



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Grado en Ingeniería Química**

**Comparativa de valorización de la fracción  
carbohidrato de diferentes biomاسas  
microalgales aplicando técnicas de diseño  
de experimentos**

**Autor:**

**Riol Pastor, Elena**

**Tutor:**

**Bolado Rodríguez, Silvia**

**Cotutor:**

**Martín Juárez, Judit**

**Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente**

**Valladolid, Julio 2018.**



Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

## RESUMEN, PALABRAS CLAVE

Un mismo diseño de experimentos de Taguchi L27 permitió estudiar las etapas de pretratamiento y de hidrólisis enzimática de diferentes biomásas microalgales (procedente de plantas de tratamiento de purines, de aguas residuales y pura) en términos de liberación y recuperación de azúcares; pero también de liberación de proteínas y lípidos. Los pretratamientos estudiados fueron ácido y básico diluido. El máximo rendimiento de azúcar recuperado fue 91.20% para el alga pura aplicando HCl 2 M a 121 °C durante 10 minutos y una concentración de alga de 75 g/L, con una concentración de enzima de 10 FPU durante 3h. El pretratamiento ácido favoreció la liberación y recuperación de azúcares, mientras que el básico incrementó la liberación de proteínas y lípidos. El factor más significativo, independientemente del tipo de alga empleada, resultó la temperatura de pretratamiento, seguido de la concentración del agente químico, con los mejores resultados a 121°C y concentración 2 M.

Palabras clave: Azúcares; Hidrólisis enzimática; Lípidos; Pretratamiento; Proteínas

## ABSTRACT, KEY WORDS

A Taguchi L27 experimental design was employed to optimize the stages of pre-treatment and enzymatic hydrolysis for three kinds of microalgal biomass: cultivated in pig manure, domestic wastewaters and pure biomass, with respect to sugar release and recovery, and proteins and lipids release. The pre-treatments studied were diluted acid-alkaline. The maximum yield of sugar recovery was 91.20%, which occurred for pure algae, employing HCl 2 M at 121 °C during 10 minutes with a concentration of algae of 75 g/L, an enzyme concentration of 10 FPU and an enzymatic hydrolysis time of 3 h. Alkaline pre-treatment favoured the protein release, while acidic conditions favoured the release and recovery of sugars. Temperature is the most significant factor independent of kind of algae and its optimum value is 121 °C. In addition, concentration of the chemical agent took on relevance, and its optimum value is 2 M.

Key words: Sugar; Enzymatic hydrolysis; Lipids; Pre-treatment; Proteins



Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

<b>RESUMEN, PALABRAS CLAVE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.2. OBJETIVOS .....	17
<b>2. DESARROLLO DEL TFG .....</b>	<b>19</b>
2.1. NOMENCLATURA .....	19
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
2.2.1. BIOMASA.....	20
2.2.2. PRETRATAMIENTOS ÁCIDO Y BÁSICO .....	21
2.2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	21
2.2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	22
2.2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	25
2.2.6. MÉTODOS DE CÁLCULO .....	26
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
2.3.1. RESULTADOS PRETRATAMIENTO .....	30
2.3.2. RESULTADOS GLOBALES .....	46
<b>3. CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>4. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>



Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la población del planeta, así como su actividad industrial, han crecido de manera exponencial. Este aumento, unido el desarrollo científico y tecnológico de la sociedad ha tenido como resultado un incremento en la demanda energética respecto a épocas anteriores. Pero los combustibles fósiles no sólo son escasos, sino que además pueden resultar perjudiciales para el medio ambiente. Por estos motivos, términos como energías renovables o biorrefinería toman cada vez mayor importancia en el panorama energético mundial (Gomez Millan, 2015).

En paralelo, el aumento de la población, el cambio en la forma de vida y el consumismo han desembocado en la generación de una gran cantidad de residuos que continúa en aumento. Además, la tecnología necesaria para tratar estos residuos ni siquiera existe en todos los países del planeta y su tratamiento hasta ahora no ha resultado demasiado eficiente (Atencio Pérez et al., 2013) (quemados a cielo abierto o disposición en vertederos), generando contaminación de ríos, mares, suelos y hasta la propia atmósfera terrestre. Sin embargo, estos residuos contienen materia orgánica y nutrientes que les convierten en una prometedora materia prima, renovable, alternativa a los combustibles fósiles, para la producción de energía y de otros bioproductos de medio y alto valor añadido.

Dentro de la gran variedad de residuos producidos, las aguas residuales domésticas y agroalimentarias ocupan un papel muy relevante. Convencionalmente se han empleado ciertos procesos biológicos clásicos para su tratamiento, como son el tratamiento con fangos activos, en los cuales se degrada la materia orgánica en condiciones aeróbicas y se emplea un tratamiento nitrificante-desnitrificante que permita eliminar el nitrógeno, fósforo y patógenos; tratamiento en un reactor secuencial discontinuo (SBR) que requiere poco espacio debido al empleo de un único tanque, presenta una mejor tolerancia a variaciones de ciertos nutrientes y permite el control del proceso mediante variables muy sencillas de manejar, como pH, potencial redox, etc.; y también se emplean tratamientos con membranas, concretamente reactores biológicos con filtración de membranas MBR, que permiten obtener unos efluentes libres de bacterias y gérmenes. Los productos finales de estos sistemas son: un líquido comúnmente empleado para limpieza o para fertirrigar, que es aplicar los fertilizantes o nutrientes necesarios para los cultivos a través del sistema de riego, y un sólido para aplicar a la tierra de acuerdo con la normativa europea, no sobrepasando los 170 kgNITRÓGENO/hectárea/año. (León Cofreces, 2007).

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

En la actualidad, se están buscando otras alternativas para el tratamiento de estos residuos que permitan una valorización más efectiva de sus componentes con un menor impacto ambiental. Para ello, se ha desarrollado una vía de tratamiento empleando microalgas, una alternativa novedosa basada en la biotecnología sostenible a la que hasta ahora no se ha prestado demasiada atención, pero que cada vez está cobrando más importancia, sobre todo para efluentes como purines, con una elevada concentración de nutrientes (García et al., 2018).

La relación entre microalgas y bacterias (el ciclo de simbiosis de ambas se muestra en la Figura 1) juega un papel fundamental en el tratamiento de aguas residuales. La biodegradación de componentes orgánicos en el agua residual se ve aumentada significativamente por la oxigenación fotosintética y el metabolismo heterótrofo del microalga. Esta oxigenación fotosintética no sólo reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> provocadas por la oxidación de la materia orgánica, sino que además reduce significativamente los costes asociados a la aireación mecánica en determinados sistemas, que suelen representar alrededor de la mitad del coste de operación de una planta de tratamiento de aguas residuales convencional. Además, las microalgas tienen capacidad para eliminar carbono, nitrógeno y fósforo, y esto representa una importante ventaja en comparación con otras tecnologías de tratamiento de efluentes en términos de recuperación de nutrientes.

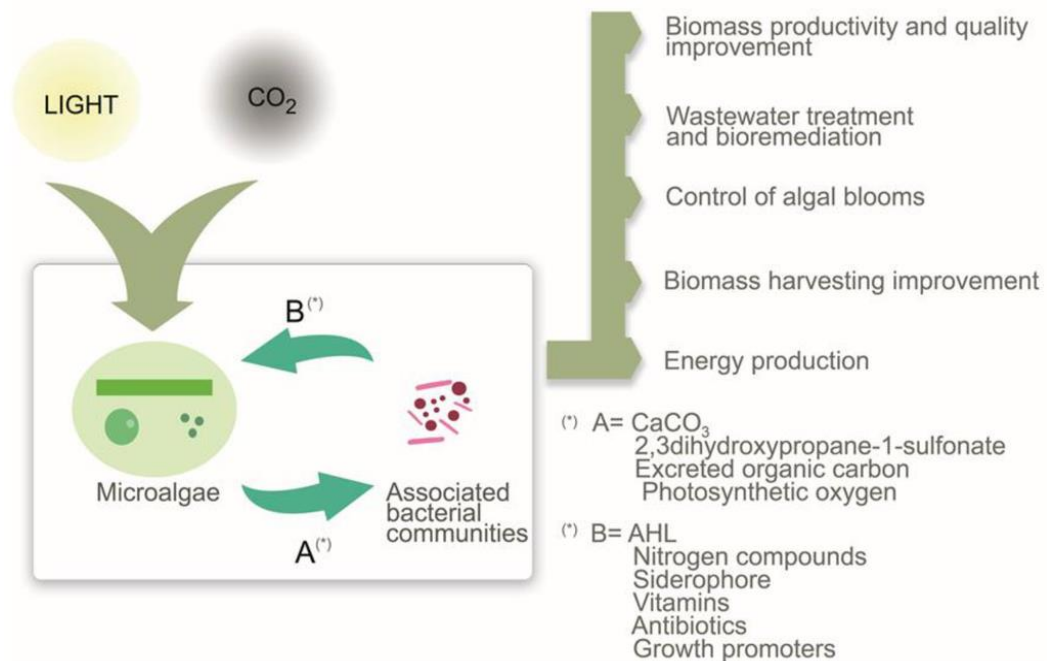


Figura 1. Ciclo de simbiosis microalga-bacteria (Fuentes et al., 2016)



## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Se han llevado a cabo estudios que demuestran que un fotobiorreactor anóxico-aeróbico de algas y bacterias permite eliminaciones en aguas residuales domésticas de TOC (carbono orgánico total) (86-90%), de IC (carbono inorgánico) (57-98%) y de TN (nitrógeno total) (68-79%) eficientes y competitivas (Alcántara et al., 2015). En este caso concreto, las especies dominantes de microalgas fueron *C. vulgaris* y *Pseudanabaena*, mientras que *Proteobacteria* fue la principal especie bacteriana presente.

También se han llevado a cabo este tipo de estudios para aguas procedentes del tratamiento de purines. Los resultados obtenidos para un fotobiorreactor trabajando con *Chrorella vulgaris* como especie dominante fueron  $94\pm 1\%$  de eliminación de carbono orgánico total TOC, 100% de eliminación del fósforo total y  $72\pm 8\%$  del nitrógeno total TN. Adicionalmente, el sistema consiguió eliminar el  $83\pm 2\%$  del zinc presente (García et al., 2017).

Tras el tratamiento de las aguas en estos fotobiorreactores, se consigue una corriente de efluente tratado que puede emplearse como agua de riego. Al mismo tiempo, se obtiene una biomasa microalgal-bacteria con una alta carga de nutrientes que se puede emplear como sustrato para la producción de diferentes compuestos de medio y alto valor añadido. Esta biomasa microalgal está compuesta por carbohidratos (4% a 60%), proteínas (20% a 60%) y lípidos (10-30% (González-Fernández y Muñoz, 2017). Estas composiciones dependen en gran medida de las condiciones de crecimiento de la biomasa y el tipo de especies de microalgas. Entre los factores más influyentes están:

- Nutrientes: hay varios elementos como nitrógeno, fósforo, potasio y azufre que son necesarios para el crecimiento de las células de microalga. Su disponibilidad afecta al crecimiento microalgal ya que el requerimiento de nutrientes y el ratio en que se necesita depende de la especie de microalga. Es más, la limitación de un nutriente en particular podría tener un impacto significativo en la composición bioquímica (Kamalanathan et al., 2016). Los efectos más importantes son la degradación de pigmentos como clorofila y ficocianina, que son proteínas, y la acumulación de lípidos y/o carbohidratos. La composición del microalga puede verse altamente alterada por hacer frente a unas condiciones ambientales desfavorables o deficientes en algún nutriente. En la mayoría de los casos, las condiciones de escasez de algún nutriente no tienen por qué ser necesariamente perjudiciales para que el microalga sintetice y acumule compuestos carbonados (lípidos o carbohidratos). La acumulación de carbohidratos podría ser una opción interesante en el campo de producción de bioetanol, pese a que en la mayoría de los casos, las condiciones de déficit dificultan el crecimiento de la biomasa.

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

- Luz: la luz es empleada normalmente por el microalga o la cianobacteria para fijar el carbón a través de la fotosíntesis. La cantidad y calidad de luz afecta a los ratios de crecimiento de biomasa así como su composición (Khajepour et al., 2015). El crecimiento de la biomasa aumenta cuando la intensidad lumínica aumenta hasta un máximo (las intensidades típicas de saturación están alrededor de 200-400  $\mu\text{mol}_{\text{fotones}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (González-Fernández y Muñoz, 2017), y superando este máximo podría llevar a inhibir el proceso de fotosíntesis. Como norma general, un incremento en la intensidad lumínica lleva a un incremento en el contenido de carbohidratos, diferente según la especie, por ejemplo, las cianobacterias *Porphyridium* y *Arthrospira* mostraron un crecimiento en el contenido de carbohidratos de 300% y 34% respectivamente cuando se incrementó la intensidad lumínica.
- Salinidad: si la salinidad es elevada, el microalga normalmente responde acumulando carbohidratos intracelulares de bajo peso molecular para ajustar la presión intracelular y autoprotgerse de una ósmosis no deseada. En la especie *Scenedesmus*, el contenido de carbohidratos se vio incrementado en un 35.91% en condiciones de concentración 400 mM de NaCl (Pancha et al., 2016). Con lo cual, la variación de la salinidad junto con la limitación de nutrientes es una estrategia efectiva para la acumulación de carbohidratos.

Las especies de microalgas capaces de crecer en aguas residuales son muy diversas y resistentes, y su amplio rango de composiciones, tanto en función de la especie a la que pertenecen como en función de sus condiciones de crecimiento, lleva a la existencia de diferentes tipos de pared celular presentes en ellas. El tipo de pared celular ocupa un lugar clave en la valorización de la biomasa, ya que, determina las condiciones del pretratamiento físico, químico, biológico o combinado para su ruptura.

En primer lugar, está la *membrana celular simple*, Tipo 1 en la Figura 2, que consiste en una agrupación en forma de bicapa lipídica con proteínas tanto integradas como periféricas. A veces, hay una capa de glicolípidos o glicoproteínas que envuelve la superficie exterior de la membrana. En segundo lugar, está la *membrana celular con material extracelular adicional* que está presente en cianobacterias y diversos tipos de algas, con una estructura de seis capas. En tercer lugar, están las *membranas celulares con material adicional intracelular*, en las cuales la capa protectora está formada mayoritariamente por celulosa (es el Tipo 3 en la Figura 2). Por último, existen las *membranas celulares con material intracelular y extracelular*, comúnmente presentes en *Euglenoideas* y *Cryptophytas* (Tipo 4 en la Figura 2).

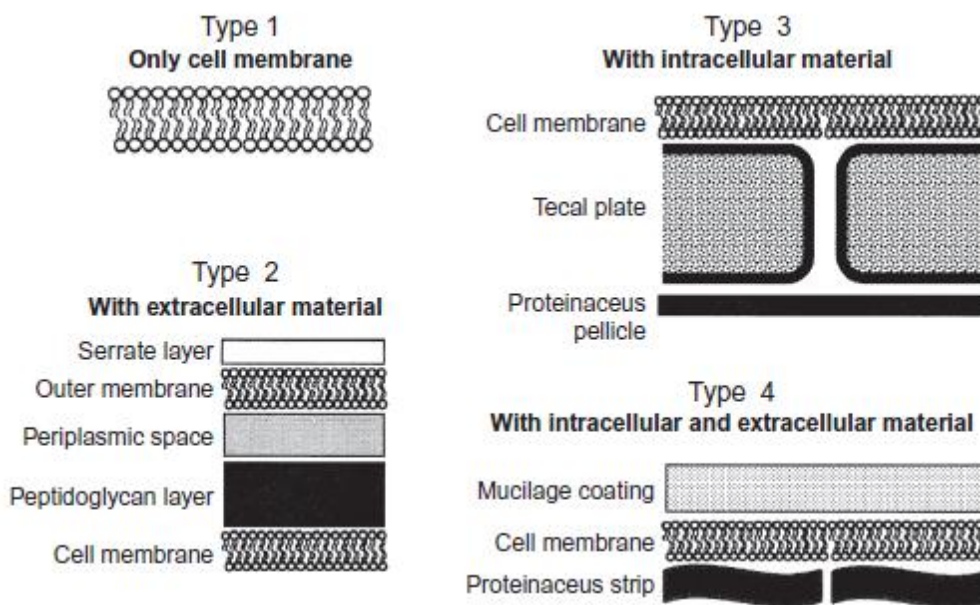


Figura 2. Representación esquemática de los tipos de membrana celular de algas y cianobacterias (González-Fernández y Muñoz, 2017)

Los pretratamientos físicos, pueden clasificarse en base a la naturaleza de las fuerzas que causan la ruptura de la membrana celular como térmicos, combinados y mecánicos. Su ventaja principal es menor contaminación y menor dependencia del rendimiento de extracción con la especie de microalga. No obstante, normalmente requieren un equipo más sofisticado y mayores cantidades de energía.

En los pretratamientos térmicos, la pared celular se rompe utilizando frío o calor, y pueden subdividirse en tres: alto (temperatura mayor de 100 °C), medio (50-100 °C) y métodos de congelación. Los métodos que implican temperaturas elevadas son los que ofrecen mejores rendimientos en la ruptura de la pared celular y normalmente se emplean para la producción de biogás.

Los métodos combinados se denominan así debido a que normalmente los métodos térmicos se combinan con cambios de presión. Atendiendo a la velocidad de liberación de presión, existen dos grandes grupos: pretratamientos hidrotermales, en los cuales la despresurización es lenta y pretratamientos de explosión de vapor, en los que la pérdida de presión es instantánea. Durante los pretratamientos de explosión a vapor, normalmente la biomasa está a su presión de vapor a elevadas temperaturas (140-180 °C) durante un tiempo que oscila entre los 5 y los 60 min. Tras ello, la mezcla de microalgas y vapor es sometida a un flash, y la biomasa es enfriada en otro depósito. La ruptura de la pared celular ocurre debido a la rápida bajada de presión (Carrere et al., 2016). Para pretratamientos de explosión a vapor en condiciones óptimas fue posible recuperar el 44% de los carbohidratos

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

presentes en el microalga y la cantidad de lípidos extraíbles aumentó de 9.8% a 18.2% (Lorente et al., 2015).

También existen los pretratamientos mecánicos, que rompen la pared celular directamente mediante una fuerza física. Uno de los pretratamientos físicos más empleados es el molino de bolas, donde la biomasa se introduce en un molino con pequeñas bolas que provocan que las células choquen con ellas y entre sí, lo que favorece la ruptura de la pared celular. Postma et al., (2015) trabajaron con *Chlorella vulgaris* para la liberación de sus productos intracelulares, y obtuvieron para todos los casos cerca de un 97% de desintegración de la célula, que resultó en una liberación de proteínas solubles. La velocidad óptima no era dependiente de la concentración de biomasa y comprobaron que estaba entre los 9-10 m/s. Montalescot et al., (2015) comprobaron que la ruptura de la pared celular se producía siguiendo una cinética de primer orden cuando *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* eran tratadas en un molino de bolas, siendo la primera más resistente que la segunda. También se ha comprobado que el pretratamiento de molino de bolas causa una liberación de componentes no selectiva entre las fases (Günerken, 2013)

Otro pretratamiento de tipo mecánico son las microondas, que son alternativas al empleo de pretratamientos térmicos. Se ha utilizado con materia prima de biomasa, incluyendo biomasa lignocelulósica, microalgal y macroalgal (Yun et al., 2016). Normalmente se utiliza una frecuencia de 2450 MHz para la ruptura de la pared celular de las microalgas (Günerken et al., 2015). Algunas ventajas de la tecnología de microondas incluyen la efectividad, robustez y fácil aumento de escala, pero la efectividad depende en gran medida del tipo de microalga (Günerken et al., 2015; Passos et al., 2015).

Por último, en cuanto a pretratamientos mecánicos es necesario mencionar el pretratamiento de ultrasonidos. Su funcionamiento consiste en la inducción de ciclos de alta y baja presión de manera alternativa en el líquido. La cavitación ultrasónica es más eficiente a bajas (18-40 kHz) que a elevadas (400-800 kHz) frecuencias. No obstante, su eficiencia depende de la especie de microalgas (forma, tamaño, estructura intercelular), condiciones de operación (temperatura, tiempo, potencia, número de ciclos) y concentración de la biomasa (E. Günerken et al., 2015; Passos et al., 2015). Passos et al (2015) demostraron que el pretratamiento de ultrasonidos (20kHz, 30 min, 26.7 MJ/kg TS) aumentó la fracción soluble de materia orgánica, proteínas, carbohidratos y lípidos en 7, 12, 9 y 3 veces respectivamente, comparado con muestras sin tratar. De la misma forma, Florentino de Souza Silva et al., (2014) aplicaron ultrasonidos (40 kHz, 60 min) en una mezcla de especies microalgales compuesta por *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae*, *Euglenophyceae* y *Bacillariophyceae*, obteniendo rendimientos de extracción de lípidos del 13.3%.

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Una desventaja importante de este tipo de pretratamiento es que su desarrollo a escala industrial tiene como limitación la moderación de los costes energéticos, que a gran escala aumentan de forma exponencial.

Otro gran grupo de pretratamientos son los pretratamientos químicos. En este tipo de pretratamientos los parámetros operacionales de mayor importancia son: el agente químico y su concentración, la temperatura, el tiempo, la concentración de biomasa y la especie de microalgas. La forma de actuar de este tipo de pretratamientos consiste en interacciones específicas con ciertos componentes de la pared celular, por lo que suelen ser más selectivos que los métodos mecánicos. Además, suelen tener mayor rendimiento de ruptura de la pared, menor consumo energético y es más simple realizar el modelo a gran escala. Como inconveniente principal está el elevado coste de los productos químicos y la necesidad de purificación de los productos, lo que podría reducir los beneficios.

Unos de los pretratamientos químicos más ampliamente empleado debido a su sencillez y su efectividad son los pretratamientos ácidos y básicos. El  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y el  $\text{HCl}$  son los agentes ácidos más empleados comúnmente y la base más empleada habitualmente es el  $\text{NaOH}$ . Estos pretratamientos han demostrado ser efectivos para extracción de compuestos fermentables y de otros, como lípidos y pigmentos (Mendes-Pinto et al., 2001; Miranda et al., 2012; Nguyen et al., 2009). Los pretratamientos ácidos o básicos concentrados normalmente son más rápidos, pero tienen efectos adversos, tales como la generación de inhibidores, corrosión de equipos, difícil recuperación de nutrientes o elevado coste operacional. Este tipo de métodos tienen una selectividad bastante baja y ello puede conllevar una separación de productos complicada. Aunque consuman más tiempo, los pretratamientos diluidos parecen más apropiados para aplicaciones industriales (Günerken et al., 2015). Por lo general, los pretratamientos básicos pueden resultar en una desnaturalización de las proteínas y los pretratamientos ácidos en la degradación de ciertos compuestos (Günerken et al., 2015). Las temperaturas elevadas en este tipo de pretratamientos aumentan los rendimientos operacionales. Se ha empleado biomasa húmeda de *Nannochloropsis salina* para la extracción de ácido eicosapentanoico (EPA), y se demostró que el tratamiento previo con ácido sulfúrico aumentaba los rendimientos de extracción de 11.8 a 58.1 mg/g<sub>células</sub> siendo las condiciones óptimas, concentración del ácido sulfúrico 1.27% w/w, 113.34 °C y 37 min (Lee & Han, 2015). También se comprobó que el ácido nítrico producía el mismo comportamiento, pero a concentraciones menores. Passos et al. (2016) combinaron el pretratamiento térmico (80 °C) con el ácido-base, y obtuvieron que para el pretratamiento contribuía mayoritariamente a la solubilización de glicoproteínas y pectinas; mientras que el ácido solubilizaba mayormente la hemicelulosa, con menor efectividad para las proteínas. Solé-

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Bundó et al. (2017) estudiaron la co-digestión anaeróbica de biomasa microalgal procedente de aguas residuales. Para mejorar la biodegradabilidad, se aplicó un pretratamiento básico (10% CaO a 75 °C durante 24 h), y se observó que el rendimiento en la producción de metano aumentó un 15% en comparación con la muestra sin tratar.

Otro pretratamiento importante es la extracción mediante líquidos iónicos, normalmente empleada para extracción de lípidos y etanol. Es una buena opción debido a su elevada capacidad para disolver moléculas orgánicas, los cortos tiempos de reacción y sobre todo, por la posibilidad de recuperación y reutilización de los líquidos iónicos. Como principal desventaja está su elevado precio y toxicidad, sobre todo en relación con la ejecución a gran escala. Kim et al. (2012) lograron un aumento de la extracción de lípidos cercano al 19% para *Chlorella vulgaris* (el porcentaje de lípidos extraíbles para muestras sin tratar era del 11%), trabajando a 65 °C durante 18 h con tres líquidos iónicos diferentes. Zhou et al. (2012) liberaron entre el 88 y el 88 wt% de los azúcares totales contenidos en *C. vulgaris* (73.58% de los azúcares totales) trabajando a 105 °C, durante 3 h con diferentes líquidos iónicos y HCl (7 wt%)

Dentro de este grupo, cabe necesario mencionar el pretratamiento mediante empleo de fluidos supercríticos, que tienen un gran potencial para romper la pared celular (Mohan et al., 2013). Este tipo de sustancias presentan las propiedades tanto de un líquido como de un gas, lo cual es favorable para la extracción de los nutrientes deseados. El producto que más se emplea es CO<sub>2</sub>, que principalmente se emplea para la extracción de lípidos, pero también ayuda en menor medida a la liberación de los carbohidratos. Las principales ventajas de este método es que no se emplean componentes tóxicos, la posibilidad de ajustar presión y temperatura para conseguir la interacción deseada entre el fluido supercrítico y la biomasa y la amplia disponibilidad de equipos. Como principal desventaja está el elevado consumo de potencia y el coste y la dificultad que supondrían su ejecución a gran escala. Algunos ejemplos de aplicación de este tipo de pretratamiento lo hicieron Bahadar et al., (2015) que aplicó este método a *C. vulgaris*, que contenía un 18% de lípidos, y obtuvieron un rendimiento de extracción de 17.7 wt% a 7000 psi, 60 °C y 3 g CO<sub>2</sub>/min durante 3 horas. Thana et al., (2008) lograron una recuperación del carotenoide astaxantina del 83.8% con un rendimiento de extracción del 23 mg/g de células de *Haematococcus pluvialis*, empleando CO<sub>2</sub> supercrítico en condiciones óptimas (50 MPa, 70 °C, 4h). Harun et al. (2010) trabajaron a 60 °C, 400 mL/min de CO<sub>2</sub> y obtuvieron una concentración de etanol que era el 60% superior comparada con la biomasa sin tratar.

Por último, se encuentran los pretratamientos biológicos, dentro de los cuales el más empleado es la hidrólisis enzimática. Esta etapa puede aplicarse de forma única o tras un pretratamiento de otro tipo. La hidrólisis enzimática se

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

aplica, además, para romper los macrocomponentes presentes en la biomasa, transformando carbohidratos en monosacáridos, proteínas en aminoácidos o lípidos en ácidos grasos, si resulta necesario para su mejor aprovechamiento posterior.

El factor clave de este proceso es el tipo de enzima a utilizar, pues determina las condiciones de operación: temperatura, pH, contenido de biomasa, concentración de la enzima, tiempo y velocidad de agitación. Algunas de las enzimas más frecuentes son celulasas, glicosidasas, amilasas, proteasas, xilanasas, peptidasas y lipasas, en función del objetivo final con que se realice la extracción. Las enzimas son catalizadores biológicos altamente selectivos, lo cual otorga al proceso de hidrólisis enzimática una selectividad muy elevada, entre otras numerosas ventajas como elevado rendimiento, condiciones de operación media, bajo requerimiento de energía, baja inversión de capital y facilidad en cuanto a la ejecución a gran escala. No obstante, tiene también aspectos negativos, siendo el más importante el elevado coste de las enzimas. Como posible solución a este problema, se plantea la recuperación de las enzimas, aplicando técnicas de inmovilización enzimática. Las enzimas se fijarían a un soporte que permita, una vez finalizada la incubación, recuperarlas, aunque la información sobre esta posible solución de momento es escasa (Yoo et al., 2014). Además, por el hecho de estar fijada, la enzima pierde parte de su actividad, y es posible que se pierda la homogeneidad del conjunto, dado que no todas las enzimas se fijan en la misma posición en el soporte y esta posición altera su actividad enzimática (Lam & Lee, 2015).

La hidrólisis enzimática ha llegado a reportar rendimientos de hasta el 60% para la extracción de aminoácidos de *Scenedesmus almeriensis*, mediante el empleo de las enzimas comerciales Alcalase y Flavourzyme (Romero García et al., 2012) y también se ha conseguido aumentar el rendimiento de extracción de lípidos de la *Nannochloropsis* de un 16% a un 40% en comparación con la biomasa sin tratar (Zuorro et al., 2016), mediante el empleo de diferentes combinaciones de enzimas. Ho et al., (2013) obtuvieron un 90.4% de liberación de glucosa de *Chlorella vulgaris*, empleando endoglucanasa (0.65 U/mL),  $\beta$ -glucosidasa (1.50 U/mL) y amilasa (0.09 U/mL), siguiendo una incubación de 3 días a 200 rpm y 45 °C. Martín Juárez et al., (2016) obtuvieron elevados rendimientos para la extracción de glucosa para tres tipos diferentes de aguas residuales domésticas; éstos fueron del 93.6%, 87.1% y 65.1%. Sin embargo, los rendimientos de extracción de xilosa fueron notablemente más bajos, siendo para los mismos tipos de agua residual de 23.5%, 21.2% y 12.6%. Harun & Danquah, (2011) realizaron hidrólisis enzimática de biomasa microalgal para la producción de bioetanol, y obtuvieron como máximo rendimiento de extracción de glucosa 64.2%, a una temperatura de 40 °C, pH 4.8 y concentración de sustrato de 10 g/L de biomasa microalgal. También se ha

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

empleado la hidrólisis enzimática para estudiar la posibilidad de la extracción de lípidos, comprobando que la ruptura de la pared celular se producía gracias a la ruptura de enlaces  $\beta$ -glucosídicos y llevando a un enfoque prometedor que llevará a mejorar los rendimientos de extracción de lípidos a partir de microalgas (Zhang et al., 2018). Del mismo modo, también se ha estudiado la extracción de L-aminoácidos a partir de microalgas mediante hidrólisis enzimática, habiendo realizado previamente el pretratamiento del molino de bolas. Las enzimas empleadas fueron Alcalase y Flavourzyme, y se comprobó que la máxima extracción se obtuvo para una concentración de biomasa de 270 g/L y previo tratamiento adicional de Viscozyme, reportando un rendimiento del 42% durante 4 h. Posteriormente se repitió exactamente en las mismas condiciones, pero con dos etapas sucesivas (8 h), obteniendo un rendimiento en este caso del 59% (Romero García et al., 2012).



## 1.2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado se enmarca dentro de un proyecto de investigación sobre valorización fraccional de los diferentes componentes de biomasa microalgal crecida en plantas de tratamiento de aguas residuales.

El objetivo global del trabajo es maximizar la extracción de la fracción carbohidrato de la biomasa algal, para su valorización fraccionada, evaluando el efecto de diferentes parámetros de operación considerados claves en las etapas de pretratamiento químico e hidrólisis enzimática sobre los rendimientos de liberación y recuperación de azúcares. Se estudia también el efecto de la extracción de azúcares sobre el resto de la biomasa, aplicando el concepto de biorrefinería para evaluar procesos de valorización secuencial, analizando el efecto de los factores estudiados en la liberación de proteínas y lípidos. Para conocer la influencia del tipo de biomasa algal empleada, se trabaja realizando todos los experimentos para tres tipos de biomasa de tres procedencias (tratamiento de purines, tratamiento de aguas residuales domésticas y pura crecida en medio sintético). Dada la gran cantidad de factores a analizar se aplica un diseño de experimentos de Taguchi  $L_{27}(3^{13})$  que permite la evaluación y optimización de los parámetros a través de un tratamiento estadístico de los resultados.

Para los objetivos parciales del proyecto son los que se enumeran a continuación:

1. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico en el rendimiento de liberación de azúcares de la fracción carbohidrato de la biomasa algal.
2. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico en el rendimiento de recuperación de azúcares de la fracción carbohidrato de la biomasa algal, teniendo en cuenta su posible degradación.
3. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico aplicado para la liberación de carbohidratos sobre los rendimientos de liberación de proteínas y lípidos de la biomasa algal.
4. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico y la hidrólisis enzimática en el rendimiento global de liberación de azúcares de la fracción carbohidrato de la biomasa algal.
5. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico y la hidrólisis enzimática en el rendimiento global de recuperación de azúcares de la fracción carbohidrato de la biomasa algal, teniendo en cuenta su posible degradación.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

6. Evaluar el efecto de los principales parámetros de operación del pretratamiento químico y la hidrólisis enzimática aplicados para la liberación de carbohidratos sobre los rendimientos globales de liberación de proteínas y lípidos de la biomasa algal.
7. Seleccionar las condiciones de operación que maximicen la recuperación de azúcares de la biomasa algal, facilitando la valorización secuencial del resto de los componentes.
8. Analizar la influencia de la procedencia de la biomasa algal en los rendimientos de liberación y recuperación de sus componentes, en función de los parámetros de operación aplicados.

## 2. DESARROLLO DEL TFG

### 2.1. NOMENCLATURA

A lo largo de este trabajo se emplearán las siguientes abreviaturas para referirse a los diferentes factores que influyen en el diseño de experimentos:

$C_A$ : concentración del alga (g/L)

$C_Q$ : concentración del agente químico (mol/L)

E: concentración de la enzima (FPU)

$e_H$ : efecto Dummy (debido a la presencia de dos niveles correspondientes a HCl (1 y 3) y sólo uno de NaOH (2) en el factor de tipo de agente químico)

H: tipo de agente químico

N: factor de ruido (tipo de alga)

T: temperatura (°C)

t: tiempo de pretratamiento (min)

$t_H$ : tiempo de hidrólisis enzimática (h)

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. BIOMASA

Para la realización de este proyecto, se emplearon tres tipos de biomazas microalgales: procedente del tratamiento de aguas de purines, de aguas residuales, y la biomasa pura, para comprobar el efecto que tenía el origen de la biomasa sobre la extracción de los componentes.

#### 2.2.1.1. BIOMASA ALGA PURINES

La biomasa fue cultivada en un fotobiorreactor de capa fina, de volumen 1200L, y alimentado con agua procedente del tratamiento de purines. La composición de esta biomasa es: 22.31% carbohidratos, 51.73% proteínas, 13.41% lípidos y 19.75% sólidos totales. El tipo de microalga mayoritaria resultó *Scenedesmus almeriense*. La biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería) y conservada a una temperatura de 4 °C antes de su utilización.

#### 2.2.1.2. BIOMASA ALGA AGUA RESIDUAL

La biomasa fue obtenida de un fotobiorreactor de capa fina alimentado con aguas residuales de uso doméstico. Su composición es: 24.17% carbohidratos, 45.40% proteínas, 13.99% lípidos y 24.34% sólidos totales. La especie mayoritaria de microalga también fue *Scenedesmus almeriense*. La biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería) y conservada a 4 °C antes de su utilización.

#### 2.2.1.3 BIOMASA ALGA PURA

La biomasa, de la especie *Scenedesmus almeriense*, fue cultivada en un fotobiorreactor tubular cerrado, empleando una disolución sintética. Su composición es: 21.93% carbohidratos, 58.00% proteínas, 13.74% lípidos y 18.64% sólidos totales. La biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería) y conservada a 4 °C antes de su utilización.

### 2.2.2. PRETRATAMIENTOS ÁCIDO Y BÁSICO

Tanto los tipos de pretratamiento como el intervalo de trabajo de todos los parámetros de operación analizados se eligieron en base a estudios previos realizados en el grupo, algunos de ellos ya publicados (Martín Juárez et al., 2016) (Martín Juárez et al., 2018).

Para realizar los pretratamientos ácido y básico se emplearon botellas de borosilicato de 1 L de capacidad, aunque el volumen final de la mezcla del pretratamiento eran 300 mL.

En primer lugar, se preparó la disolución de la biomasa para que tuviese la concentración adecuada a cada condición. A continuación, se añadía agua y el agente químico (HCl o NaOH) en la cantidad necesaria para alcanzar la concentración correspondiente a cada condición y se completaba hasta 300 mL de volumen final con agua de clase II. Posteriormente, esa botella se introducía bien en un baño termostático o bien en el autoclave y se configuraba para que estuviese a la temperatura fijada el tiempo correspondiente a cada condición. Una vez pasado este tiempo, las botellas se dejaban enfriar y se centrifugaba el contenido durante 6 minutos a una velocidad de 10000 rpm con el objetivo de separar las fracciones sólidas y líquidas, que se almacenaban a 4 °C hasta su utilización para los análisis de lípidos, proteínas y azúcares en la fracción sólida y de proteínas y azúcares en la fracción líquida, además de sólidos totales y volátiles en ambas fracciones.

### 2.2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Partiendo de la experiencia previa del grupo en este campo, se seleccionaron los factores claves de esta etapa y su rango de estudio. Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 100 mL. Cada Erlenmeyer contenía 1.5 g de las suspensiones completas pretratadas, se añadía la cantidad de enzima Celluclast correspondiente y se añadía Buffer de Citrato 1 M. El pH fue ajustado a 4.8 y el volumen final a 25 mL. Las hidrólisis se llevaron a cabo a una temperatura de 50 °C y a una velocidad de agitación de 300 rpm. Posteriormente, se separaron las fracciones sólida y líquida mediante centrifugación (10', 5000 rpm).

Tras la hidrólisis, las muestras se almacenaron a 4 °C previamente a realizar la determinación de azúcares, proteínas y lípidos en la fracción sólida y la determinación de azúcares y proteínas en la fracción líquida, además de los sólidos totales y volátiles en ambas fracciones.

#### 2.2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se ha empleado un diseño experimental con una matriz ortogonal de Taguchi  $L_{27}(3)^{13}$  con el objetivo de estudiar el efecto de las siete principales variables de operación seleccionadas, 5 correspondientes a la etapa de pretratamiento (tipo de agente químico H, concentración de alga  $C_A$ , concentración del agente químico  $C_Q$ , temperatura T y tiempo t) y 2 a la de hidrólisis enzimática (concentración de la enzima E y tiempo  $t_H$ ) al mismo tiempo. Para cada variable, se ha trabajado con 3 niveles y la matriz completa obtenida se ha aplicado para cada uno de los 3 tipos de biomasa microalgales, que han actuado por tanto como factor ruido. El diseño de experimentos aplicado permite también evaluar el efecto de la interacción entre algunas parejas de variables. Las interacciones seleccionadas en este trabajo han sido concentración de agente químico-temperatura, concentración de agente químico-tiempo de pretratamiento y temperatura-tiempo de pretratamiento.

En la Tabla 1 se presentan los diferentes niveles de los factores estudiados, seleccionados en base a experiencias previas realizadas para algas de purines (Martín Juárez et al., 2018):

*Tabla 1. Niveles de los factores estudiados*

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	
H	HCl	NaOH	HCl	-
$C_A$	50	75	100	g/L
$C_Q$	0,5	1	2	mol/L
T	80	100	120	°C
t	10	30	60	min
E	10	30	60	FPU
$t_H$	3	6	12	h

A continuación, en la Tabla 2, se muestra el diseño de experimentos completo, aplicado a las 3 biomasa algales:

Tabla 2. Diseño de experimentos

Experimento	H	C <sub>A</sub>	C <sub>Q</sub>	T	t	E	t <sub>H</sub>
	-	g/L	mol/L	°C	min	FPU	h
1	HCl	50	0,5	80	10	10	3
2	NaOH	75	0,5	80	30	20	6
3	HCl	100	0,5	80	60	30	12
4	HCl	75	0,5	100	10	20	12
5	HCl	100	0,5	100	30	30	3
6	NaOH	50	0,5	100	60	10	6
7	NaOH	100	0,5	120	10	30	6
8	HCl	50	0,5	120	30	10	12
9	HCl	75	0,5	120	60	20	3
10	HCl	75	1	80	10	30	6
11	HCl	100	1	80	30	10	12
12	NaOH	50	1	80	60	20	3
13	NaOH	100	1	100	10	10	3
14	HCl	50	1	100	30	20	6
15	HCl	75	1	100	60	30	12
16	HCl	50	1	120	10	20	12
17	NaOH	75	1	120	30	30	3
18	HCl	100	1	120	60	10	6
19	NaOH	100	2	80	10	20	12
20	HCl	50	2	80	30	30	3
21	HCl	75	2	80	60	10	6
22	HCl	50	2	100	10	30	6
23	NaOH	75	2	100	30	10	12
24	HCl	100	2	100	60	20	3
25	HCl	75	2	120	10	10	3
26	HCl	100	2	120	30	20	6
27	NaOH	50	2	120	60	30	12

Por último, se muestra la matriz del diseño experimental en la Tabla 3:

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Tabla 3. Matriz del diseño experimental L27 con sus diferentes niveles

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	$C_Q$	T	$C_Q \times T$	$C_Q \times T$	t	$C_Q \times t$	$C_Q \times t$	T x t	$C_A$	E	T x t	$t_H$	H
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	1'
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	1'
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	1'
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1'
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	1'
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	1'
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	1'
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	1'
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	1'
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2



### Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Se utilizó el análisis de varianza con el objetivo de detectar los factores más significativos en la maximización de (1) la liberación, (2) la recuperación de azúcares y (3) la liberación de proteínas global teniendo en cuenta ambas etapas (pretratamiento e hidrólisis enzimática). El rendimiento de liberación de lípidos (4) es minimizado, aplicando un criterio de valorización secuencial. Como se verá en el apartado de conclusiones, no ha sido posible liberar de forma selectiva los azúcares. Los pretratamientos con NaOH y HCl liberan tanto proteínas como azúcares, por lo que la alternativa sobre la que se ha trabajado es maximizar la liberación de azúcares y proteínas y minimizar la liberación de lípidos.

Se realizó el Test de Duncan para determinar las diferencias significativas entre los niveles de los factores más influyentes del ANOVA.

#### 2.2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Las mediciones de identificación, cuantificación y biometría del microalga se llevaron a cabo por examinación microscópica (OLYMPUS IX70) de muestras de este microalga (fijadas con lugol ácido al 5% y almacenadas a 4 °C previamente al análisis) de acuerdo con Sournia, (1978).

Los sólidos totales y sólidos volátiles fueron medidos siguiendo el NREL (National Renewable Energy Laboratory – USA) (Van Wychen & Laurens, 2013).

El contenido de carbohidratos de la fracción sólida se determinó mediante hidrólisis ácida y HPLC-RI utilizando una modificación del procedimiento NREL (Van Wychen & Laurens, 2013). En primer lugar, la biomasa se sometía a una hidrólisis ácida concentrada durante 1 h, añadiendo 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72% w/w) a 30 °C. Después, se agregaban 84 mL de agua desionizada para diluir la concentración de ácido al 4% w/w, y a continuación se autoclavaba durante 1 h a 120 °C. Posteriormente, las fracciones sólida y líquida fueron separadas mediante filtración y la fracción líquida se almacenaba a 4 °C. La fracción líquida del pretratamiento se almacenaba directamente a 4 °C. Para ambas, se empleó una columna de exclusión de iones Bio-Rad HPX-87H instalada en un módulo de separación Waters e2695 equipada con un detector de índice de refracción Waters 2414 empleado para cuantificar la cuantificación de azúcares (glucosa, xilosa, celobiosa y arabinosa) y subproductos (ácidos oxálico, fórmico, acético, butírico, succínico y levulínico, metanol y xilitol) en la fracción líquida tanto de los pretratamientos como de las hidrólisis enzimáticas. Una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025 M fue eluída a un flujo de 0.6mL/min y 50 °C. Se emplearon patrones externos para la cuantificación.

El contenido de proteínas fue determinado con el método Nitrógeno Total Kjeldahl, multiplicando por un factor de 5.95. El contenido de lípidos fue determinado por el método de Kochert (Crisóstomo-Vázquez et al., 2016).

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

2.2.6. MÉTODOS DE CÁLCULO

Las variables a estudiar, azúcar recuperado y liberado, degradación de azúcares proteínas liberadas y lípidos liberados, se han calculado analíticamente empleando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ liberación azúcar} = 100 - \frac{g \text{ sólido}_{pretrat/HE} \cdot \% \text{ carbohidratos}_{sólido}}{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ carbohidratos}_{alga \text{ inicial}}} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\% \text{ recuperación azúcar} = \frac{C \text{ carbohidratos}_{fase \text{ líq}} \left( \frac{g}{L} \right) \cdot V \text{ líq}_{pretrat/HE} (L)}{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ carbohidratos}_{alga \text{ inicial}}} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\% \text{ degradación} = \frac{\% \text{ liberación azúcar} - \% \text{ recuperación azúcar}}{\% \text{ liberación azúcar}} \quad \text{Ec. 3}$$

$$\begin{aligned} & \% \text{ liberación proteínas} \\ & = \frac{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ proteína}_{alga \text{ inicial}} - g \text{ sólido}_{pretrat/HE} \cdot \% \text{ proteína}_{sólido}}{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ proteína}_{alga \text{ inicial}}} \quad \text{Ec. 4} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \% \text{ liberación lípidos} \\ & = \frac{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ lípidos}_{alga \text{ inicial}} - g \text{ sólido}_{pretrat/HE} \cdot \% \text{ lípidos}_{sólido}}{g \text{ alga}_{inicial} \cdot \% \text{ lípidos}_{alga \text{ inicial}}} \quad \text{Ec. 5} \end{aligned}$$

Las ecuaciones se han aplicado tanto para la etapa de pretratamiento como para el proceso global, tomando en cada caso los resultados del análisis de la muestra correspondiente; bien la muestra obtenida tras el pretratamiento o bien la muestra obtenida tras la hidrólisis enzimática.

### 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diseño de experimentos se ha realizado para estudiar el efecto de diversos parámetros, considerados los más influyentes: concentración de alga, tipo de agente químico, concentración del agente químico, tiempo de pretratamiento, temperatura de pretratamiento, tiempo de hidrólisis enzimática y concentración de enzimas en la hidrólisis enzimática; y dos interacciones entre ellos: concentración de agente químico-temperatura y temperatura-tiempo de pretratamiento. Además, el tipo de microalgas (procedente de purines, residual y pura) fue estudiado como factor de ruido sobre las dos etapas del proceso, pretratamiento e hidrólisis. El orden de realización de los experimentos fue aleatorio. Las diferencias entre los valores fueron estudiadas mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Las variables a estudiar son: azúcar liberado, azúcar recuperado, proteínas liberadas y lípidos liberados, de las cuales el azúcar liberado, azúcar recuperado y las proteínas liberadas se han maximizado y los lípidos liberados se han minimizado.

Los resultados obtenidos en cuanto a rendimientos de dichas variables se muestran en la Tabla 4 para la etapa de pretratamiento, y en la Tabla 5 se muestran los rendimientos globales, en el mismo orden de 1 a 27 como se presentó el diseño de experimentos en la Tabla 2.

Tabla 4. Rendimientos de la etapa de pretratamiento

Liberación azúcar (pretrat)			Recuperación azúcar (pretrat.)			Degradación (pretrat.)			Liberación proteínas (pretrat.)			Liberación lípidos (pretrat.)		
ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:
PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA
Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1
27,58	37,14	12,62	4,17	9,98	4,25	84,89	73,13	66,30	17,65	13,18	17,77	0,85	62,15	43,67
44,56	33,04	47,91	8,94	7,51	17,42	79,94	77,27	63,64	37,16	33,56	48,04	2,01	39,81	78,15
39,75	54,36	20,00	4,97	8,82	6,56	87,50	83,78	67,21	25,88	22,55	32,60	10,84	67,19	25,68
75,43	44,26	56,55	10,27	15,15	31,44	86,39	65,77	44,40	34,21	46,48	29,35	30,42	69,24	45,47
72,52	66,85	68,62	15,82	15,40	30,35	78,19	76,97	55,77	45,29	26,08	38,35	19,53	29,27	13,80
39,83	44,96	75,88	12,39	17,49	31,95	68,90	61,10	57,90	67,17	73,04	87,91	63,37	71,31	88,17
55,23	53,79	39,54	4,41	12,46	27,98	92,01	76,84	29,25	61,66	55,68	51,32	58,66	64,83	76,66
84,85	84,78	78,25	76,21	56,05	70,34	10,18	33,88	10,10	66,60	57,38	67,80	11,62	31,77	16,30
85,16	74,70	74,76	55,58	52,30	50,54	34,73	29,99	32,40	58,35	49,44	35,43	6,67	18,94	22,86
51,51	34,11	22,24	2,78	8,64	7,60	94,60	74,67	65,82	13,33	17,33	20,03	6,61	65,51	45,64
57,31	63,68	51,43	4,10	7,91	15,79	92,84	87,58	69,29	12,56	20,86	21,52	13,38	44,38	43,83
25,13	53,07	67,37	13,58	10,17	26,65	45,95	80,85	60,44	66,55	53,07	81,30	4,90	49,85	88,77
61,25	61,38	44,72	19,35	8,66	30,11	68,41	85,89	32,67	64,38	54,19	64,27	9,14	6,65	77,04
81,68	84,26	66,91	44,46	46,64	56,63	45,57	44,64	15,36	56,49	57,95	58,01	15,70	44,23	48,59
73,59	80,02	74,39	72,70	50,65	64,18	1,20	36,70	13,73	54,41	60,79	55,48	2,43	38,67	28,22
87,28	87,84	78,10	54,18	62,21	71,67	37,92	29,18	8,23	52,16	62,99	62,02	11,89	33,62	40,80
57,53	45,44	64,64	22,12	15,03	37,00	61,54	66,91	42,76	86,21	74,90	85,93	13,51	64,25	77,81
85,28	82,39	67,25	54,57	57,75	52,32	36,01	29,91	22,20	70,96	62,88	42,97	21,99	29,62	21,85
51,63	28,04	27,58	7,50	7,57	20,84	85,47	73,01	24,43	55,89	60,56	33,78	2,76	53,47	92,39
60,32	66,91	66,68	24,29	15,22	31,17	59,72	77,25	53,25	27,87	49,80	34,87	9,95	19,50	50,65
83,80	73,98	63,59	59,97	29,91	54,87	28,44	59,57	13,72	53,74	24,31	40,55	17,43	41,08	42,88
85,87	94,46	84,97	49,28	44,46	77,45	42,61	52,93	8,85	51,45	92,04	74,84	9,58	77,67	59,17
55,18	76,32	79,10	13,32	14,40	31,95	75,86	81,13	59,62	81,83	67,00	89,10	37,25	92,99	96,46
74,96	84,07	70,78	68,48	52,15	58,98	8,64	37,97	16,67	42,10	70,97	51,00	4,60	47,74	18,38
85,22	84,70	83,51	52,97	58,75	79,58	37,85	30,64	4,71	60,07	66,87	75,46	15,88	1,19	58,84
87,75	82,88	78,09	48,21	50,06	66,96	45,05	39,59	14,25	66,53	72,06	50,93	26,48	40,23	32,73
67,32	76,54	86,72	32,63	21,26	39,67	51,53	72,22	54,25	86,23	78,38	95,77	44,34	92,91	95,66

Tabla 5. Rendimientos globales

Liberación azúcar (global)			Recuperación azúcar (global)			Degradación (global)			Liberación proteínas (global)			Liberación lípidos (global)		
ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:	ALGA 1:	ALGA 2:	ALGA 3:
PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA	PURINES	RESIDUAL	PURA
Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1	Réplica1
37,58	75,05	38,57	5,09	13,94	8,75	86,46	81,43	77,31	53,85	40,74	39,99	10,83	76,87	65,07
67,02	86,90	58,30	11,06	20,12	23,53	83,50	76,84	59,64	89,20	77,78	67,66	14,17	87,06	82,92
47,16	99,30	54,44	5,97	52,93	14,54	87,34	46,69	73,30	67,01	65,71	50,01	26,04	68,03	46,09
85,72	86,95	68,52	11,90	25,44	34,47	86,11	70,74	49,69	77,30	72,21	35,23	40,29	71,12	60,20
81,89	98,43	90,95	19,31	45,61	46,83	76,42	53,66	48,51	84,76	61,41	50,36	31,17	57,42	53,08
49,80	68,74	99,69	14,90	33,65	54,87	70,08	51,05	44,96	85,92	84,60	90,59	68,25	79,29	89,08
68,72	87,10	96,70	14,85	35,29	82,63	78,39	59,49	14,56	85,73	77,22	78,86	60,06	68,78	77,89
91,04	92,16	96,55	78,44	60,85	87,25	13,84	33,97	9,64	87,93	91,25	80,97	37,13	52,99	57,97
93,87	97,50	92,33	57,30	71,88	64,31	38,96	26,28	30,35	91,11	86,55	74,02	56,98	41,44	81,71
65,10	61,43	49,09	6,75	22,78	18,25	89,64	62,92	62,82	79,61	45,46	41,56	56,21	75,54	60,94
71,53	70,06	67,49	6,71	10,57	24,77	90,62	84,92	63,31	71,12	31,68	38,27	47,41	53,16	61,40
33,77	88,96	84,18	15,58	17,82	38,43	53,86	79,97	54,35	90,85	83,96	86,95	22,71	79,56	89,34
65,92	91,02	93,67	20,35	37,95	41,00	69,12	58,31	56,22	76,53	78,94	95,42	39,68	54,76	93,64
88,81	97,51	86,47	48,07	59,09	75,57	45,87	39,41	12,61	83,29	81,71	72,13	36,48	47,60	70,73
81,28	91,00	86,36	75,74	57,24	74,77	6,83	37,10	13,42	91,32	84,34	64,15	15,89	40,81	65,27
92,97	99,90	92,61	55,89	73,79	84,02	39,88	26,14	9,27	80,77	88,16	70,03	48,01	42,09	50,97
70,83	97,92	89,60	30,32	66,88	61,26	57,19	31,70	31,63	96,51	94,55	92,59	26,85	75,61	81,59
90,63	95,77	93,65	57,04	69,79	74,38	37,06	27,13	20,58	87,28	75,00	85,15	48,08	50,61	74,88
75,53	62,79	56,72	27,31	18,78	31,80	63,84	70,09	43,94	85,21	91,20	63,75	30,31	58,37	97,99
85,89	85,39	77,16	45,91	20,54	38,35	46,55	75,95	50,30	78,22	67,65	58,45	44,42	50,05	63,76
94,68	98,08	71,08	69,31	53,42	56,32	26,79	45,53	20,77	86,23	49,61	49,33	61,92	44,46	61,65
97,73	99,45	90,75	61,05	49,31	79,64	37,53	50,41	12,24	90,94	98,63	82,30	45,82	79,20	62,00
91,02	93,84	87,25	45,70	30,91	38,71	49,79	67,06	55,63	92,16	91,19	94,08	52,73	94,08	97,67
92,19	98,91	83,70	85,61	66,78	71,33	7,13	32,49	14,78	70,49	83,95	81,39	26,49	72,82	80,39
96,66	98,37	95,27	63,88	68,14	91,20	33,92	30,73	4,27	82,08	77,31	93,32	49,33	46,37	66,08
96,97	99,36	85,91	57,27	66,07	74,32	40,94	33,51	13,49	91,65	80,37	80,38	65,34	50,83	59,39
97,42	99,25	89,41	62,03	42,35	41,70	36,33	57,33	53,36	99,49	96,23	98,81	61,22	93,73	95,90

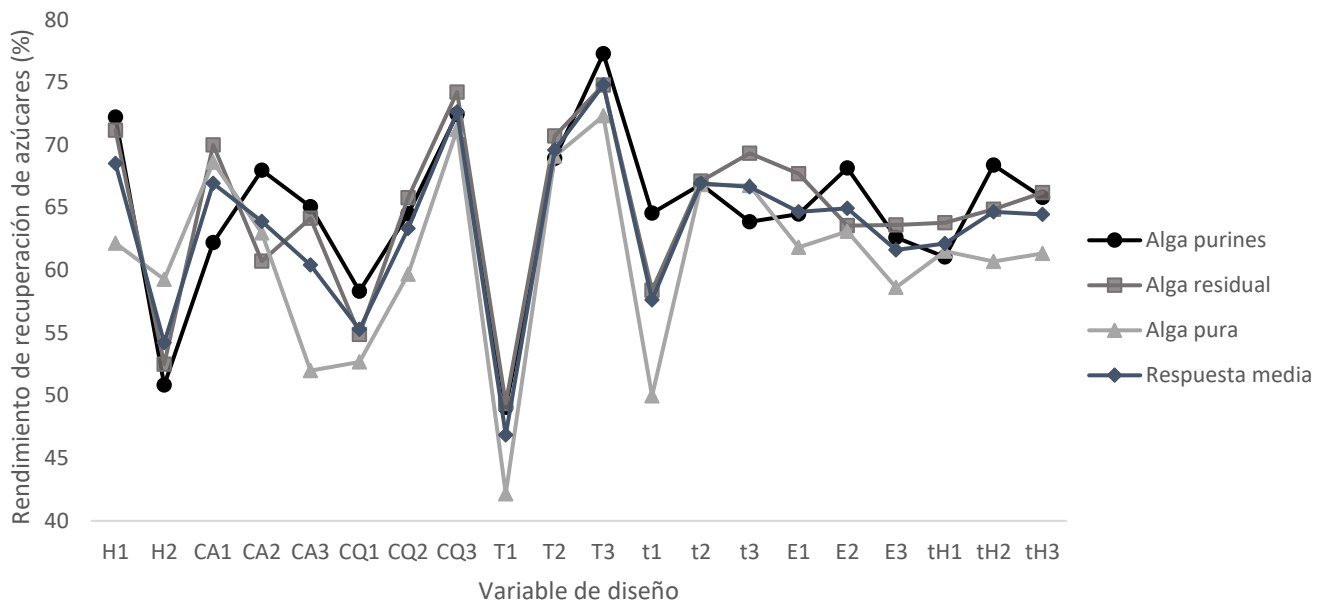
### 2.3.1. RESULTADOS PRETRATAMIENTO

#### 2.3.1.1. AZÚCAR LIBERADO

El azúcar liberado es la cantidad de azúcar que se ha conseguido extraer del núcleo celular tras la ruptura de la pared celular con el pretratamiento. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de azúcares, que es una medida de la cantidad de azúcares que se consiguen liberar respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 1 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se muestra la Gráfica 1, que representa el rendimiento de liberación de azúcares para cada nivel de cada variable de diseño para las tres algas. Para cada tipo de biomasa se calcula el promedio de rendimiento de liberación de azúcares obtenido en todos los experimentos del diseño experimental que aplican ese nivel de la variable, es decir, por ejemplo, el valor correspondiente a T2 es el valor promedio de todos los rendimientos de liberación de azúcares obtenidos en experimentos en los que se ha aplicado una temperatura de pretratamiento de 100°C, sean cuales sean los valores del resto de los factores). Se representa, además, los valores promedios para las tres algas para cada nivel del factor. Existe una tendencia similar entre todas ellas (la que más se aleja de esta tendencia es el alga pura) y ninguna de ellas tiene en todo momento un valor superior al resto, siendo los mayores rendimientos los correspondientes al alga procedente de aguas residuales y de algas de purines. El rango de liberación en el que se encuentran los resultados obtenidos son: alga de purines 50-76%, alga residual 47-73% y alga pura 42-70%.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal



Gráfica 1. Respuestas medias del rendimiento de liberación de azúcares en función de las variables de diseño para cada tipo de alga en la etapa de pretratamiento

En la Tabla 6 se presenta el ANOVA respuestas se muestra la influencia de los factores a estudiar y sus interacciones en presencia del factor ruido, es decir, aquéllos que poseen un p-valor inferior a 0.05 son factores significativos. Por orden de influencia, los factores más significativos en cuanto a liberación de azúcares son: temperatura (38%), concentración del agente químico (13%), tipo de agente químico (12%), interacción entre temperatura y tiempo de pretratamiento (5%), tiempo de pretratamiento (5%) y el resto que se pueden observar en la Tabla 6 cuyo p-valor es inferior a 0.05, y poseen una contribución menor o igual a 4%.

Aunque el factor de ruido N no sea una de ellas, es importante consultar el ANOVA S/R ratio, que es el ANOVA respuestas pero habiendo suprimido el efecto del ruido, es decir, de la diferencia de tipo de alga, porque puede que cada alga presente un tipo de comportamiento y es algo que se está ignorando al no suprimir el factor ruido. En la Tabla 6 se presentan de izquierda a derecha, la fuente de variación, es decir, el factor o interacción estudiado, el p-valor para cada uno de los factores, cuyo nivel de significancia es 0.05 y el porcentaje de contribución que representan cada uno de los factores estudiados a la variable de azúcares liberados en el pretratamiento.

*Tabla 6. ANOVA respuestas para la liberación de azúcares promedio para las tres algas en la etapa de pretratamiento*

<b>Fuente variación</b>	<b>p-value</b>	<b>%Contrib.</b>
C <sub>Q</sub>	3,249·10 <sup>-10</sup>	13,05
T	6,403·10 <sup>-18</sup>	38,27
C <sub>Q</sub> X T	0,1951	
t	2,260·10 <sup>-5</sup>	4,84
C <sub>Q</sub> X t	0,0099	2,67
T x t	0,0002	4,89
C <sub>A</sub>	0,0091	1,85
H	1,875·10 <sup>-10</sup>	11,84
N	0,1017	
C <sub>Q</sub> xN	0,7396	
TxN	0,5678	
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,0113	4,07
txN	0,0097	2,68
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,7619	
(TxT)xN	0,4905	
C <sub>A</sub> xN	0,0008	4,03
HxN	0,0001	3,85
Residual		7,96
Total		100,00

En este caso, tras la supresión del factor ruido, se obtiene el ANOVA S/R ratio (Tabla 7), en el cual se observa que los factores significativos son los mismos que antes (debido a que el ruido no era un factor significativo), excepto que ahora han tomado mayor importancia las contribuciones en porcentaje: la temperatura (48%), la concentración del agente químico (15%), la interacción entre temperatura y tiempo de pretratamiento (10%), el tiempo de pretratamiento (9%) y el tipo de agente químico (8%).

Para un mismo nivel de concentración, la liberación de azúcares es menor en todos los casos con NaOH que con HCl, con valores que se reducen desde un máximo de 94% para HCl 2 M hasta 28% para NaOH 2M para el alga residual. Sin embargo, este efecto es menor para el alga pura, que va de 85% a 28%. Con la temperatura, el efecto es muy pronunciado para la diferencia entre 80 °C y 100 °C, que para una concentración de HCl 1 M va de 51-57% a 74-82%, y menos acusado para el cambio de 100 a 120°C, que provoca un cambio de 74-82% a 85-87% para el alga de purines. Para la concentración del agente químico, a la misma temperatura, es cierto que se observan rendimientos mayores para mayores concentraciones de éste, por ejemplo, para temperatura



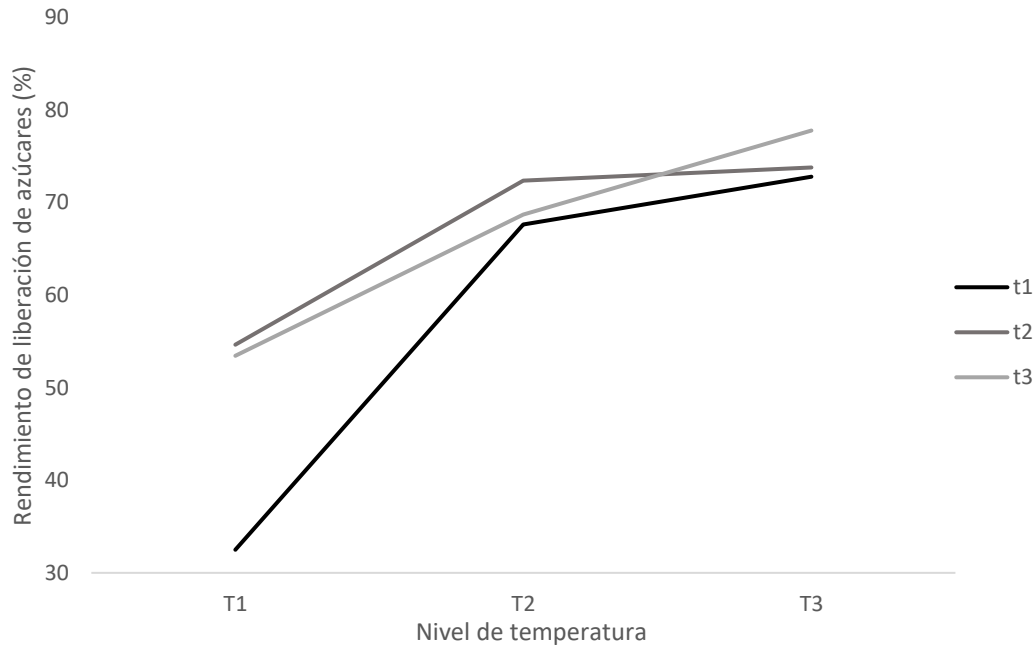
Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

de 120°C y para el alga pura, la diferencia entre 0.5 M y 2 M es máxima, pasando de 75-78% a 84-87%. Por último, para tiempos de pretratamiento, también se ha observado la misma tendencia, a aumentar el rendimiento cuando aumenta este tiempo. Para HCl 1 M a 100°C durante 10 y 60 min la mayor diferencia se produjo para el alga pura, que pasó de un rendimiento de liberación de azúcares de 45 a 74%.

*Tabla 7. ANOVA S/R ratio para la liberación de azúcares en la etapa de pretratamiento*

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0009	14,84
T	1,293·10 <sup>-6</sup>	48,48
C <sub>Q</sub> X T	0,2256	
t	0,0075	8,76
C <sub>Q</sub> X t	0,3183	
T x t	0,0200	10,29
C <sub>A</sub>	0,6170	
H	0,0027	8,12
Residual		9,51
Total		100,00

La interacción temperatura-tiempo de pretratamiento ha resultado significativa, pero, en contra de lo esperado, no se ha observado una interacción apreciable entre concentración de agente químico y temperatura. En la Gráfica 2 se muestra la forma de interactuar de las dos variables; la existencia de puntos de corte en ella, como se puede observar, indica que la interacción como tal es un factor influyente. Parece que, a baja temperatura, el factor tiempo es muy importante, sobre todo para tiempos cortos ( $t_2$  y  $t_3$  son muy similares), pero a la temperatura de 100°C lo es menos, y a 120°C se cruzan los tiempos, porque el efecto del tiempo se reduce considerablemente a altas temperaturas. Es importante destacar que para el alga de aguas residuales domésticas la diferencia de temperatura entre 100 y 120°C deja de tener importancia, pues la línea entre esos dos puntos es horizontal, es decir, ambas temperaturas reportarían el mismo rendimiento.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Gráfica 2. Interacción entre temperatura y tiempo en la etapa de pretratamiento

Las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de los factores que producen la respuesta óptima se evaluaron mediante la prueba de rango múltiple de Duncan (Ross, 1988). Se utilizó un nivel de significancia  $p=0.05$  en todos los cálculos estadísticos. Con el empleo de esta prueba se comprueba si existe diferencia significativa entre los diferentes niveles de un mismo factor sobre la variable estudiada.

La realización del Test de Duncan a las variables significativas mostró que, para la temperatura, existen diferencias significativas entre todos los niveles, estando el óptimo en el nivel 3 ( $121^{\circ}\text{C}$ ). Para la concentración del agente químico también hay diferencias significativas entre todos los niveles, estando el óptimo en el nivel 3, concentración 2 M. Y para el tiempo de pretratamiento, no hay diferencia significativa entre los niveles 2 y 3 pero sí la hay entre los niveles 1-2 y 1-3. El valor óptimo del tiempo está en el nivel 2, 30 min.

Para la etapa de pretratamiento, las condiciones óptimas se resumen como: empleo de HCl como agente químico con concentración de HCl 2 M, temperatura  $121^{\circ}\text{C}$  y duración 30 min.

Dentro del empleo de agentes ácidos, varias experiencias previas reportan rendimientos inferiores cuando, en condiciones similares, el agente empleado es  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Una de ellas fue llevada a cabo por Nguyen et al. (2009), que obtuvieron un rendimiento del 58% aplicando un pretratamiento empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3% (v/v), a  $110^{\circ}\text{C}$  y 30 min sobre una biomasa de *Chlamydomonas reinhardtii* con un contenido total de carbohidratos de 60%. Miranda et al.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

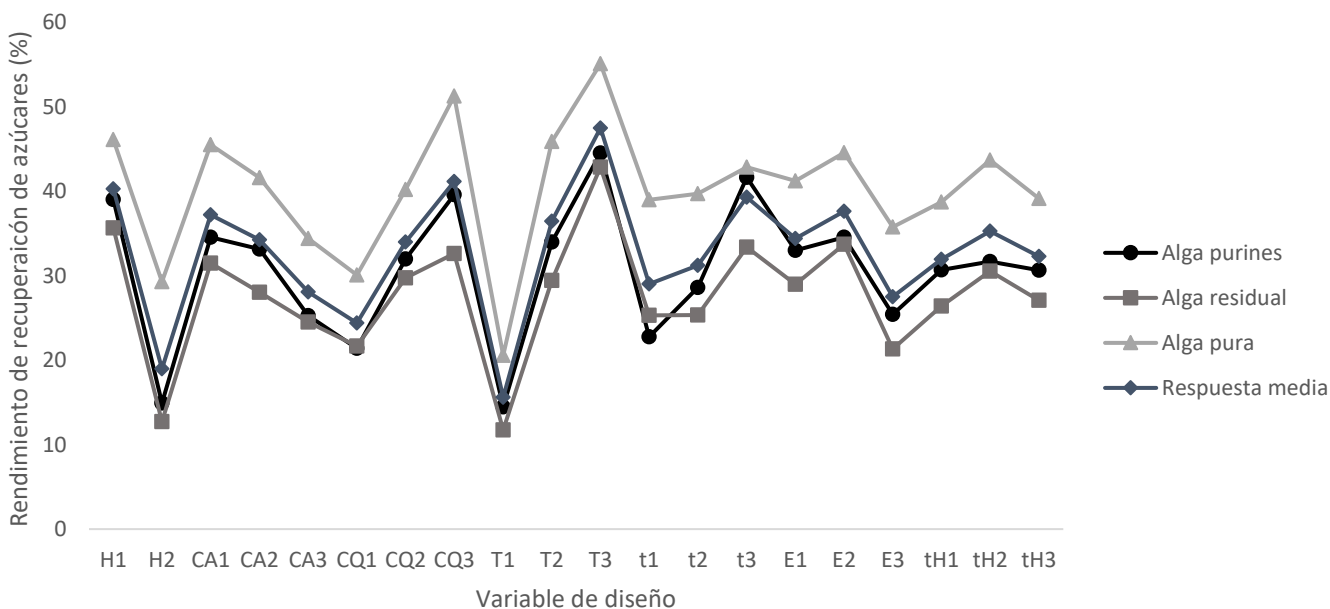
(2012) emplearon  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, a  $120^\circ\text{C}$  durante 30 min, con una biomasa microalgal mayoritariamente compuesta por *Scenedesmus obliquus* con una composición de carbohidratos de 31.8%, y llegaron a obtener rendimientos de 28.6%. Al menos para las especies de algas estudiadas en este trabajo, los resultados con HCl parecen satisfactorios, trabajando a concentraciones relativamente bajas. Los experimentos con HCl 2 M, a  $121^\circ\text{C}$  durante 30 min proporcionaron un rendimiento de 87.75% para purines, 82.88% para aguas residuales y 78.09% para alga pura. Ashokkumar et al. (2015) aplicaron un pretratamiento consistente en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 2% (v/v) a  $130^\circ\text{C}$  durante 45 min a una biomasa microalgal mayoritariamente compuesta por *Scenedesmus bijugatus* con una composición total de carbohidratos de 26%, y lograron rendimientos de extracción de solo 21.8%. En este caso, en condiciones comparables, aunque diferentes, pero los resultados vuelven a mostrar que el agente químico con mayores rendimientos sigue siendo el HCl. El pretratamiento con HCl, a  $121^\circ\text{C}$  durante 60 min, proporcionó rendimientos en torno al 80% para los tres tipos de alga.

No sólo el agente químico empleado es importante, pues también se ha comprobado que en función del contenido inicial de la biomasa en carbohidratos los rendimientos pueden ser muy diferentes. Markou et al. (2013) emplearon  $\text{HNO}_3$  0.5 M a  $100^\circ\text{C}$  durante 180 min con la especie *Spirulina platensis*, para una biomasa con un 58% de carbohidratos totales y obtuvieron un rendimiento de 52.2% de liberación de azúcares. En este caso, para el pretratamiento con HCl 0.5 M a  $100^\circ\text{C}$  durante 60 minutos se obtuvieron unos rendimientos de 72.52%, 66.85% y 68.62% respectivamente para los tres tipos de alga, valores superiores, máxime si consideramos la menor concentración de carbohidratos de la biomasa empleada en este trabajo.

### 2.3.1.2. AZÚCAR RECUPERADO

El azúcar recuperado es la cantidad de azúcar que se consigue solubilizar en la fase líquida; pues el azúcar, una vez liberado, puede quedar retenido en la fase sólida o solubilizarse en la líquida, siendo lo segundo lo preferente para diversos tipos de valorizaciones posteriores (fermentación, producción de bioplásticos, etc.). La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de recuperación de azúcares, que es una medida de la cantidad de azúcares que se consiguen recuperar (solubilizar) respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 2 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

A continuación, se muestran en la Gráfica 3 las respuestas medias a cada nivel de factor para los tres tipos de alga y el valor promedio de todas ellas. Se observa una tendencia más clara si cabe que la anterior seguida por los tres tipos de alga, y se aprecia que para todas las variables la que tiene un rendimiento superior de recuperación de azúcares es el alga pura. Si bien menores rendimientos de liberación de azúcares se encontraron en el alga pura, la degradación de los azúcares liberados es también inferior en este, dando lugar a mayores porcentajes de recuperación. Los rangos en los que se mueve la recuperación de azúcares son: alga de purines: 14-42%, alga residual: 11-43% y alga pura: 21-55%.



Gráfica 3. Respuestas medias del rendimiento de recuperación de azúcares en función de las variables de diseño para cada tipo de alga en la etapa de pretratamiento

En este caso, el ANOVA respuestas se muestra en la Tabla 8 e indica que los factores significativos, por orden de influencia, son: temperatura (34%), tipo de

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

agente químico (20%), concentración del agente químico (9%), interacción entre concentración del agente químico y el tiempo de pretratamiento (7%), y posteriormente el ruido, con un 6%. A pesar de que haya más valores significativos, el hecho de que el ruido sea uno de ellos no permite ver con claridad la verdadera influencia del resto de factores, por lo que es necesario eliminar el factor ruido y esto implica la realización del ANOVA S/R ratio.

*Tabla 8. ANOVA respuestas para la recuperación de azúcares en la etapa de pretratamiento*

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	1,604·10 <sup>-8</sup>	9,18
T	1,244·10 <sup>-18</sup>	33,99
C <sub>Q</sub> X T	0,0002	4,85
t	0,0002	3,78
C <sub>Q</sub> X t	9,374·10 <sup>-6</sup>	6,68
T x t	0,0043	3,13
C <sub>A</sub>	0,0011	2,81
H	1,110·10 <sup>-14</sup>	19,60
N	5,691·10 <sup>-6</sup>	5,52
C <sub>Q</sub> xN	0,4668	
TxN	0,7301	
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,6878	
txN	0,1311	
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,7901	
(TxT)xN	0,6279	
C <sub>A</sub> xN	0,9211	
HxN	0,3110	
Residual		10,46
Total		100,00

El ANOVA S/R ratio (Tabla 9) muestra que, exentos de ruido, los factores más influyentes son: la temperatura, con una contribución del 42%, el tipo de agente químico (13%), la concentración del agente químico (13%) y el tiempo de pretratamiento (9%). Estos valores son muy parecidos a los de liberación de azúcares, para los cuales la temperatura es un poco más influyente (48%), el agente químico también (15%) y el tipo de agente químico es más influyente para la recuperación de azúcares (13%) que para su liberación (8%). No obstante, la diferencia más notable es que para la liberación, un factor influyente era la interacción entre temperatura y tiempo de pretratamiento (10%), mientras que para la recuperación no es significativa.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

En primer lugar, para la temperatura, se aprecia que el tipo de alga más afectado por su variación es la residual, pues para HCl 2 M la diferencia de temperatura de 80 a 120 °C provoca un aumento de rendimiento de 15-30% a 50-59%, seguida de cerca por el alga residual, en la cual se producen unos aumentos de 31-55% a 67-80%. El tipo de agente químico empleado que maximiza la liberación nuevamente es el HCl, y esta diferencia se observa sobre todo en el alga pura, en la cual mientras con NaOH se obtienen un rendimiento de 40% para NaOH 2 M a 120 °C, con HCl en esas mismas condiciones se obtienen de 67-80%. La concentración del agente químico elevada (2 M) a 120 °C reportó rendimientos de 50-58% para el alga residual y la concentración más baja (0.5 M) de 52-56%, con lo cual la diferencia de concentración de agente químico no provoca grandes diferencias de rendimiento, siendo en algunos casos el rendimiento mayor para las concentraciones más bajas. En el tiempo de pretratamiento, se notan diferencias notables para el alga de purines y residual entre tratamientos de 10 minutos (rendimientos de 49 y 44% respectivamente) y tratamientos de 60 minutos en las mismas condiciones (rendimientos de 68 y 52%). No obstante, para el alga pura se observa que en algunas ocasiones el aumento del tiempo de pretratamiento disminuye el rendimiento de recuperación, en este caso el rendimiento fue de 77% para 10 min y 59% para 60 min, debido a que la prolongación del pretratamiento favorece la degradación de los azúcares (la degradación fue de 9% para 10 min y de 17% para 60 min) y por tanto disminuye el rendimiento de recuperación.

*Tabla 9. ANOVA S/R ratio para la recuperación de azúcares en la etapa de pretratamiento*

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0142	12,96
T	4,970·10 <sup>-5</sup>	42,11
C <sub>Q</sub> X T	0,4361	
t	0,0451	8,84
C <sub>Q</sub> X t	0,2875	
T x t	0,8074	
C <sub>A</sub>	0,1673	
H	0,0037	13,19
Residual		22,91
Total		100,00

La realización del test de Duncan a los factores significativos muestra que: en primer lugar, para la temperatura hay diferencias significativas en todos los niveles, y que el nivel óptimo es el 3, 121 °C. Para la concentración del agente químico, hay diferencias significativas entre todos los niveles y nuevamente el



## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

nivel óptimo es el 3, 2 M. En último lugar, para el tiempo de pretratamiento, no hay diferencias significativas entre los niveles 1 y 2, pero sí entre los niveles 1-3 y 2-3, siendo el valor óptimo el correspondiente al nivel 3, 60 min.

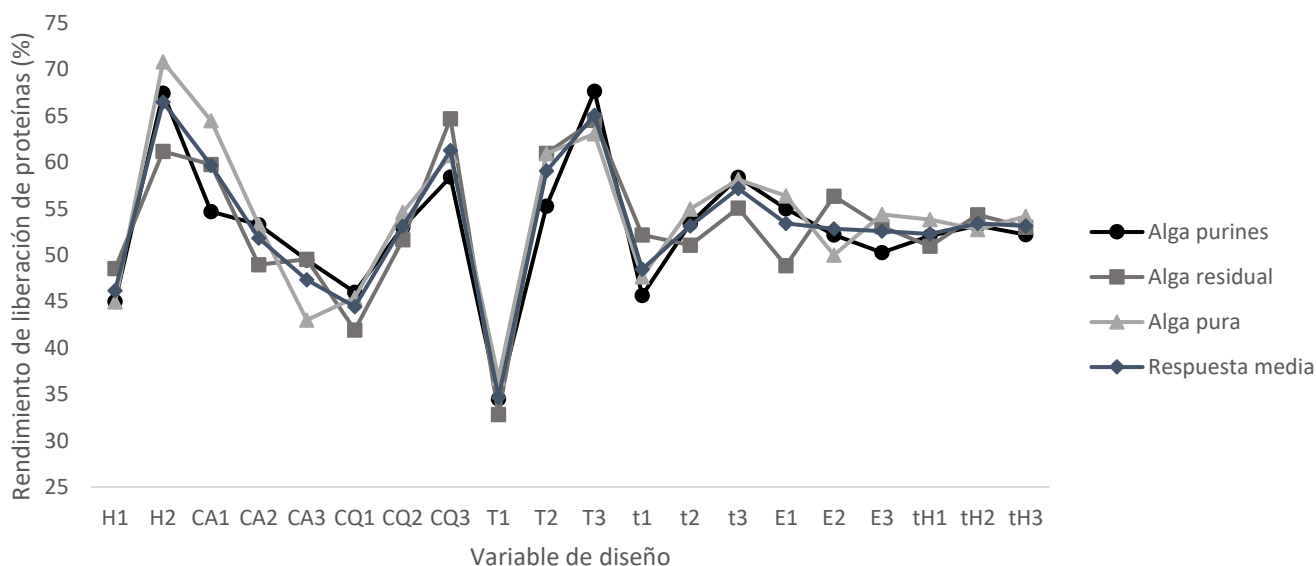
A modo de conclusión, las condiciones óptimas para la recuperación de azúcares son: empleo de HCl como agente químico a concentración 2 M, temperatura 121°C, y tiempo de pretratamiento 60 min. Para liberación de azúcares, todas eran iguales menos el tiempo, que fue de 30 min, es decir, la liberación de azúcares se ve favorecida por tiempos intermedios mientras que la recuperación se ve favorecida por tiempos elevados.

Concretamente, es importante que la concentración del agente químico a emplear sea elevada, pues ha habido estudios previos que demuestran que los pretratamientos con ácidos diluidos están asociados con la generación de inhibidores. Por ejemplo, empleando una biomasa consistente en *Chlorella vulgaris*, Yun et al. (2013) descubrieron que la formación de hidroximetilfurfurales (HMF) variaba con la concentración de ácido y el tiempo de exposición. La concentración de HMF variaba de 0.23 a 4.3 g/L cuando la concentración de HCl aumentaba de 0.1% a 3%.

### 2.3.1.3. PROTEÍNA LIBERADA

La proteína liberada hace referencia a la cantidad de proteínas que se consigue extraer del núcleo celular tras la aplicación de la etapa de pretratamiento. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de proteínas, que es una medida de la cantidad de proteínas que se consiguen liberar respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 4 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

En la gráfica de respuestas medias (Gráfica 4) se observa nuevamente que la tendencia seguida por los tres tipos de alga es muy similar en lo que a liberación de proteínas respecta. Ninguna de las tres algas muestra un rendimiento claramente superior al resto, pues dependiendo de la variable y el nivel que se quiera estudiar es un tipo u otro de alga el que presenta el mayor rendimiento. En este caso, no existe diferencia apreciable, ni siquiera en el alga pura. Los rangos del rendimiento de liberación de proteína para los diferentes tipos de alga son: para el alga de purines, 35-68%, para el alga residual, 32-65% y para el alga pura de 36-71%.



Gráfica 4. Respuestas medias del rendimiento de liberación de proteínas en función de las variables de diseño para cada tipo de alga en el pretratamiento

El ANOVA respuestas mostrado en la Tabla 10 muestra que los factores significativos son: temperatura (39%), tipo de agente químico (21%), concentración de agente químico (11%), concentración del alga (6%) y otros valores inferiores al 4% de influencia entre los que no se encuentra el ruido.



*Tabla 10. ANOVA respuestas para la liberación de proteínas en la etapa de pretratamiento*

<b>Fuente variación</b>	<b>p-value</b>	<b>%Contrib.</b>
C <sub>Q</sub>	7,676·10 <sup>-10</sup>	10,66
T	1,005·10 <sup>-19</sup>	39,05
C <sub>Q</sub> X T	0,8067	
t	0,0005	2,86
C <sub>Q</sub> X t	0,0036	2,89
T x t	0,0085	2,47
C <sub>A</sub>	1,210·10 <sup>-6</sup>	5,85
H	2,424·10 <sup>-15</sup>	20,75
N	0,8586	
C <sub>Q</sub> xN	0,3003	
TxN	0,2191	
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,1887	
txN	0,2618	
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,5664	
(TxT)xN	0,0085	3,83
C <sub>A</sub> xN	0,0158	2,18
HxN	0,0109	1,59
Residual		7,87
Total		100,00

Al analizar el ANOVA S/R ratio (Tabla 11), se observa que los factores más influyentes son los mismos que los observados en el ANOVA respuestas, aunque con diferentes porcentajes: temperatura (50%), tipo de agente químico (21%) y concentración del agente químico (9%). Como las interacciones no tienen un p-valor inferior a 0.05, ninguna de ellas tiene una influencia significativa para la liberación de proteínas.

La influencia de la temperatura sobre el rendimiento final de liberación de proteínas es muy clara, y provoca diferencias de rendimientos muy elevadas, por ejemplo, para concentraciones de HCl 1 M, el alga purines es la que mayor sensibilidad a la temperatura presenta, pasando de rendimientos de 13% para 80 °C a rendimientos entre 52-70% para 120 °C. Para el empleo de diferentes tipos de agente químico, la diferencia máxima de liberación de proteínas se da para la concentración 1 M a 120 °C: para NaOH se obtuvo un rendimiento de liberación de 86% y para HCl fue de 43%; esto determina que para la liberación de proteínas es mejor un pretratamiento básico. Para dos pretratamientos a la misma temperatura con NaOH, pero diferentes en concentración, se obtuvo que para el alga residual y de purines el rendimiento aumentaba al aumentar

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

la concentración de 0.5 M a 2 M (de 56 y 62% a 78 y 86% respectivamente), mientras que para el alga pura se obtuvo que el rendimiento disminuía de 51% a 36%.

Tabla 11. ANOVA S/R ratio para la liberación de proteínas en la etapa de pretratamiento

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0226	8,84
T	2,1232·10 <sup>-6</sup>	50,26
C <sub>Q</sub> X T	0,8222	
t	0,1764	
C <sub>Q</sub> X t	0,3010	
T x t	0,3574	
C <sub>A</sub>	0,1382	
H	0,0002	20,55
Residual		20,35
Total		100,00

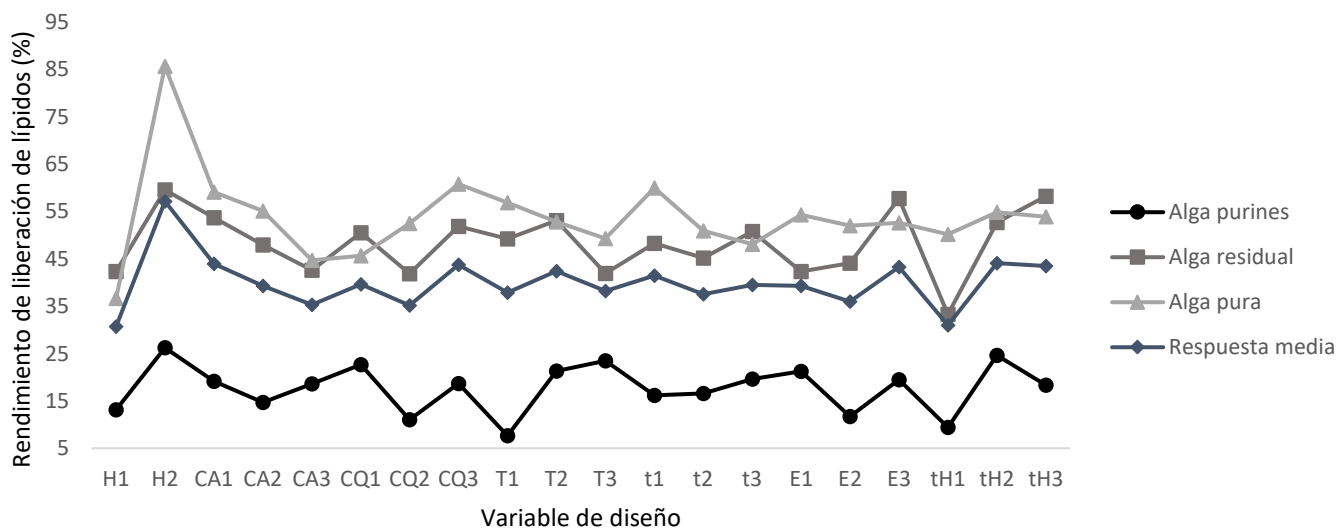
La realización del test de Duncan a los factores significativos mostró que para la temperatura el valor óptimo es 121 °C y que hay diferencias significativas entre todos los niveles; para la concentración del agente químico, hay diferencias significativas entre todos los niveles y el valor óptimo es el correspondiente al nivel 3, 2 M. Por último, para el tiempo de pretratamiento, existen no hay diferencias significativas entre los niveles 2 y 3 pero sí entre los niveles 1-2 y 1-3. El valor óptimo es el correspondiente al nivel 3, 60 min.

A modo de conclusión, observando la Gráfica 4 y los test de Duncan realizados se resuelve que las condiciones óptimas para la liberación de proteínas en la etapa de pretratamiento son: empleo de NaOH como agente químico, con concentración 2 M, temperatura 121 °C y tiempo 60 min. La concentración de agente químico es un factor significativo y tiene gran influencia. García-Martínez et al. (2016) observaron que para la especie *Chlorella vulgaris* las condiciones óptimas para la solubilización de proteínas eran NaOH 3M, a 85 °C y un ratio NaOH/biomasa de 45 mL/g, con las que se llegó a obtener un rendimiento de solubilización de proteínas del 98%. Para este caso, un empleo de NaOH 2M a 80 °C ha proporcionado un rendimiento de 55.89% para el alga de purines, 60.56% para el alga de agua residual y 33.78% para el alga pura. De esta diferencia se infiere el hecho de que el aumento de la concentración del agente químico afecta positivamente a la liberación de las proteínas contenidas en las células.

### 2.3.1.4. LÍPIDOS LIBERADOS

Los lípidos liberados son la variable que hace referencia a la cantidad de lípidos que se extraen del núcleo celular tras la etapa de pretratamiento. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de lípidos, que es una medida de la cantidad de lípidos que se consiguen liberar respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 5 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

En la Gráfica 5 se muestran las respuestas medias de liberación de lípidos para los tres tipos de alga. Se puede observar que para el fin de la minimización del rendimiento de liberación de éstos el tipo más apropiado es la procedente de aguas de purines, pues tiene unos rendimientos muy inferiores al resto. Para el alga pura y la procedente de aguas residuales se observa una tendencia relativamente similar pero no tan clara como para las otras variables. Los rangos en los que se encuentran los rendimientos de liberación de lípidos son: para el alga de purines, 8-26%; para el alga residual, 33-60% y para el alga pura 45-86%.



Gráfica 5. Respuestas medias del rendimiento de liberación de lípidos en función de las variables de diseño para cada tipo de alga en el pretratamiento

El ANOVA respuestas para la liberación de lípidos se muestra en la Tabla 12 se observa que el factor más influyente es el ruido (33%), por lo cual, a pesar de mostrar también otros factores significativos como el tipo de agente químico, no se puede dar por hecho que éste sea significativo hasta no ver el ANOVA S/R ratio, en el cual se ha eliminado el factor de ruido, debido a que los resultados de este ANOVA respuestas están altamente influenciados por el ruido y por ello no son fiables.

Tabla 12. ANOVA respuestas para la liberación de lípidos durante la etapa de pretratamiento

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,1958	
T	0,5708	
C <sub>Q</sub> X T	0,2084	
t	0,7120	
C <sub>Q</sub> X t	0,0656	
T x t	0,9097	
C <sub>A</sub>	0,1938	
H	9,6083·10 <sup>-9</sup>	21,03
N	5,1489·10 <sup>-11</sup>	33,36
C <sub>Q</sub> xN	0,4250	
TxN	0,2097	
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,4607	
txN	0,6815	
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,9283	
(TxT)xN	0,7460	
C <sub>A</sub> xN	0,7172	
HxN	0,0009	7,74
Residual		37,87
Total		100,00

En el ANOVA S/R ratio que se muestra en la Tabla 13, se observa que el único factor influyente (p-valor menor que 0.05) es el tipo de agente químico empleado, coincidiendo con la previsión obtenida en el ANOVA respuestas de la Tabla 12. Para este factor influyente, se han observado diferencias muy acusadas en los diferentes experimentos: por ejemplo, para el experimento con NaOH 1M a 120°C el rendimiento fue de 64%, mientras que para HCl en esas condiciones fue 30-34%.



Tabla 13. ANOVA S/R ratio para la liberación de lípidos en la etapa de pretratamiento

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,3803	
T	0,2838	
C <sub>Q</sub> X T	0,4047	
t	0,2115	
C <sub>Q</sub> X t	0,2877	
T x t	0,9764	
C <sub>A</sub>	0,4316	
H	8,743·10 <sup>-6</sup>	55,32
Residual		44,68
Total		100,00

Como conclusión, los niveles de las variables que minimizan la liberación de lípidos durante el pretratamiento son: empleo de HCl como agente químico, concentraciones de alga elevadas (100 g/L), concentración de HCl intermedia, 1 M, temperaturas elevadas (121 °C) y tiempos de pretratamiento intermedio, 30 min.

El pretratamiento ácido básico no suele ser empleado para la extracción de lípidos de microalgas. Esto es debido a que normalmente las microalgas tienen un bajo contenido en lípidos y las técnicas de extracción de lípidos son más complejas, el pretratamiento ácido-básico no es la manera más adecuada para su extracción, por lo que las comparaciones que se pueden realizar con otros autores son escasas.

En este proyecto se ha conseguido la minimización de la liberación de éstos, ya que un estudio llevado a cabo por Lee et al. (2014) estadísticamente, tendría una liberación máxima de lípidos de 24.6%, que experimentalmente resultó de 24.4%. Este rendimiento fue conseguido empleando ácido nítrico 0.57 w/w a 120 °C durante 30 minutos. En este caso, el empleo HCl 0.5 M durante 30 min a 121 °C y se obtuvieron unos rendimientos de 16.30% para el alga pura, lo cual prueba que ha habido cierta retención de lípidos con respecto a otras experiencias.

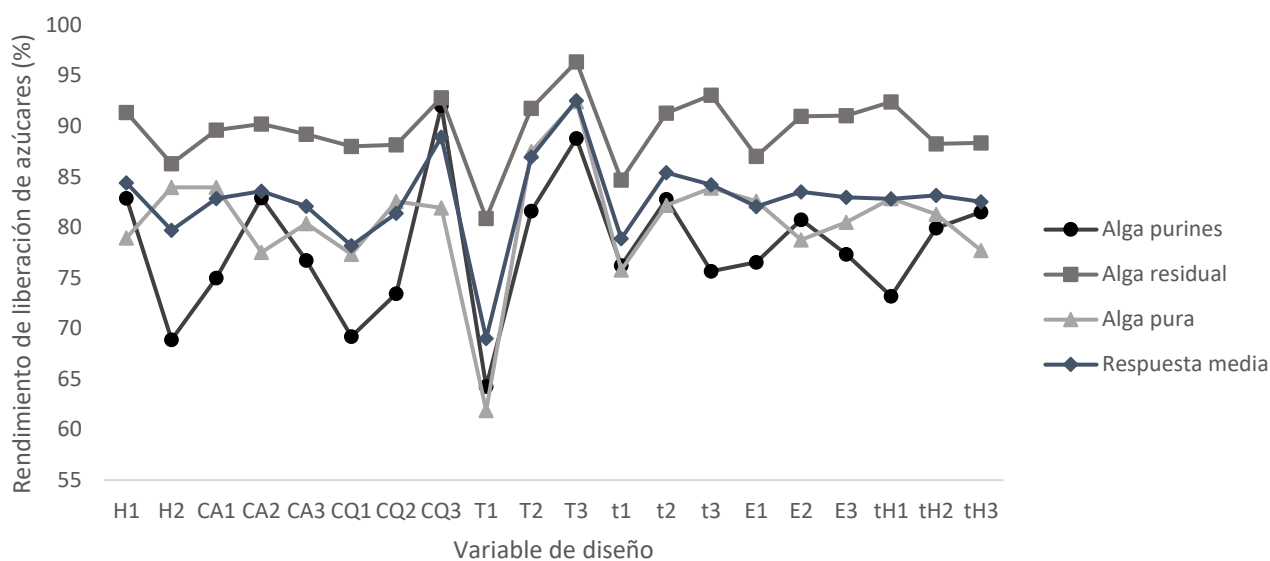
## 2.3.2. RESULTADOS GLOBALES

### 2.3.2.1. AZÚCAR LIBERADO

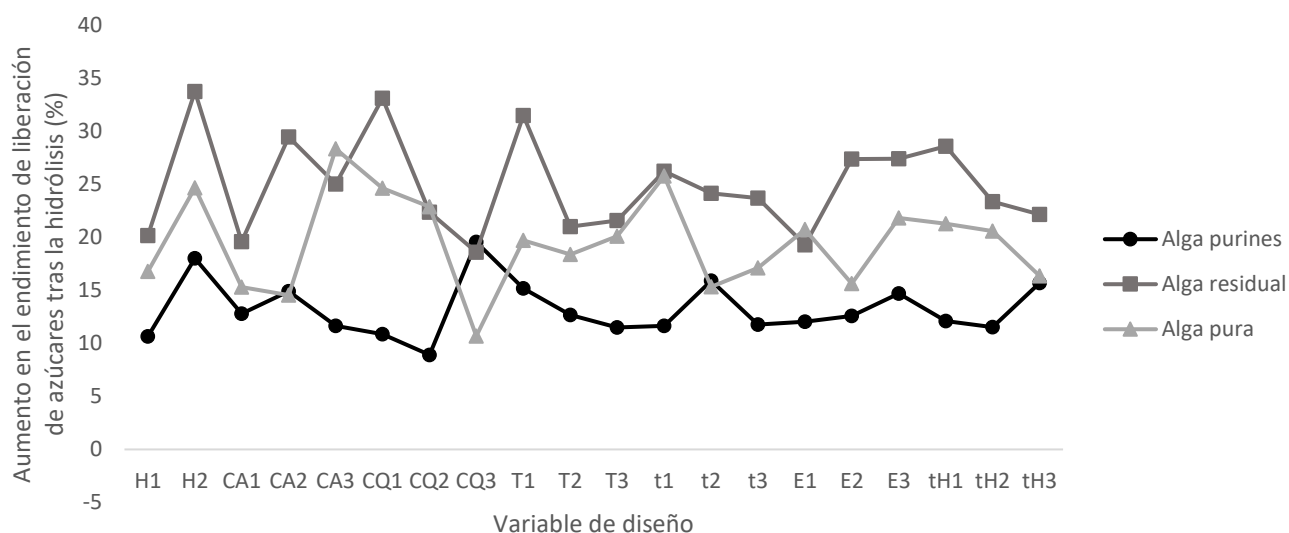
El azúcar liberado de forma global es la variable que hace referencia a la cantidad de azúcares que se extraen del núcleo celular tras las etapas de pretratamiento e hidrólisis. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de azúcares global, que es una medida de la cantidad de azúcares que se consiguen liberar respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 1 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se presenta en la Gráfica 6 las respuestas medias rendimiento de liberación de azúcares para cada una de las tres algas y su promedio. Se puede observar una tendencia similar para los tres tipos de algas con las diferentes variables, pero con resultados más elevados en todo momento para el alga procedente de aguas residuales, para la que se alcanzan porcentajes de liberación cercanos al 100% (81-96%), mientras que para la etapa de pretratamiento estos porcentajes fueron de 47-73%. Es extraño que sea el alga de purines la que dé los peores rendimientos, siendo éstos entre 64 y 92%, siendo para la etapa de pretratamiento de 50-76%; para el alga pura, el intervalo de rendimientos es de 62-92%, habiendo sido para la etapa de pretratamiento de 42-70%. En la Gráfica 7 se aprecia la diferencia en porcentaje de rendimiento que supone la realización de hidrólisis enzimática, y se puede apreciar que el tipo de alga que más se ve beneficiada por la hidrólisis es claramente el alga procedente de aguas residuales domésticas, y la que menos afectada se ve en términos de liberación de azúcares es el alga de purines. Los factores en los que la diferencia de rendimientos es mayor son la concentración de agente químico (nivel 1) y temperatura (nivel 1), pero en general las diferencias están muy igualadas, ningún factor destaca sobre el resto.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal



Gráfica 6. Respuestas medias del rendimiento de liberación de azúcares en función de las variables de diseño para cada tipo de alga de forma global



Gráfica 7. Aumento en el rendimiento de liberación de azúcares tras la hidrólisis enzimática

Los resultados del ANOVA (Tabla 14) muestran que los factores más influyentes son la temperatura del pretratamiento, que posee una contribución del 37% y el ruido, que tiene una contribución del 9%. La concentración también tiene una contribución de 7%, aunque al ser un valor menor que el ruido no se conoce si la variable es realmente significativa. Siendo el ruido un factor relevante es difícil conocer la influencia del resto de factores.



Tabla 14. ANOVA respuestas para la liberación de azúcares global

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0003	7,47
T	8,147·10 <sup>-13</sup>	37,19
C <sub>Q</sub> X T		
t	0,0324	2,97
C <sub>Q</sub> X t		
T x t	0,0114	5,81
C <sub>A</sub>		
E		
t <sub>H</sub>		
H	0,0400	1,80
e <sub>H</sub>		
N	8,365·10 <sup>-5</sup>	8,99
C <sub>Q</sub> xN	0,0106	5,89
TxN		
(C <sub>Q</sub> xT)xN		
txN		
(C <sub>Q</sub> xt)xN		
(TxT)xN		
C <sub>A</sub> xN		
E x N		
t <sub>H</sub> xN		
HxN	0,0041	4,94
e <sub>H</sub> xN		
Residual		24,94
Total		100,00

Como el ruido es una variable significativa, es necesario comprobar el ANOVA S/R ratio, donde se elimina el factor de ruido. Éste se muestra en la Tabla 15, donde se observa que el factor más influyente es la temperatura, cuya influencia es del 58%, y la concentración del agente químico, cuya influencia es del 14%. Comparando con la etapa de pretratamiento únicamente, se observa que tras la hidrólisis pierden importancia los factores de interacción temperatura-tiempo de pretratamiento, el tiempo de pretratamiento y el tipo de agente químico, que para la etapa de pretratamiento eran significativos y para el proceso global no lo son. Los factores propios de la hidrólisis no afectan significativamente a este rendimiento. Como se puede comprobar, las interacciones entre parámetros no son significativas para la variable de azúcar liberado, puesto que ninguna tiene un p-valor inferior a 0.05.



Tabla 15. ANOVA S/R ratio para la liberación de azúcares global

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0144	13,49
T	5,3637·10 <sup>-6</sup>	57,81
C <sub>Q</sub> x T		
t		
C <sub>Q</sub> x t		
T x t		
C <sub>A</sub>		
E		
t <sub>H</sub>		
H		
e <sub>H</sub>		
Residual		28,70
Total		100,00

Tras la realización del Test de Duncan para los factores significativos se obtuvo: en primer lugar, para la temperatura, que no hay diferencia significativa entre los niveles 2 y 3, pero sí que la hay entre los niveles 1-2 y 1-3, mientras que en el pretratamiento había diferencias significativas para todos los niveles, y que el valor óptimo para la liberación de azúcares es T3, es decir, 121 °C (exactamente igual que en la etapa de pretratamiento); en segundo lugar, para la concentración del agente químico, se obtuvo que no existen diferencias significativas entre los niveles 1 y 2, pero sí la hay entre los niveles 1-3 y 2-3, (en la etapa de pretratamiento había diferencias significativas entre todos los niveles) y que el valor óptimo es la concentración de agente químico 3, es decir, 2 M (igual que para la etapa de pretratamiento por separado).

Como conclusión, se resumen las condiciones óptimas para la liberación de azúcares como: en lo referente a la etapa de pretratamiento, empleo de HCl como agente químico, concentración del agente químico 2 M, temperatura del pretratamiento 121 °C y tiempo de pretratamiento 30 minutos (pues el tiempo sí fue variable significativa en la etapa de pretratamiento por separado).

Aunque la etapa de hidrólisis enzimática también influye, lo más importante es la etapa del pretratamiento, concretamente, la temperatura a la que se realiza como se viene demostrando a lo largo de este proyecto. Martín Juárez et al. (2016) realizaron una experiencia similar a la de este proyecto: un pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% a 50 °C fue aplicado a un microalga mayoritariamente formado por *Scenedesmus obliquus*, y posteriormente la

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

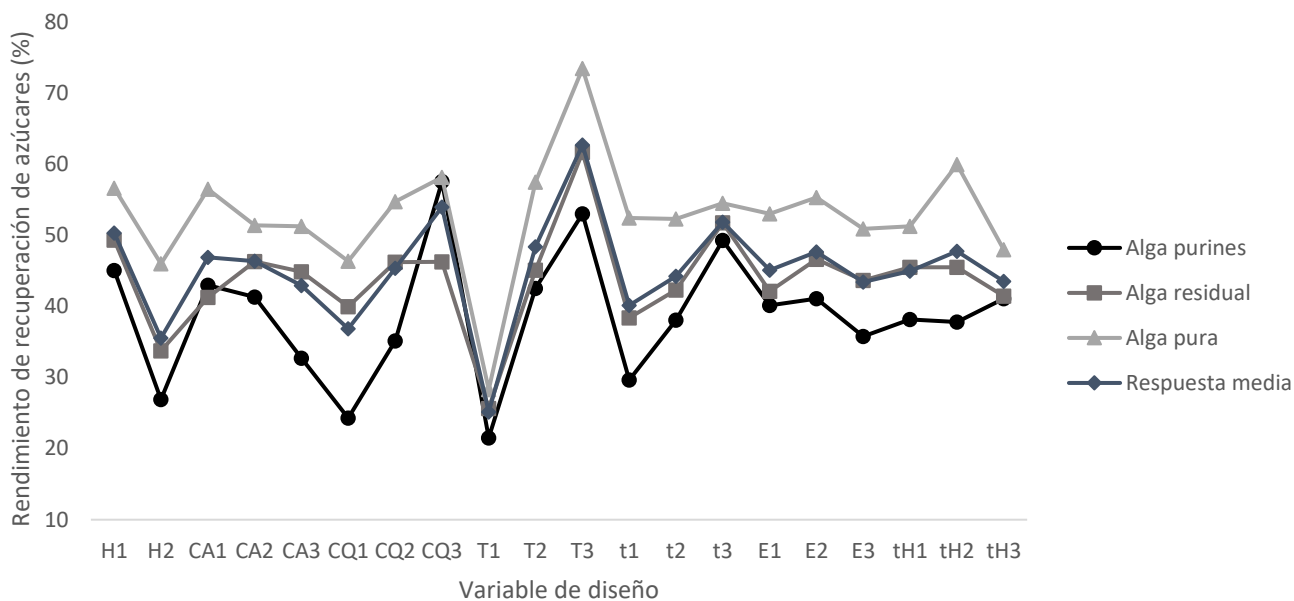
muestra fue sometida a hidrólisis enzimática durante 48 h, con unas concentraciones de enzima de 10 FPU de la enzima Celluclast y 20 CBU de la enzima Novozyme. El rendimiento de liberación de azúcares global de este proceso fue del 34%. El hecho de aplicar un pretratamiento básico a mayor temperatura ya provocó un rendimiento de liberación de azúcares sólo en la etapa de pretratamiento. Es decir, en este proyecto se realizó un pretratamiento con NaOH 0.5 M a 80°C durante 30 min y el rendimiento de liberación de azúcares fue de 48%. Posteriormente, se le aplicó también una etapa de hidrólisis enzimática con enzima Celluclast a la concentración de 30 FPU durante 6 h y ese rendimiento aumentó al 58%. Pero como se ha podido comprobar, el factor de temperatura durante el pretratamiento es el que más condiciona la liberación de azúcares, de tal manera que no importa tanto el tiempo de pretratamiento y ni siquiera la realización o no de una etapa de hidrólisis enzimática a posteriori.

### 2.3.2.2. AZÚCAR RECUPERADO

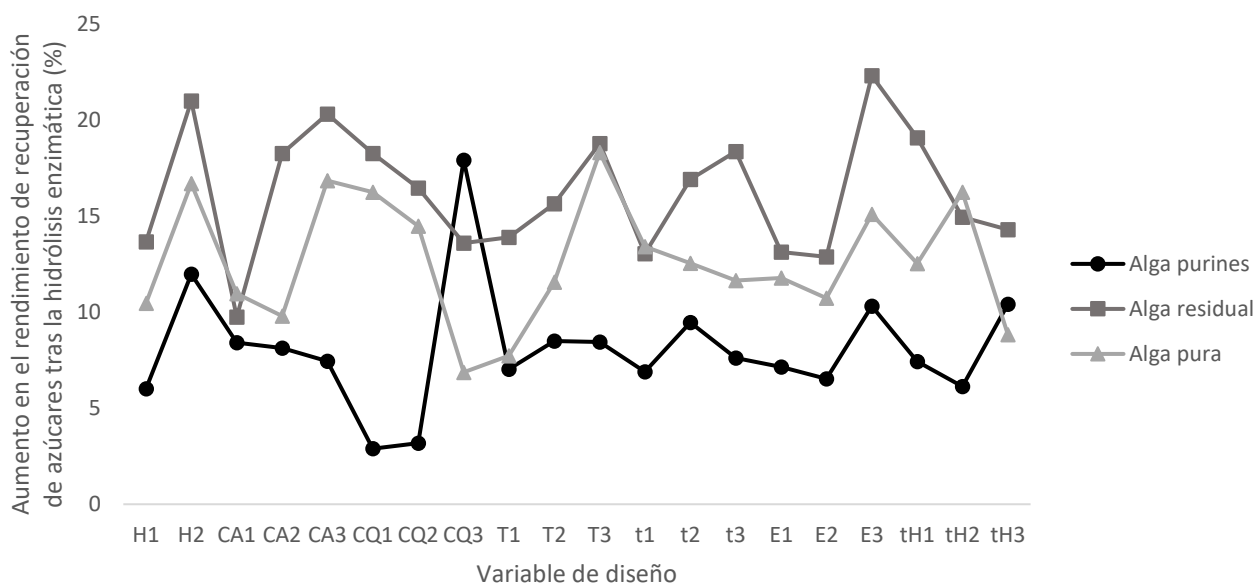
El azúcar recuperado global es la cantidad de azúcar solubilizado en la fase líquida tras las dos etapas de pretratamiento e hidrólisis. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de recuperación de azúcares global, que es una medida de la cantidad de azúcares que se consiguen solubilizar respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 2 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

De nuevo, en primer lugar, se muestran en la Gráfica 8 las respuestas medias obtenidas para el rendimiento de azúcar recuperado, en la cual la tendencia que siguen las tres biomosas microalgales es incluso más parecida, pero en cambio en este caso es el alga pura para la cual se obtienen los valores más elevados. Los rangos de rendimientos obtenidos son 22-58% para purines, 26-62% para aguas residuales y 28-73% para alga pura, mientras que para la etapa de pretratamiento fueron de 14-42%, 11-43% y 21-55% respectivamente. En la Gráfica 9 se aprecia que el alga más afectada por la segunda etapa es la procedente de aguas residuales, y nuevamente la menos afectada es el alga procedente de purines, no obstante, este alga experimenta un máximo cuando se emplea una concentración de agente químico 2 M, llegando incluso a superar el rendimiento de recuperación de los dos tipos de alga. En este caso, los factores entre los que más diferencia hay son la concentración de enzimas (a nivel 3), la concentración de alga (a nivel 3) y la concentración de agente químico (a nivel 1).

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal



Gráfica 8. Respuestas medias del rendimiento de recuperación de azúcares en función de las variables de diseño para cada tipo de alga de forma global

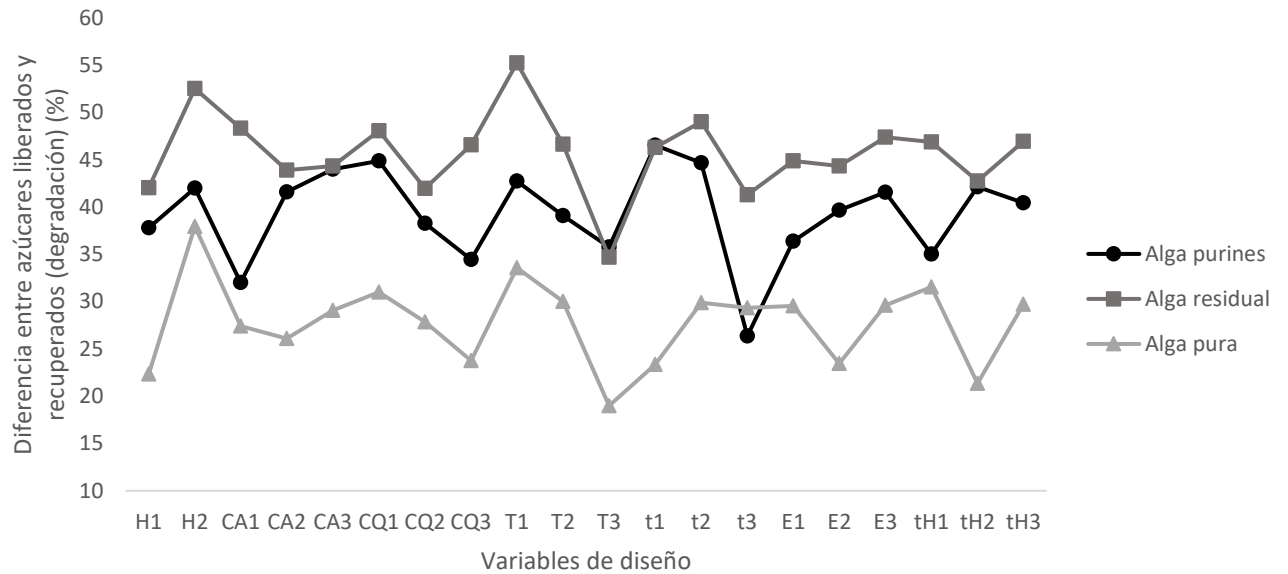


Gráfica 9. Aumento de los rendimientos de recuperación de azúcares tras la hidrólisis enzimática

También es necesario ver qué cantidad de los azúcares liberados se ha recuperado, por lo que en la Gráfica 10 se muestra la diferencia entre los azúcares liberados y los finalmente recuperados, es decir, se muestra la degradación en función de los diferentes factores de estudio. El alga con menor que sufre menor degradación es el alga pura, como ya se había comprobado en la etapa de pretratamiento, y la que más degradación experimenta es el alga residual. En general, algunos factores que minimizan la degradación son: HCl

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

como agente químico, concentración de agente químico elevada, temperatura elevada, y tiempos de pretratamiento elevados.



Gráfica 10. Degradación en función de los niveles de las variables de diseño

Los resultados del ANOVA (Tabla 16) en este caso muestran que las variables más influyentes son: la temperatura (41%), la concentración del agente químico (8%), el tipo de agente químico (8%), la interacción entre concentración del agente químico y temperatura (6%) y a continuación el factor de ruido (6%), por lo que es necesario comprobar de nuevo el ANOVA S/R ratio.



Tabla 16. ANOVA respuestas para la recuperación de azúcares global

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	2,910·10 <sup>-6</sup>	8,42
T	5,900·10 <sup>-17</sup>	41,28
C <sub>Q</sub> X T	0,0005	6,12
t	0,0010	4,05
C <sub>Q</sub> X t	0,0156	3,49
T x t	0,0128	3,64
C <sub>A</sub>		
E		
t <sub>H</sub>		
H	5,161·10 <sup>-7</sup>	8,39
e <sub>H</sub>		
N	8,219·10 <sup>-5</sup>	5,82
C <sub>Q</sub> xN	0,0040	4,52
TxN		
(C <sub>Q</sub> xT)xN		
txN		
(C <sub>Q</sub> xt)xN		
(TxT)xN		
C <sub>A</sub> xN		
E x N		
t <sub>H</sub> xN		
HxN		
e <sub>H</sub> xN		
Residual		14,27
Total		100,00

El ANOVA S/R ratio (Tabla 17) muestra que los factores más influyentes son de nuevo la temperatura (51%) y la concentración del agente químico (20%). De la misma manera, muestra que las interacciones no son significativas pese a haber aparecido en el ANOVA respuestas (Tabla 16) la interacción entre temperatura y concentración del agente químico. Para el caso de sólo pretratamiento, en lo referente a la recuperación de azúcares las variables influyentes también eran temperatura y concentración, pero, aunque menos influyentes, había otras que también eran significativas y que ya no lo son, que son tiempo de pretratamiento y tipo de agente químico; han perdido su influencia tras la hidrólisis.

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

En cuanto a la etapa de liberación de azúcares del proceso global, tenía como factores significativos exactamente los mismos: concentración de agente químico y temperatura.

*Tabla 17. ANOVA S/R ratio para la recuperación de azúcares global*

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,0039	19,54
T	1,788·10 <sup>-5</sup>	50,68
C <sub>Q</sub> X T		
t		
C <sub>Q</sub> X t		
T x t		
C <sub>A</sub>		
E		
t <sub>H</sub>		
H		
e <sub>H</sub>		
Residual		29,79
Total		100,00

La realización del Test de Duncan a los factores significativos muestra que, para la temperatura, no hay diferencias significativas entre los niveles 2 y 3, pero sí las hay entre los niveles 1-2 y 1-3. También concluye que el valor óptimo es T3, 121 °C. Para la concentración del agente químico, el test prueba que no hay diferencias significativas entre los niveles 1 y 2 ni tampoco entre los niveles 2 y 3, pero sí entre los niveles 1 y 3. La concentración de agente químico óptima es, nuevamente, 2 M. En cuanto a las diferencias significativas entre niveles y los valores óptimos, se ha obtenido exactamente lo mismo que para la etapa de liberación de azúcares. No obstante, para la etapa de pretratamiento hubo la única diferencia de que para la temperatura había diferencias significativas entre todos los niveles, mientras que ahora para los niveles 2 y 3 no la hay.

En conclusión, los valores óptimos para la recuperación de azúcares son: en lo referente a la etapa de pretratamiento, agente químico a emplear HCl, concentración del agente químico 2M y temperatura del pretratamiento 121 °C.

La etapa de hidrólisis enzimática también marca la diferencia en lo que a recuperación de azúcares respecta. Shokrkar et al. (2017) obtuvieron un rendimiento óptimo de recuperación de azúcares de 95.1%, empleando un pretratamiento consistente en ácido diluido seguido de un tratamiento enzimático con la misma enzima que se empleó en este proyecto, Celluclast. En este caso, el óptimo se consiguió empleando HCl 0.5 M a 121 °C durante

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

60 min, con una concentración de enzima Celluclast de 30 FPU y un tiempo de hidrólisis enzimática de 3 h. Los azúcares recuperados totales fueron de 57.3%, 71.88% y 64.31% respectivamente para el alga procedente de purines, de aguas residuales y pura, notoriamente inferiores a los obtenidos por Shokrkar et al debido a que en este caso, gran parte de los azúcares pese a tener rendimientos de liberación muy elevados (del orden de 95%) se degradan, lo que provoca que se obtengan rendimientos de recuperación muy inferiores a los obtenidos por ellos.

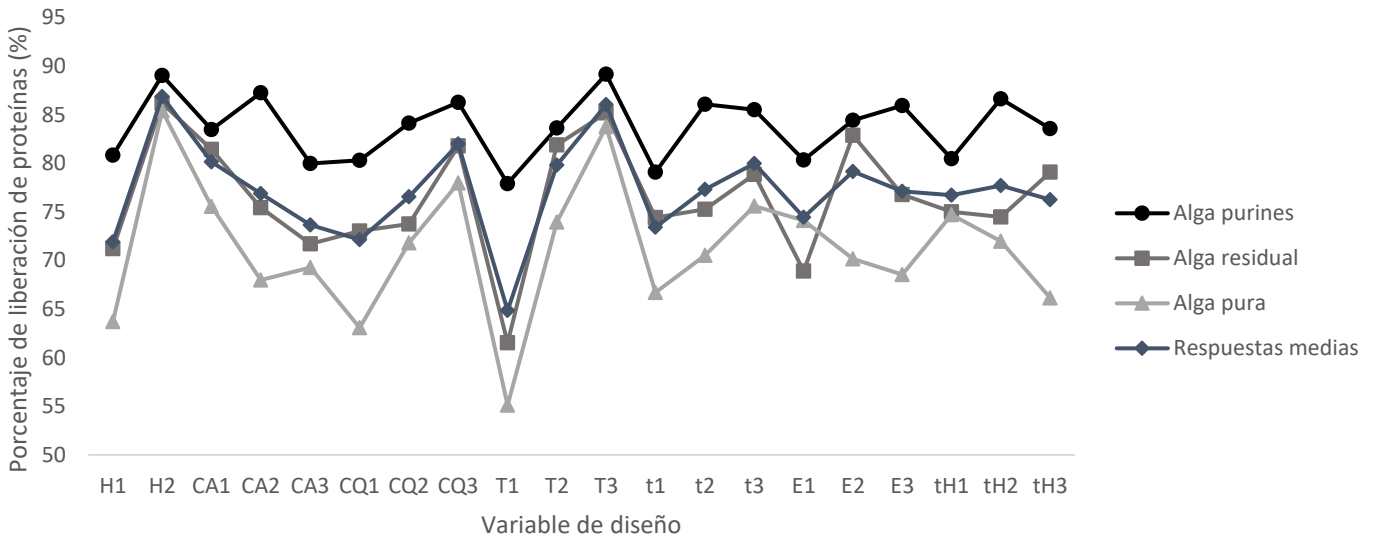
### 2.3.2.3. PROTEÍNAS LIBERADAS

La proteína liberada es la cantidad de proteínas que se consigue extraer del núcleo tras la aplicación de las etapas de pretratamiento e hidrólisis consecutivas. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de proteínas global, que es una medida de la cantidad de proteínas que se consiguen liberar en las dos etapas respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 4 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

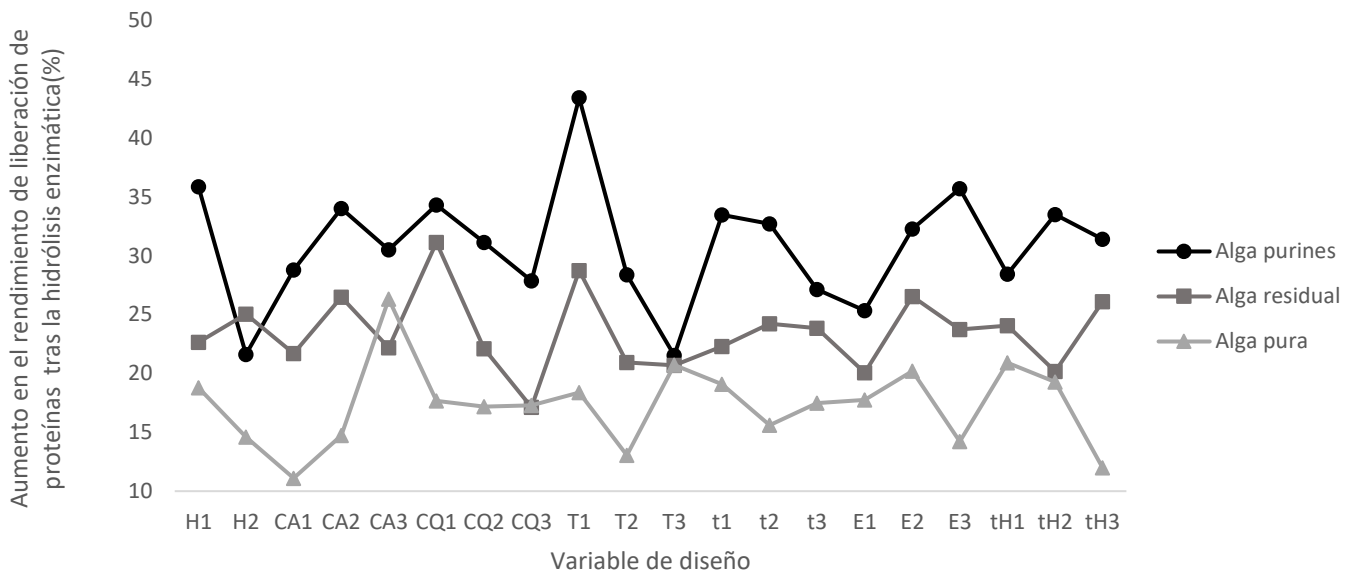
Se presenta nuevamente la gráfica de respuestas medias (Gráfica 11) y se observa esta vez de nuevo una misma tendencia, más similar para las algas procedentes de agua residual y pura; una tendencia con gran diversidad de rendimientos lo que provoca máximos y mínimos muy acusados. En cambio, para el alga de purines se observa una mayor homogeneidad para los diferentes niveles de los factores a niveles de rendimiento más elevado que en los otros dos tipos de alga, es decir, el alga que reporta mayores rendimientos para la liberación de proteínas es aquella procedente del tratamiento de aguas de purines. Los rangos de rendimiento de liberación de proteínas son 78-89% para purines, que en la etapa de pretratamiento obtuvo rendimientos de 35-68%; 62-86% para aguas residuales, que en el pretratamiento estuvo entre 32-65% y 55-85% para el alga pura, que en la etapa previa había obtenido entre 36 y 71%.

En la Gráfica 12 se muestra la diferencia en la liberación de proteínas entre el pretratamiento y el proceso global, es decir, el aumento del rendimiento de la liberación de proteínas debido a la etapa de hidrólisis enzimática. El alga para el cual aumenta más el rendimiento es el alga de purines, y el que menos es el alga pura. Algunos de los factores donde mayor es la diferencia de la medida en que se ven afectados son: temperatura (nivel 1), concentración de enzima (nivel 3) y tiempo de pretratamiento (nivel 2).

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal



Gráfica 11. Respuestas medias del rendimiento de recuperación de proteínas en función de las variables de diseño para cada tipo de alga de forma global



Gráfica 12. Aumento del rendimiento de liberación de proteínas tras la hidrólisis enzimática

El ANOVA respuestas de esta variable (Tabla 18) muestra que las variables más influyentes en este caso son la temperatura en primer lugar (29%), el tipo de agente químico (18%) y el ruido (10%). La concentración del agente químico también tiene una contribución significativa (6%), pero debido a la elevada contribución del ruido, es necesario comprobar el ANOVA S/R ratio, donde este factor ha sido suprimido.





Tabla 18. ANOVA respuestas para la liberación de proteínas global

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	7,971·10 <sup>-5</sup>	5,88
T	1,599·10 <sup>-13</sup>	28,55
C <sub>Q</sub> X T	0,2565	
t	0,0094	2,63
C <sub>Q</sub> X t	0,0004	6,42
T x t	0,5423	
C <sub>A</sub>	0,0109	2,54
E	0,0849	
t <sub>H</sub>	0,7804	
H	4,071·10 <sup>-11</sup>	17,96
e <sub>H</sub>		
N	7,687·10 <sup>-7</sup>	9,67
C <sub>Q</sub> xN	0,3202	
TxN	0,0062	4,18
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,1505	
txN	0,6696	
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,9273	
(TxT)xN	0,9678	
C <sub>A</sub> xN	0,1589	
E x N	0,0087	3,92
t <sub>H</sub> xN	0,0463	2,69
HxN	0,0134	2,42
e <sub>H</sub> xN		
Residual		13,12
Total		100,00

El ANOVA S/R ratio para la variable proteínas liberadas se muestra en la Tabla 19 y muestra como resultado que las variables más influyentes son la temperatura (39%) y el tipo de agente químico (23%). Como ninguna de las interacciones tiene un p-valor inferior a 0.05, ninguna de ellas tiene una influencia significativa. Para la etapa de pretratamiento, los factores más influyentes fueron la temperatura, el tipo de agente, la concentración de éste y la concentración del alga. Los dos últimos han perdido su significancia tras la etapa de hidrólisis. Como para la etapa de liberación de azúcares actúan los mismos parámetros y en el mismo sentido, es necesario mencionar que para la variable de liberación de azúcares los factores significativos fueron la temperatura y la concentración del agente químico, lo que quiere decir que para la liberación de proteínas es más importante el agente como tal porque

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

en medio ácido las proteínas no son apenas liberadas, mientras que, si para la liberación de azúcares no se utiliza HCl (que es el óptimo) los azúcares pueden seguir liberándose siempre y cuando se utilice una concentración elevada del agente que se emplee.

Tabla 19. ANOVA S/R ratio para la liberación de proteínas global

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,1222	
T	0,0003	38,89
C <sub>Q</sub> X T	0,5859	
t	0,2679	
C <sub>Q</sub> X t	0,1578	
T x t	0,9651	
C <sub>A</sub>	0,3445	
E	0,4784	
t <sub>H</sub>	0,7414	
H	0,0010	23,38
e <sub>H</sub>		
Residual		37,73
Total		100,00

Tras la realización del test de Duncan, se observó para la temperatura que no hay diferencias significativas entre los niveles 2 y 3 en este caso, pero sí entre los niveles 1-2 y 1-3, resultando el valor óptimo nuevamente T3, 121 °C (en el pretratamiento, aunque el óptimo era el mismo, había diferencias significativas entre todos los niveles; en la fase de liberación de azúcares, se obtuvieron los mismos resultados que en la liberación de proteínas). El otro factor influyente es el tipo de agente químico, para el cual el test ha dado como resultado que hay diferencia significativa entre 1 y 2 (HCl y NaOH) y que el óptimo para la liberación de proteínas es el NaOH (2).

A modo de resumen, los valores que optimizan la liberación de proteínas en la etapa de pretratamiento son: empleo de NaOH como agente químico, y temperatura 121°.

La liberación de proteínas, como ya se ha mencionado, se ve favorecida por temperaturas elevadas, y este hecho también ha sido corroborado por otros autores. Por ejemplo, Safi et al. (2014) aplicaron sobre una biomasa compuesta por *A. platensis* y *P. cruentum* un pretratamiento básico, consistente en NaOH 2 N a 40 °C durante 60 min con agitación a pH 12, y

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

obtuvieron un rendimiento de extracción de aminoácidos del 20%; mientras, en este caso, se ha aplicado un pretratamiento consistente en NaOH 2 M a 80 °C durante 10 minutos, y, pese a ser el tiempo mucho menor, el empleo de una temperatura más alta ha permitido obtener un rendimiento de 33.78% para la biomasa consistente en alga pura. La influencia de otros factores como por ejemplo el tiempo es mucho menos relevante, como demuestra el estudio realizado por Solé-Bundó et al. (2017) que obtuvieron un valor máximo de solubilización de proteínas del 32.4% empleando CaO 10% a 72 °C durante 24 h. En este caso, el empleo de NaOH 2 M durante 10 min a 80 °C, reportó un rendimiento de 33.78% para alga pura. La existencia de una diferencia tan pequeña entre ambos valores existiendo entre ellos una diferencia de tiempos tan elevada indica que el tiempo es un valor menos influyente que el resto para esta variable.

La variación de la temperatura hasta 121 °C, ha permitido obtener un rendimiento cercano al 95% para el pretratamiento de NaOH 2 M durante 60 min, lo que implica que un aumento de temperatura afecta positiva y significativamente en la liberación de proteínas del microalga.

### 2.3.2.4. LÍPIDOS LIBERADOS

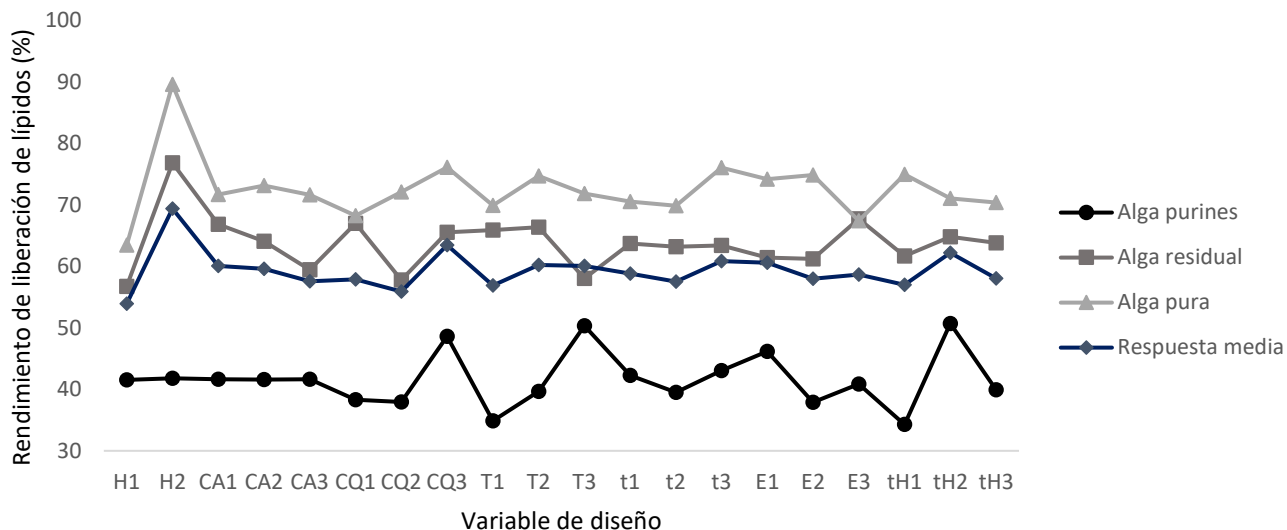
Los lípidos liberados son la variable que hace referencia a la cantidad de lípidos que se extraen del núcleo celular tras las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática sucesivas. La variable con la que se cuantifica es el rendimiento de liberación de lípidos global, que es una medida de la cantidad de lípidos que se consiguen liberar en el proceso completo respecto a los presentes inicialmente en la biomasa. Para su cálculo, se emplea la Ecuación 5 que se presenta en el apartado de métodos de cálculo, dentro del apartado de Materiales y Métodos.

La Gráfica 13 presenta las respuestas medias de rendimiento de liberación de lípidos para cada variable de diseño y para cada tipo de microalga. Se puede observar una tendencia similar en la mayoría de las variables entre la biomasa procedente del tratamiento de aguas residuales y la pura, mientras que para el alga procedente de purines no sólo se observa que es completamente diferente, sino también que los resultados son mucho menores, algo positivo dado que esta era la única variable que se buscaba minimizar. Los rangos de rendimiento de liberación de lípidos son: para el alga de purines de 34 a 51%, mientras que para pretratamiento fue de 8 a 26%; para el alga de agua residual, 58-77% mientras que para pretratamiento fue 33-60%; y para el alga pura de 67 a 90%, mientras que para el pretratamiento fue de 45 a 86%.

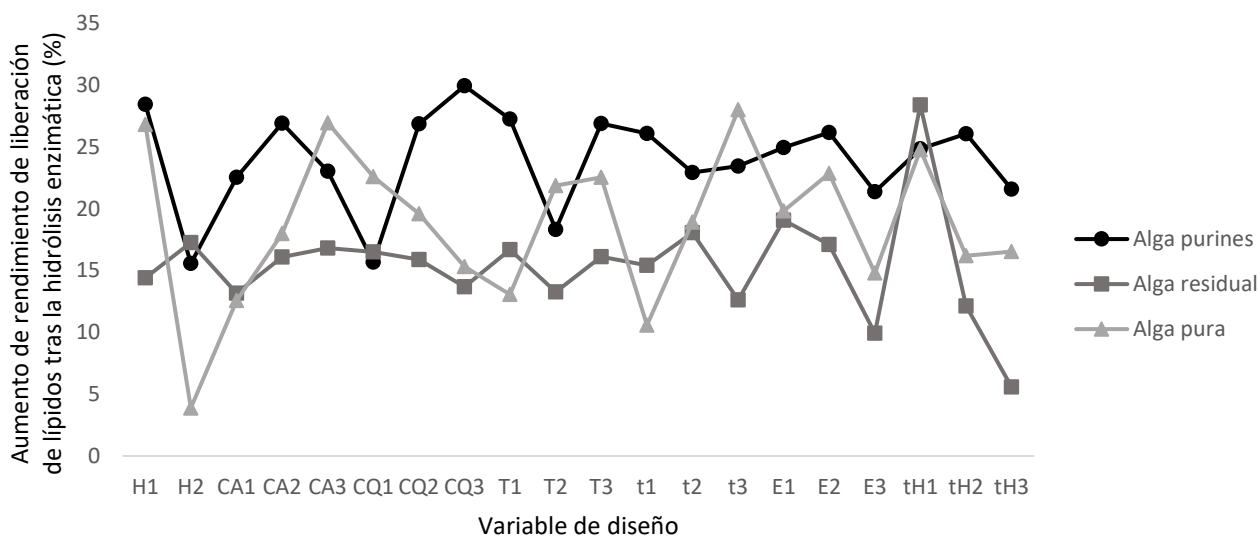
En la Gráfica 14 se presenta la diferencia de rendimiento de liberación de lípidos entre la etapa de pretratamiento y el proceso global, para ver cómo afecta a cada alga la hidrólisis enzimática en lo que a la liberación de lípidos

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

respecta. Se puede apreciar que el alga al que menos afecta es el alga de aguas residuales (aumento del rendimiento entre un 10 y 15% aproximadamente) y la más afectada es el alga de purines, que pese a haber sido la que menores rendimientos obtiene en global, es la que más afectada se ve por la hidrólisis enzimática, llegando a aumentar el rendimiento de extracción entre un 20 y un 30%.



Gráfica 13. Respuestas medias del rendimiento de liberación de lípidos en función de las variables de diseño para cada tipo de alga de forma global



Gráfica 14. Aumento del rendimiento de liberación de lípidos tras la hidrólisis enzimática



Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

La Tabla 20 presenta el ANOVA respuestas, donde se puede observar que la variable más significativa es el ruido o tipo de alga, que contribuye con un 40%, lo cual hace imposible tratar de sacar cualquier otra conclusión sobre variables influyentes sin analizar el ANOVA S/R ratio en el cual se elimine el factor de ruido.

*Tabla 20. ANOVA respuestas para la liberación de lípidos global*

<b>Fuente variación</b>	<b>p-value</b>	<b>%Contrib.</b>
C <sub>Q</sub>	0,0483	2,46
T	0,4818	
C <sub>Q</sub> X T	0,0872	
t	0,5589	
C <sub>Q</sub> X t	0,3807	
T x t	0,3319	
C <sub>A</sub>	0,6946	
E	0,6846	
t <sub>H</sub>	0,2097	
H	2,6171·10 <sup>-7</sup>	12,96
e <sub>H</sub>		
N	6,8793·10 <sup>-14</sup>	40,10
C <sub>Q</sub> xN	0,3638	
TxN	0,0343	4,30
(C <sub>Q</sub> xT)xN	0,0040	9,99
txN	0,9184	
(C <sub>Q</sub> xt)xN	0,2964	
(Txt)xN	0,8050	
C <sub>A</sub> xN	0,8557	
ExN	0,2146	
t <sub>H</sub> xN	0,1143	
HxN	0,0005	6,62
e <sub>H</sub> xN		
Residual		23,57
Total		100,00

El ANOVA S/R ratio se muestra en la Tabla 21. En él se puede observar que el único valor verdaderamente influyente en lo que a la liberación de lípidos respecta es el tipo de agente químico empleado, que contribuye con un 61%, siendo el nivel que minimiza esta variable el nivel 2 (empleo de NaOH). El resto de variables tienen un p-valor superior a 0.05 por lo que no deben ser consideradas influyentes. En la etapa de pretratamiento, el tipo de agente

Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

químico empleado también era el único factor significativo, mientras que para la liberación de azúcares los factores más influyentes en la etapa global eran la temperatura y la concentración del agente químico, y para la liberación de proteínas eran la temperatura y el tipo de agente empleado.

*Tabla 21. ANOVA S/R ratio para la liberación de lípidos global*

Fuente variación	p-value	%Contrib.
C <sub>Q</sub>	0,1087	
T	0,8986	
C <sub>Q</sub> x T	0,1868	
t	0,5309	
C <sub>Q</sub> x t	0,6824	
T x t	0,2589	
C <sub>A</sub>	0,7483	
E	0,7755	
t <sub>H</sub>	0,2968	
H	1,3577·10 <sup>-6</sup>	61,36
e <sub>H</sub>		
Residual		38,64
Total		100,00

Como la variable más influyente es el tipo de agente químico, no es necesario realizarle el test de Duncan, ya que sólo hay dos posibles agentes químicos y se deberá escoger aquél que minimice la liberación de lípidos, en este caso el agente óptimo es el NaOH. Aunque ninguno de los otros factores tiene un p-valor inferior a 0.05, la variable con menor p-valor y por lo tanto la más influyente después del tipo de agente químico es la concentración de éste. Por ello se le ha realizado el test de Duncan a la variable de concentración del agente químico, obteniéndose que había una diferencia significativa entre los valores 2 y 3, resultando el 3 mucho menos adecuado para la minimización de liberación de lípidos. Por lo tanto, los valores óptimos son el 1 y el 2, es decir, 0.5 y 1 M.

Como resumen, a la hora de minimizar la liberación de lípidos es importante emplear como agente químico el NaOH en concentraciones diluidas, entre 0.5 y 1 M.

### 3. CONCLUSIONES

En primer lugar, se presentan los rangos de rendimientos de las variables de estudio obtenidos para cada tipo de alga, tanto en la etapa de pretratamiento como de manera global:

Tabla 22. Rango de rendimientos obtenidos para las variables de estudio

	Alga purines		Alga residual		Alga pura	
	Pretrat.	Global	Pretrat.	Global	Pretrat.	Global
Liberación azúcares (%)	25-88	34-98	28-94	61-99	13-87	39-99
Recuperación azúcares (%)	3-76	5-86	8-62	11-74	4-80	9-91
Degradación (%)	1-95	7-91	29-88	26-77	5-69	4-77
Liberación proteínas (%)	13-86	54-99	13-92	41-99	19-96	35-99
Liberación lípidos (%)	1-63	11-68	1-93	41-94	14-96	46-98

Como conclusiones a nivel general, para los tres tipos de alga, la temperatura del pretratamiento es el factor más importante de los estudiados, que afecta a las tres variables a maximizar de manera que a mayor temperatura, mayor es la cantidad de azúcares liberados, recuperados y proteínas liberadas. Las temperaturas bajas (80 °C en este caso), minimizan los rendimientos de manera determinante. Para la extracción de lípidos no es un factor significativo. En cuanto a la liberación de proteínas, es importante destacar que se ve maximizada por el empleo de un agente básico, mientras que la liberación de azúcares se ve maximizada por el empleo de un agente ácido. La liberación de los lípidos se ve minimizada por el empleo de un agente ácido. La degradación es mínima en el alga pura. La concentración de agente químico que maximiza la liberación de azúcares, su recuperación y la liberación de proteínas es la máxima, 2 M. La respuesta en lípidos es del mismo tipo, por lo que en cambio, la extracción de lípidos se vería minimizada a concentraciones entre 0.5 y 1 M.

En la etapa de pretratamiento, se ha alcanzado valores de liberación de azúcares prácticamente totales, con un valor de 94.46% para el alga crecida en agua residual doméstica, empleando HCl 2 M a 100 °C durante 10 min; el hecho de que la temperatura no sea 120 °C es que, como ya se comentó, para el alga residual doméstica, la influencia de la temperatura no variaba entre 100 °C y 120 °C, siendo éste el único alga para el que se produce este efecto; el rendimiento de recuperación de azúcares más elevado fue 79.58%, que se produjo para el alga pura empleando HCl 2 M a 120 °C durante 10 min; el máximo rendimiento de recuperación de proteínas también se produjo para el alga pura, empleando NaOH 2 M a 120 °C durante 60 min, siendo este rendimiento de 95.77%; y por último, el rendimiento de liberación de lípidos



## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

mínimo obtenido en la etapa de pretratamiento se dio para el alga de purines, tratada con HCl 0.5 M a 80 °C durante 10 min, siendo el rendimiento de 0.85%.

De forma global, el valor máximo global de rendimiento de liberación de azúcares ha sido 99.90%, obtenido para el alga de agua residual doméstica tratada con HCl 1 M a 120 °C durante 10 min; el máximo valor global de recuperación de azúcares fue 91.20%, obtenido con el alga pura para el tratamiento con HCl 2 M a 120 °C durante 10 min; el máximo valor de liberación de proteínas global ha sido de 99.49%, obtenido para condiciones de NaOH 2 M, a 120 °C y 60 min para el alga de purines; por último, el mínimo rendimiento para la liberación de lípidos global ha sido de 10.89% para el alga de purines tratada con HCl 0.5 M a 80 °C y 10 min.

En la Tabla 23 se muestra la significancia de los factores de estudio sobre las variables de estudio, tanto para la etapa de pretratamiento como de forma global, siendo verde factor significativo y gris factor no significativo. En los cuadros se incluyen los valores de los factores significativos que maximizan la liberación de azúcares y proteínas y minimizan la liberación de lípidos.



Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

Tabla 23. Resumen de factores significativos y niveles óptimos para cada variable en la etapa de pretratamiento y de manera global

	Liberación de azúcares		Recuperación de azúcares		Liberación de proteínas		Liberación de lípidos	
	Pretrat.	Global	Pretrat.	Global	Pretrat.	Global	Pretrat.	Global
Tipo de agente químico	HCl		HCl		NaOH	NaOH	HCl	HCl
Concentración del alga								
Concentración del agente químico	2 M	2 M	2 M	2 M	2 M			
Temperatura	120 °C	120 °C	120 °C	120 °C	120 °C	120 °C		
Tiempo de pretratamiento	30 min		60 min					
Concentración de enzimas								
Tiempo de hidrólisis								
Interacción C <sub>Q</sub> T								
Interacción C <sub>Q</sub> t								
Interacción Txt								

En cuanto a la comparación entre biomazas algales de diferentes procedencias, las diferencias no han sido muy importantes. Los factores significativos han resultado los mismos para todas ellas, influyendo en el mismo sentido y con efectos muy similares.

El alga que ha sufrido mayor grado de degradación de azúcares en el proceso global ha sido el alga de aguas residuales domésticas, y la que menos fue el alga pura. No obstante, para la etapa de pretratamiento, el alga de purines y el alga residual sufren unos porcentajes de degradación del mismo orden. El alga pura es de nuevo, aunque con menor diferencia que para el proceso global, el alga que menor degradación sufre en la etapa de pretratamiento.

El alga procedente del tratamiento de aguas residuales fue la que obtuvo mayores rendimientos de liberación de azúcares tanto en la etapa de pretratamiento como de forma global, pero no los mayores rendimientos de recuperación (que corresponden a alga pura) debido a que también fue la que mayores porcentajes de degradación presentó.

El alga procedente del tratamiento de purines fue la que mayores rendimientos de liberación de proteínas proporcionó de forma global, y la que minimizó el rendimiento de extracción de lípidos; no obstante, en cuanto a liberación de azúcares fue superada por el alga residual y en cuanto a recuperación, por el alga pura.

El alga pura es en la que se han obtenido mayores rendimientos de recuperación de azúcares tanto para la etapa global como para la de pretratamiento, aunque no los mayores rendimientos de liberación (que corresponden a purines). Concretamente en liberación de azúcares este tipo de alga presenta una tendencia anómala, que es la supremacía del NaOH sobre el HCl para maximizar esta variable. Respecto al resto de variables, también se ve favorecida por tiempos de pretratamiento elevados, y una concentración de agente químico elevado aumenta ligeramente el rendimiento de liberación y recuperación de azúcares, pero lo importante es que aumenta significativamente la liberación de proteínas.

La etapa de hidrólisis enzimática en términos de liberación y recuperación de azúcares afectó en mayor medida al alga crecida en agua residual doméstica, que experimentó aumentos en el rendimiento de 15 al 25%, y a la que menos al alga de purines (5-18%). No obstante, aunque en términos de liberación de azúcares los mejores resultados corresponden al agua residual doméstica, es importante remarcar que fue el tipo de alga para la que se reportaron mayores porcentajes de degradación, entre 35 y 55%, mientras que para el alga pura sólo fue de un 20-35%. En cuanto a liberación de proteínas, el alga más afectada fue el alga de purines, que experimentó aumentos en el rendimiento

## Valorización de la fracción carbohidrato de diferentes tipos de biomasa microalgal

---

de liberación de proteínas de entre el 20 y el 40%, y la que menos afectada se vio fue el alga pura (10-20%). Para la etapa de liberación de lípidos, el tipo de alga menos afectado fue el alga crecida agua residual doméstica, que sólo experimentó aumentos entre el 10 y 15% y el alga de purines fue la que más afectada se vio, experimentando aumentos de hasta el 30%.



#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Alcántara, C., Domínguez, J. M., García, D., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2015). Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic-aerobic algal-bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresource Technology*, 191(December), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.125>
- Ashokkumar, V., Zainal Salam, F., Tiwari, ON., Chinnasamy, S., Mohammed, S. & Nasir, FN., (2015). An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor. *Energy Conversion and Management* 101, 778-786.
- Atencio Pérez, R. M., Reyes-López, J. A., & Guevara-García, J. A. (2013). Evaluación de riesgo ambiental en un tiradero con quema de basura. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(SUPPL. 3), 107–117.
- Bahadar, A., Khan, M. B., Asim, M. A., & Jalwana, K. (2015). *Supercritical Fluid Extraction of Microalgae (Chlorella vulgaris) Biomass. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00021-2>
- González-Fernández, C. & Muñoz, R. (2017). *Microalgae-based biofuels and bioproducts*. Kindlington, United Kingdom: Woodhead Publishing (Elsevier).
- Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., & Ferrer, I. (2016). Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresource Technology*, 199, 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.007>
- Crisóstomo-Vázquez, L., Alcocer-Morales, C., Lozano-Ramírez, C., & Rodríguez-Palacio, M. C. (2016). Fitoplancton de la Laguna del Carpintero, Tampico, Tamaulipas, México. *Interciencia*, 41(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>
- De, J., De, T., & Industria, D. E. L. A. (2007). Distintas tecnologías de tratamiento para los residuos ganaderos y de las industrias agroalimentarias aplicados al caso concreto de Castilla y León.

- Florentino de Souza Silva, A. P., Costa, M. C., Colzi Lopes, A., Fares Abdala Neto, E., Carrhá Leitão, R., Mota, C. R., & Bezerra dos Santos, A. (2014). Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. *Renewable Energy*, 63(March 2014), 762–766. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.10.038>
- Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., & Vázquez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- García-Martínez, B. Ayala-Torres, E., Reyes-Gómez, O., Zorro, A., Barajas-Solano, A., & Barajas-Ferreira, C. (2016). Evaluation of a two-phase extraction system of carbohydrates and proteins from *Chlorella vulgaris* utex 1803. *Chemical Engineering Transactions*, 49(May), 355–360. <https://doi.org/10.3303/CET1649060>
- García, D., Posadas, E., Blanco, S., Acién, G., García-Encina, P., Bolado, S., & Muñoz, R. (2018). Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggy wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresource Technology*, 248(October), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>
- García, D., Posadas, E., Grajeda, C., Blanco, S., Martínez-Páramo, S., Acién, G., ... Muñoz, R. (2017). Comparative evaluation of piggy wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors under indoor and outdoor conditions. *Bioresource Technology*, 245(August), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.135>
- Gomez Millan, G. (2015). Desarrollo de biorrefinerías en el mundo ( Biorefineries development : a worldwide review ). *Ciencia y Desarrollo*, 1(May), 13.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Günerken, E., Gonzalez, L. G., Elst, K., Eppink, M., & Wijffels, R. (2013). Disruption of *Neochloris oleabundans* by bead milling as the first step in the recovery of intracellular metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(July 2013), S43. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.093>
- Harun, R., & Danquah, M. K. (2011). Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 168(3), 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>

- Harun, R., Danquah & M.K., Forde, G.M., (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2) 199-203.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- Kamalanathan, M., Pierangelini, M., Shearman, L. A., Gleadow, R., & Beardall, J. (2016). Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1509–1520. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0726-y>
- Khajepour, F., Hosseini, S. A., Ghorbani Nasrabadi, R., & Markou, G. (2015). Effect of Light Intensity and Photoperiod on Growth and Biochemical Composition of a Local Isolate of *Nostoc calcicola*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(8), 2279–2289. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1717-9>
- Kim, Y. H., Choi, Y. K., Park, J., Lee, S., Yang, Y. H., Kim, H. J., ... Lee, S. H. (2012). Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresource Technology*, 109, 312–315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.064>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2015). *Bioethanol Production from Microalgae. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00012-1>
- Lee, I., & Han, J. I. (2015). Hydrothermal-acid treatment for effectual extraction of eicosapentaenoic acid (EPA)-abundant lipids from *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 191(May 2015), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.124>
- Lee, I., Park, JY., Choi, SA., Oh, YK. & Han, JI., 2014. Hydrothermal nitric acid treatment for effectual lipid extraction from wet microalgae biomass. *Bioresource Technology* 172C:138-142.
- Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2015). Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Processing Technology*, 131, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.11.009>
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Energies*, 6(8), 3937–3950. <https://doi.org/10.3390/en6083937>

- Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., & Bolado Rodríguez, S. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 218(December), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
- Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., & Morais, R. (2001). Evaluation of different cell disruption process on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 13, 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1008183429747>
- Mijaylova Nacheva, P., Chávez, G. M., Bustos, C., Zúñiga, M. A. G., & Orozco, Y. H. (2008). Comparison of bioreactors with different kinds of submerged packed beds for domestic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 58(1), 29–36. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.321>
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., & Gouveia, L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 104, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.059>
- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V., & Chandra, R. (2013). *Algae Oils as Fuels. Biofuels from Algae*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00008-5>
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., ... Marchal, L. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology*, 196, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>
- Nguyen, M. T., Choi, S. P., Lee, J., Lee, J. H., & Sim, S. J. (2009). Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 161–166. <https://doi.org/10.4014/jmb.0810.578>
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Bhattacharya, S., Bachani, P., & Mishra, S. (2016). Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. *Bioresource Technology*, 204, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.078>
- Passos, F., Carretero, J. & Ferrer, I., (2015a). Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chemical Engineering Journal* 279.



- Passos, F., Felix, L., Rocha, H., Pereira, J. de O., & de Aquino, S. (2016). Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresource Technology*, 209(November 2017), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>
- Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, 184, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Romero García, J. M., Ación Fernández, F. G., & Fernández Sevilla, J. M. (2012). Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 112, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>
- Safi, C., Charton, M., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Research*, 3(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.017>
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S. & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, 200:380-386.
- Solé-Bundó, M., Carrere, H., Garfí, A. & Ferrer, I., (2017). Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Research* 24:199-206.
- Solé-Bundó, M., Eskicioglu, C., Garfí, M., Carrère, H., & Ferrer, I. (2017). Anaerobic co-digestion of microalgal biomass and wheat straw with and without thermo-alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 237(February), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.151>
- Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2008). Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 99(8), 3110–3115. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.062>
- Van Wychen, S., & Laurens, L. M. L. (2013). [NREL] Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass, (December), NREL/TP-5100-60956. <https://doi.org/10.2172/1118077>
- Yoo, G., Yoo, Y., Kwon, J. H., Darpito, C., Mishra, S. K., Pak, K., ... Yang, J. W. (2014). An effective, cost-efficient extraction method of biomass from wet microalgae with a functional polymeric membrane. *Green Chemistry*, 16(1), 312–319. <https://doi.org/10.1039/c3gc41695j>

- Yun, E. J., Kim, H. T., Cho, K. M., Yu, S., Kim, S., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2016). Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 199, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.001>
- Yun, Y.-M., Jung, K.-W., Kim, D.-H., Oh, Y.-K., Cho, S.-K. & Shin, H.-S., (2013). Optimization of dark fermentative H<sub>2</sub> production from microalgal biomass by combined (acid + ultrasonic) pretreatment. *Bioresource Technology* 141, 220–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.054>.
- Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., & Lv, P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. *Renewable Energy*, 125(May), 1049–1057. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.078>
- Zhou, N., Zhang, Y., Gong, X., Wang, Q., & Ma, Y. (2012). Ionic liquids-based hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 118, 512–517. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.074>
- Zuorro, A., Miglietta, S., Familiari, G., & Lavecchia, R. (2016). Enhanced lipid recovery from *Nannochloropsis* microalgae by treatment with optimized cell wall degrading enzyme mixtures. *Bioresource Technology*, 212, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.025>