



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Máster en Ingeniería Ambiental**

**Estudio del Efecto del Pretratamiento Básico con  
Peróxido de Hidrógeno en la Liberación de  
Azúcares de Microalgas**

**Autor:**

**Castaño Ojero, Lucía**

**Tutor:**

**Bolado Rodríguez, Silvia**

**Martín Juárez, Judit**

**Departamento Ingeniería Química y  
Tecnología del Medio Ambiente**

**Valladolid, julio de 2015.**

SILVIA BOLADO RODRÍGUEZ, profesora del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid y

JUDIT MARTÍN JUÁREZ, doctorando del programa de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad de Valladolid

INFORMAN:

Que D. LUCÍA CASTAÑO OJERO ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado **Estudio del Efecto del Pretratamiento Básico con Peróxido de Hidrógeno en la Liberación de Azúcares de Microalgas**

Valladolid, *día*---- de *JULIO* de 2015

Fdo. Silvia Bolado Rodríguez

Judit Martín Juárez

Reunido el Tribunal designado por el Comité Académico del Master en Ingeniería Ambiental, para la evaluación de Trabajos Fin de Master, y después de estudiar la memoria y atender a la defensa del trabajo “**Estudio del Efecto del Pretratamiento Básico con Peróxido de Hidrógeno en la Liberación de Azúcares de Microalgas**”, presentado por el alumno D. *Lucía Castaño Ojero* decidió otorgarle la calificación de \_\_\_\_\_.

Valladolid, *día* ----de Julio de 2015

El Presidente

El Secretario

Fdo.:

Fdo.:

Vocal

Fdo.:

## Índice

<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Palabras clave:</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	11
<b>2.1. Microalgas</b> .....	11
<b>2.2. Pretratamiento para la extracción de azúcares</b> .....	12
<b>2.3. Hidrólisis enzimática</b> .....	12
<b>2.4. Métodos analíticos</b> .....	12
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	14
<b>3.1. Pretratamiento</b> .....	15
<b>3.2. Hidrólisis enzimática</b> .....	23
<b>4. Conclusiones</b> .....	27
<b>5. Bibliografía</b> .....	28

## **Resumen**

El trabajo estudia la valorización de biomasa algal procedente de un tratamiento de aguas residuales domésticas, mediante su transformación en biocombustibles. Se consiguen así dos objetivos medioambientales, el tratamiento de aguas residuales mediante una tecnología limpia y el aprovechamiento de los residuos generados para obtener biocombustibles, que sustituyan a los combustibles fósiles. El estudio se centra en la producción de alcoholes a partir de la fracción de hidratos de carbono existente en la biomasa algal. Para obtener azúcares sencillos fermentables, es necesario aplicar un pretratamiento que rompa la estructura de las microalgas y facilite la acción de las enzimas en la posterior etapa de hidrólisis. En este trabajo, se lleva a cabo un tipo de pretratamiento como es el peróxido de hidrógeno, el cual ha sido estudiado para materiales lignocelulósicos dando lugar a unos buenos resultados. Se ha ensayado el pretratamiento con microalga liofilizada y con microalga reconstituida trabajando con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el rango 1%, 2,5%, 5% y 7,5%, pH 11,5; 50°C, 120 rpm, 60 min, 5% de microalgas (base seca).

## **Abstract**

These work studies the valuation of algal biomass from a domestic wastewater treatment, for transformation into biofuels. Two environmental objectives are achieved, the treatment of waste water by clean technology and utilization of waste generated to produce biofuels to replace fossil fuels. The study is focused on the production of alcohols from the carbohydrate fraction in the algal biomass. For obtaining simple fermentable sugars, it is necessary to apply a pretreatment to break the structure of microalgae and facilitate the action of enzymes in the subsequent hydrolysis step. In this paper, it is carried out a pretreatment with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which has been studied for lignocellulosic materials resulting in good results. Pretreatment was tested with microalga lyophilized and reconstituted microalga working with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the range 1%, 2,5%, 5% and 7,5%, , pH 11.5; 50 ° C, 120 rpm, 60 min, 5% of microalgae (dry basis).

## **Palabras clave:**

Microalga, biocombustible, pretratamiento, peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), rendimiento, azúcares.

## **1. Introducción**

En la actualidad, el cambio climático y el rápido agotamiento de los combustibles fósiles está haciendo que aumente la preocupación y concienciación social por el medio ambiente de forma que los gobiernos, políticos, científicos e investigadores están buscando alternativas para conseguir una energía limpia, renovable y sostenible, como la proporcionada por los biocombustibles (Alam F. et al, 2012; Ghayal M.S. y Pandya M.T., 2013; Batista A.P. et al, 2014).

El Plan de Energías Renovables (PER) 2011-2020 de España cita que según los escenarios elaborados por la Agencia Internacional de la Energía (AIE) para el año 2035, la demanda energética aumentará un tercio, sobre todo en países que no son miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la mayoría de ellos en vías de desarrollo. Según la AIE, esta demanda, se concentrará en el sector de los transportes, demandando 99 millones de barriles diarios en 2035, frente a los 87 millones en 2010. Por otro lado, se prevé que el uso de los combustibles fósiles disminuya del 81% en el año 2010 al 75% en el 2035. Se estima que la producción de petróleo convencional disminuya hasta los 68 millones de barriles diarios en 2035, por lo que será necesario la producción de biocombustibles como fuentes alternativas. (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, 2011).

Centrándonos en la producción de biocombustibles como fuente alternativa de energía limpia y renovable, es importante conocer que existen tres categorías de biocombustibles dependiendo de la materia prima que se utilice para su generación y según se han ido produciendo en la historia.

En primer lugar, se produjeron biocombustibles a partir de biomasa vegetal y animal (patata, maíz, palma, grasa animal...) los cuales competían con la producción de alimento debido a la necesidad de grandes superficies de cultivo, de forma que no son sostenibles ambiental y socialmente. Más tarde se generaron a partir de residuos y materiales lignocelulósicos (paja, bagazo, etc.) los cuales necesitan pretratamientos costosos para romper la lignina, y por último, a partir de biomasa algal (Maity J.P. et al, 2014; Daroch M. et al, 2013).

Aunque las microalgas se consideren novedosas porque su investigación está en auge, estas ya fueron utilizadas en la Segunda Guerra Mundial por científicos alemanes quienes comenzaron a cultivarlas masivamente para obtener nutrientes de ellas (González de Chabbarri E. et al, 1992). Más tarde, en la década de los 70 se investigó de forma más intensa la producción de biocombustibles (Passos F. et al, 2014), momento en el que hubo una crisis energética que

ayudó a concienciar socialmente a la población con la protección del ecosistema global (Ghayal M.S. y Pandya M.T., 2013).

Las microalgas son un recurso interesante que tiene muchas ventajas frente a otros recursos renovables, como se puede observar en la siguiente tabla resumen (Chen C.Y. et al, 2013; Castro Y.A. et al, 2015; Alam F. et al, 2012; Hernández D. et al, 2015; Maity J.P. et al, 2014).

Tabla 1: Ventajas de las microalgas

<b>Ventajas</b>
- No necesitan amplias superficies de cultivo.
- No necesitan aguas limpias.
- Tienen una alta tasa de crecimiento y un alto rendimiento por área de cultivo (de 1 a 10 días dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo) comparando con otros recursos renovables como maíz, paja, etc.
- Tienen una alta tasa fotosintética y bajas demandas biológicas, de forma que son capaces de transformar la energía solar en productos de almacenamiento de carbono, acumular lípidos y triglicéridos.
- Son capaces de fijar carbono por lo que mitigan las emisiones de CO <sub>2</sub> y gases de efecto invernadero.
- Son eficientes para eliminar fósforo, nitrógeno, potasio, nitritos, entre otros, y son capaces de acumular metales pesados y compuestos tóxicos orgánicos, por lo que son importantes para la depuración de aguas residuales.
- Resisten a altas dosis de radiación ultra violeta (UVA).

Fuente: Elaboración propia

Actualmente, son múltiples los usos y las aplicaciones de las microalgas en nuestra sociedad, se utilizan con fines energéticos (biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrógeno, producción de calor y de electricidad), en acuicultura, alimentación animal (peces, rumiantes, cerdos, aves...), para la producción de biofertilizantes, y en la depuración de aguas residuales (Santos A.M. et al, 2014; González de Chabbarri E. et al, 1992). Las algas específicamente crecidas con ese fin pueden generar productos de alto valor añadido que se emplean en nutrición, cosmética y farmacia. Estas aplicaciones, muy rentables económicamente no son posibles en algas crecidas durante el tratamiento de aguas residuales, como las empleadas en este trabajo.

Dependiendo de la fracción que se utilice de las microalgas, se pueden obtener diferentes subproductos, las proteínas pueden valorizarse como alimentación animal o fertilizante para el

campo, a partir de los lípidos se puede obtener biodiesel y de la fracción carbohidratos se pueden obtener alcoholes. En la actualidad, el bioetanol constituye el 85% de los combustibles a nivel mundial (García-Cuadra F. et al 2012), de forma que es una buena alternativa a las actuales fuentes de energía, pero para ello es necesario liberar azúcares sencillos que sean fácilmente fermentables. Otra opción muy prometedora es la producción de butanol, biocombustible con gran poder energético y propiedades muy similares a las de la actual gasolina. El butanol tiene mayor contenido de energía, menor volatilidad y es menos higroscópico que el etanol, por lo que se puede mezclar mejor con la gasolina en cualquier proporción (Chen C.Y. et al, 2013).

La composición de las microalgas depende de cómo hayan sido cultivadas y de la especie de la que se trate. Principalmente están compuestas por carbohidratos, lípidos y proteínas (Torres C.M. et al, 2013). Los lípidos de las microalgas se encuentran formando la membrana como productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. Además, la pared celular de estas contiene celulosa y hemicelulosa (Yoo G. et al, 2015). Según Chen C.Y. et al (2013) las microalgas contienen bajas concentraciones de lignina. Por otro lado, Montingelli M.E. et al, 2015, dicen que las microalgas casi no tienen lignina, teniendo menos del 2% (en peso seco) (*Ulva* sp, contiene 1,3%). Dependiendo del origen de las microalgas y del tipo de las mismas, estas tienen una composición variable. Según Chen C.Y. et al (2013), las microalgas pueden acumular un 50% de carbohidratos en forma de almidón y celulosa (*Chlorella vulgaris* puede contener 37-55% de carbohidratos en peso seco, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus obliquus* pueden tener entre 45-60% de carbohidratos), en cambio, las empleadas por Hernández D. et al (2015), *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis gaditana* y *Scenedesmus almeriensis*, tienen entre un 15% y un 25% de carbohidratos. Por otro lado, Ación F.G. et al (2014) dicen que las microalgas tienen una composición de 20-30% de carbohidratos, 10-30% de lípidos y 5-10% de cenizas, al igual que García-Cuadra F. et al (2012), que citan esta misma composición junto con un 30-60% de proteínas.

La composición de las microalgas depende del medio donde se hayan cultivado, sus condiciones de temperatura, pH, luz, incluso de la zona geográfica, así como el tipo de reactor donde se cultiven. Dentro de una misma especie de microalga existen diferencias apreciables en su composición por ejemplo, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. son las especies que más contenido en carbohidratos tienen. Ellis et al (2012) trabajaron con estas especies para el tratamiento de aguas residuales hallando más de un 50% en masa seca de carbohidratos en forma de almidón, celulosa y glucógeno (Ellis J.T. et al, 2012). Noraini M.Y. et al (2014) también afirman que



*Scenedesmus* sp. acumula alrededor de un 50% de carbohidratos (en masa seca) que pueden encontrarse como almidón o como glucógeno, mientras que Batista A.P. et al (2014) trabajaron con *Scenedesmus obliquus* en tratamiento de aguas residuales con entre un 10% y un 34% (en peso seco) de azúcares, siendo el almidón su carbohidrato de almacenamiento.

Para obtener azúcares reductores a partir de las microalgas, es importante pretratarlas antes de hidrolizarlas enzimáticamente. Los pretratamientos rompen la matriz y la pared celular, aumentando el área superficial y la porosidad del material celulósico, y liberan los hidratos de carbono mejorando su digestibilidad enzimática posterior (Toquero C. y Bolado S., 2014). Los pretratamientos más utilizados en la actualidad para otros tipos de biomasa como paja de trigos son los siguientes (Talebnia F. et al, 2010; Demirbas A., 2010):

Tabla 2: Pretratamientos

<b>Pretratamientos:</b>
- Físicos: con métodos para reducción de tamaño (cribado, tamizado...). Térmicos.
- Físico- químicos: con agua líquida caliente, explosión a vapor, explosión de fibra de amoniaco.
- Químicos: hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, agentes oxidantes (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ozono)
- Biológicos: con hongos.
- Mecánico o enzimático

Fuente: Elaboración propia

Castro Y.A. et al (2015), realizaron un estudio para producir ABE mediante un pretratamiento ácido a un coctel de microalgas, que contenía *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Micromonas* y *Chlamydomonas* (con 10% microalga producida con agua residual, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, 80-90°C, 120min) obteniendo un rendimiento de 166,1 g azúcar/kg de alga seca, y unas concentraciones de 5,23g ABE/L y 3,74g butanol/L.

Miranda J.R. et al (2012) realizaron un pretratamiento ácido a la microalga *Scenedesmus obliquus* (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, 120°C, 30 min, microalga seca) obteniendo un rendimiento de 30% de azúcar (base seca) respecto del microalga inicial (Yoo G. et al 2015).

Hernández D. et al (2014), realizaron un estudio en el cual compararon varios pretratamientos en microalgas (*C. sorokiniana*, *Nannochloropsis gaditana* B-3 and *S. almeriensis*) para ver el rendimiento de los mismos y ver cuál era más efectivo, entre los cuales realizaron un

pretratamiento ácido (se suspendieron las microalgas en 100ml de agua destilada, concentración de 30g VSS/L, 30 min, 121°C, al 4%, al 7% y al 10% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), también realizaron un pretratamiento alcalino (NaOH 1M y 5M, 30g VSS/L, 30min, 90°C, 60rpm), otro térmico con autoclave (por un lado la biomasa se suspendió en un volumen de 100ml de agua destilada para obtener una concentración de 30g VSS/L, por otro lado la biomasa de microalgas se suspendió en 100ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4% v/v), ambos a 121°C, 30, 40, 50, 60 y 90 min de autoclave), térmico microondas (microalga suspendida en 100 ml de agua destilada para tener una concentración de 200g VSS/L, 40 seg, 150W, seguido de un baño de hielo durante 10 min). El pretratamiento ácido y el térmico con autoclave, fueron hidrolizados enzimáticamente con celulasas y amilasas (Celluclast 1,5 L, 60 µL/ 3 g de ST y Novozyme 188, 30 µL/ 3 g de ST, incubado a 55°C, pH 4,5; durante 72h).

Con el pretratamiento ácido, obtuvieron su mayor rendimiento al 7% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (84mg azúcar/g alga seca con *C. sorokiniana*, 93 mg azúcar/g alga seca con *N. gaditana* y 55 mg azúcar/g alga seca con *S. almeriensis*).

El pretratamiento alcalino resultó menos eficiente que el ácido, obteniendo los mejores resultados con NaOH 5M, 14 mg azúcar/ g alga seca para *N. gaditana*, 15 mg azúcar/g alga seca para *S. almeriensis* y 8 mg azúcar/ g alga seca para *C. sorokiniana*.

El efecto de la combinación de la hidrólisis ácida con autoclave (4% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v/v) variaba dependiendo de la especie de microalga, de forma que los mayores rendimientos que obtuvieron para *C. sorokiniana* fue a los 90 min de autoclave (136 mg azúcar/ g microalga seca), para *N. gaditana* fue a los 45 min (97 mg azúcar/ g microalga seca) y para *S. almeriensis* a los 60 minutos (88 mg azúcar/ g microalga seca).

Con el efecto del microondas consiguieron la extracción de 21mg azúcar/ g microalga seca para *C. sorokiniana*., 8 mg azúcar/g microalga seca para *N. gaditana* y 2 mg/ g microalga seca para *S. almeriensis*. Para *C. sorokiniana* pretratada con 0% de ácido sulfúrico, la hidrólisis enzimática con amilasas y celulasas, consiguió unos rendimientos de 67 mg azúcar/g alga seca y 101mg azúcar/g alga seca respectivamente. Al pretratar con 10% de ácido sulfúrico antes de la hidrólisis enzimática, consiguieron que hidrolizando con celulasas, *N. gaditana* y *S. almeriensis* obtuvieran mejores rendimientos (129 mg azúcares/ g alga seca y 62 mg azúcares/ alga seca), mientras que *C. sorokiniana* obtuvo mejores resultados con hidrólisis con amilasas (128 mg azúcares/g alga seca).

Finalmente, el contenido de carbohidratos en los hidrolizados obtenidos de las microalgas hidrolizadas fue de 18% para *C. sorokiniana*, 11% para *N. gaditana* y 15% para *S. almeriensis*. Estos carbohidratos, fueron en su mayor parte glucosa, 70% en *C. sorokiniana*, 59% en *N. gaditana* y 52% en *S. almeriensis*.

Este trabajo ha seleccionado un pretratamiento químico con peróxido de oxígeno ( $H_2O_2$ ), que ha dado muy buenos resultados con otros materiales lignocelulósicos como bagazo, paja de trigo, cáscara de arroz (Toquero C. y Bolado S., 2014) y para el que no hay ninguna referencia previa con microalgas.

Toquero C. y Bolado S. (2014) realizaron un pretratamiento con 5% de  $H_2O_2$  a paja de trigo con una concentración de celulosa (asimilable a glucosa) del 35% w/w, hemicelulosa (asimilable a xilosa) 22% w/w y de lignina 22% w/w. La paja era suspendida durante 5 minutos en una proporción de líquido 1:20, a pH 11,5 (ajustado con NaOH 2M), agitado a 50°C, 120rpm, durante 60 minutos. Una vez enfriado, separaron el líquido y el sólido por filtración. El sólido fue secado en horno a 45°C durante 48 horas, después la mitad de dicho sólido fue lavado con agua destilada (proporción 1:10, a 120 rpm, 60min, temperatura ambiente), después lo filtraron y secaron a 45°C durante 48 horas. Por ultimo realizaron una hidrólisis enzimática (10 FPU  $g^{-1}$  de NS50013 y 10 CBU  $g^{-1}$  de NS50010). Obteniendo un aumento del 38,8% en la composición de celulosa (glucosa) y 13,3% de hemicelulosa (xilosa), obteniendo 48,86% (m/m) de glucosa y 25,10% (m/m) de xilosa. Inicialmente, la paja, tenía una composición en cenizas del 7% w/w y humedad del 6% w/w.

Saha y Cotta (2006) realizaron un pretratamiento a paja previamente pretratada con 2,15% (v/v) de  $H_2O_2$  e hidrólisis enzimática (Celulasa,  $\beta$ - glucosidasa y xilanasas) a 45°C, pH 5 durante 120 h con el que obtuvieron un rendimiento de 672 mg azúcar / g paja seca (Talebnia F. et al, 2010).

El objetivo del presente estudio, es desarrollar una etapa preliminar de pretratamiento con peróxido de hidrógeno seguido de una etapa de hidrólisis enzimática de microalgas para la obtención de azúcares reductores (que puedan ser posteriormente fermentables para obtener biocombustibles).

## 2. Materiales y métodos.

### 2.1. Microalgas

La biomasa algal utilizada durante este trabajo fue cultivada en un sistema abierto poco profundo de tipo raceway con aguas residuales urbanas como medio, posteriormente liofilizadas y proporcionadas por la Universidad de Almería (Almería, España) de forma que las algas son un residuo del tratamiento del agua residual que nosotros aprovechamos, valorizándolas para la producción de alcoholes.

El coctel utilizado es un consorcio de microalgas y bacterias. El análisis de las algas, componente mayoritario de la biomasa, identificó las especies *Scenedesmus obliquus*, *Nitzschia* sp. y *Secenedesmus quadricauda*, con unas concentraciones de 94.046%; 0.406% y 5.548% respectivamente.

La biomasa liofilizada fue guardada a 4°C antes de su análisis composicional y del pretratamiento.

En la tabla 3, se muestra el análisis composicional de las microalgas antes de ser pretratadas.

Tabla 3: Análisis composicional de las microalgas sin pretratar.

Componentes	Cantidades (% en masa, en base seca)
Carbohidratos	15,7%
Proteínas	33,4%
Lípidos	3,8%
Cenizas	41,0%
Extractivos	3,8%
Lignina soluble	1,33%
Sólidos Totales (ST)	95,6%

Fuente: Elaboración propia

## **2.2. Pretratamiento para la extracción de azúcares**

El pretratamiento estudiado durante este trabajo fue realizado con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en medio alcalino. Se realizaron experimentos con alga liofilizada directamente y con alga previamente reconstituida con agua, para comparar los resultados. Para reconstruir la biomasa algal liofilizada, se hacía una dilución a 150g/L, de forma que se diluía 12,5 g de microalga seca en 83,33 ml de agua destilada. La biomasa algal se mezclaba con una disolución de peróxido de hidrógeno con 7,5%, 5%, 2,5% y 1% m/m de peróxido de oxígeno (del 33% m/v) en botellas de 1litro con una relación sólido: líquido de 1:20 m/m, durante 5 minutos. Seguidamente, el pH fue ajustado a 11,5 con NaOH (2M) y la mezcla resultante fue colocada en un incubador a 50°C, en agitación a 120rpm, durante 60 minutos (Toquero C. y Bolado S., 2014).

Después del pretratamiento y una vez enfriado hasta temperatura ambiente, el líquido obtenido del pretratamiento y el sólido residual, fueron separados por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. Ambas fracciones, fueron guardadas en una cámara de refrigeración. Se tomaron muestras tanto de las fracciones sólidas como de las líquidas de cada pretratamiento para su análisis composicional. Además, la fracción sólida también fue utilizada como sustrato en el siguiente paso, la hidrólisis enzimática.

## **2.3. Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática de las microalgas fue llevada a cabo en Erlenmeyers con 5% (peso seco) de materia prima o microalga pretratada y buffer de citrato sódico 0,1M (pH 4,8), conteniendo una cantidad de enzimas (Celulasa from *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma Aldrich y  $\beta$ -glucosidasa, Novozym 188 (IV), Novozymes A/S) por gramo de celulosa (en base seca) de 10 FPU g<sup>-1</sup> y 20 CBU g<sup>-1</sup>. Estas hidrólisis fueron llevadas a cabo a 50°C, 300 rpm durante 48 horas. Después de la hidrólisis, se centrifugaron y el sobrenadante fue filtrado (0,22 $\mu$ m) y guardadas para analizar posteriormente el contenido de azúcares y otros componentes (por ejemplo, inhibidores y ácidos).

## **2.4. Métodos analíticos**

Se analizaron los carbohidratos, la lignina y los extractivos según el procedimiento de “National Renewable Energy Laboratory” (NREL) (Sluiter A. et al., 2008). Las proteínas fueron medidas siguiendo el método de Lowry (Borowitzka M. A. y Moheimani, N. R., 2012) y los lípidos

según el método de Kochert (Van Wychen S. y Laurens L. M. L., 2013). Las cenizas y los sólidos totales se analizaron siguiendo el método de NREL (Van Wychen S. y Laurens L. M. L., 2013).

Por último, para medir glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico y metanol de las muestras fue empleada cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) utilizando una columna Bio-Rad HPX-87H de exclusión-ión con  $\text{H}_2\text{O}_2$ (0,025 M) como fase móvil, con flujo de 0,6ml/min y 50°C.

### 3. Resultados y discusión

La microalga inicial fue caracterizada mediante los métodos analíticos citados en el apartado anterior, obteniendo los resultados que se pueden ver en la tabla 4.

Tabla 4: Caracterización del microalga inicial sin pretratar.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidades (% masa en base seca)</b>
Carbohidratos	15,7%
Proteínas	33,4%
Lípidos	3,8%
Cenizas	41,0%
Extractivos	3,8%
Lignina soluble	1,3%
Sólidos totales (ST)	95,6%

Las cantidades de carbohidratos son acordes con los valores que afirmaban Batista A.P. et al (2014), quienes decían que *Scenedesmus* sp. contenía entre un 10 y un 34% de carbohidratos (en peso seco). A su vez, la cantidad de proteínas son acordes a las cantidades que afirmaban García-Cuadra F. et al (2012) quienes decían que las microalgas tenían entre un 30-60% (en peso seco) de proteínas. Por otro lado, la cantidad de lignina soluble, es acorde con los valores que daban Montigelli M.E. et al (2015), quienes decían que las microalgas tenían menos de un 2% de lignina. El alga presenta una concentración elevada de cenizas, debido a que provienen de un tratamiento de aguas residuales urbanas sin eliminación previa de sólidos.

El microalga, se envió a un laboratorio externo para analizar la proporción de almidón dentro de los carbohidratos, siendo esta el 1,45% de la muestra seca y el resto glucosa. Es importante conocer la composición de almidón para poder saber que enzimas utilizar en la posterior hidrólisis enzimática.

El análisis por cromatografía, proporcionó la siguiente distribución de azúcares en el alga:

Tabla 5: Porcentaje de azúcares en el microalga sin pretratar.

	% glucosa	% xilosa	% celobiosa	% arabinosa	TOTAL (%)
Microalga Inicial sin pretratar	8,10	7,26	0,32	0,00	15,67

### 3.1. Pretratamiento

Una vez conocida la composición del microalga sin pretratar, se realizaron los pretratamientos a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por un lado para el alga seca, y por otro para el alga reconstruida. En las fotografías se pueden observar imágenes de las muestras pretratadas.



Ilustración 1: Incubación de las muestras



Ilustración 2: Botes de centrifugación para separar el líquido y el sólido de las muestras

El pretratamiento, resultó muy fuerte, sobre todo para las mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno, generándose grandes cantidades de gas, burbujeo y aumentando la presión en las botellas. Por este motivo, en algunos casos, resultó inevitable la pérdida de materia por salpicaduras, a pesar de que se estaba trabajando en botellas de 1L en las cuales sólo se ocupaba inicialmente  $\frac{1}{4}$  del volumen total ya que se introducían únicamente 12,5 g de biomasa algal y 237,5 ml de líquido.

A continuación, se adjuntan los resultados obtenidos en términos de balance global de materia, con las cantidades introducidas al pretratamiento y las cantidades finales obtenidas.



Tabla 6: Antes del pretratamiento con microalga seca.

Muestra	Inicialmente			
	Alga puesta en la botella (g)	Sólidos en el alga puesta en la botella (g)	Masa de líquido (g)	Masa total inicial (g)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	37,79	36,11	715,71	753,50
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	124,73	119,18	2347,52	2472,25
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	125,12	119,56	2338,50	2463,62
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	125,25	119,68	2325,59	2450,84

Tabla 7: Después del pretratamiento con microalga seca

Muestra	Después del pretratamiento					
	Alga húmeda	Sólidos en el alga (g)	Sólidos en el líquido (g)	Masa total recuperada (g)	Masa total perdida (g)	Sólidos perdidos (g)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	44,17	11,44	13,35	466,88	288,62	11,31
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	188,41	37,51	45,24	1924,95	547,3	36,44
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	373,73	81,90	47,08	2485,24	-21,62	-9,43
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	394,84	85,97	31,37	2452,00	-1,16	2,35

Como puede observarse en la tabla 6, para la condición al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicialmente se tiene menos cantidad, debido a la pérdida de materia durante la experimentación.

La masa total perdida fue calculada a partir de la masa total inicial (tabla 6) y la masa total recuperada (tabla 7). Por otro lado, los sólidos perdidos fueron calculados a partir de los sólidos que inicialmente tenía el microalga puesta en la botella (tabla 6) y los sólidos que tenía la fracción líquida y la fracción sólida obtenida del pretratamiento (tabla 7).

Por otro lado, la condición al 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con microalga seca después del pretratamiento, es la condición con la que mayores cantidades de masa (547, 3 g) y de sólidos se perdieron (36, 44g), seguido de la condición al 7% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con microalga seca, en la que se perdieron 288,62 g de masa total y 11, 31 g de sólidos.

Tabla 8: Antes del pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Inicialmente			
	Alga puesta en la botella (g)	Sólidos en el alga puesta en la botella (g)	Masa de líquido (g)	Masa total del pretratamiento (g)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	37,53	35,86	500,44	785,15
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	125,25	119,68	1651,34	2597,18
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	125,38	119,80	1639,40	2584,37
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	125,16	119,59	1637,75	2583,69

Tabla 9: Después del pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Después del pretratamiento					
	Alga	Sólidos en el alga (g)	Sólidos en el líquido (g)	Masa total recuperada (g)	Masa total perdida (g)	Sólidos perdidos
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	65,35	17,92	13,16	703,09	82,06	4,77
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	323,80	71,64	55,38	2482,48	114,7	-7,34
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	385,54	83,31	46,95	2628,55	-44,18	-10,46
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	416,66	92,90	35,70	2586,17	-2,48	-9,01

La masa total perdida y los sólidos perdidos se calcularon de la misma manera que para el pretratamiento con microalga seca.

En este caso, como puede observarse en la tabla 9, la condición al 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con microalga reconstruida fue la que más pérdida de masa total tuvo (114,7 g), seguido de la condición al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (82,06g), mientras que sólo se pierden sólidos en la condición al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4,77g).

Comparando los pretratamientos con microalga seca y con microalga reconstruida, se observa que con microalga seca, se pierde más masa y más sólidos que con la microalga reconstruida. Esto es debido a la acción directa del peróxido de hidrógeno con la biomasa algal, que provoca que se forme más gases, burbujeo y con ello pérdidas por salpicadura.

Una vez realizado el pretratamiento, se analizaron la fracción sólida y líquida obtenida de cada pretratamiento, obteniendo para ambas fracciones las concentraciones de azúcares, y para la fracción líquida también, las concentraciones de inhibidores.

En el caso de los sólidos obtenidos en el pretratamientos se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 10: Porcentaje de azúcar en el sólido del pretratamiento de microalga seca.

Muestra	Sólido del pretratamiento					
	Peso muestra seca (g)	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Celobiosa (%)	Arabinosa (%)	TOTAL (%)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,40	3,93	3,45	0,09	0,00	7,47
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,36	7,06	4,58	0,14	0,18	11,97
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,34	7,70	5,75	0,15	0,00	13,60
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,29	7,36	5,45	0,16	0,00	12,98

Como puede observarse en la tabla 10, los sólidos del pretratamiento con microalga seca al 2,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo (13,60% azúcares m/m), seguido del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12,98% azúcares), y la condición que menos obtuvo fue al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7,47% azúcares).

Tabla 11: Porcentaje de azúcar en el sólido del pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Sólido del pretratamiento					
	Peso muestra seca (g)	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Celobiosa (%)	Arabinosa (%)	TOTAL (%)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,61	4,04	2,59	0,09	0,12	6,84
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,35	6,93	5,23	0,15	0,00	12,30
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,33	7,79	5,09	0,17	0,00	13,05
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,36	7,35	5,07	0,13	0,00	12,55

En la tabla 11, puede verse que al igual que para el pretratamiento con microalga seca, para el pretratamiento con microalga reconstruida, la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo en el sólido fue al 2,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (13,05% azúcares), seguido de la condición al 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12,55% azúcares), y la que menor concentración obtuvo fue al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6,48% azúcares).

Estos valores se corresponden a las siguientes cantidades en masa de azúcares, para con ello poder calcular el rendimiento de los sólidos del pretratamiento.

Tabla 12: Cantidad en masa de azúcares en el sólido del pretratamiento de microalga seca.

Muestra	Sólido del pretratamiento					Total (g azúcares/g alga seca)
	Glucosa (g)	Xilosa (g)	Celobiosa (g)	Arabinosa (g)	Total (g)	
7,5% H2O2, alga seca	0,45	0,40	0,01	0,00	0,85	0,07
5% H2O2, alga seca	2,65	1,72	0,05	0,07	4,49	0,12
2,5% H2O2, alga seca	6,31	4,71	0,12	0,00	11,14	0,14
1% H2O2, alga seca	6,33	4,38	0,14	0,00	10,85	0,13

Tabla 13: Cantidad en masa de azúcares en el sólido del pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Sólido del pretratamiento					Total (g azúcares/g alga seca)
	Glucosa (g)	Xilosa (g)	Celobiosa (g)	Arabinosa (g)	Total (g)	
7,5% H2O2, alga reconstruida	0,72	0,46	0,02	0,02	1,23	0,07
5% H2O2, alga reconstruida	4,96	3,75	0,10	0,00	8,81	0,12
2,5% H2O2, alga reconstruida	6,49	4,24	0,14	0,00	10,88	0,13
1% H2O2, alga reconstruida	6,83	4,71	0,12	0,00	11,66	0,13

Con estos resultados se calcularon los rendimientos de los sólidos de los pretratamientos respecto del microalga inicial sin pretratar, dividiendo la cantidad de azúcares en el sólido entre la cantidad de azúcares en el microalga sin pretratar.

$$\text{Rendimiento del sólido pretratado} = \frac{\text{masa de azúcar en el sólido pretratado}}{\text{masa de azúcar en el microalga inicial}} \times 100$$

Tabla 14: Rendimiento de la cantidad de azúcar en el sólido del pretratamiento respecto del microalga inicial.

Muestra	Rendimiento (%)
7,5% H2O2, alga seca	15,10
5% H2O2, alga seca	24,03
2,5% H2O2, alga seca	59,45
1% H2O2, alga seca	57,85

Como puede observarse en la tabla 14, para el pretratamiento con microalgas secas, la condición de pretratamiento que mayor rendimiento de sólido tiene es al 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (59,45%), seguido del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (57,85%), 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (24,03%) y por último al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15,10%).

Tabla 15: Rendimiento de la cantidad de azúcar en el sólido del pretratamiento respecto del microalga reconstruida.

Muestra	Rendimiento (%)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	21,80
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	47,00
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	57,93
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	62,20

Como puede observarse en la tabla 15, para el pretratamiento con microalgas reconstruidas, la condición de pretratamiento que mayor rendimiento de sólido tiene es al 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62, 20%), seguido del 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (57, 93%), 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (47% %) y por último al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (21,80%).

Comparando los rendimientos de los sólidos del pretratamiento con microalgas secas y con microalgas reconstruidas, se puede ver que en general (menos para la condición al 2,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), con microalgas reconstruidas, se obtiene mayores rendimientos que con microalgas secas. A su vez, se observa que cuanto mayor es la concentración de peróxido de hidrógeno añadida, menores rendimientos se obtiene, debido a la pérdida de materia y la fuerte acción del peróxido de hidrogeno sobre las microalgas.

En el caso del líquido obtenido, se analizaron las concentraciones de azúcares y de inhibidores que este tenía para ver la influencia de los inhibidores sobre los azúcares, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 15: Concentración de azúcar en el líquido del pretratamiento de microalga seca.

Muestra	Líquido del pretratamiento				
	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,89	0,00	0,38	0,03	1,30
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,92	0,00	0,57	0,02	1,51
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	1,02	0,00	0,56	0,02	1,60
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	1,03	0,00	0,48	0,01	1,52

Como puede observarse en la tabla 15, en el pretratamiento con microalga seca, en la fracción líquida, la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo fue la del 2,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,60 g/L), seguido del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,52 g/L), 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,51 g/L) y por último, 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,30 g/L).

Tabla 16: Concentración de azúcar en el líquido del pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Líquido del pretratamiento				
	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,81	0,00	0,44	0,02	1,27
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,93	0,00	0,53	0,02	1,48
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,61	0,00	0,32	0,01	0,93
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	1,06	0,00	0,50	0,01	1,57

En el pretratamiento con microalga reconstruida, en la fracción líquida (tabla 16), la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo fue la del 1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,57g/L), seguido del 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,48 g/L), 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,27 g/L) y por último, 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,93 g/L).

Relacionando el pretratamiento con microalga seca y el pretratamiento con microalga reconstruida, se ve que la concentración de azúcar no sigue la misma tendencia para ambos.

Tabla 17: Concentración de inhibidores en el líquido del pretratamiento de microalga seca.

Muestra	Líquido del pretratamiento				
	Oxálico (g/L)	Acético (g/L)	Fórmico (g/L)	Metanol (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,15	0,36	1,26	0,11	1,88
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,00	0,33	0,99	0,14	1,46
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,00	0,32	0,85	0,00	1,17
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	0,00	0,28	0,53	0,09	0,91

En el pretratamiento con microalga seca, en la fracción líquida, la condición que mayor concentración de inhibidores obtuvo fue la del 7,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,88g/L), seguido del 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,46 g/L), 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,17 g/L) y por último, 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,91 g/L).

Tabla 18: Concentración de inhibidores el líquido de pretratamiento con microalga reconstruida.

Muestra	Líquido del pretratamiento				
	Oxálico (g/L)	Acético (g/L)	Fórmico (g/L)	Metanol (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,00	0,29	1,49	0,00	1,79
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,00	0,31	0,95	0,00	1,26
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,00	0,20	0,56	0,18	0,94
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	0,00	0,29	0,51	0,45	1,25

En el pretratamiento con microalga reconstruida, en la fracción líquida, la condición que mayor concentración de inhibidores obtuvo fue la del 7,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,79g/L), seguido del 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,26 g/L), 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,25 g/L) y por último, 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,94 g/L).

De forma que la concentración de inhibidores en el líquido del pretratamiento, no sigue la misma tendencia en el caso del pretratamiento con microalga seca que con microalga reconstruida, aunque puede verse que a mayor concentración de peróxido de hidrógeno, la formación de inhibidores es mayor.

Relacionando las concentraciones de azúcares del líquido y del sólido, con los inhibidores del líquido, podemos decir que a mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno son las concentraciones de inhibidores en el líquido obtenido después del pretratamiento.

Con estos resultados, se calcularon las recuperaciones totales del pretratamiento obtenidos tras el pretratamiento relativos a la masa total de azúcares en el sólido y en el líquido, y los inhibidores del líquido, respecto de los azúcares contenidos en el microalga inicial.

$$\text{Recuperación total en el pretratamiento} = \frac{\text{azúcares sólido} + \text{azúcares líquido} + \text{inhibidores líquido}}{\text{azúcares microalga inicial sin pretratar}} \times 100$$

Obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 19: Recuperación total del pretratamiento con microalga seca.

<b>Muestra</b>	Total azúcares Sólido+ Líquido + Inhibidores. (g)	Recuperación total en el pretratamiento.(%)
7,5% H2O2, alga seca	2,34	41,32
5% H2O2, alga seca	10,21	54,69
2,5% H2O2, alga seca	18,03	96,26
1% H2O2, alga seca	16,82	89,69

La recuperación total del pretratamiento con microalga seca, como se observa en la tabla 19, obtuvo su mejor valor con la condición del 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (96, 26%), seguido del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (89,69%), 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (54,69%) y por último la condición de 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (41,32%).

Tabla 20: Recuperación total del pretratamiento con microalga reconstruida.

<b>Muestra</b>	Total azúcares Sólido+ Líquido + Inhibidores. (g)	Recuperación total en el pretratamiento.(%)
7,5% H2O2, alga reconstruida	3,37	60,02
5% H2O2, alga reconstruida	15,62	83,29
2,5% H2O2, alga reconstruida	15,79	84,09
1% H2O2, alga reconstruida	18,96	101,16

Por otro lado, la recuperación total del pretratamiento con microalga reconstruida, (tabla 20), obtuvo su mejor valor con la condición del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (101,16%), seguido del 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (84,09%), 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (83,09%) y por último la condición de 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60,02%).

Con ello, se puede ver que la recuperación total del pretratamiento, no sigue la misma tendencia si se utiliza microalga seca que si se utiliza microalga reconstruida, aunque si se observa que cuanto mayor sea el porcentaje de peróxido de hidrógeno que se aplique al pretratamiento, menor es la recuperación total en el mismo.

### 3.2. Hidrólisis enzimática

Las muestras pretratadas y una muestra control de alga no pretratada se sometieron a hidrólisis enzimática, obteniendo los siguientes resultados.

Para la muestra control, se utilizó el microalga no pretratada. Una vez conocida su composición, se realizó una hidrólisis enzimática de (con un coctel de celulasas y  $\beta$ -glucosidas), se tomó muestra de la misma y se llevó a cromatografía para conocer la concentración de azúcares que tenía (5,68g/L), como se puede ver en la tabla 21.

Tabla 21: Concentración de azúcares en el microalga inicial hidrolizado enzimáticamente.

	g/L glucosa	g/L xilosa	g/L celobiosa	g/L arabinosa	TOTAL (g/L)
Hidrólisis enzimática, microalga sin pretratar	4,37	0,98	0,33	0,00	5,68

Estas concentraciones, corresponden en relación g azúcares/ g alga seca a las cantidades que pueden observarse en la tabla 22.

Tabla 22: Cantidad de azúcar/ g alga seca después de la hidrólisis enzimática del microalga sin pretratar.

	Glucosa (g/g alga seca)	Xilosa (g/g alga seca)	Celobiosa (g/g alga seca)	Arabinosa (g/g alga seca)	Total (g azúcares/g alga seca)
Hidrólisis enzimática, microalga sin pretratar	0,08	0,02	0,00	0,00	0,10

Estas concentraciones, se utilizaron para calcular el rendimiento de liberación de azúcares mediante hidrólisis enzimática del microalga sin pretratar, dividiendo los gramos de azúcar/ g microalga seca obtenidos después de la hidrólisis enzimática, entre los gramos de azúcar/ microalga seca que tenían inicialmente las microalgas, obteniendo un rendimiento del 60, 81% como se puede ver en la tabla 23.



$$\text{Rendimiento de la hidrólisis enzimática} = \frac{\text{concentración azúcares después de la hidrólisis enzimática}}{\text{concentración de azúcares en el microalga inicial}} \times 100$$

Tabla 23: Rendimiento de la hidrólisis enzimática del microalga sin pretratar.

Inicialmente (g azúcares/ g alga seca)	0,16 g azúcares/ g alga seca
Después de la hidrólisis enzimática (g azúcares/ g alga seca)	0,10 g azúcares/ g alga seca
Rendimiento (%)	60,81 %

Del mismo modo que para el microalga sin pretratar, se analizaron los azúcares de cada condición del pretratamiento con peróxido de hidrógeno para poder conocer con cuál de ellos se obtenía un rendimiento final mayor.

Tabla 24: Concentración de azúcares después de la hidrólisis enzimática del sólido pretratado a partir de microalga seca

Muestra	Después de la hidrólisis enzimática del sólido del pretratamiento				
	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	1,55	0,00	0,87	0,00	2,43
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	3,28	0,02	0,29	0,00	3,58
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	2,69	0,02	0,09	0,00	2,80
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	3,02	0,02	0,10	0,00	3,14

Como puede observarse en la tabla 24, después de la hidrólisis enzimática del sólido obtenido del pretratamiento con microalga seca, la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo fue la condición al 5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3, 58%), seguida del 1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3, 1%), 2,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,80%) y por último al 7,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,43-%).

Tabla 25: Concentración de azúcares después de la hidrólisis enzimática del sólido pretratado a partir del microalga reconstruida.

Muestra	Después de la hidrólisis enzimática del sólido del pretratamiento				
	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	TOTAL (g/L)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	2,11	0,00	0,32	0,00	2,44
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	2,84	0,02	0,09	0,00	2,95
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	2,99	0,04	0,08	0,00	3,10
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	2,82	0,03	0,07	0,00	2,92

Como puede observarse en la tabla 25 después de la hidrólisis enzimática del sólido obtenido del pretratamiento con microalga reconstruida, la condición que mayor concentración de azúcares obtuvo fue la condición al 2,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3,10%), seguida del 5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,95%), 2,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,92%) y por último al 7,5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,44%).

De forma que las mejores condiciones de pretratamiento para liberar azúcares son al 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con microalga seca, y al 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con microalga reconstruida.

Estas concentraciones de azúcares (g/L), equivalen a las siguientes concentraciones (g azúcar/g alga seca), para con ellas poder calcular el rendimiento final después de la hidrólisis enzimática del sólido obtenido en el pretratamiento.

Tabla 26: Cantidad de azúcares liberados después de la hidrólisis enzimática para microalga seca.

Muestra	Volúmen total de la hidrólisis enzimática	Después de la hidrólisis					
		Glucosa (g)	Xilosa (g)	Celobiosa (g)	Arabinosa (g)	Total (g)	Total (g azúcares/g alga seca pretratada)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	25,16	0,04	0,00	0,02	0,00	0,06	0,04
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	24,99	0,08	0,00	0,01	0,00	0,09	0,06
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	25,21	0,07	0,00	0,00	0,00	0,07	0,05
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	25,42	0,08	0,00	0,00	0,00	0,08	0,05

Tabla 27: Cantidad de azúcares liberados después de la hidrólisis enzimática con microalga reconstruida.

Muestra	Volúmen total de la hidrólisis enzimática	Después de la hidrólisis					
		Glucosa (g)	Xilosa (g)	Celobiosa (g)	Arabinosa (g)	Total (g)	Total (g azúcares/g alga seca pretratada)
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	25,06	0,05	0,00	0,01	0,00	0,06	0,04
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	25,90	0,07	0,00	0,00	0,00	0,08	0,05
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	24,98	0,07	0,00	0,00	0,00	0,08	0,05
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	25,27	0,07	0,00	0,00	0,00	0,07	0,05

Con estos resultados, se calculó rendimiento final obtenido con la hidrólisis enzimática, dividiendo la cantidad de azúcar que se obtiene después de la hidrólisis enzimática entre la cantidad de azúcar que contenía el sólido obtenido con el pretratamiento.

$$\text{Rendimiento final} = \frac{\text{azúcar obtenido con la hidrólisis enzimática}}{\text{azúcar del sólido del pretratamiento}} \times 100$$

Tabla 28: Rendimiento final después de la hidrólisis enzimática para microalga seca.

<b>Muestra</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	54,11
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	49,55
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	34,69
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga seca	42,27

En la tabla 28, se puede ver que el mayor rendimiento final se obtuvo con la mayor concentración de peróxido de hidrógeno en el pretratamiento con alga seca, es decir al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (54,11%).

Tabla 29: Rendimiento final después de la hidrólisis enzimática para el microalga reconstruida.

<b>Muestra</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
7,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	59,18
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	41,36
2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	39,50
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , alga reconstruida	38,85

En la tabla 29, se puede ver que el mayor rendimiento final se obtuvo con la mayor concentración de peróxido de hidrógeno del pretratamiento con alga reconstruida, es decir al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (59,18%).

Teniendo en cuenta que con el microalga inicial sin pretratar hidrolizado enzimáticamente se obtuvo un rendimiento del 60,81%, el pretratamiento con microalga reconstruida al 7,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el que obtiene un rendimiento final más aproximado, por lo que sería el mejor para obtener azúcares libres.

Si se comparan los resultados con los obtenidos por Hernández D. et al (2014), podemos ver que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno obtiene más cantidad de azúcar por cada gramo de microalga seca que el pretratamiento alcalino (15mg azúcar/g alga seca) y el térmico con microondas (2mg azúcar/g alga seca) que estos autores realizaban, en cambio, se consiguen menores cantidades que con el pretratamiento térmico con autoclave (88mg azúcar/g alga seca).

Comparando los resultados con los obtenidos por Toquero C. y Bolado S. (2014) quienes obtuvieron un rendimiento final de azúcares del 73,96% a partir de un 57% azúcares iniciales, y en este trabajo se obtiene un 59% de rendimiento final de azúcares a partir de un 15,67%, podemos decir que el pretratamiento con peróxido de oxígeno es más efectivo para las microalgas que para la paja de trigo.

#### **4. Conclusiones**

Con el pretratamiento alcalino con peróxido de hidrógeno se consiguen tener azúcares libres con el inconveniente de que a mayor concentración de este se utilice mayor probabilidad de perder materia se tiene, por lo que las mejores concentraciones para ello son al 2,5 y 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cuanto mayor es la concentración de peróxido de hidrógeno menores rendimientos de azúcares se consiguen en el sólido obtenido del pretratamiento con respecto al microalga inicial. Lo mismo ocurre, para la recuperación total (azúcares e inhibidores del líquido y azúcares del sólido). Mientras que si el sólido obtenido se hidroliza enzimáticamente, esto cambia, ya que se consiguen mayores rendimientos finales de obtención de azúcares libres cuanta mayor concentración de peróxido de hidrógeno se haya utilizado en el pretratamiento inicial, ya que consigue romper mejor la estructura de las microalgas

## 5. Bibliografía

1. Ación, F. G., Fernández, J. M. & Molina-Grima, E. Economics of Microalgae Biomass Production. *Biofuels from Algae* 313–325 (2013). doi:10.1016/B978-0-444-59558-4.00014-0
2. Alam, F. *et al.* Biofuel from algae-Is it a viable alternative? *Procedia Eng.* **49**, 221–227 (2012).
3. Batista, A. P. *et al.* *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* **117**, 537–543 (2014).
4. Castro, Y. a., Ellis, J. T., Miller, C. D. & Sims, R. C. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. *Appl. Energy* **140**, 14–19 (2015).
5. Chen, C. Y. *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* **78**, 1–10 (2013).
6. Daroch, M., Geng, S. & Wang, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy* **102**, 1371–1381 (2013).
7. Demirbas, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers. Manag.* **51**, 2738–2749 (2010).
8. Ellis, J. T., Hengge, N. N., Sims, R. C. & Miller, C. D. Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresour. Technol.* **111**, 491–495 (2012).
9. García-Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González-López, C. V., Fernández-Sevilla, J. M. & Ación Fernández, F. G. *Valorización de biomada de microalgas: Aprovechamiento de proteínas y lípidos.* **2570**, (2012).
10. Ghayal, M. S. & Pandya, M. T. Microalgae biomass: A renewable source of energy. *Energy Procedia* **32**, 242–250 (2013).
11. González de Chabbarri, E., Aguado Ramo, J. A. & Mas Alvarez, B. Las microalgas: ¿una potencial alternativa de producción? (II). *Mundo Ganad.* 68–70 (1992).
12. González de Chabbarri, E., Aguado Ramo, J. A. & Mas Alvarez, B. Las microalgas: ¿una potencial alternativa de producción? (I). *Mundo Ganad.* 5–8 (1992).
13. Hernández, D., Riaño, B., Coca, M. & García-González, M. C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* **262**, 939–945 (2015).
14. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Plan de Energías Renovables 2011-2020. (2011). at <<http://www.idae.es/index.php/id.670/re/menu.303/mod.pags/mem.detalle>>
15. Maity, J. P., Bundschuh, J., Chen, C. Y. & Bhattacharya, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. *Energy* (2014). doi:10.1016/j.energy.2014.04.003
16. Noraini, M. Y., Ong, H. C., Badrul, M. J. & Chong, W. T. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **39**, 24–34 (2014).

17. Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. & Ferrer, I. Bioresource Technology Pretreatment of microalgae to improve biogas production : A review. **172**, 403–412 (2014).
18. Santos, A.M., González-Arechavala, Y., Martín-Sastre, C. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. (2014).
19. Sluiter, a, Hames, B., Ruiz, R. & Scarlata, C. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab. Anal. ...* **2011**, (2008).
20. Talebnia, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* **101**, 4744–4753 (2010).
21. Toquero, C. & Bolado, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresour. Technol.* **157**, 68–76 (2014).
22. Torres, C. M. *et al.* Microalgae-based biodiesel: A multicriteria analysis of the production process using realistic scenarios. *Bioresour. Technol.* **147**, 7–16 (2013).
23. Van Wychen, S. & Laurens, L. M. L. Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass - Laboratory Analytical Procedure ( LAP ) - <http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60956.pdf>. NREL/TP–5100–60956 (2013).
24. Van Wychen, S. & Laurens, L. M. L. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters ( FAME ) by in situ Transesterification - Laboratory Analytical Procedure ( LAP ) - <http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60958.pdf>. NREL/TP–5100–60958 (2013).
25. Yoo, G., Park, M. S. & Yang, J. *Chemical Pretreatment of Algal Biomass*. (2015). doi:10.1016/B978-0-12-800080-9.00012-8