

# Evaluación de los métodos de hidrólisis ácida, hidrólisis básica y extracción mecánica para la obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa microalgal

pags 15-26

Grupo de Investigación: Biotecnología

Línea de investigación: Investigación en Biotecnología

Diego Rubio •, Nury Stefany Rincon Aya••, Milena Johana Torres Espitia•••

Recibido: 15 de noviembre de 2014    Aceptado: 5 de diciembre de 2014

## RESUMEN

El presente trabajo evalúa tres métodos para la obtención de azúcares reductores (hidrólisis ácida, hidrólisis básica y ultrasonificación) a partir de biomasa de *Chlorella Vulgaris*.

Se realiza el respectivo cultivo de la microalga con medio de cultivo Foliagro 0,2 %V/V con pH 6, con una agitación de 4L/min, intensidad lumínica de 8 watts, fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, temperatura entre 23 °C±3°C.

Entre los métodos químicos y el mecánico probados los mejores resultados se obtuvieron con la hidrólisis ácida, con concentración 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizando 0,5 gr de biomasa liofilizada a condiciones de temperatura de 120°C, presión 1.2 bar, tiempo de exposición al ácido 30 min, y neutralización con NaOH.

Las mejores condiciones encontradas en la ultrasonificación son a una amplitud del 45% con tiempos efectivos de 5 min y 11 minutos. En la hidrólisis básica utilizando diferentes concentraciones de NaOH con condiciones de temperatura de 120°C, presión 1.2 bar y tiempo de exposición a la base de 30 min, no se encuentran azúcares reductores. La cuantificación de los azúcares se realiza por el método del DNS a una longitud de onda de 540 nm.

**Palabras claves:** *Chlorella Vulgaris*, Azúcares reductores, Hidrólisis ácida, hidrólisis básica, ultrasonificación, Biomasa, cultivo microalgal, tiempo efectivo, DNS.

## ABSTRACT

The present work evaluates the obtaining of reducing sugars by (acid hydrolysis, base hydrolysis and ultrasonication) from biomass of *Chlorella vulgaris*.

The respective microalgae grow is done with Foliagro cultivation medium, 0.2% V/V and pH 6, with an agitation of 4L / min, 8 watt light intensity, 12 hours of light and 12 hours of darkness photoperiod and temperature between 23 ° C ± 3 ° C.

Between the chemical and mechanical methods proven, the better results were obtained by acid hydrolysis, with 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration, using 0.5 g of lyophilized biomass, at temperature conditions of 120°C, pressure 1.2 bar, 30 min acid time exposure and neutralization with NaOH.

The best conditions found in the ultra-sonication, are a 45% amplitude with effective times of 5 min and 11 min. In basic hydrolysis, using different types of NaOH concentrations, at temperature conditions of 120°C, pressure 1.2 bar and 30 min base time exposure, reducing sugars were not found. The quantification of sugar was done by the DNS method at a wavelength of 540 nm.

**Key words:** *Chlorella Vulgaris*, Reducing sugars, acid hydrolysis, basic hydrolysis, ultra sonication, biomass, microalgae grow, effective time, DNS.

• Docente investigador, Ingeniería Química, Fundación Universidad de América, diego.rubio@investigadores.uamerica.edu.co

•• Estudiante coinvestigador, Ingeniería Química.

••• Estudiante coinvestigador, Ingeniería Química

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad mundial de suplir la demanda de combustibles fósiles por los biocombustibles que generen menor contaminación ambiental para ofrecer mejores condiciones de vida a futuro y evitar el agotamiento total de estos recursos energéticos, es indispensable indagar sobre todas las posibles alternativas que sirvan como biomasa en el proceso fermentativo para la obtención de alcohol, sin que estos dejen su rol principal en la sociedad como lo son los alimentos pero teniendo en cuenta además que las alternativas sean eficientes al momento de obtener el producto con organismos con crecientes tolerancias a los alcoholes, mayores rangos de sustrato a mayores temperaturas, además de menor consumo de energía para la recuperación de los alcoholes; a raíz de esto, con ayuda de nuevas tecnologías se estudia la biomasa obtenida de materiales celulósicos los cuales no tienen valor nutricional y un alto valor comercial en el mercado.

Uno de estos materiales son las microalgas las cuales pueden ser cultivadas en diferentes hábitats y a diferentes condiciones sin alterar sus rápido crecimiento y cortos periodos de cosecha; además por ser organismos fotosintéticos son altas fijadoras de CO<sub>2</sub> reduciendo en gran proporción las emisiones gaseosas dadas por los combustibles. Del rompimiento celular de estos organismos se extraen por medio de diferentes procesos los lípidos y azúcares que participan la fermentación alcohólica para obtener el bioetanol. Es por esta razón que en la actualidad el grupo BIOTECFUA centra sus investigaciones en la biomasa microalgal a diferentes condiciones de cultivo y de proceso para evaluar el más eficiente al momento de obtener mayores concentraciones de azúcares fermentables.

Con biomasa microalgal este proyecto pretende evaluar, analizar y comparar dos métodos de rompimiento celular (hidrólisis ácida y ultrasonificación) de los cuales se pueda obtener la mayor cantidad de azúcares reductores a las mejores condiciones referenciadas y así concluir cuál de ellos es más eficiente para este

propósito y prometedor con miras a producción a mayores escalas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Producción de biomasa

#### 2.1.1. Microalga

El grupo BIOTECFUA proporciona a la investigación 500 mL de la microalga *Chlorella Vulgaris* cultivada con fertilizante foliar.

#### *Condiciones de cultivo*

Teniendo claras las variables que afectan el crecimiento de la microalga, gracias a la información reportada por investigaciones realizadas con anterioridad por el grupo BIOTECFUA, se trabaja en este proyecto con las siguientes condiciones de crecimiento: Temperatura que oscila entre 23°C ± 3°C (GUAUQUE *et al*, 2013), agitación y oxigenación de 0,04 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), intensidad lumínica de 8 watts con fotoperiodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (CALDERON *et al*, 2013). El medio de cultivo se realiza a una concentración de 0.02% V/V de Fertilizante (ANGEL *et al*, 2012) el cual no afecta el pH de la microalga el cual es 6.

#### 2.1.3. Sistema de producción de biomasa

Se realiza un montaje donde se pueden aplicar las condiciones seleccionadas para el crecimiento del medio de cultivo.

Los materiales que se emplean para el diseño del montaje son: tres cajas de poliestireno, aluminio suficiente para forrar las cajas en su interior, bombas de aire Boyu Model S-4000B para controlar el flujo de oxígeno y la agitación, temporizador de frecuencia Noru nr-936 encargado de controlar automáticamente los fotoperiodos del sistema, tres bombillos con luz roja de 8 watts (uno para cada caja) encargados de la luz artificial y de la temperatura a la cual crece favorablemente la microalga, nueve recipientes de 4L

## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

cada uno y manguera suficiente para transportar el aire de las bombas a los recipientes.

Inicialmente para el montaje se toman las tres cajas de poliestireno que permiten que el sistema sea cerrado y que se mantenga la temperatura a la cual crece la microalga, se forra el poliestireno con aluminio de 0,2 mm encargado de la reflexión de la luz artificial dentro de la incubadora. Adicionalmente el sistema se complementa con los instrumentos ya nombrados que permiten mantener el las condiciones de proceso del cultivo sin que hayan variaciones significativas que afecten el crecimiento microalgal.

#### 2.1.4. Preparación del medio de cultivo

Se reporta que la concentración recomendada de medio de cultivo preparado con fertilizante 0,2% V/V. Esta concentración aporta los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento integral del cultivo microalgal.

Para la preparación del medio de cultivo se maneja 2 mL/L de Fertilizante y agua destilada. La esterilización del medio de cultivo se realiza en un recipiente a presión en donde se procede a esterilizar por un tiempo de 45 min e inmediatamente a enfriar a temperatura ambiente.

#### 2.1.5. Cultivo

Se realiza una producción de biomasa que se somete desde el comienzo a las condiciones de la incubadora en los recipientes de 4L a las condiciones ya nombradas. Inicialmente se toman 50 mL de microalga y 450 mL de medio de cultivo y se observa la adaptación y el crecimiento de la microalga. Se les hace un conteo celular diario utilizando microscopio con lente 40X y cámara de Neubauer, en donde se observa que hay aumento celular.

## 2.2. Tratamiento de biomasa

Inicialmente se concentra la mayor cantidad de material sólido (biomasa microalgal) por medio de la sedimentación por un periodo de

diez días y se retira el sobrenadante; después la biomasa recuperada se somete al proceso de centrifugación en una centrifuga Sigma Laborzentrifugen 1-14 durante 10 minutos con una velocidad angular de 4000 RPM. La biomasa centrifugada se liofiliza en el laboratorio de Nutrición de Rumiantes de la Facultad de Zootecnia en la Universidad Nacional de Bogotá.

## 2.3. Cuantificación de azúcares fermentables: método del dns

Se realiza una curva de calibración, con una solución patrón de glucosa (1g/L) y 9 soluciones cada una con diferentes concentraciones de la solución patrón mezcladas con agua destilada y la solución del DNS, se procede después de un baño serológico (80°C -10min) y un baño de hielo (5 min) a la lectura de datos en el espectrofotómetro marca Genesys 20 a una longitud de onda de 540 nm.

La ecuación obtenida con la curva es:

Ecuación 1. Ecuación de la Recta DNS

$$y = 1,1387x - 0,0078$$

En donde X es la variable de dependiente y de interés que representa la concentración de azúcares en cada muestra y Y la absorbancia arrojada en cada uno de los experimentos; despejando la variable dependiente se adquiere la ecuación 2 de concentración de azúcares.

Ecuación 2. Ecuación de concentración de azúcares

$$x = \frac{y + 0,0078}{1,1387}$$

## 2.4. Hidrólisis ácida

Se utiliza 0,5 g de biomasa liofilizada y 5 mL de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones (1N, 2N, 3N), se autoclavan a una temperatura de 120°C, presión 1.2 bar, por un tiempo de

30 min, y se someten a centrifugación durante 10 minutos con una velocidad angular de 4000 RPM. El sobrenadante se neutraliza con NaOH.

A las muestras obtenidas se les hace la lectura con el espectrofotómetro a 540 nm después de realizar todo el proceso del DNS sobre las muestras.

## 2.5. Ultrasonificación

Se realiza un diseño de experimentos para estudiar las variables (amplitud de onda y tiempo efectivo) que afectan la concentración de azúcares en la ultrasonificación.

Se hacen nueve ensayos diferentes (ver tabla 1) cada uno con dos replicas para estudiar la variabilidad de los datos.

En el proceso se utiliza biomasa sedimentada por 10 días y se centrifuga durante 10 min a 4000 RPM para concentrar la muestra. Para cada experimento se utiliza 2mL de biomasa centrifugada más 5 mL de biomasa sedimentada que pesan 1,5 g, también, durante la ultrasonificación, cada muestra (tubo) se sumerge en una cama de hielo debido a la alta generación de energía liberada en el proceso.

Tabla 1. Experimento variables ultrasonificación

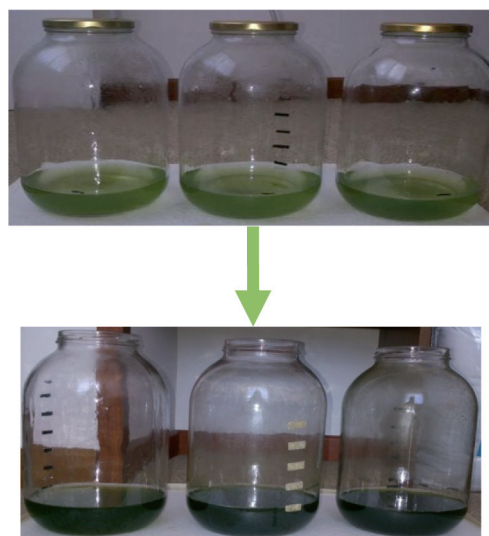
	5 min	Prueba 1	Réplica 1 de 1	Réplica 2 de 1
AMPLITUD: 25%	11 min	Prueba 2	Réplica 1 de 2	Réplica 2 de 2
	22 min	Prueba 3	Réplica 1 de 3	Réplica 2 de 3
	5min	Prueba 4	Réplica 1 de 4	Réplica 2 de 4
AMPLITUD 35%	11 min	Prueba 5	Réplica 1 de 5	Réplica 2 de 5
	22 min	Prueba 6	Réplica 1 de 6	Réplica 2 de 6
	5min	Prueba 7	Réplica 1 de 7	Réplica 2 de 7
AMPLITUD: 45%	11 min	Prueba 8	Réplica 1 de 8	Réplica 2 de 8
	22 min	Prueba 9	Réplica 1 de 9	Réplica 2 de 9

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1. Crecimiento inicial de la microalga

Inicialmente, por medio de un análisis cualitativo se observa que la microalga *Chlorrella Vulgaris* se adapta al medio Foliagro y a las condiciones de cultivo, debido la disminución del volumen inicial de cultivo y la coloración verde oscuro después de transcurrir 10 días de crecimiento (Ver figura 1). Lo dicho anteriormente indica que el fertilizante Foliagro suministra los nutrientes necesarios para un buen crecimiento de la microalga y que el sistema de cultivo también es el adecuado.

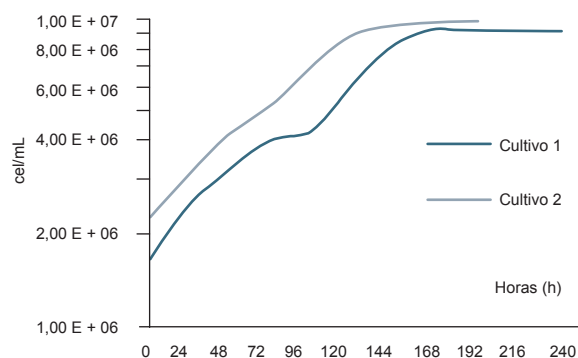
Figura 1. Cultivo en los primeros diez días de crecimiento



### 3.2. Cinética de crecimiento

Después del conteo celular, la curva de crecimiento que se obtiene del cultivo 1 y 2 se observa en la Gráfica 1. Determina las etapas de crecimiento y concentración de biomasa.

**Gráfica 1. Cinética de crecimiento**



En el Grafico 1 se evidencia que en los dos cultivos no hay una etapa de adaptación clara, esto se debe a que las microalgas se adaptan rápidamente al medio y condiciones de cultivo. El cultivo uno inicia una fase exponencial a las 96 horas de crecimiento, su número de microorganismo aumenta hasta llegar una fase estacionaria a las 168 horas. El cultivo dos presenta una fase exponencial a las 72 horas y fase estacionaria a las 120 h, cinética similar a la del cultivo uno, sin embargo, esta crece más rápido y alcanza una concentración celular de  $9,76 \times 10^6$  en 192 horas, mientras que el cultivo uno tarda 240 hora para llegar a una concentración de  $9,23 \times 10^6$ .

### 3.3. tratamiento de la biomasa

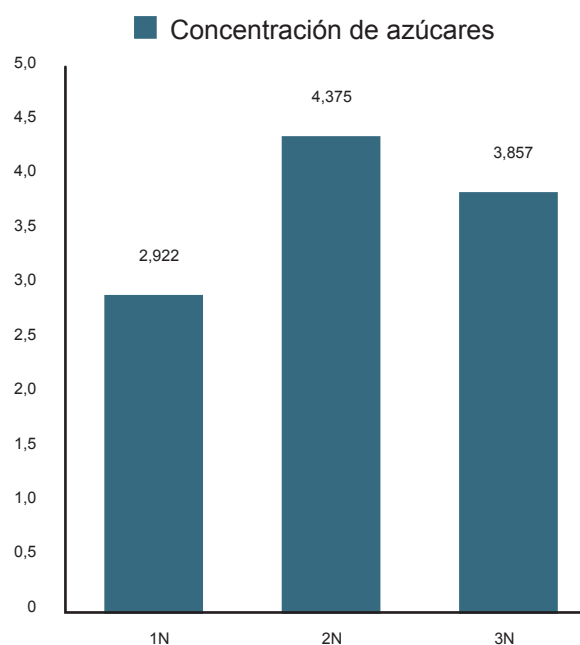
Como se detalla en la sección 2.2, el proceso de obtención de biomasa se realiza en dos partes: concentración (sedimentación y centrifugación) y deshidratación. De 45 L cultivados se obtiene 9,41 g de biomasa liofilizada en el laboratorio de Nutrición de Rumiantes de la Facultad de Zootecnia en la Universidad Nacional de Bogotá, aproximadamente 0,21 g/L de biomasa liofilizada es el rendimiento a condiciones estándar, concentración baja comparada con otro

estudio de CASTRO y ORTIZ (2013) de *Chlorella Vulgaris* cultivada en medio enriquecido con Carbono y Nitrógeno (15:1), presentando un rendimiento de 0,7 g/L de biomasa liofilizada. La concentración baja de biomasa se debe a las pérdidas generadas en el tratamiento por el manejo de grandes volúmenes (45L), además al aplicar condiciones estándar se observa en la cinética que la concentración celular no supera una  $1 \times 10^6$  Cel/mL.

### 3.4. Hidrólisis ácida

En la figura 2 se muestran los resultados de los azúcares de de aplicar el ácido a las diferentes concentraciones.

**Figura 2. Azúcares obtenidos en la hidrólisis ácida**



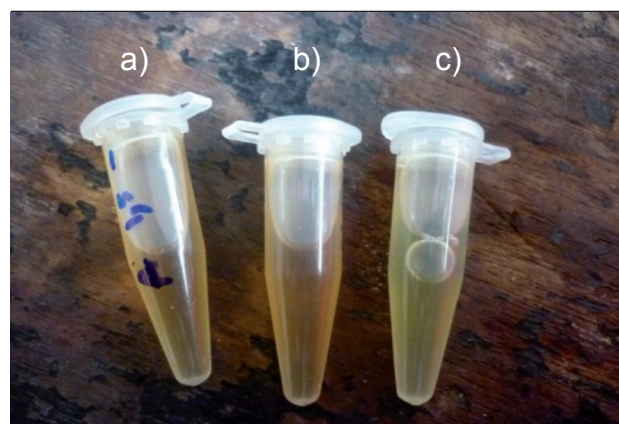
Con base el artículo de MIRANDA *et al*, (2012) donde la cantidad de biomasa y los parámetros fueron iguales a los de este proyecto (0,5 gr de biomasa liofilizada, temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$ , presión 1,2 bar, tiempo de exposición al ácido 30 min, 5 mL de ácido  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y neutralización con NaOH; se llega a la misma conclusión, que para obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables la mejor concentración es la 2N.

La reacción principal que ocurre cuando entra en contacto el ácido con la biomasa es la hidrólisis de la hemicelulosa y solubilización de la celulosa, que como resultado generan los monómeros que las componen (Xilosa, Arabinosa, Galactosa, Manosa y en su mayoría Glucosa).

Los monómeros resultantes (Hexosas y Pentosas) en presencia de ácidos y a temperaturas elevadas sufren procesos de deshidratación originando furfural (derivados de pentosas) o hidroximetilfurfural (derivados de hexosas) DÍAZ, *et al*, que son compuestos aromáticos de fácil polimerización y que al contacto con el aire se tornan de color amarillo. Investigaciones realizadas por MIRANDA *et al*, (2012) que estudiaron el efecto del Furfural y HMF, concluyen que estos son compuestos inhibitorios que afectan la formación de azúcares fermentables a medida que aumenta la concentración del ácido.

Según lo anterior y los resultados indica que en la hidrólisis hay presencia de Furfural y HMF como se observa en Figura 3 que la concentración 1N (c) tiene un color amarillo más claro por la baja presencia de sustancias volátiles; mientras que con las concentración 2N (b) y 3N (c) el color se torna más oscuro.

**Figura 3. Sobrenadante recuperado después del autoclavado**



### 3.5 Ultrasonido

En la tabla 2 se muestran las variables de experimentación, las absorbancias resultantes de cada uno de los experimentos y los g/L de azúcares respectivamente obtenidos. Se realiza un diseño de experimentos para establecer con un grado de confianza el efecto que tienen las variables manipuladas (amplitud y tiempo efectivo) sobre la concentración de azúcares obtenidos.

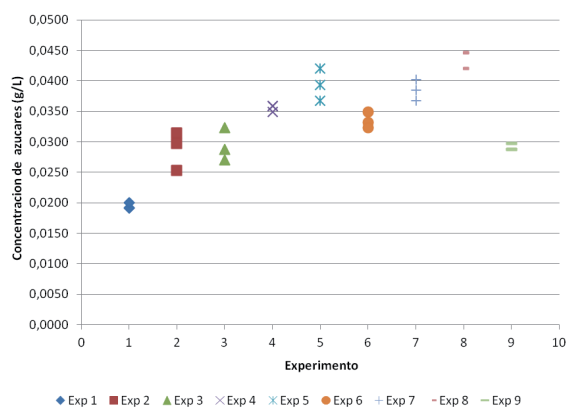
**Tabla 2. Resultados obtenidos de la ultrasonificación**

Variables de experimentación			Resultados absorbancias			Resultados azúcares (g/L)		
Amplitud (%)	tiempo efectivo (min)	Experi-mento	Prueba	replica 1	replica 2	azúcares Prueba	azúcares replica 1	azúcares replica 2
25	5	1	0,014	0,014	0,015	0,0191	0,0191	0,0200
	11	2	0,028	0,021	0,026	0,0314	0,0253	0,0297
	22	3	0,025	0,023	0,029	0,0288	0,0270	0,0323
35	5	4	0,032	0,033	0,033	0,0350	0,0358	0,0358
	11	5	0,037	0,04	0,034	0,0393	0,0420	0,0367
	22	6	0,03	0,029	0,032	0,0332	0,0323	0,0350
45	5	7	0,036	0,034	0,038	0,0385	0,0367	0,0402
	11	8	0,043	0,04	0,043	0,0446	0,0420	0,0446
	22	9	0,025	0,025	0,026	0,0288	0,0288	0,0297

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Lo primero que se realiza en el análisis preliminar, es un diagrama de dispersión para observar la variación de los azúcares con respecto a los experimentos. La grafica 3 muestra una primera aproximación para observar si hay diferencias entre un experimento y otro en cuanto contenido de azúcares.

**Gráfica 3. Diagrama de dispersión (contenido de azúcares vs Experimento)**



Como se aprecia en el gráfico de dispersión, hay diferencias en el contenido de azúcares para las distintas condiciones de experimentación, indicando que las condiciones que mayor contenido de azúcares dejan son las de los experimentos 8, 7 y 5. Y las condiciones que menor cantidad de azúcares deja son la 1,2 y 3.

Para observar que hay diferencias significativas entre los cada uno de los experimentos se realiza un ANOVA; la hipótesis nula de este plantea que el contenido promedio de azúcar entre experimentos es igual; y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) plantea que el contenido promedio de azúcar de al menos uno de los experimentos difiere de los demás.

La tabla 3 muestra el análisis de varianza de un factor, donde descompone la varianza de Azúcares en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 44.382, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre los Azúcares de un nivel de experimento a otro para un nivel de confianza del 95.0%; rechazando la hipótesis nula y aceptando por lo tanto la hipótesis alternativa.

Como el ANOVA está diciendo que si hay diferencia entre los experimentos, se realiza la prueba de Tukey para saber cuáles son diferentes de cuáles. En esta prueba interactuaron todos los promedios de los 9 experimentos; como se muestra en la tabla 4 en donde se obtiene la diferencia entre cada interacción

**Tabla 3. ANOVA un factor**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	f	Probabilidad	Valor crítico para f
Entre grupos	0.00127	8	0.000158173	44.3	2.77248E-10	2.5101
Dentro de los grupos	6.4E-05	18	3.57049E-06			
Total	0.00133	26				

**Tabla 4. Diferencias entre experimentos por medio del criterio de Tukey**

Exp I	Exp J	Promedio Exp i ( $Y_i$ )	Promedio Exp j ( $Y_j$ )	Diferencia	Criterio
1	8	0.0194	0.0437	0.0243	Significativamente diferentes
2	8	0.0288	0.0437	0.0149	Significativamente diferentes
3	8	0.0294	0.0437	0.0143	Significativamente diferentes
4	8	0.0355	0.0437	0.0082	Significativamente diferentes
5	8	0.0393	0.0437	0.0044	No significativamente diferentes
6	8	0.0335	0.0437	0.0102	Significativamente diferentes
7	8	0.0385	0.0437	0.0053	No significativamente diferentes
9	8	0.0437	0.0291	0.0146	Significativamente diferentes

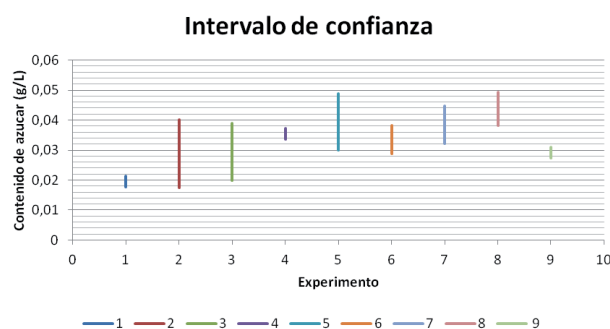
Se desarrolló un Intervalo de confianza que permite con un 95% de confianza estimar un intervalo dentro del cual se va a localizar la media de cada experimento. La Tabla 5 y la Gráfica 4 muestran los nueve intervalos de confianza, en donde dependiendo las condiciones de amplitud y tiempo de cada experimento el contenido de azúcar se va a encontrar entre esos intervalos.

**Tabla 5. Intervalos de confianza**

Experimento	Menor contenido de azúcares en el intervalo (g/L)	Mayor contenido de azúcares en el intervalo (g/L)
1	0.01762087	0.02125387
2	0.01746074	0.04014882
3	0.01977822	0.03900226
4	0.0337211	0.0373541
5	0.0299043	0.04878192
6	0.02868247	0.03829449
7	0.03217237	0.04475746
8	0.03828458	0.04918358
9	0.02728101	0.03091401

Lo que refleja los datos a nivel estadístico, es que si el intervalo es muy amplio, en este caso experimentos 2, 3 y 5, la varianza del contenido de azúcares es grande y por lo tanto estos experimentos no proporcionan información confiable.

**Gráfica 4. Intervalos de confianza**



En las gráficas 4 y 5 se observa que el experimento ocho tiene el pico más alto en el contenido de azúcares, también se observa en la tabla 20 que el experimento 8 no es significativamente diferente en contenido de azúcares con los experimentos 5 y 7.

Como se explica anteriormente el experimento 5 tiene un intervalo de confianza muy amplio por lo que puede actuar como un falso positivo, por esa razón su información es poco confiable al momento de decir que se observa un alto contenido de azúcares. Por lo tanto las condiciones de los experimentos 7 y 8, se toman como las mejores para obtener el mayor contenido de azúcares.

En el Grafico 6 también se puede observar que ha mayor amplitud hay mayor contenido de azúcar; lo que no se puede decir del tiempo efectivo, pues se observa en las tres amplitudes que el tiempo de 11 minutos efectivos alcanza los



## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

picos más altos de azúcares y no el de 22 minutos; esto se debe a que la ultrasonificación en largos periodos de tiempo genera radicales libres<sup>1</sup> por la descomposición de la molécula del agua que reacciona muy fácilmente con otros electrones para poderse aparear; desapareando de esta manera otras moléculas lo que puede estar afectando la composición de los carbohidratos.

**Gráfico 5. Variables y resultados de la ultrasonificación**



### 3.6. Comparación entre la hidrólisis ácida y Ultrasonido

Después de realizar la experimentación basándose en los resultados se realiza una réplica (Ver tabla 2) de las condiciones que reporta el mayor contenido de azúcares para validar la información. En el caso de La hidrólisis con  $H_2SO_4$  2N y para el ultrasonido con una amplitud de 45% con tiempos efectivos de 5 minutos y 11 minutos.

La concentración de azúcares de las réplicas son parecidas a las realizadas en la primera experimentación, por lo que se comprueba que los resultados obtenidos en la experimentación son acertados.

Para comparar los métodos se realiza con el promedio de los azúcares para rendimiento de la cantidad de azúcares con respecto a la biomasa utilizada (Ver Gráfica 3). Como se ve claramente el método que reporta mayor rendimiento es la hidrólisis ácida con el 0,433%, mientras que el ultrasonido reporta rendimientos drásticamente inferiores con 0,059% y el 0,068%.

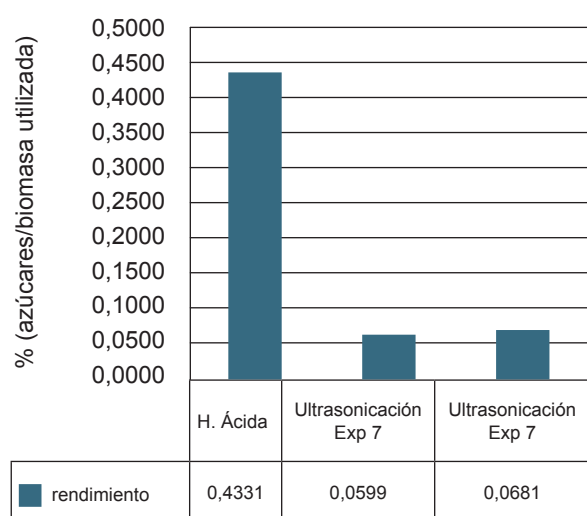
**Tabla 2. Réplica de la hidrólisis ácida y ultrasonificación**

Métodos	Prueba [Azúcares] (g/L)	Réplica 1 [Azúcares] (g/L)	Réplica 2 [Azúcares] (g/L)	Promedio (g/L)
HIDRÓLISIS ÁCIDA $H_2SO_4$ Concentración 2N Biomasa Liofilizada 0,5 g	4,376	4,328	4,288	4,33
ULTRASONIFICACIÓN Amplitud 45% Tiempo 5 min Biomasa húm 1,5 g	0.038	0,0385	0,0393	0,0389
ULTRASONIFICACIÓN Amplitud 45% Tiempo 11 min Biomasa húm 1,5 g	0.043	0,0429	0,0455	0,0442

1 ZHAO Guili y CHEN Xue. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. Bioresource Technology,

El rendimiento favorable del método ácido se debe a la forma química de los carbohidratos contenidos en microalgas, la celulosa como antes se había mencionado principalmente situada en la membrana celular de las microalgas, es fácilmente hidrolizada por ácidos diluidos, eso hace que la sacarificación de la biomasa de microalgas sea mucho más fácil, comparado con la Ultrasonido que es un método mecánico que se basa en la ruptura celular mediante una fuerza mecánica, lo que coincide con otros estudios que afirman que la ultrasonificación no es un método efectivo para la extracción de metabolitos de interés McMILLAN, *et al.* (2013).

**Gráfica 3. Rendimiento de los métodos**

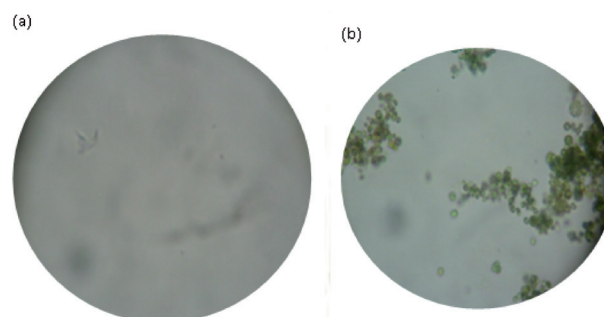


Además las imágenes microscópicas tomada con una resolución de 40x de las células después de aplicar los métodos: (a) Ácido y (b) Ultrasonificación, mostradas en la Figura 4, revelan que la hidrólisis ácida rompe la pared celular, mientras que el ultrasonido solo altera y rompe unas pocas células.

La hidrólisis ácida a pesar que es el método que se muestra con mayor rendimiento en este estudio, comparación el artículo de MIRANDA, *et al.* (2012), es muy bajo ya que esta investigación reporta un rendimiento del 40% azúcares/biomasa. Además la hidrólisis ácida presenta

una gran desventaja, a gran escala no es un método viable por ser altamente contaminante, corrosivo y peligroso a altas temperaturas. Pero por otra parte, la ultrasonificación genera un consumo adicional de energía en comparación con la hidrólisis ácida por el tiempo en que las muestras están expuestas a este, y se obtiene poco beneficio para que esta pueda ser aplicada como método de obtención de azúcares.

**Figura 4. Imágenes microscópicas de las células después de la aplicar los métodos**



#### 4. CONCLUSIONES

Se obtuvo 9,41 g de biomasa liofilizada aplicando condiciones de cultivo estándar de temperatura, pH, fotoperiodo, aireación y medio de cultivo (Foliagro), lo cual indica que las condiciones seleccionadas de cultivo son adecuadas.

Se alcanzó un rendimiento de 0,43% con la hidrólisis ácida utilizando 0,5 g de Biomasa Liofilizada y 5 mL de ácido  $H_2SO_4$  de una concentración 2N a una de temperatura de 120°C, presión 1.2 Bar, tiempo de exposición al ácido 30 minutos, y neutralización con NaOH hasta alcanzar un pH neutro.

Las mejores condiciones encontradas en la ultrasonificación son a una amplitud del 45% con tiempo efectivo de 5 min y 11 minutos y con un rendimiento de azúcares reductores de 0,059 % y 0,068 % respectivamente.

## LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

El método que reporta un mayor contenido de azúcares para 0,5 g de Biomasa microalgal *Chlorella Vulgaris* es la hidrólisis ácida con 4,38g/L, mucho mayor a lo reportado por la ultrasonificación con 0,58 g/L y 0,66 g/L. La hidrólisis ácida también tiene la ventaja de ser rentable y tener un consumo de energía muy bajo lo que no ocurre con la ultrasonificación donde el tiempo y la energía empleada es muy alta; la desventaja de la hidrólisis ácida es la formación de compuestos tóxicos generados durante el proceso y que su implementación con miras a gran escala puede ser riesgosa por la gran cantidad de ácido expuesto a las altas temperaturas.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios a nuestros padres y hermanos a la Universidad de América por su formación, a Diego Rubio, Biólogo, docente investigador y director del proyecto por sus conocimientos, por su acompañamiento en el proceso de este trabajo de grado, a la Química Diana Farías, docente de la Universidad Nacional, quien nos colaboró con sus conocimientos, con el uso de los laboratorios, con el préstamo de equipos y de reactivos, a el profesor Jairo Cerón, coordinador del IBUN (Instituto de Biotecnología) y a la Ing. Elizabeth Torres, asesora representante del comité de trabajo de grado, quien nos brindó sus conocimientos y se interesó por la culminación del proyecto.

## 6. REFERENCIAS

ÁNGEL, María Camila. PI-MIENTA, Wendy. Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobio-reactor, para la obtención de ácidos grasos. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2012, p. 90

BERMEO, Lorena. Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. España. Univesidad de Caliz. 2011, p. 44.

CALDERON, Sara. RAMIREZ, Diana. Evaluación de la influencia lumínica sobre la producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella Vul-*

*garis* en un fotobioreactor de panel plano a escala banco. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá DC. Fundación Universidad de América. Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2013, p.46

CASTRO Katherine, ORTIZ Javier. Determinación de la incidencia de la relación carbono:nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella Vulgaris* a escala laboratorio. Fundación Universidad de América. 2013, p.57, 63,70

DÍAZ, Nieves Abril, JORRÍN, Jesús V y BÁRCENA, José A. Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares. Vol. 6, p. 2

GAIL LORENZ, Miller. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical*

*Chemistry*. 1959. Vol. 31, no. 3, p. 426–428.

GBA. Liofilización [ en línea]. <<http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/laboratorio/files/2012/08/LIOFILIZACION.pdf>

GERDE, Jose A, *et al.* Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. 2012. Vol. 125, p. 176

HARUN, Razif, et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. 2010. Vol. 14, No. 3, p. 1041

HENDRIKS, T W M y ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. 2009. Vol. 100, No. 1, p. 14

HERNANDEZ, Alicia. Microbiología Industrial. Costa Rica: EUNED, 2003. p. 21

McMILLAN, Jonathan, *et al.* Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. 2013. Vol. 103, p. 133

MIRANDA, J R, PAS-SARINHO, P C y GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. En: *Bioresource technology*, 2012. Vol. 104, p. 340-343

MONTGOMERY, Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición: Limusa Wiley. Universidad Estatal de Arizona. 2004, p.81

MOXLEY, G. y ZHANG, Y. More accurate determination

of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. En: *Energy Fuels*. 2007, p. 3684–3688.

QUINTERO, Julián y CARDONA, Carlos. En: ORREGO, Carlos y CARDONA, Carlos. Avances Investigativos en la producción de Biocombustibles. Manizales: Cardona C. A. y Orrego C.E, 2009, p. 177-178. ISBN: 978-958-44-5261-0

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. Determinación por espectrofotometría de la concentración de carbohidratos en una muestra alimentaria [En línea]. <[https://www5.uva.es/guia\\_docente/uploads/2012/470/45803/1/Documento4.pdf](https://www5.uva.es/guia_docente/uploads/2012/470/45803/1/Documento4.pdf)> [citado el

22 de Marzo del 2014] > [citado en 10 de mayo de 2014] for yeast fermentation. *Biore-source Technology*,

GUAUQUE, Catalina y ALCALA, Camilo. Evaluación de la incidencia de la temperatura en la producción de lípidos obtenidos a partir de biomasa microalgal a escala laboratorio. Fundación Universidad de América. Revista de investigación. Vol 6, No 2. Julio- diciembre 2013. Bogotá DC, p.38

ZHAO Guili y CHEN Xue. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock