiae* para obtener bioetanol es el proceso más rentable tanto económicamente como energéticamente. Dicho proceso se comparó para una concentración de *S. maxima* del 3% w/w y del 7,5% w/w. En el primer caso el requerimiento fue de 4,8 kW/kg alga mientras que en el segundo caso se consume 1,3 kW/kg alga, un 73% menos de energía por cada kg de alga.
- La única opción económicamente viable es trabajar con altas concentraciones de biomasa (7,5% w/w) porque se reduce considerablemente los consumos energéticos. Para ello habría que optimizar las condiciones de hidrólisis y fermentación para aumentar los rendimientos y conseguir caldos de fermentación concentrados.



6. *Bibliografía*



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



- [1] Manahan S.E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. Ed. Reverté, México.
- [2] Rühl, C. BP statistical review of world energy 2014. Disponible en: http://www.bp.com/content/dam/bp-country/es_es/downloads/PDF/StatisticalReview2014.pdf [Última consulta: 10.03.2016].
- [3] Los biocombustibles a partir de microalgas. Portal de energías renovables. (2013). Disponible en: <http://www.sitiosolar.com/los-biocombustibles-de-microalgas/>. [Última consulta: 12.03.2016].
- [4] Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Energías renovables. Disponible en: <http://www.idae.es/index.php/idpag.16/reلمenu.301/mod.pags/mem.detalle>. [Última consulta: 20.04.2016].
- [5] Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A. & Badillo-Corona, J.A. (2012). *Producción de biocombustibles a partir de microalgas*. Revista Ra Ximhai, 8(3), 101-115.
- [6] Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Energía de la biomasa. (2007). Disponible en: http://dl.idae.es/Publicaciones/10374_Energia_de_la_biomasa_A2007.pdf. [Última consulta: 20.04.2016].
- [7] Unified Bioenergy Terminology. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/j4504e/j4504e00.pdf> [Última consulta: 14.03.2016].
- [8] Zeriuoh, O. (2013). *Diseño de una biorrefinería de microalgas a nivel planta piloto*. Proyecto Fin de Carrera, Escuela Politécnica Superior. España.
- [9] Energías renovables. Tipos de biocombustibles. Disponible en: <http://www.energiasrenovablesinfo.com/biomasa/tipos-biocombustibles/>. [Última consulta: 04.04.2016].
- [10] Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). *Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2), 578-597.
- [11] Agencia Andaluza de la Energía. Biocombustibles. Disponible en: <https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/ciudadania/biocarbura ntes>. [Última consulta: 06.04.2016].



- [12] Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- [13] Garibay Hernandez, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez Saavedra, M. del P., Serrano Carreón, L., & Martínez Jiménez, A. (2009). *Biodiesel a partir de microalgas*. *Revista BioTecnología*, 13(3).
- [14] Tomaselli, L. (2008). *The microalgal cell. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ed. John Wiley & Sons, NY.
- [15] Richmond, A. (2008). *Biological principals of mass cultivation. The microalgal cell. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ed. John Wiley & Sons, NY.
- [16] Acién-Fernández, G., Fernández, J. M., Magán, J. J., & Molina, E. (2012). *Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it*. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1344-1353.
- [17] Kovacevic, V., & Wesseler, J. (2010). *Cost-effectiveness analysis of algae energy production in the EU*. *Energy Policy*, 38(10), 5749-5757.
- [18] Chisti, Y., (2008). *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. *Trends in Biotechnology*, 26 (3), 126-131.
- [19] Ho, S. H., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). *Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N*. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.
- [20] Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A., & Giacometti, G. M. (2012). *Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of Chlorella protothecoides and Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523-529.
- [21] Bennett, M. C., Turn, S. Q., & Chan, W. Y. (2014). *A methodology to assess open pond, phototrophic, algae production potential: A Hawaii case study*. *Biomass and Bioenergy*, 66, 168-175.
- [22] Dragone, G., Fernández, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011). *Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae*. *Applied Energy*, 88(10), 3331-3335.



- [23] Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., & Thajuddin, N. (2012). *Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production*. *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.
- [24] Melis, A. (2002). *Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1217-1228.
- [25] Gravilescu, M., & Chisti, Y. (2005). *Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry*. *Biotechnology Advances*, 23(7), 471-499.
- [26] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). *Commercial applications of microalgae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- [27] Becker, E. W. (2007). *Micro-algae as a source of protein*. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207-210.
- [28] Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). *Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable*. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409-416.
- [29] Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). *Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions*. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542.
- [30] Xin, L., Hong-Ying, H., & Yu-Ping, Z. (2011). *Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. Under different cultivation temperature*. *Bioresource Technology*, 102(3), 3098-3102.
- [31] Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). *Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock*. *Bioresource Technology*, 135, 191-198.
- [32] Stratta, J. (2000). *Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel*.



- [33] Valverde María, E., & Olalde Portugal, V. (2009). *Rutas, procesos y microorganismos implicados en la producción de biocombustibles*. *Concyteg*, 4(52), 1216-1233.
- [34] Metanol (combustible). Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Metanol_\(combustible\)#Biometanol](https://es.wikipedia.org/wiki/Metanol_(combustible)#Biometanol). [Última consulta: 05.05.2016].
- [35] Gupta, V., Ratha, S.K., Soobj, A., Chaudharya, V. & Prasanna, R. (2013). *New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae). Prospects and challenges*. *Algal Research*, 2, 79–97.
- [36] Ficha Internacional de Seguridad Química. Etanol (anhidro). Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/Oa100/nspn0044.pdf>. [Última consulta: 25.03.2016].
- [37] Brennan, L., & Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- [38] Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037-1047.
- [39] Kim, J. K., Um, B. H., & Kim, T. H. (2012). *Bioethanol production from micro-algae, Schizocytrium sp., using hydrothermal treatment and biological conversion*. *Korean journal of Chemical Engineering*, 29(2), 209-214.
- [40] Bellido, C., Pinto, M. L., Coca, M., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2014). *Acetone–butanol–ethanol (ABE) production by Clostridium beijerinckii from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates*. *Bioresource Technology*, 167, 198-205.
- [41] Cheryl, O. (2010) *Algae becoming the new biofuel of choice*. Disponible en: <http://duelingfuels.com/biofuels/non-food-biofuels/algaebiofuel.php#more-115N>. [Última consulta: 15.04.2015].



- [42] John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). *Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol*. *Bioresource Technology*, 102(1), 186-193.
- [43] Huber, C. (2007). *Biología marina*. Ed. McGraw-Hill, España.
- [44] Harun, R., Danquah, M.K., & Forde, G.M. (2009). *Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production*. *Journal of Chem. Tech and Biotechnology*, 85, 199-203.
- [45] Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T. & Danquah, M.K. (2011), *Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production*. *Applied Energy*, 88, 3464–3467.
- [46] Harun, R., & Danquah, M.K. (2011). *Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production*. *Process Biochemistry*, 46, 304-309.
- [47] Harun, R., Danquah, M.K. (2011). *Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production*. *Chemical Engineering Journal* 166, 1079-1084.
- [48] Miranda, J. R., Passarinho, P. C., & Gouveia, L. (2012). *Pre-treatment optimization of Scenedesmus obliquus microalga for bioethanol production*. *Bioresource Technology*, 104, 342-348.
- [49] 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*, 48, 56-65.
- [50] Rodrigues, M.A. & Pinto da Silva Bon, E. (2011). *Evaluation of Chlorella (Chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars via CellWall Enzymatic Hydrolysis Enzyme*. Disponible EN: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/405603>. [Última consulta: 22.04.2016].
- [51] Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). *Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*, 6, 3937-3950.
- [52] Eshaq, F.S., Ali, M.N. & Mohd, M.K. (2010). *Spirogyra biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) Production*. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(12), 7045-7054.



- [53] Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M.C. (2015), *Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production*. Chemical Engineering Journal, 262, 939–945.
- [54] Sujatha, K. & Nagajaran, P., (2013). *Optimization of growth conditions for carotenoid production from Spirulina platensis*. International Journal of Microbiology and Applied Sciences, 2, 325-328.
- [55] Margalef, R. (1983). *Limnología*. Ed. Omega, España.
- [56] Markou, G., Chatzipavlidis, I. & Georgakakis, D. (2012). *Carbohydrates Production and Bio-flocculation Characteristics in Cultures of Arthrospira (Spirulina) platensis: Improvements Trough Phosphorus Limitation Process Bioenerg. Resources*, 5, 915–925.
- [57] González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). *Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation*. Elsevier Biotechnology Advances Journal, 30, 1655-1661.
- [58] Olguín J.E, Galicia S., Angulo-Guerrero, O. & Hernández, E. (2001). *The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of Spirulina sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste*. Bioresource Technology, 77, 19-24.
- [59] Wingren, A., Galbe, M., & Zacchi, G. (2003). *Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks*. Biotechnology Progress, 19(4), 1109-1117.
- [60] Harun, R., Yip, J. W., Thiruvankadam, S., Ghani, W. A., Cherrington, T., & Danquah, M. K. (2014). *Algal biomass conversion to bioethanol a step-by-step assessment*. Biotechnology Journal, 9(1), 73-86.
- [61] Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., & Bogel-Lukasik, R. (2010). *Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A review*. Bioresource Technology, 101, 4775-4800.
- [62] Hidrólisis enzimática. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Hidr%C3%B3lisis_enzim%C3%A1tica. [Última consulta: 07.05.2016].



- [63] Novozymes. Application Sheet. Disponible en: http://bioenergy.novozymes.com/en/starch-based-ethanol/our-solutions/Documents/Spirizyme%20Excel%20application%20sheet_Final_29June2010.pdf. [Última consulta: 02.04.2016].
- [64] Novozymes. Liquozymes SC DS. Disponible en: <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/starch-based-ethanol/our-solutions/Documents/Liquozyme%20SC%20DS%20benefit%20sheet.pdf>. [Última consulta: 02.04.2016].
- [65] Novozymes, Spirizyme Fuel. Disponible en: <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/starch-based-ethanol/our-solutions/Documents/Spirizyme%20Fuel%20benefit%20sheet.pdf>. [Última consulta: 02.04.2016].
- [66] Halim, R., Harun, R., Danquah, M.-K., & Webley P.A. (2012). *Microalgal cell disruption for biofuel development*. Applied Energy, 91, 116–121.
- [67] Cruz González, M., Hurtado Arroyo, G. B., Terán Landa, A. S., & Tomas Cabrera, K. V. *Rapidez de fermentación por Saccharomyces cerevisiae de algunos tipos de glúcidos*.
- [68] Choi, S. P., Nguyen, M. T., & Sim, S. J. (2010). *Enzymatic pretreatment of Chlamydomonas reinhardtii biomass for ethanol production*. Bioresource Technology, 101(14), 5330-5336.
- [69] Pedraza, G. X. (1989). *Cultivo de Spirulina máxima para suplementación proteica*. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/lrrd/lrrd1/1/gloria.htm>. [Última consulta: 03.05.2016].
- [70] Barra Galárraga, R. F. (2010). *Diseño de un fotobiorreactor industrial para cultivo de Spirulina (Arthrospira platensis)*. Tesis de Grado, Escuela superior politécnica del litoral. Ecuador.
- [71] Zhen-yuan, N., Jin-lan, X., & Levert, J. (2002). *Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium Spirulina (Arthrospira) maxima in nitrogen-limited batch culture*. Journal CSUT, 9(2), 81-86.



- [72] El-Bestawya, E., Bellingera, E., & Sigea, D. (1996). "*Elemental composition of phytoplankton in a subtropical lake: X-ray microanalytical studies on the dominant algae Spirulina platensis (Cyanophyta) and Cyclotella meneghiniana (Bacillariophyceae)*". *European Journal of Phycology*, 31, 157-166.
- [73] Rocha Trejo, J. E. (2011). *Producción de biocombustibles utilizando Spirulina sp. como fuente de carbono*. Master Thesis, Universidad autónoma de Nuevo León. México.
- [74] BioOils energy. (2013). *Biocarburantes: definición y tipos*. Disponible en: <http://myslide.es/documents/biocarburantes-definicion-y-tipos.html>. [Última consulta: 20.05.2016].
- [75] González López, C.V., del Carmen, M., García, C., Acién Fernández, F.G., Segovia, Bustos, C., Chisti, Y., & Fernández Sevilla, J.M. (2010). *Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass*. *Bioresource Technology*, 101, 7587-7591
- [76] Díaz, M. (2012). *Ingeniería de Bioprocesos*. Ed. Paraninfo. España



7. Anexos



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

7.1. Anexo I: Balances de materia y de energía

A continuación, se muestran los resultados tabulados de los balances de materia de cada uno de los procesos descritos en el apartado 4.3 y 4.4. Estos procesos son:

- Hidrólisis ácida 3% w/w
- Hidrólisis ácida 7,5% w/w
- Hidrólisis enzimática 3% w/w

La **Tabla 7.1** recoge los balances de materia para el proceso de hidrólisis ácida al 1% v/v de H₂SO₄, 3% w/w de biomasa seca durante 45 min.

	1	2	3	4	5
T (°C)	20	90	100	30	30
P (bar)	1	1	1	1	1
Alga (kg/h)	10	10	10	10	10
Agua (kg/h)	317,4	317,4	317,4	317,4	317,4
Agua(m ³ /h)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
H ₂ SO ₄ (kg/h)	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
H ₂ SO ₄ (m ³ /h)	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Total (kg/h)	333,3	333,3	333,3	333,3	333,3
Glucosa (g/L)	0,0	0,0	19,0	19,0	0,0
Glucosa (g/kgMS)	0,0	0,0	633,3	633,3	0,0
EtOH (g/L)	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2
EtOH (g/kgMS)	0,0	0,0	0,0	0,0	240,0

Tabla 7.1: Balance de materia del proceso de hidrólisis ácida con un 3% w/w de biomasa seca.

Los balances de materia para el otro proceso de hidrólisis ácida (7,5% w/w) se muestran en la **Tabla 7.2**.



	1	2	3	4	5
T (°C)	20	90	100	30	30
P (bar)	1	1	1	1	1
Alga (kg/h)	10	10	10	10	10
Agua (kg/h)	121,1	121,1	121,1	121,1	121,1
Agua(m ³ /h)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H ₂ SO ₄ (kg/h)	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
H ₂ SO ₄ (m ³ /h)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Total (kg/h)	133,3	133,3	133,3	133,3	133,3
Glucosa (g/L)	0,0	0,0	21,5	21,5	0,0
Glucosa (g/kgMS)	0,0	0,0	286,7	286,7	0,0
EtOH (g/L)	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1
EtOH (g/kgMS)	0,0	0,0	0,0	0,0	148,0

Tabla 7.2: Balance de materia del proceso de hidrólisis ácida con un 7,5% w/w de biomasa seca.

Por último, la **Tabla 7.3** recoge los datos del balance de materia para la hidrólisis térmica durante 30 min e hidrólisis enzimática realizada con un 3% w/w de biomasa seca.

	1	2	3	4	5
T (°C)	20	90	100	80	80
P (bar)	1	1	1	1	1
Alga (kg/h)	10	10	10	10	10
Agua (kg/h)	323,3	323,3	323,3	323,3	323,3
Agua(m ³ /h)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Total (kg/h)	333,3	333,3	333,3	333,3	333,3
Glucosa (g/L)	0,0	0,0	15,7	15,7	-
Glucosa (g/kgMS)	0,0	0,0	523,3	523,3	-
EtOH (g/L)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
EtOH (g/kgMS)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 7.3 (A): Balance de materia del proceso de hidrólisis enzimática con un 3% w/w de biomasa seca.

	6	7	8	9
T (°C)	50	50	30	30
P (bar)	1	1	1	1
Alga (kg/h)	10	10	10	10
Agua (kg/h)	323,3	323,3	323,3	323,3
Agua(m ³ /h)	0,3	0,3	0,3	0,3
Total (kg/h)	333,3	333,3	333,3	333,3
Glucosa (g/L)	-	-	-	0,0
Glucosa (g/kgMS)	-	-	-	0,0
EtOH (g/L)	0,0	0,0	0,0	6,9
EtOH (g/kgMS)	0,0	0,0	0,0	230,0

Tabla 7.3 (B): Balance de materia del proceso de hidrólisis enzimática con un 3% w/w de biomasa seca.

También se muestran a continuación las ecuaciones utilizadas para calcular las necesidades energéticas y de consumo de cada proceso.

Para conocer la potencia calorífica que se intercambia en cada intercambiador se utiliza la siguiente ecuación de calor:

$$Q = \dot{m}_{ds} \cdot C_p \cdot \Delta T$$

Donde Q es el calor intercambiado expresado en kW, \dot{m}_{ds} es el flujo másico total de la alimentación expresado en kg/s, C_p es la capacidad calorífica de la corriente expresada en kJ/kgK y ΔT es la variación de temperatura entre la salida y la entrada del intercambiador.

El equipo de hidrólisis ácida, tiene que calentar la corriente desde 90°C hasta 121°C y mantener la temperatura durante 45 min. Por el encamisado del equipo circula vapor saturado a 160°C que se encarga de aportar el calor necesario para el funcionamiento del equipo.

Para calcular el calor del equipo de hidrólisis ácida, se utiliza la siguiente ecuación:



$$Q = \dot{m}_{ds} \cdot (h_{121^{\circ}C} - h_{90^{\circ}C}) = \dot{m}_{vap} \cdot \lambda_{vap}$$

Donde Q es el calor intercambiado expresado en kW, \dot{m}_{ds} es el flujo másico total de la alimentación expresado en kg/s, $h_{121^{\circ}C}$ es la entalpía de la disolución a 121°C y $h_{90^{\circ}C}$ es la entalpía de la disolución a 90°C, ambas expresadas en kJ/kg; \dot{m}_{vap} es el flujo másico total de vapor sobrecalentado a 160°C en kg/s y λ_{vap} es el calor latente del vapor expresado en kJ/kg.

Para la hidrólisis ácida con 3% w/w los resultados son:

$$Q = 12,1 \text{ kW}$$

$$\dot{m}_{vap} = 21 \text{ kg}_{vap}/h$$

En la hidrólisis ácida con un 7% w/w de biomasa seca, el flujo total de la alimentación es menor, por lo que las necesidades energéticas son menores, como ya se ha comentado en el apartado 4.3. Los resultados para este proceso de hidrólisis son:

$$Q = 4,9 \text{ kW}$$

$$\dot{m}_{vap} = 8,4 \text{ kg}_{vap}/h$$

El equipo de hidrólisis térmica trabaja exactamente igual que el equipo de hidrólisis ácida. Este equipo tiene que calentar la corriente desde 90°C hasta 121°C y mantener la temperatura durante 30 min. Por el encamisado del equipo circula vapor saturado a 160°C.

La ecuación para calcular el calor que se necesita retirar del equipo y el flujo de vapor saturado necesario es la misma que para el equipo de hidrólisis ácida.

$$Q = \dot{m}_{ds} \cdot (h_{121^{\circ}C} - h_{90^{\circ}C}) = \dot{m}_{vap} \cdot \lambda_{vap}$$



Los resultados del proceso de hidrólisis térmica durante 30 min son:

$$Q = 12,1 \text{ kW}$$

$$m_{vap} = 21 \text{ kg}_{vap}/h$$

La primera hidrólisis enzimática se realiza en un biorreactor adiabático, por lo que no se necesita calcular ningún calor. La segunda hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un biorreactor durante 12 horas. Este biorreactor tiene que estar agitado mecánicamente, por lo que se utilizan dos agitadores. Se necesita calcular la cantidad de calor que proporcionan dicho agitadores, para calcular la temperatura a la que tiene que estar el fluido que circula por el encamisado.

Para calcular este calor se utiliza la siguiente ecuación:

$$Q_{agi} = Q_{inter}$$

$$N_{agi} \cdot P_{Agi} = U \cdot S \cdot \Delta T$$

Donde N_{agi} es el número de agitadores, P_{agi} es la potencia de cada agitador expresada en kW, U es el coeficiente global de transferencia de calor en kW/m²°C, S es la superficie de intercambio de calor en m² y ΔT es la variación de temperatura entre el interior del biorreactor y el encamisado, ya que ambos fluidos se tiene que mantener a temperatura constante.

Para calcular la potencia de agitación se utiliza la siguiente ecuación:

$$P_{agi} = Np \cdot \rho \cdot Na^3 \cdot Da^5$$

Donde Np es el número de potencia, ρ es la densidad de la disolución en kg/m³, Na son las rpm del agitador y Da el diámetro del agitador en m.



El flujo de agua que circula por el encamisado tiene una temperatura constante, pero para poder calcular este flujo se supone una ΔT de 8°C.

Los resultados de la segunda hidrólisis enzimática son:

$$V_{\text{equipo}} = 4,0 \text{ m}^3$$

$$Q = 9,4 \text{ kW}$$

$$\Delta T = 5^\circ\text{C}$$

$$m_{AR} = 1010,9 \text{ kg}_{AR}/h$$

La etapa de fermentación es igual en los tres procesos, por lo que la ecuación utilizada es la misma. Esta ecuación es:

$$q_{\text{met}} + q_{\text{agi}} + q_{\text{gas}} = q_{\text{inter}} + q_{\text{evapo}} + q_{\text{sen}} + q_{\text{acc}}$$

Donde q_{met} es el calor producido por el crecimiento y mantenimiento celular, q_{agi} es la potencia de agitación, q_{gas} es el calor producido por aireación, q_{inter} es el calor intercambiado con el medio, q_{evapo} es el calor por pérdidas de evaporación, q_{sen} es el calor sensible y q_{acc} es el calor por acumulación.

q_{gas} , q_{evapo} , q_{sen} , q_{acc} se consideran cero o despreciables.

Entonces la ecuación a utilizar es la siguiente:

$$q_{\text{met}} + q_{\text{agi}} = q_{\text{inter}}$$

El calor de agitación y de intercambio con el medio, se calculan igual que en el equipo de la segunda hidrólisis enzimática. El calor de crecimiento y acumulación (q_{met}) se calcula a partir de:



$$q_{met} = \frac{V_{reac} \cdot \mu \cdot X}{Y_A}$$

Donde V_{reac} es el volumen de reacción, μ es la velocidad específica de crecimiento (s^{-1}), X es la concentración de biomasa ($kg \text{ células } / m^3$) y Y_A es el coeficiente de generación de calor (kg_{cel}/kJ).

El flujo de agua que circula por el encamisado tiene una temperatura constante, pero para poder calcular este flujo se supone una ΔT de $8^\circ C$.

Para la hidrólisis ácida con 3% w/w los resultados son:

$$V_{equipo} = 8,4 m^3$$

$$q_{met} = 4,3 kW$$

$$q_{agi} = 31,6 kW$$

$$q_{inter} = 35,9 kW$$

$$\Delta T = 12^\circ C$$

$$\dot{m}_{AR} = 3868,5 kg_{AR}/h$$

Para la hidrólisis ácida con 7,5% w/w los resultados son:

$$V_{equipo} = 3,3 m^3$$

$$q_{met} = 1,7 kW$$

$$q_{agi} = 6,6 kW$$

$$q_{inter} = 8,3 kW$$

$$\Delta T = 5^\circ C$$

$$\dot{m}_{AR} = 897,6 kg_{AR}/h$$



Para la hidrólisis enzimática con 3% w/w los resultados son:

$$V_{\text{equipo}} = 8,1 \text{ m}^3$$

$$q_{\text{met}} = 4,1 \text{ kW}$$

$$q_{\text{agi}} = 31,6 \text{ kW}$$

$$q_{\text{inter}} = 35,7 \text{ kW}$$

$$\Delta T = 12^\circ\text{C}$$

$$\dot{m}_{AR} = 3851,2 \text{ kg}_{AR}/\text{h}$$

7.2. Anexo II: Integración energética

Para realizar la recuperación de energía dentro del proceso se identifican las corrientes frías y calientes del proceso, la energía que consumen estas corrientes tanto para enfriarlas como para calentarlas y se dibujan las curvas compuestas para conocer cómo integrar los equipos dentro del proceso.

Para el proceso de hidrólisis ácida, la **Tabla 7.4** recoge las corrientes frías y calientes y la energía intercambiada, para el proceso correspondiente a un 3% w/w de biomasa seca y para el proceso realizado con un 7,5% w/w de biomasa seca.

Corrientes del proceso		3% w/w	7,5% w/w
	T° entrada (°C)	T° salida (°C)	Energía (kW)
Corriente caliente	100	30	27,2
Corriente fría	20	90	10,9

Tabla 7.4: Corrientes frías y calientes del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación a bioetanol a partir de *S. maxima*.

Una vez conocidas cuales son las corrientes fría y caliente del proceso, se dibujan las curvas compuestas. Para ello hay que fijar una variación de temperatura mínima (ΔT_{\min}). Para este proceso se escoge una ΔT_{\min} de 10°C.

La **Figura 7.1** representa las curvas compuestas del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación para una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 3% w/w.

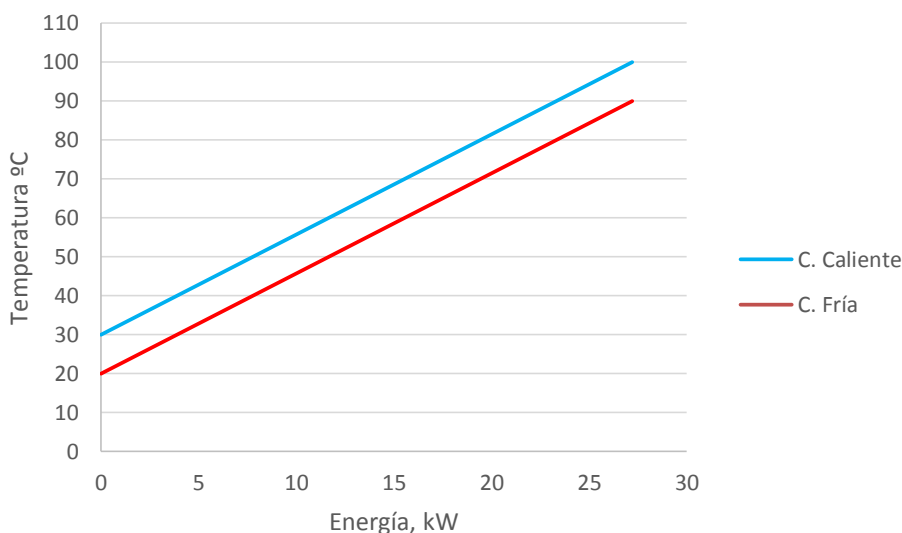


Figura 7.1: Curvas compuestas del proceso de hidrólisis ácida (1% v/v H_2SO_4) y fermentación para una concentración de *S.maxima* del 3% w/w.

No se representan las curvas compuestas del proceso de hidrólisis ácida y posterior fermentación para una concentración de biomasa en la corriente de alimentación del 7,5% w/w, porque la figura es igual que la figura 4.7, lo único que cambia es que en el proceso con 7,5% w/w la cantidad de energía intercambiada es 10,9 kW en vez de 27,2 kW.

Para el proceso combinado de hidrólisis térmica e hidrólisis enzimática y posterior fermentación, la recuperación de energía se realiza igual.

La **Tabla 7.5** recoge las corrientes frías y calientes y la energía intercambiada, para el proceso combinado de hidrólisis térmica y enzimática.

Corrientes del proceso			
	T° entrada (°C)	T° salida (°C)	Energía (kW)
Corrientes Calientes	100	80	7,7
	80	50	11,7
	50	30	7,8
Corriente fría	20	90	27,2

Tabla 7.5: Corrientes frías y calientes del proceso de hidrólisis enzimática y posterior fermentación a bioetanol a partir de *S. maxima*.

Una vez conocidas cuales son las corrientes fría y caliente del proceso, se realizan las curvas compuestas. Para ello hay que fijar una variación de temperatura mínima (ΔT_{\min}). Para este proceso se escoge una ΔT_{\min} de 10°C.

La Figura 7.2 representa las curvas compuestas del proceso de hidrólisis térmica, hidrólisis enzimática y posterior fermentación.

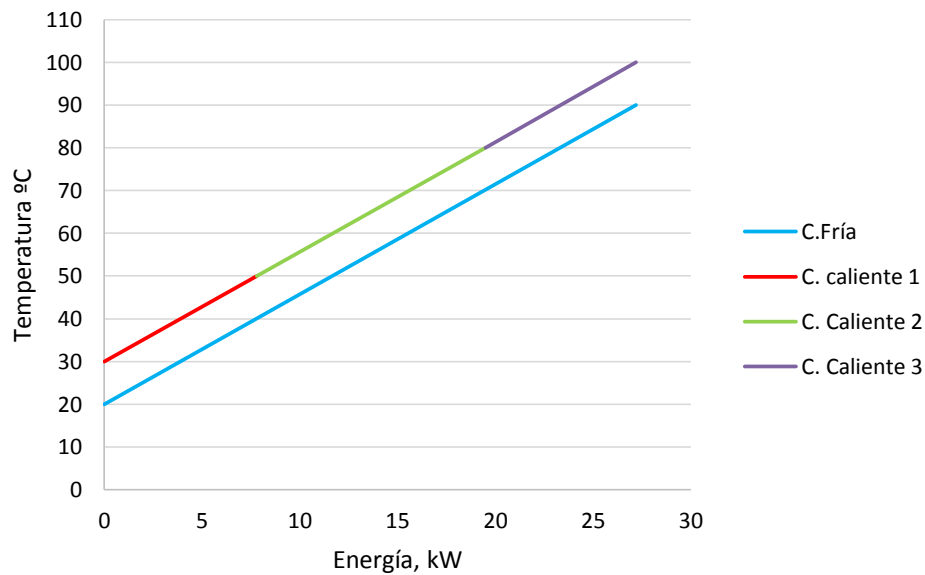


Figura 7.2: Curvas compuestas del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación para una concentración de *S.maxima* del 3% w/w.



Universidad de Valladolid

Grado en Ingeniería Química



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES