



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Grado en Ingeniería Química**

**Estudio de hidrólisis enzimática en  
biomasa microalgal procedente del  
tratamiento de aguas residuales con  
purines**

**Autor:**

**Gómez Gato, Gabriel**

**Tutor:**

**Bolado Rodríguez, Silvia**

**Lorenzo Hernando, Ana**

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

**Valladolid, 6 Julio 2016.**



## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. LISTA DE ILUSTRACIONES .....	6
3. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	7
4. INTRODUCCIÓN .....	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. BIOMASA ALGAL.....	15
5.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	16
5.2.1. ESTUDIO DE CINÉTICAS ENZIMÁTICAS DE SOLUBILIZACION DE CARBOHIDRATOS.....	16
5.2.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICAS CON COMBINACIONES DE DIFERENTES ENZIMAS COMERCIALES (CELULASAS, PROTEASAS Y LIPASAS).....	16
5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
6.1. COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA ALGAL.....	19
6.2. ESTUDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS .....	20
6.3. ESTUDIO DE LA SOLUBILIZACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LA BIOMASA CON DIVERSAS ENZIMAS COMERCIALES .....	24
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
8. AGRADECIMIENTOS.....	32
9. BIBLIOGRAFÍA.....	33



## 1. RESUMEN

El presente trabajo investiga la posibilidad de una valorización fraccionada de biomasa microalgal obtenida mediante el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria agroalimentaria. Para ello, se lleva a cabo un tratamiento de hidrólisis enzimática, con el objetivo de extraer las distintas fracciones mayoritarias (carbohidratos, lípidos y proteínas) y, en base a los resultados, poder analizar las distintas posibilidades de posteriores procesos de valorización de las fracciones (fermentación, transesterificación...) para la obtención de diversos bioproductos (bioetanol, biodiesel...) intentando el mayor aprovechamiento a la biomasa residual mediante la aplicación del concepto de biorrefinería.

Las hidrólisis enzimáticas fueron llevadas a cabo con enzimas comerciales específicas para cada fracción (*Celluclast 1,5L/Novozyme 188* y *Viscozyme* como carbohidrolasas, *Alcalase* y *Flavourzyme* como proteasas, y *Lecitase* como lipasa) a 50°C, 300rpm, pH 4,8-5 y un 6% en base seca de alga.

Palabras clave: Biomasa microalgal, hidrólisis enzimática, carbohidratos, lípidos, proteínas.

## ABSTRACT

This work studies the feasibility of the fractional valorization of microalgal biomass cultivated in pig manure and other agroindustrial wastewater treatment reactor. Enzymatic hydrolysis was carried out as a pretreatment, in order to selectively extract the major biomass fractions (carbohydrates, lipids and proteins) and, according to the results, to decide how to valorize them, analyzing the different possibilities (fermentation, transesterification, etc.) for producing several types of byproducts (bioethanol, biodiesel, etc.) and giving maximum economic value to this residual biomass by applying a biorefinery concept.

Enzymatic hydrolysis was carried out using commercial enzymes specific for the different fractions: *Celluclast 1,5L/Novozyme 188* and *Viscozyme* as carbohydrases, *Alcalase* and *Flavourzyme* as proteases, and *Lecitase* as lipase at 50 °C, 300rpm, pH 4,8 and 6% w/w dry basis of algae.

Key words: Microalgae biomass, enzymatic hydrolysis, carbohydrates, lipids, proteins.

## 2. LISTA DE ILUSTRACIONES

### TABLAS

Tabla 1. Composición química de diferentes especies de microalgas (% en base seca). (Página 10)

Tabla 2. Revisión bibliográfica de experimentos previos de hidrólisis enzimática sobre biomasa algal. (Página 14)

Tabla 3. Composición química de las muestras de biomasa algal evaluadas. (Página 19)

### FIGURAS

Figura 1. Simbiosis algas/bacterias en la depuración de aguas residuales. (Página 12)

Figura 2. Vista al microscopio de la biomasa algal fresca (1A a 40 aumentos). (Página 15)

Figura 3. Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 1A. (Página 20)

Figura 4. Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 1B. (Página 21)

Figura 5. Comparativa de la hidrólisis enzimática de las biomazas algales 1A y 1B. (Página 22)

Figura 6. Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 2A. (Página 23)

Figura 7. Solubilización de carbohidratos de la muestra 3A con diferentes carbohidrolasas. (Página 25)

Figura 8. Comparativo de la solubilización de carbohidratos con carbohidrolasas y proteasas. (Página 26)

Figura 9. Solubilización de carbohidratos con carbohidrolasas, proteasas y lipasas. (Página 28)

### 3. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
m/m	Porcentaje en masa
w/w	Porcentaje en masa (inglés)
v/v	Porcentaje en volumen
A <sub>a</sub>	Índice de absorbancia (a: longitud de onda)
NKT	Nitrógeno Kjeldahl
HPLC-IR	Cromatografía de líquidos de alta resolución (detector de índice de refracción)
~	Valor aproximado
FPU	Unidad de actividad enzimática de celulasas
CBU	Unidad de actividad enzimática de β-glucosidasas
FBGU	Unidad de actividad enzimática de β-glucanasas
IU	Unidad de actividad enzimática (genérica)
U	Unidad de actividad enzimática (genérica)





## 4. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el encarecimiento y el progresivo agotamiento de las reservas naturales del petróleo están centrando la búsqueda de nuevas alternativas para la producción de biocombustibles e incluso de otro cierto tipo de productos más específicos como los productos químicos, alimenticios o fertilizantes. El petróleo supone un 35 % del consumo de energía primaria mundial, sin embargo según las previsiones, al ritmo de consumo actual, éstas se agotarán en 40 años (Brennan et al., 2010). Debido a esta problemática y a una mayor concienciación medioambiental de la sociedad, se intentan buscar nuevas salidas apostando por fuentes renovables.

En cuanto a la producción de biocombustibles, existe una evolución temporal a medida que se han investigado nuevas y prometedoras fuentes según su origen. En primer lugar, se encuentran los biocombustibles de primera generación, los cuales derivan de materias primas de procedencia agrícola, usando las partes alimenticias de plantas con alto contenido en almidón, azúcares y aceites (caña de azúcar o semilla de girasol), pero debido al problema ético que supone el desvío de recursos alimenticios para la producción fundamentalmente de recursos energéticos, se comenzó a buscar otras alternativas (Lee et al., 2015). Así, surgieron los de segunda generación, aquellos que derivan de residuos lignocelulósicos, agrícolas o forestales, y que están compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina en proporciones variables (paja de trigo o bagazo de caña de azúcar). Debido precisamente a la presencia de lignina, un compuesto especialmente resistente y muy complejo, y a las dificultades que acarrea su tratamiento, desde hace relativamente poco tiempo ha comenzado a desarrollarse una tercera alternativa.

El uso de macro y microalgas como materia prima ha supuesto una revolución en los últimos años debido a su alta tasa de crecimiento y altos rendimientos por área de cultivo (doblan su masa en un tiempo de 1 a 10 días dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo), además de por su alta tasa fotosintética y bajas demandas biológicas, de forma que son capaces de transformar la energía solar en productos de almacenamiento de carbono, y por lo tanto, mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> y gases de efecto invernadero (Bruton et al., 2009). Análogamente, son capaces de eliminar ciertos excesos de nutrientes como fósforo, nitrógeno o potasio y de acumular metales pesados y compuestos tóxicos, por lo que juegan un papel importante en el tratamiento de aguas residuales de diversos orígenes. Por último, no necesitan de amplias superficies de cultivos y resisten a altas dosis de radiación ultra violeta (Gouveia et al., 2016). Actualmente tienen sus

principales aplicaciones en el sector energético como biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrógeno, calor y/o electricidad a partir de biogás; en acuicultura para alimentación de animales como peces, rumiantes o cerdos; para la producción de biofertilizantes y en el tratamiento de aguas residuales, entre otras (Brennan et al., 2010).

Las características previamente citadas, confieren a estos microorganismos una gran flexibilidad para desarrollarse en todo tipo de aguas. Fue en los años 60 cuando Ostwald y Golüecke comenzaron a implementar la tecnología para la depuración de aguas residuales con microalgas y la posterior valorización de la biomasa generada, lo que conlleva un abaratamiento del proceso de producción de estas microalgas y una ventaja competitiva frente a los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales (Singh et al., 2016).

De forma general, las microalgas están principalmente compuestas por proteínas entre 30-60%, de lípidos del 10-30% y de carbohidratos del 20-30% en función de la especie de alga predominante y de las condiciones de cultivo (Brown et al., 1997). En condiciones de exceso de nutrientes, crecerán en mayor medida desarrollando una mayor fracción proteica, mientras que en condiciones de estrés (falta de nutrientes, variación del pH o de la temperatura del medio), se limitará su crecimiento, favoreciendo un mayor contenido en lípidos y carbohidratos (He et al., 2016).

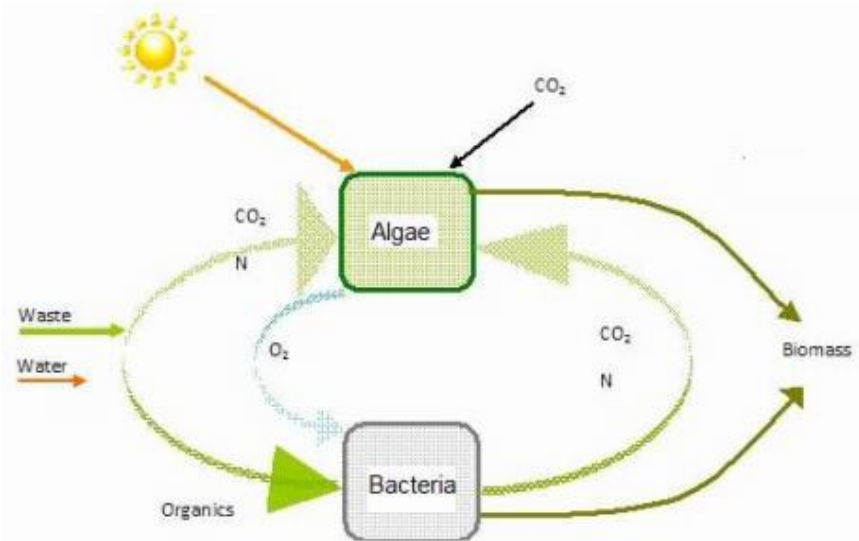
**Tabla 1:** Composición química de diferentes especies de microalgas (% en base seca). (Bruton et al., 2009).

	Protein	Carbohydrate	Lipids	Nucleic acid
<b>Freshwater algal species</b>				
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-
<b>Marine algal species</b>				
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5

Los carbohidratos principalmente se encuentran en la pared celular de las microalgas como celulosa y hemicelulosa, y/o incluso intracelularmente en forma de almidón. Se suelen usar como sustrato para la producción de biocombustibles por fermentación, tales como bioetanol o biobutanol. La fracción lipídica, dispuesta fundamentalmente en forma de triglicérido (aceite vegetal) intracelularmente, y de fosfolípido en la membrana plasmática de la célula, tiene su aplicación fundamental en la producción de biodiesel. Por último, la fracción proteica, formada por la unión de distintos tipos de aminoácidos por enlace peptídico, tiene su principal aplicación en la producción de biofertilizantes y en la actualidad se ha desarrollado una nueva tecnología para la conversión termoquímica de la misma en bioaceites, utilizables directamente en la producción de biodiesel (Huang et al., 2016).

Para poder valorizar esta biomasa y conseguir unos productos de alto/medio valor añadido, son necesarios diferentes métodos o pretratamientos para conseguir romper la pared celular. Debido a la falta de lignina, se esperan unos costes de producción de biocombustibles menores a partir de microalgas que con otro tipo de biomasa de otras generaciones. (Suganya et al., 2016). Sin embargo, la mayoría de las referencias tratan a cerca de microalgas cultivadas en condiciones puras, lo cual conlleva un encarecimiento considerable del proceso de producción de cualquier tipo de producto a partir de ellas (Pancha et al., 2016) (Romero et al., 2012).

Consecuentemente, las microalgas provenientes del tratamiento de aguas residuales se plantean como una buena alternativa para la valorización. Se debe tener en cuenta que en los procesos de depuración de aguas residuales con algas, estas trabajan en simbiosis con las bacterias, y la contribución conjunta microalgas-bacterias va a influir notablemente en los procesos posteriores de valorización de la biomasa. Esta simbiosis consiste básicamente en que las bacterias son capaces de oxidar la materia orgánica biodegradable y algunos nutrientes presentes en el agua, dando lugar a CO<sub>2</sub> y otros compuestos como nitratos y fosfatos, que, junto con los nutrientes presentes en el propio agua residual, son reutilizados por las algas para su biosíntesis. De esta manera, se consigue disminuir la concentración de nutrientes y la carga orgánica del efluente y, espontáneamente, se producen altas cantidades de biomasa algal (Ramanan et al., 2016). La Figura 1 muestra la cooperación entre ambos tipos de microorganismos en la depuración de aguas residuales:



**Figura 1:** Simbiosis algas/bacterias en la depuración de aguas residuales.  
(Fuente: [www.oilgae.com](http://www.oilgae.com))

Se han investigado diferentes pretratamientos o métodos para la liberación de los carbohidratos de la biomasa microalgal, principalmente químicos, enzimáticos, físicos o térmicos e incluso algunas técnicas emergentes, como fluidos supercríticos o líquidos iónicos; siendo alguno de estos métodos también aplicado en la liberación de proteínas y lípidos.

La hidrólisis enzimática se plantea a veces como una única etapa de pretratamiento o como una etapa intermedia entre un pretratamiento previo y un posterior proceso de valorización (fermentación alcohólica, transesterificación, etc.). El mecanismo de reacción que se lleva a cabo durante la hidrólisis enzimática consiste en la interacción entre las distintas enzimas específicas de cada fracción del sustrato que se pretenda solubilizar. Así se consiguen hidrolizar estas fracciones en compuestos más simples como, por ejemplo, monómeros de azúcares procedentes de los carbohidratos o aminoácidos de las proteínas. El tipo de enzima aplicado es el parámetro crucial, tanto en la rotura de la pared celular, como desde el punto de vista económico dentro del proceso global. Además, son importantes otros parámetros como la temperatura, el pH, la cantidad de biomasa, la concentración de enzima empleada, el tiempo y la agitación. Las principales enzimas usadas para la hidrólisis enzimática son celulasas, glucosidasas, amilasas, proteasas, xilanasas, peptidasas y lecitinas, dependiendo de la fracción que se pretenda solubilizar. La hidrólisis enzimática presenta varias ventajas sobre los pretratamientos químicos como: especificidad biológica, alta selectividad, altos rendimientos de conversión, condiciones de operación

suaves, bajos requerimientos de energía, bajo capital de inversión y fácil de reproducir a gran escala. Sin embargo, este proceso presenta ciertos inconvenientes como el alto coste de las enzimas comerciales, la dificultad de recuperación de las mismas y, a veces, los largos tiempos de proceso, además del hecho de que la solubilización de las diferentes fracciones de la biomasa puede alterarse por la generación de compuestos de degradación.

Debido a la importancia de la hidrólisis enzimática, numerosos autores han realizado anteriormente estudios acerca del efecto de la misma sobre las distintas fracciones de la biomasa microalgal de distintas especies de alga. La tabla 2 muestra un resumen del estado del arte de este método y los principales resultados obtenidos.

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio avanzado de la hidrólisis enzimática sobre diferentes biomazas algales procedentes del tratamiento de efluentes líquidos residuales de la industria agroalimentaria, los cuáles se caracterizan por una elevada concentración de nutrientes, evaluándose como afecta dicha etapa de hidrólisis en la liberación y solubilización de carbohidratos, lípidos y proteínas presentes en las biomazas. Se determinará la efectividad de la hidrólisis enzimática sobre cada de las fracciones, analizando los hidrolizados resultantes, valorando si tras esta etapa cada una de ellas es apta para una futura valorización.

**Tabla 2.** Revisión bibliográfica de experimentos previos de hidrólisis enzimática sobre biomasa algal

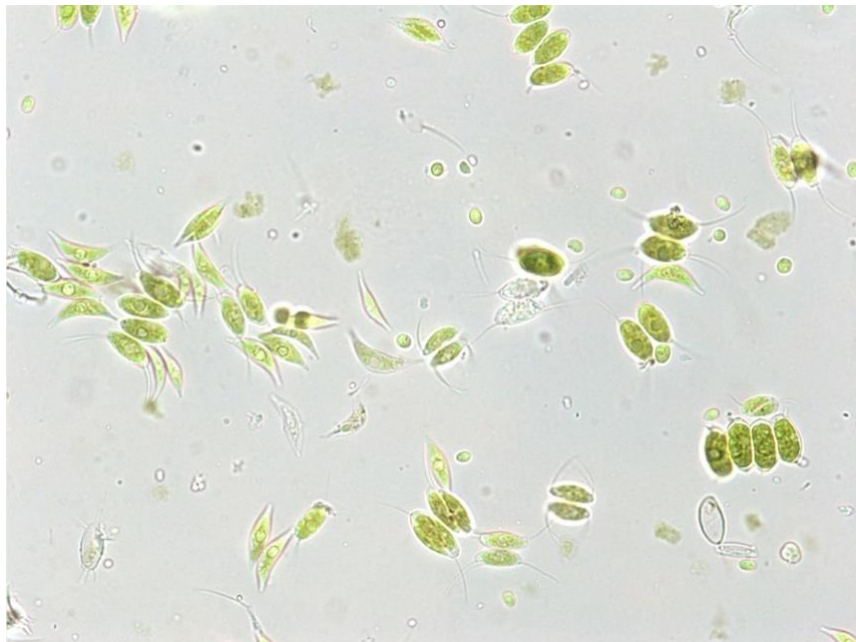
Especie de microalga	Procedencia	Método de hidrólisis	Condiciones de hidrólisis	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Referencia
<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i>	Cultivo puro	Ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) + Enzimática	<i>Celluclast</i> 1.5 L y <i>Novozyme</i> 188 15 FPU/g y 15 IU/g 55° C, pH 4.5 ,72 h	18,2 ( <i>C. sorokiniana</i> ) y 11.2 ( <i>N. gaditana</i> ) <sup>a</sup>	-	-	Hernández et al. (2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> y <i>Nitzschia</i> sp.	Tratamiento de aguas residuales	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Enzimática	10 FPU/g y 20 CBU/g. 6% w/w peso seco, pH 4,8-5, 50°C, 300rpm, 48h	6,37 <sup>a</sup>	-	-	Martín et al. (2016)
<i>Scenedesmus</i> sp. CCNM 1077	Cultivo puro (alga deslipidizada)	Enzimática	<i>Viscozyme</i> L: 20 FBGU/g 45°C, pH 5.5, 72h, 2-6% w/w alga seca	43,44 <sup>a</sup>	-	-	Pancha et al. (2016)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Cultivo algal puro	Enzimática	<i>Alcalase</i> , <i>Flavourzyme</i> y <i>Viscozyme</i> pH 7-8, 50°C, 3h. Concentración biomasa: 250g/L Celulasa (80 U/mg), <i>Neutrase</i> y	-	59 <sup>c</sup>	-	Romero et al. (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cultivo algal puro	Enzimática	<i>Alcalase</i> (100U/mg), pH 4,8-6, 55-60°C, 10-24h 100g alga seca/L.	17,5 <sup>b</sup>	12,1 <sup>c</sup>	36 <sup>d</sup>	Zheng et al. (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cultivo algal puro	Enzimática	<i>Celluclast</i> 1.5L (2% v/v) y <i>Novozyme</i> 188 (1% v/v) pH 4.8, 50° C, 72h 1-5% w/w base seca	85,3 <sup>b</sup>	-	92,7 <sup>d</sup>	Cho et al. (2013)

<sup>a</sup> Porcentaje de azúcares solubilizados en masa en base seca de alga o g/100g; <sup>b</sup> Rendimiento de solubilización de azúcares totales (g azúcares recuperados/100 g azúcares iniciales); <sup>c</sup> Rendimiento de solubilización de proteínas (g proteínas recuperados/100 g proteínas iniciales); <sup>d</sup> Rendimiento de solubilización de lípidos (g lípidos recuperados/100 g lípidos iniciales)

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. BIOMASA ALGAL

Se han analizado 3 tipos de biomasa microalgal durante este trabajo (denominadas como 1, 2 y 3) presentadas en dos formatos distintos: fresca centrifugada y/o liofilizada, y codificadas como A o B respectivamente. Así, las biomazas microalgales que se han usado durante este trabajo quedan codificadas como sigue: muestra 1, fresca centrifugada (1A) y liofilizada (1B); muestra 2 fresca centrifugada (2A); y finalmente muestra 3, fresca centrifugada (3A) y liofilizada (3B). Las biomazas fueron almacenadas en una cámara frigorífica a 4°C durante todo el trabajo, durante no más de 15 días. Todas las biomazas algales de este trabajo fueron cultivadas en un reactor inclinado de capa fina, alimentado con purines de granjas porcinas diluidos al 10% en aguas residuales, y que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento del organismo. Esta biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería, España). Las especies identificadas de microalgas como especies predominantes son: *Scenedesmus peccensis* (46.64%), *Scenedesmus quadricauda* (32.73%) y *Scenedesmus acuminatus* (15.25%). Las diferencias entre estas biomazas radican en la composición química, que es presentada en la Tabla 3 (ver sección 4.1).



**Figura 2.** Vista al microscopio de la biomasa algal fresca (1A a 40 aumentos)

## 5.2 . HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los ensayos de hidrólisis enzimática de la biomasa algal fueron llevados a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL, con un 6% (m/m) en peso seco de materia prima y buffer de citrato sódico 0,1M (pH 4,8-5). Dos tipos de ensayo fueron realizados: un estudio cinético preliminar de solubilización de carbohidratos, y un segundo estudio de optimización del proceso enzimático usando distintas combinaciones de varias enzimas comerciales.

### 5.2.1 ESTUDIO DE CINÉTICAS ENZIMÁTICAS DE SOLUBILIZACION DE CARBOHIDRATOS

Se realizó una combinación de *Celluclast 1.5L* y *Novozyme 188* ( $\beta$ -glucosidase de *Aspergillus niger*). La cantidad de enzimas empleada para estos experimentos fue de 10 FPU  $g^{-1}$  y 20 CBU  $g^{-1}$  respectivamente. Las hidrólisis fueron llevadas a cabo en un agitador orbital a una temperatura de 50°C, a 300 rpm de agitación durante 48 horas. Para observar la evolución en la solubilización de carbohidratos, se tomaron 15 muestras por duplicado a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 42 y 48h. Las muestras fueron almacenadas a 4°C antes de la determinación de la concentración de los azúcares simples (glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, fructosa y galactosa) y los subproductos (ácidos oxálico, fórmico, acético, butírico, succínico y levulínico; metanol, xilitol, etanol y acetona).

### 5.2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICAS CON COMBINACIONES DE DIFERENTES ENZIMAS COMERCIALES (CELULASAS, PROTEASAS Y LIPASAS)

Este estudio se realizó exclusivamente para la muestra 3A de biomasa microalgal, mediante la aplicación de distintas combinaciones de enzimas comerciales que fueron amablemente proporcionadas por Novozymes España. Además del cóctel usado en el estudio cinético explicado en el apartado anterior, consistente en el uso de *Celluclast 1.5L* y *Novozyme 188* en las mismas condiciones (86,67  $\mu L g^{-1}$  alga seca), se emplearon otro tipo de celulasa (*Viscozyme* a 86,67  $\mu L g^{-1}$  alga seca), dos proteasas (*Alcalase* a 433,33  $\mu L g^{-1}$  alga seca, y *Flavourzyme* a 86,67  $\mu L g^{-1}$  alga seca) y una lipasa (*Lecitase* a 86,67  $\mu L g^{-1}$  alga seca).

Las hidrólisis fueron llevadas a cabo en un agitador orbital a 50°C, 300 rpm durante 48 horas, y para observar la evolución temporal en la liberación de carbohidratos, proteínas y lípidos se tomaron 6 muestras por duplicado a diferentes tiempos: 1, 3, 6, 12, 20 y 48h. Las fracciones sólida y líquida del hidrolizado fueron separadas mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min con el fin de analizar las proteínas y lípidos en la fracción sólida obtenida y los carbohidratos solubilizados en la fracción líquida del hidrolizado.



### 5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

La identificación, cuantificación y medidas de biometría de microalgas fueron llevadas a cabo mediante una examinación al microscopio (OLYMPUS IX70) de las muestras de microalgas (fijadas con lugol ácido al 5% y almacenadas a 4°C antes del análisis), de acuerdo con Sournia (1978). La relación de absorbancias a 680 y a 750nm según la fórmula:  $(A_{680} - A_{750})/A_{680}$ , medida en un espectrofotómetro GENESYS 20, fue usada como medida para una estimación cualitativa de la relación microalgas/ bacterias. El contenido en proteínas fue determinado a través del análisis de NKT, multiplicando por un factor de 5.95 mientras los lípidos fueron determinados siguiendo el método de Kochert.

La determinación de sólidos totales, humedad, cenizas, compuestos insolubles y extractivos de las materias primas se llevó a cabo de acuerdo a los procedimientos analíticos del NREL (“National Renewable Energy Laboratory”) modificado (J.B. Sluiter, 2010). El contenido de carbohidratos fue determinado mediante HPLC-IR siguiendo una modificación del protocolo del NREL, mediante una hidrólisis ácida concentrada de 0.3 g con 3mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (v/v), incubación en un baño termostático a 30°C durante 1h. Posteriormente, se lleva a cabo una hidrólisis ácida diluida tras la adición de 84 mL de agua clase II hasta una concentración de ácido del 4% y autoclavado durante 1h a 121°C. La mezcla resultante se centrifugaba a 10000 rpm durante 10 min. La fracción líquida se almacenó a 4°C para la determinación de los azúcares, mientras la fracción sólida fue empleada para sucesivas hidrólisis ácidas. Este proceso se repitió tres veces consecutivas para asegurar una completa solubilización y cuantificación de los azúcares presentes en la biomasa. Una columna de BioRad HPX-87H de exclusión-ión instalada en un módulo de Waters e2695 equipado con un módulo de detección Waters 2414 de índice de refracción fue empleada para cuantificar la concentración de los azúcares (glucosa, xilosa, celobiosa, arabinosa, fructosa y galactosa) y subproductos (ácidos oxálico, fórmico, acético, butírico, succínico y levulínico; metanol, xilitol, etanol y acetona) en las fracciones líquidas de los hidrolizados, usando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una concentración 0.025 M a un flujo de 0.6mL/min. La temperatura de la columna era de 50 °C y la del detector de 35 °C. Estándares externos fueron usados para la cuantificación de los compuestos.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA ALGAL

La tabla 3 muestra la composición macromolecular de la diferente biomasa algal evaluada.

**Tabla 3.** Composición química de las muestras de biomasa algal evaluadas

Parámetros	1A	1B	2A	3A	3B
Sólidos totales	19,59±0,07	97,36±0,01	22,81±0,22	25,61±0,87	96,87±0,07
Cenizas	12,31±0,19	11,33±0,31	14,71±0,46	16,40±0,24	9,31±0,23
Carbohidratos totales <sup>a</sup>	10,98±1,42	9,77±0,11	36,20±1,65	41,34±0,06	47,76±3,88
Celulosa <sup>a</sup>	5,50±1,26	7,10±0,01	28,46±1,16	35,99±0,10	37,86±2,78
Hemicelulosa <sup>a</sup>	5,48±0,16	2,66±0,10	7,74±0,49	5,35±0,04	9,90±1,10
Proteínas <sup>a</sup>	79,16±0,71	79,16±0,71	N.C. <sup>b</sup>	20,84±0,08	17,46±0,23
Lípidos <sup>a</sup>	14,54±1,72	14,54±1,72	N.C. <sup>b</sup>	11,20±2,47	11,20±2,47
Extractivos <sup>a</sup>	17,86±0,90	11,04±0,53	12,14±1,46	6,69±0,60	N.C. <sup>b</sup>
Compuestos insolubles <sup>a</sup>	6,08±0,35	5,67±0,26	5,99±0,15	4,98±0,47	0,01±0,00

<sup>a</sup> Porcentaje en masa en base seca de alga

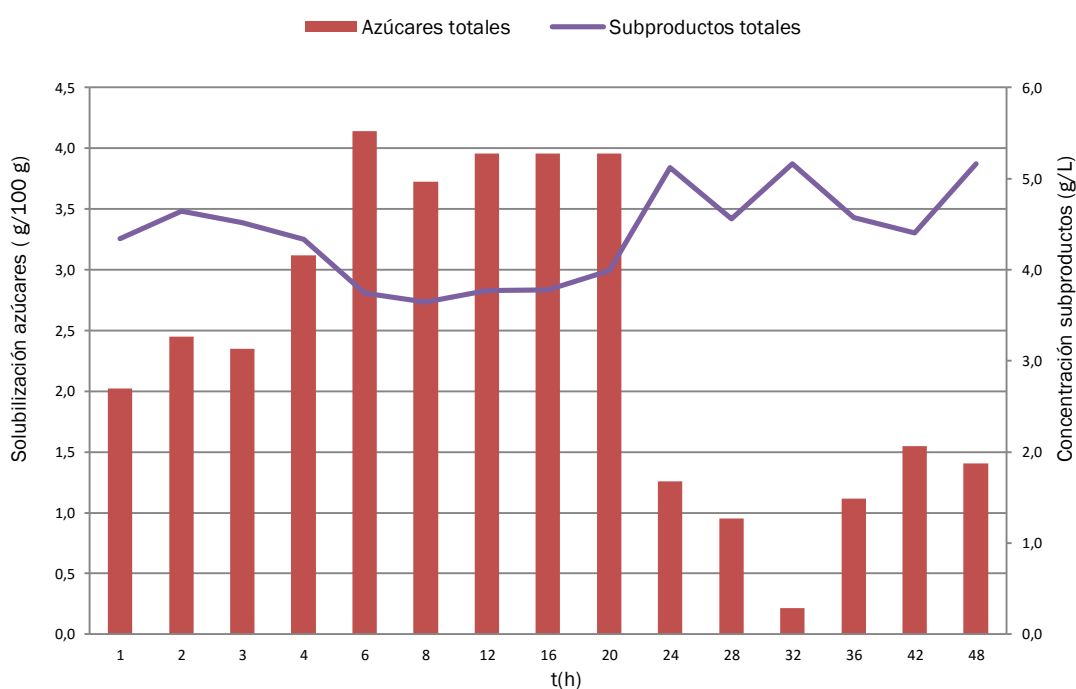
<sup>b</sup> N.C.: No cuantificado

Los resultados del análisis composicional mostraron grandes diferencias entre la biomasa 1A y 1B, con respecto a 2A, 3A y 3B, sobre todo observable en la fracción de carbohidratos y proteínas, aumentando la primera considerablemente y disminuyendo la segunda. Esto podría ser debido a un cambio en las condiciones de cultivo del reactor, provocando la adaptación del alga a estas nuevas condiciones mediante la reorientación de su metabolismo hacia la acumulación de carbohidratos, y el consecuente detrimento de la fracción proteica. Sin embargo, tanto la fracción lipídica como el contenido en cenizas y en compuestos insolubles permanece relativamente invariable, con la excepción de la muestra 3B que no presenta valores cuantificables. El contenido en extractivos, por otra parte, desciende ligeramente. La relación microalgas/bacterias también fue analizada, revelando una mayor proporción de microalgas en la muestra 1 que en las muestras 2 y 3. Los valores obtenidos para la muestra 1 fueron 37% y 39% en la fresca (A) y en la liofilizada (B) respectivamente, 29% en la biomasa fresca 2A, y finalmente 14% y 21% para la muestra 3, en sus formas fresca (A) y liofilizada (B) respectivamente. Esta relación da una idea de la proporción de algas respecto al resto de materia orgánica (denominado de forma genérica como “bacterias”) presente en una muestra de biomasa y debe ser considerada más como una herramienta de comparación cualitativa que cuantitativa. De forma general, esta variable es más alta para la presentación liofilizada que para la fresca, pudiéndose pensar que la liofilización tiene un cierto efecto bactericida.

Como se ha explicado numerosas veces en anteriores secciones, el objetivo último es la valorización fraccionada de las diferentes fracciones de la biomasa evaluada, con el objetivo de alcanzar un balance económico positivo. Desde un punto de vista práctico, y debido a que la fracción de carbohidratos se ve aumentada considerablemente, esta parte de la biomasa se va a convertir en la fracción prioritaria a la hora de valorizar. Así, se consideró necesario realizar un estudio preliminar de solubilización de carbohidratos de la muestra 1 mediante el uso de enzimas hidrolíticos específicos de celulosa y hemicelulosa.

## 6.2 ESTUDIO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA SOLUBILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

La gráfica 3 muestra la evolución en el tiempo de la solubilización de los azúcares ( $\text{g}/100 \text{ g}_{\text{alga seca}}$  en) y de los subproductos (concentración  $\text{g}/\text{L}$ ) durante la hidrólisis enzimática de la biomasa algal 1A, aplicando el cóctel de enzimas *Celluclast 1,5L* y *Novozyme 188*.



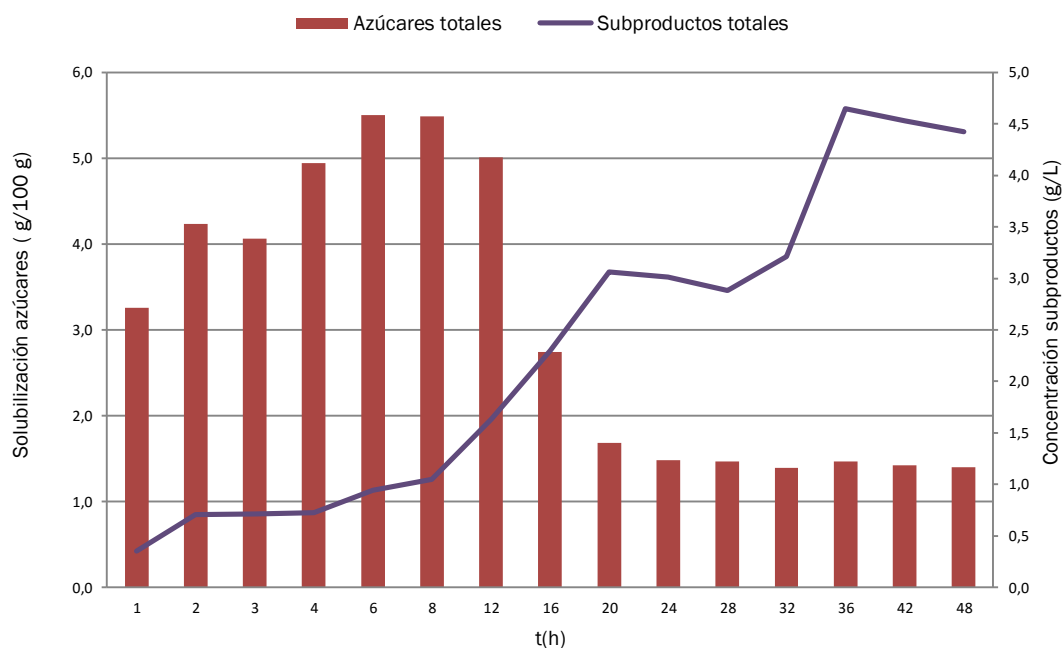
**Figura 3.** Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 1A

La evolución temporal de los azúcares solubilizados, fundamentalmente glucosa (~60% del total de azúcares solubilizados), fructosa (~10%) y arabinosa (~30%), muestra una clara tendencia creciente durante las primeras horas de hidrólisis hasta aproximadamente las 6h de experiencia, momento en el cual se produce el rendimiento máximo de solubilización de azúcares, con un 37,70% de azúcares solubilizados (con respecto a los azúcares iniciales en la biomasa). A partir de este punto, éstos empiezan a

disminuir progresivamente debido a su transformación en subproductos, alcanzando valores mínimos a partir de las 24 horas de experiencia. El subproducto mayoritario detectado fue el ácido acético, con concentraciones entre 0,77 y 1,75 g/L, seguido de otros productos como el etanol o el xilitol en menor concentración (aproximadamente 0,5 g/L cada uno). Estos subproductos aparecen probablemente por efecto de la acción oxidativa y fermentativa sobre los azúcares (solubilizados por la acción enzimática) a través de distintas rutas metabólicas de las bacterias presentes en la matriz de la biomasa, ya que la biomasa procede del tratamiento de aguas residuales y compuestos como el acético y el etanol se producen como resultado de la vía fermentativa de la glucosa y el xilitol, de la xilosa, respectivamente.

Considerando los azúcares liberados y los subproductos generados por la bioconversión de azúcares, el porcentaje de azúcares iniciales que no fueron solubilizados y que por tanto permanecieron en la biomasa tras la hidrólisis enzimática fue del 4,77%, lo que denota una alta eficiencia de la reacción y también una alta tasa de degradación bacteriana de los azúcares solubilizados.

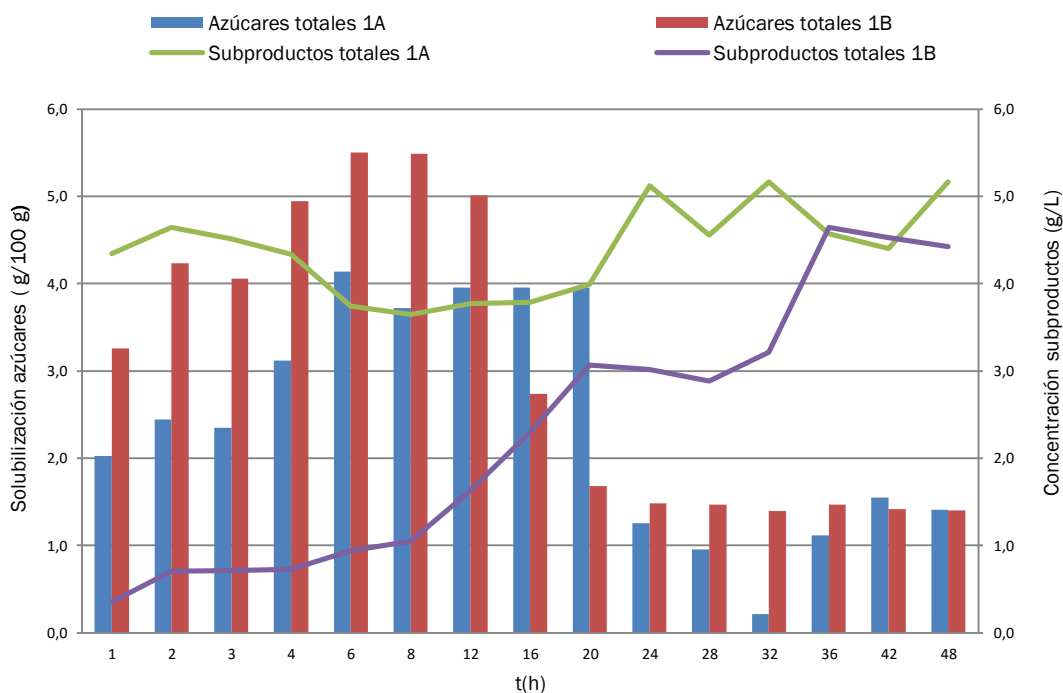
Para comprobar la posible influencia de la liofilización en el proceso de hidrólisis, se procedió a repetir la experiencia en este caso con la muestra de biomasa algal 1B, observando igualmente la evolución temporal de solubilización de azúcares y compuestos de degradación. Esta evolución es mostrada en la gráfica 4.



**Figura 4.** Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 1B

En el caso de los azúcares, se observa una tendencia muy similar a la de la muestra 1A. Como consecuencia de la hidrólisis enzimática de los polisacáridos, se observa la progresiva ruptura de éstos en azúcares simples, predominando la glucosa (~62% de los azúcares solubilizados), xilosa (~12%), y arabinosa (~25%), y apareciendo otros nuevos en menor cantidad, como fructosa y maltosa, desde el comienzo de la reacción hasta las 6 horas de reacción, momento en el cual se alcanza otra vez el rendimiento máximo, con un 56,36% de azúcares solubilizados. En esta ocasión, la concentración de subproductos durante las 6 primeras horas es sensiblemente inferior a la detectada en la biomasa fresca, pudiéndose pensar que las bacterias presentes en la biomasa han requerido un tiempo de aclimatación y, una vez pasado este periodo, se han adaptado a las condiciones del medio y pueden comenzar a degradar los azúcares simples solubilizados presentes en la fase líquida. Los compuestos de degradación mayoritarios detectados en el hidrolizado líquido fueron xilitol (0,14-0,39 g/L) y ácido succínico (0,35-0,48 g/L) al principio de la hidrólisis, virando al ácido acético (0,84-1,86 g/L) hacia el final de la reacción. También se produjo metanol en bajas cantidades.

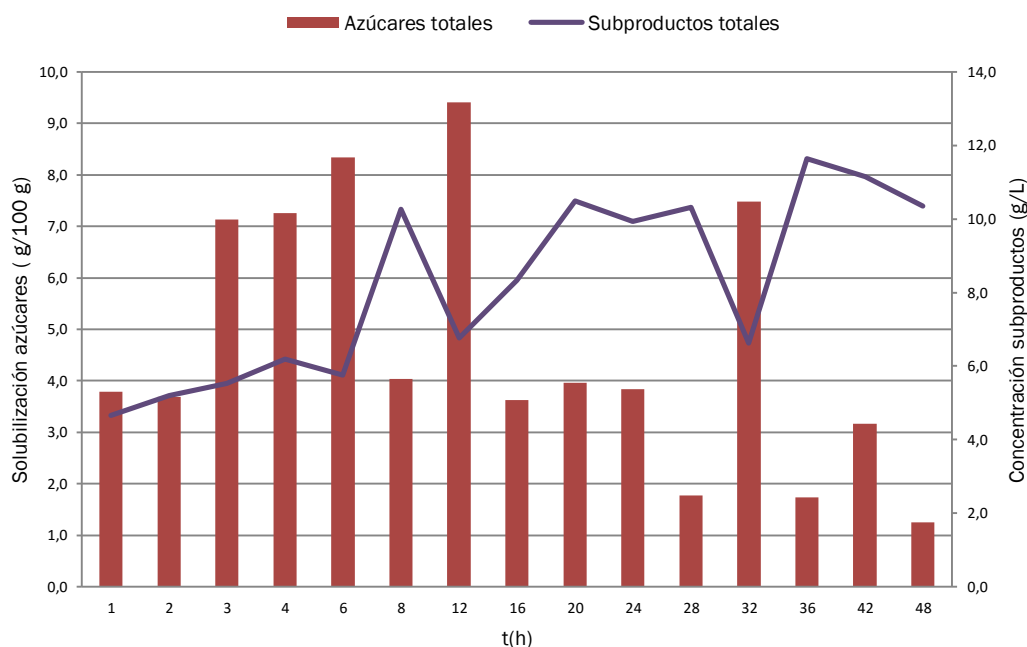
Respecto al rendimiento total de transformación de carbohidratos, es decir, la cantidad de azúcares iniciales que se han transformado tanto en azúcares simples como en subproductos, se obtiene un grado de solubilización un 20% mayor en este caso que en la hidrólisis enzimática de la biomasa fresca 1A. La gráfica 5 muestra la influencia que tiene el proceso de liofilización de la biomasa sobre la solubilización de azúcares y subproductos.



**Figura 5.** Comparativa de la hidrólisis enzimática de las biomásas algales 1A y 1B.

Como se puede observar en la figura anterior, la liofilización tiene un efecto bastante importante sobre la solubilización y degradación de los azúcares, ya que en la hidrólisis de la muestra liofilizada 1B, se están produciendo menores cantidades de subproductos que en la fresca 1A, lo cual se traduce a su vez en mayores rendimientos de solubilización de azúcares, siendo el rendimiento máximo de solubilización de azúcares del 37,70% en 1A frente al 56,36% en 1B a las 6 horas de hidrólisis. Se podría pensar por tanto que el proceso de liofilización está teniendo cierto efecto bactericida o de aletargamiento de las bacterias, requiriendo un periodo de adaptación. Así, se disminuye su actividad degradativa y la recuperación de azúcares solubilizados es mayor para el mismo tiempo de reacción. También se observa una variación en los compuestos de degradación que se producen durante la reacción enzimática. Por ejemplo, el ácido acético aparece desde el primer momento en la biomasa fresca 1A pero en la liofilizada 1B sólo tras un determinado periodo y tras la aparición y desaparición del ácido succínico del medio, indicando que éste último podría ser intermediario en esa ruta de transformación.

Para comprobar la repetitividad del proceso con otras biomazas similares procedentes de las mismas fuentes y la influencia del contenido en carbohidratos, se procedió a realizar el mismo estudio cinético con la muestra de biomasa algal 2A, cuyo resultado es mostrado en el gráfico 6.



**Figura 6.** Cinética enzimática de solubilización de azúcares y subproductos de la biomasa 2A

Los azúcares monoméricos se van solubilizando a medida que avanza la reacción de hidrólisis hasta el tiempo de muestra 12 horas, en el cual se obtiene el rendimiento máximo de solubilización de azúcares, 25,99%. En este caso, los azúcares solubilizados mayoritarios han sido glucosa (~32%), xilosa (~12%) y fructosa (~14%), y otros como arabinosa y galactosa en menores cantidades. Por otro lado, se obtiene de nuevo como subproducto principal de degradación por la actividad bacteriana el ácido acético, alcanzando concentraciones de hasta 3,5 g/L.

En cambio, esta vez se obtiene un rendimiento máximo de solubilización de carbohidratos totales de solo el 62,82 %, lo que supone una importante disminución con respecto a la biomasa 1A y 1B, en cuyas hidrólisis se conseguían rendimientos de prácticamente el 100%, al lograr extraer los azúcares iniciales casi por completo. Además, el hecho de que el contenido de carbohidratos totales iniciales se haya triplicado en la muestra 2A con respecto a las muestras 1A y 1B (36,20% en 2A frente a 10,98% y 9,77% en 1A y 1B) y los menores rendimientos de solubilización de azúcares monoméricos (25,99% en 2A frente a 37,70% en 1A y 56,36% en 1B), puede llevar a plantear la hipótesis de que en la biomasa 2A existe algún tipo de carbohidrato distinto a los estructurales (celulosa y hemicelulosa), al que la enzima no está logrando acceder para hidrolizarlo. Este carbohidrato podría ser almidón, un polisacárido cuya función es ser fuente de carbono y energía en situaciones de escasez, ya que por el hecho de encontrarse en el espacio intracelular y no en la pared sería menos accesible para la enzima. Además, se requeriría de enzimas específicas para este sustrato concreto, que en el caso del almidón serían amilasas, o llevar a cabo un pretratamiento previo a la hidrólisis enzimática (hidrólisis ácida, básica, tratamiento térmico, etc.) para alcanzar unos rendimientos de solubilización mayores.

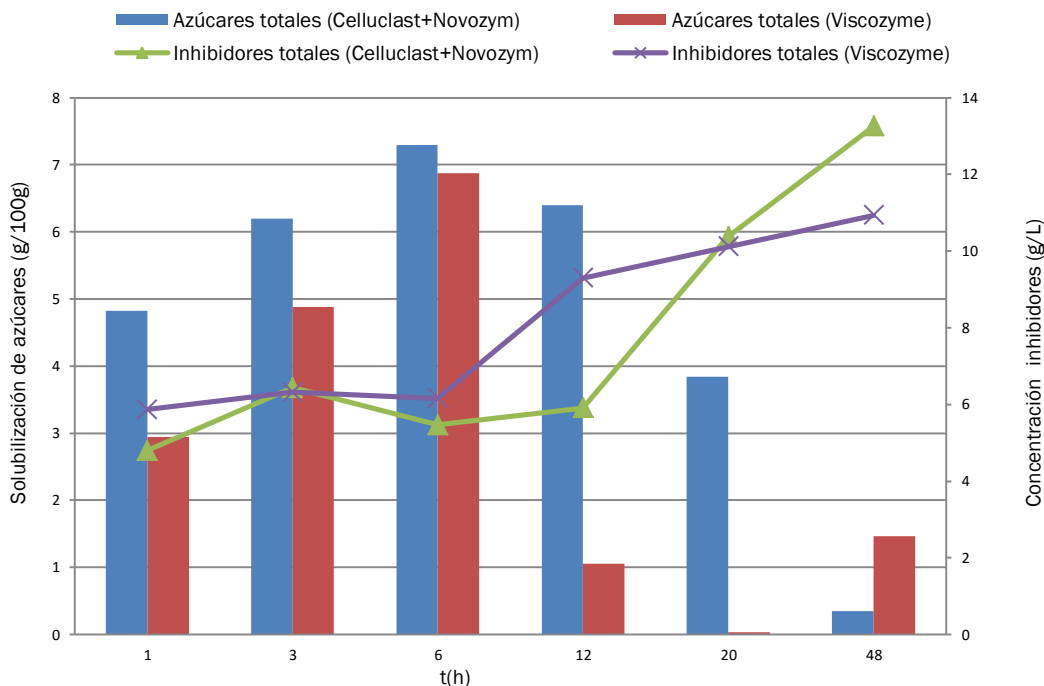
### **6.3 ESTUDIO DE LA SOLUBILIZACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LA BIOMASA CON DIVERSAS ENZIMAS COMERCIALES**

Se realizó un estudio cinético de solubilización de las distintas fracciones de la biomasa 3A mediante la aplicación secuencial de diversos enzimas comerciales. Se usaron como enzimas dos tipos de carbohidrolasas (por un lado, el cóctel *Celluclast 1,5L/Novozyme 188* utilizado en la sección anterior, y por otro *Viscozyme*), dos tipos de proteasas (*Alcalase* y *Flavourzyme*), y una lipasa (*Lecitase*). Con este estudio se pretendía encontrar la combinación óptima de enzimas (carbohidrolasa, proteasa y lipasa) que maximizase la eficiencia de la hidrólisis enzimática, para solubilizar la mayor cantidad de



compuestos de cada una de las fracciones, en vistas a una futura valorización.

Inicialmente, tras comprobar que los carbohidratos eran la fracción mayoritaria en la muestra debido a su elevado contenido (más de un 40%), se decidió comenzar analizando y comparando la eficacia de solubilización de azúcares y subproductos con cada una de las dos enzimas carbohidrolíticas (*Celluclast 1,5L/Novozyme 188* y *Viscozyme*). La evolución temporal de las variables evaluadas está representada en la gráfica 7.



**Figura 7.** Solubilización de carbohidratos de la muestra 3A con diferentes carbohidrolasas

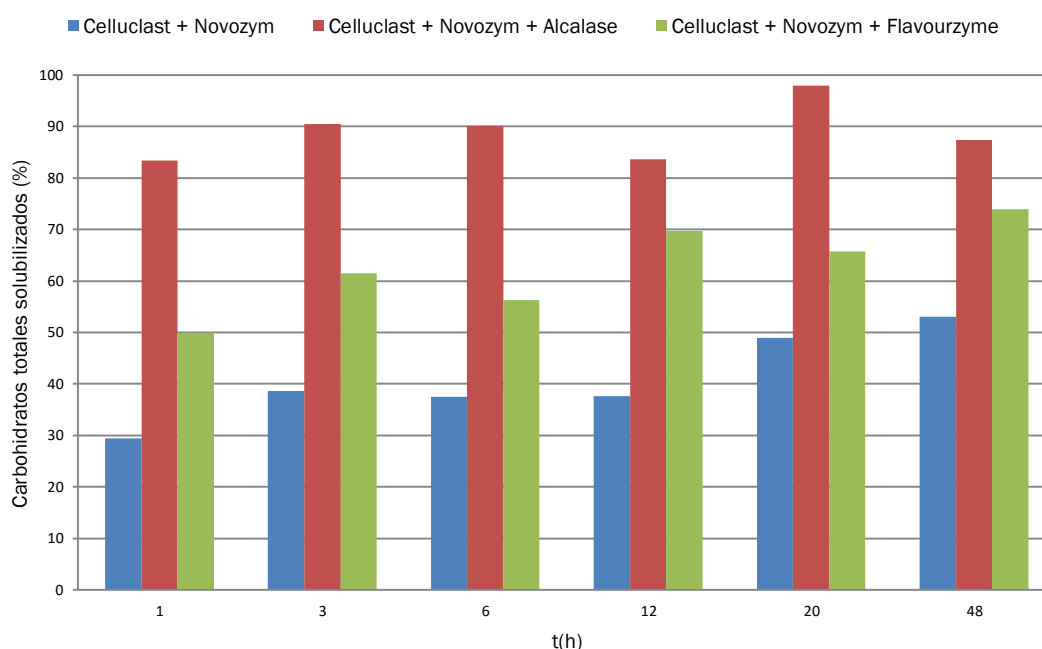
Como se observa claramente en la figura, el contenido de azúcares totales solubilizados por la reacción enzimática es mayor para el caso del cóctel *Celluclast - Novozyme*, con el cual se obtiene un rendimiento de solubilización máximo de 15,28 % a las 6 horas de reacción, que para *Viscozyme*, cuyo rendimiento máximo de solubilización es sólo de 14,39% en el mismo tiempo. Esta tendencia se observa de forma generalizada a lo largo de toda la reacción.

Considerando los azúcares solubilizados y los subproductos generados por la bioconversión de estos azúcares por parte de las bacterias contenidas en la biomasa, el porcentaje de azúcares iniciales solubilizados con la combinación de enzimas *Celluclast - Novozyme* fue 53,08% y con *Viscozyme* 46,07%. Ambos valores son relativamente bajos en ambos casos, en comparación con los obtenidos para la muestra 1, lo que de nuevo lleva a pensar en la existencia de algún otro tipo de carbohidrato complejo como ya se ha comentado en secciones anteriores. En este caso, y como es lógico, las

fracciones proteica y lipídica no sufren variación ni transformación (no se consigue solubilizar ningún tipo de péptido ni de ácido graso) puesto que no se están aplicando ningún tipo de enzimas para la hidrólisis de estas fracciones.

A la luz de los resultados, se selecciona la carbohidrolasa de mayor eficacia, la combinación *Celluclast* - *Novozyme*, para continuar con la optimización de la solubilización fraccionada.

Así, la siguiente etapa consistió en la selección de la mejor combinación de la enzima carbohidrolítica con una de las dos proteasas disponibles (*Alcalase* y *Flavourzyme*). Los rendimientos de solubilización de la fracción de carbohidratos de la biomasa 3A por efecto de la combinación de las distintas proteasas con el cóctel *Celluclast* - *Novozyme* están representados en la gráfica 8.



**Figura 8.** Comparativo de la solubilización de carbohidratos con carbohidrolasas y proteasas

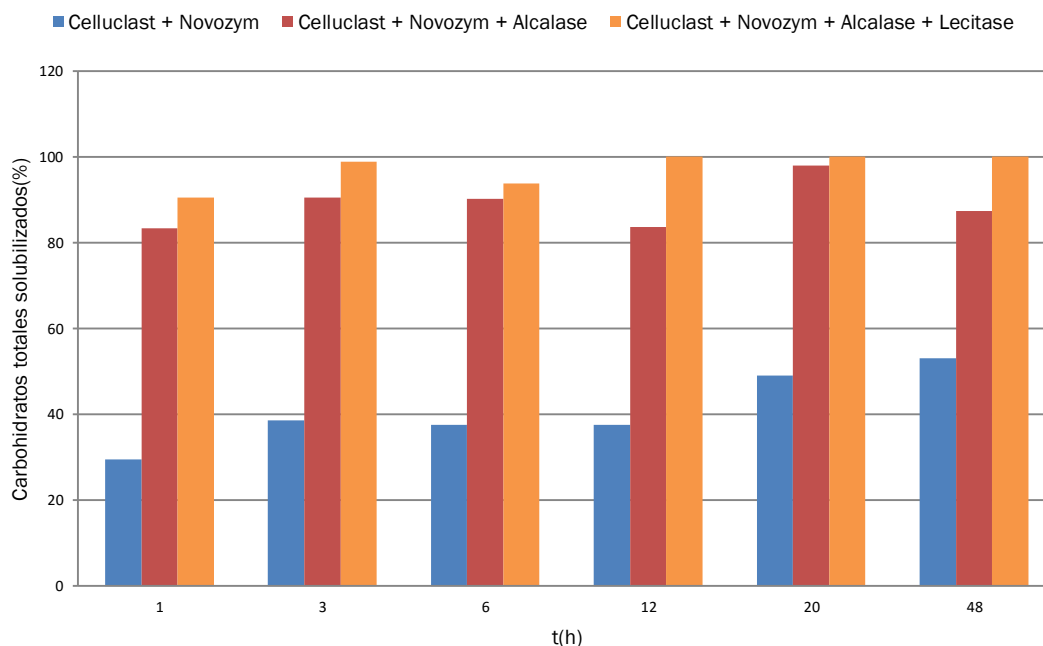
Se observa que al introducir una proteasa junto con el cóctel de carbohidrolasas, aumenta ligeramente la solubilización de azúcares (22,26% de los azúcares de partida de la biomasa se hidrolizaron y solubilizaron con *Alcalase* y 23,97% con *Flavourzyme*). Sin embargo, la diferencia principal frente a la hidrólisis exclusivamente con carbohidrolasas, se encuentra en los rendimientos de solubilización de carbohidratos totales (conjunto de azúcares y subproductos), llegando a valores máximos del 97,89% sobre la cantidad de azúcares iniciales de la biomasa en *Alcalase* y de 73,94% en *Flavourzyme*). Por tanto, por la acción de proteasas, está aumentando la eficacia de la hidrólisis de carbohidratos estructurales, los cuales a medida que se van

solubilizando se degradan en subproductos por la acción de bacterias en porcentajes muy altos (83% de los carbohidratos solubilizados con *Alcalase* son subproductos, y 75 % con *Flavourzyme*). Las causas que podrían explicar este hecho son, por un lado, que estas proteasas poseen cierta actividad carbohidrolasa, puesto que no se trata de enzimas puras, y por otro, que están debilitando la pared celular del alga, favoreciendo el acceso de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas a sustratos azucarados, lo que se traduce en un aumento en la eficacia de la hidrólisis de carbohidratos.

La fracción proteica, por el hecho de aplicar enzimas específicas, sufrió cierto grado de hidrólisis. Los rendimientos de solubilización a las 48 horas de hidrólisis fueron 33,17% en *Alcalase* y 17,09% en *Flavourzyme* (con respecto a la cantidad de proteínas iniciales del alga). La fracción lipídica no se solubilizó en ninguno de los dos casos ya que, como se ha explicado previamente, no se han añadido enzimas lipolíticas en esta etapa.

Viendo los resultados obtenidos, se concluye que la proteasa *Alcalase* es más eficaz que *Flavourzyme*, lo cual no solo se traduce en un mayor grado de solubilización de proteínas, sino también de carbohidratos. Una vez seleccionadas la combinación óptima de enzimas carbohidrolasa y proteasa (*Celluclast-Novozyme* y *Alcalase*), se procedió a completar el proceso de solubilización fraccionada mediante la adición de una lipasa (*Lecitase*), con el objetivo de hidrolizar la fracción lipídica, y de cuantificar su efecto sobre la solubilización del resto de fracciones. Los rendimientos de solubilización de la fracción de carbohidratos de la biomasa 3A de esta tercera etapa se muestran en la gráfica 9.

En este caso, se observa que se produce una relativa mejora en la solubilización de carbohidratos, tanto en forma de azúcares como subproductos, por el hecho de adicionar la lipasa *Lecitase* junto con la proteasa *Alcalase* y el cóctel de *Celluclast-Novozyme*. El valor máximo de azúcares solubilizados alcanzó el 38,52% a las 12 horas de hidrólisis, siendo los rendimientos de solubilización de carbohidratos totales del 100% en la mayor parte de los tiempos de muestra de la etapa. De estos resultados se puede concluir que se están extrayendo íntegramente los carbohidratos de la biomasa, los cuales se encuentran en la fracción líquida del hidrolizado en forma de azúcares simples (~24% de los carbohidratos totales solubilizados) o subproductos (~76%).



**Figura 9.** Solubilización de carbohidratos con carbohidrolasas, proteasas y lipasas

El rendimiento de solubilización de la fracción proteica con esta combinación de enzimas a las 48 horas de hidrólisis fue de 39.69 % (con respecto a la cantidad de proteínas iniciales del alga). Esto supone una mejora con respecto a la etapa anterior sin la lipasa presente, ya que se produce un aumento del 6%. Por último, y como era de esperar, la fracción lipídica también se solubilizó al introducir la lipasa, con un rendimiento de solubilización de 8,41% (con respecto a la cantidad de lípidos iniciales del alga).

Se concluye por tanto que la adición de la *Lecitase* al combinado de carbohidrolasas y proteasa aumenta ligeramente los rendimientos de solubilización de las tres fracciones con respecto a los experimentos previos. El contenido en lípidos se ve reducido por la aplicación de una enzima específica para su hidrólisis, y el resto de fracciones porque probablemente la lipasa destruye elementos con base lipídica constituyentes de la pared celular, debilitándola y favoreciendo el acceso de los enzimas hidrolíticos al contenido intracelular. De este modo, la eficacia hidrolítica global del proceso se ve mejorada con respecto a las otras etapas evaluadas.

Por otro lado, el hecho de que los carbohidratos fueran la fracción mayoritaria y, por tanto, la prioritaria a la hora de valorizar la biomasa, fue el criterio escogido a la hora de diseñar el experimento para llevar a cabo la hidrólisis enzimática conjunta de todas las fracciones, lo que hizo que se seleccionaran las condiciones óptimas de operación de las enzimas encargadas de la solubilización de esta fracción. Esta variación en las

condiciones de operación, fundamentalmente el pH, pueden haber sido la causa de una disminución de su actividad, lo que explicaría que los rendimientos de solubilización de proteínas y lípidos hayan sido relativamente bajos, por debajo de lo esperado a nivel general. Estas enzimas trabajan con su máxima eficacia en un rango de temperatura de 30 -70°C y de pH en torno a 7-10, relativamente alejadas de las condiciones aplicadas, y por tanto puede que se haya visto parcialmente comprometida su actividad.

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En primer lugar, y en base a las grandes diferencias existentes entre las biomásas con las que se ha experimentado, fundamentalmente en la fracción de carbohidratos (la biomasa 1 ~10%, y la 2 y 3 ~40%) y de proteínas (la biomasa 1 ~80%, y la 3 ~20%), se comprueba que la composición química de la biomasa algal varía si cambian las condiciones en el reactor de cultivo, puesto que las distintas especies de microalga se adaptan a estos cambios de esta forma.

En cuanto a la hidrólisis enzimática de carbohidratos, se pone de manifiesto que un aumento en la concentración inicial de carbohidratos estructurales conlleva, en nuestro caso, unos bajos rendimientos de hidrólisis con celulasas y  $\beta$ -glucosidasas (~60% de los carbohidratos iniciales son liberados), puesto que las enzimas no pueden acceder al sustrato y extraer los azúcares completamente. Se requeriría un pretratamiento previo para aumentar dichos rendimientos de solubilización. De hecho, la introducción de proteasas y lipasas favorece el acceso de carbohidrolasas a sus sustratos específicos a causa del debilitamiento de la pared celular del alga, traduciéndose en la solubilización casi completa de los azúcares de partida de la biomasa, ya sea en forma de azúcares o subproductos. Sin embargo, los rendimientos de solubilización por la hidrólisis enzimática de las fracciones de proteínas y lípidos fueron más bajos de lo que se esperaba, a causa de la acidez del medio en el que se llevaba a cabo la reacción, lo cual pudo haber causado una pérdida de actividad de proteasas y lipasas.

El objetivo de este trabajo era encontrar la combinación óptima de enzimas (carbohidrolasa-proteasa-lipasa) para solubilizar cada una de las fracciones de la biomasa al máximo en la reacción de hidrólisis enzimática llevada a cabo a 50°C y 300 rpm, siendo esta la combinación Celluclast 1,5L/Novozym 188 (86,67  $\mu\text{L g}^{-1}\text{alga seca}$ )- Alcalase (433,33  $\mu\text{L g}^{-1}\text{alga seca}$ )- Lecitase (86,67  $\mu\text{L g}^{-1}\text{alga seca}$ ), con la cual se alcanzaron unos rendimientos de solubilización de azúcares monoméricos (aptos para una posterior etapa de fermentación) de ~39%, de proteínas ~40% y de lípidos ~9%, concluyendo que la fracción de carbohidratos era la más interesante de valorizar.

Finalmente, las bacterias contenidas en la biomasa, se podría decir que están condicionando en gran medida el proceso de hidrólisis enzimática, ya que se está generando una gran cantidad de compuestos de degradación en la reacción, lo que hace pensar que son subproductos producidos por dichos microorganismos a partir de los azúcares solubilizados como consecuencia de la hidrólisis enzimática.

Las perspectivas de futuro podrían ir orientadas a la aplicación del concepto de biorrefinería mediante la hidrólisis enzimática y extracción secuencial de cada una de las fracciones de la biomasa, con el objetivo de hidrolizar íntegramente la materia prima y posteriormente convertir cada una de las fracciones en productos de alto valor añadido. El desarrollo de este tipo de procesos integrados permitirá maximizar la viabilidad económica de los procesos basados en microalgas como materia prima para la obtención de biocombustibles y otros compuestos de interés.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado por la unidad de investigación UIC 071 del gobierno regional “Junta de Castilla y León”, España. Los autores agradecen al “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y alimentaria (INIA)”, España, “Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)”, España, (RTA2013-00056-C03-02) y a la “Junta de Castilla y León – JCyL”, España, (VA094U14) por la financiación del trabajo.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- A. Singh, P. S. (2011). Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology* 102, 26-34.
- D. Hernández, B. R.-G. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal* 262 , 939–945.
- F.García-Cuadra, N. J.-L.-S. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(2), 147-161.
- H. Cho, Y. O. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 54, 156-160.
- H. Zheng, Z. G. (2012). Lipid production of *Chlorella vulgaris* from lipid-extracted microalgal biomass residues through two-step enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 117, 1-6.
- I. Pancha, K. C. (2016). Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. *Bioresource Technology* 204, 9–16.
- J. Martín Juárez, A. L. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology* 218, 265–271.
- J.B. Sluiter, R. R. (2010). Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 9043–9053.
- J.M. Romero García, F. A. (2012). Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 112, 164–170.
- L. Brennan, P. O. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557–577.
- L. Gouveia, S. G. (2016). Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. *Algal Research* 16, 167-176.

- M.J.Brown. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 315-331.
- O.K Lee, D. S. (2015). Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 29, 24–31.
- Q. He, H. Y. (2016). Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for bio- diesel production in desert area with open raceway pond. *Bioresource Technology*.
- R. Ramanan, B. K. (2016). Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances* 34, 14-29.
- T. Bruton, H. L. (2009). A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. *Sustainable Energy Ireland*.
- T. Suganya, M. V. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55, 909-941.
- V. Singh, A. T. (2016). Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: A review. *Fuel* 173, 90-97.
- Y. Huang, Y. C. (2016). Bio-oil production from hydrothermal liquefaction of high-protein high-ash microalgae including wild Cyanobacteria sp. and cultivated Bacillariophyta sp. *Fuel* 183, 9-19.