



# Centro Universitario de la Defensa en la Escuela Naval Militar

## TRABAJO FIN DE GRADO

*Aprovechamiento de residuo algal para la obtención de bioetanol  
de tercera generación*

### Grado en Ingeniería Mecánica

**ALUMNO:** Carlos Gutiérrez Ramos

**DIRECTORES:** Rocío Maceiras Castro  
Víctor Ángel Alfonsín Pérez

**CURSO ACADÉMICO:** 2017-2018

Universida<sub>de</sub>Vigo





# Centro Universitario de la Defensa en la Escuela Naval Militar

## TRABAJO FIN DE GRADO

*Aprovechamiento de residuo algal para la obtención de bioetanol  
de tercera generación*

**Grado en Ingeniería Mecánica**  
Intensificación en Tecnología Naval  
Cuerpo General

Universida<sub>de</sub>Vigo



## RESUMEN

El panorama energético actual, basado en el consumo de combustibles fósiles, no solo genera un cuantioso número de problemas medioambientales, también está abocado a su fin por el agotamiento de los mismos.

Por ello, las energías renovables ganan cada día más peso respecto de sus competidores, entre las que destaca la biomasa, de la cual se producen combustibles como el bioetanol, capaz de sustituir a derivados del petróleo como la gasolina, pero con la gran ventaja de poder obtenerlo a partir de un variado campo de materias primas.

El objeto de este trabajo es estudiar la posibilidad de producir bioetanol de tercera generación a partir de residuo algal procedente de un proceso industrial. El proceso comienza con un pretratamiento del alga *Eucheuma Denticulatum (Spinosum)*, seguido de una hidrólisis ácida, cuyas variables serán optimizadas, para llegar a obtener la máxima cantidad de azúcares reducidos posibles. Tras ello, se procederá a la fermentación de los azúcares obtenidos, para obtener el bioetanol, gracias a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, finalmente, se separará el biocombustible por destilación.

En última instancia, se caracterizará el bioetanol, con objeto de verificar si cumple o no alguno de los requisitos necesarios para su uso como combustible. De forma adicional, se ha analizado el residuo resultante del proceso de hidrólisis, con objeto de comprobar si es viable su aprovechamiento energético.

## PALABRAS CLAVE

Bioetanol, Residuo algal, Hidrólisis ácida, Aprovechamiento energético



## AGRADECIMIENTOS

Durante mi estancia en esta institución, son numerosas las personas que me han brindado su apoyo incondicional, no solo en las victorias, también en los momentos más desafortunados:

En primer lugar, le agradezco al Subteniente del Ejército de Tierra Don Abilio Nogueira Diz el ser un ejemplo para mí en todos los aspectos, tanto militar como personal, estando siempre dispuesto a una grata charla en su primer momento libre.

En segundo lugar, a mi profesor y amigo Don Alfonso Alejandro José Martín Quintá, por acompañarme desde mis inicios en mi carrera estudiantil, incentivando siempre mi curiosidad por aprender más en cada una de sus clases.

No debo olvidar a mi familia, que ha sido y será en un pilar para mí, junto con mi pareja, pues han sido capaces de hacerme ver el lado positivo de la vida en los momentos difíciles. También agradecerle a mis amigos esos momentos de desconexión que todo el mundo necesita, en especial los de mi camarada, Rafael, Julio y Adrián, por esas noches pre-examen entre risas, haciendo más liviano el estudio hasta horas intempestivas.

Y por último, pero no menos importante, a mis tutores Doña Rocío Maceiras Castro y Don Víctor Ángel Alfonsín Pérez, que a pesar de su gran carga de trabajo como profesores de esta escuela, siempre han tenido un minuto para solventar mis dudas y problemas durante todo el desarrollo de este proyecto.





## CONTENIDO

Contenido .....	1
Índice de figuras .....	4
Índice de Tablas.....	6
1 Introducción y objetivos.....	8
1.1 Paradigma energético.....	8
1.2 Crisis energética.....	9
1.2.1 Carbón.....	9
1.2.2 Petróleo.....	9
1.3 Crisis medioambiental.....	11
1.3.1 Carbón.....	11
1.3.2 Petróleo.....	12
1.4 Bioenergía.....	12
1.4.1 Biomasa.....	12
1.4.2 Biocombustibles.....	13
1.5 Bioetanol.....	14
1.5.1 Primera generación.....	15
1.5.2 Segunda generación.....	15
1.5.3 Tercera generación.....	15
1.6 Algas para la obtención de bioetanol.....	16
1.6.1 Macroalgas.....	16
1.6.2 Hábitat y distribución de las algas.....	17
1.6.3 Eucheuma Denticulatum (Spinosum).....	17
1.7 Objetivos.....	19
2 Estado del arte.....	20
2.1 Producción de etanol a partir de algas.....	20
2.2 Hidrólisis.....	20
2.2.1 Hidrólisis enzimática.....	21
2.2.2 Hidrólisis ácida.....	22
2.3 Fermentación.....	22
2.3.1 Fermentación de biomasa de algas.....	24
2.3.2 Fermentación de extracto de algas sobrante después de la extracción de aceite.....	24
2.3.3 Fermentación de gas de síntesis.....	25
2.4 Comparativa de producción de bioetanol bajo distintas condiciones.....	25
2.5 Situación global de producción.....	26

2.5.1 Proyección de Asia .....	26
2.5.2 Ejemplos de empresas productoras.....	27
3 Desarrollo del TFG.....	28
3.1 Metodología .....	28
3.2 Pretratamiento y caracterización del alga .....	29
3.2.1 Pretratamiento al residuo algal .....	29
3.2.2 Pretratamiento al alga .....	29
3.2.3 Determinación de la humedad .....	29
3.2.4 Cálculo de la celulosa .....	30
3.3 Hidrólisis ácida .....	32
3.3.1 Ensayos .....	33
3.4 Caracterización del licor madre .....	35
3.4.1 Recta de calibrado del índice de refracción.....	35
3.4.2 Método de DNS .....	36
3.5 Fermentación.....	38
3.6 Destilación .....	40
3.7 Caracterización del bioetanol.....	41
3.7.1 Método de la densidad.....	41
3.7.2 Método del índice de refracción .....	42
3.7.3 Método del dicromato.....	43
3.7.4 Rendimiento del bioetanol y la fermentación.....	44
3.7.5 Turbidez y coloración .....	45
3.8 Caracterización del residuo .....	45
3.8.1 Preparación de las muestras.....	45
3.8.2 Caracterización de la humedad.....	46
3.8.3 Análisis elemental.....	46
3.8.4 Análisis inmediato .....	46
3.8.5 Poder calorífico en base seca.....	46
3.8.6 Poder calorífico en base húmeda .....	46
3.8.7 Análisis de elementos inorgánicos.....	46
4 Resultados .....	47
4.1 Caracterización del alga .....	47
4.1.1 Caracterización de la humedad.....	47
4.1.2 Caracterización de la celulosa .....	48
4.2 Establecimiento de las condiciones iniciales .....	48
4.3 Resultado y análisis de los ensayos de hidrólisis ácida .....	50

4.3.1 Influencia de la concentración .....	51
4.3.2 Influencia del tiempo .....	52
4.3.3 Influencia del ratio .....	52
4.3.4 Diseño de experimentos.....	53
4.4 Resultado y análisis de los ensayos óptimos.....	56
4.5 Comparativa de la eficiencia del rendimiento de fermentación.....	58
4.6 Comparativa entre alga y residuo.....	59
4.7 Segunda destilación.....	61
4.8 Caracterización del bioetanol.....	62
4.9 Caracterización del residuo .....	63
4.9.1 Análisis elemental.....	63
4.9.2 Análisis de elementos inorgánicos.....	64
4.9.3 Análisis inmediato .....	64
4.9.4 Poder calorífico.....	65
5 Conclusiones y líneas futuras .....	66
5.1 Conclusiones .....	66
5.2 Líneas futuras .....	66
5.2.1 Aplicación a otras algas y/o residuos.....	67
5.2.2 Hidrólisis.....	67
5.2.3 Fermentación .....	67
6 Bibliografía.....	68
Anexo I: Rectas de calibrado hidrólisis.....	74
Anexo II: Rectas de calibrado de destilación .....	76
Anexo III: Valores Statistica .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Ranking Global generación de energía eléctrica por carbón en TW/h [7] .....	9
Figura 1-2 Gráfica de la teoría del pico de Hubbert [9] .....	10
Figura 1-3 Proyección del aumento de temperatura global [10] .....	11
Figura 1-4 Emisiones de CO <sub>2</sub> mundiales por sectores en 2012 [11] .....	11
Figura 1-5 Tipos de biomasa [17] .....	13
Figura 1-6 Tipos de biomasa vegetal [18] .....	13
Figura 1-7 Distribución global de las algas [42] .....	17
Figura 1-8 <i>Euchema denticulatum</i> ( <i>spinosum</i> ) [46] .....	18
Figura 1-9 Estructura de biomasa lignocelulósica [49] .....	19
Figura 2-1 Hidrólisis de Celulosa [54] .....	21
Figura 2-2 Hidrólisis enzimática de la celulosa [57] .....	21
Figura 2-3 Despolimerización de la celulosa [62] .....	22
Figura 2-4 Rutas metabólicas en fermentación [33] .....	23
Figura 2-5 Esquema sistema de reutilización [45] .....	24
Figura 3-1 Plan de trabajo .....	28
Figura 3-2 Analizador de humedad "RADWAG MA 110.R" .....	30
Figura 3-3 Esquema pasos a seguir para el cálculo de la celulosa .....	30
Figura 3-4 Estufa "INDELAB" .....	31
Figura 3-5 Montaje a reflujo .....	31
Figura 3-6 Mufla "NABERTHERM" y desecador .....	32
Figura 3-7 Autoclave "P SELECTA MED 20" .....	34
Figura 3-8 Montaje del filtrado, muestra obtenida de licor madre y residuos .....	34
Figura 3-9 Centrifugadora "SIGMA 2-7" .....	34
Figura 3-10 Refractómetro "ABBE-REF 1" .....	35
Figura 3-11 Recta de calibrado índice de refracción de la glucosa (Tabla A1-2) .....	35
Figura 3-12 Reacción redox DNS y azúcares reductores [85] .....	36
Figura 3-13 Esquema obtención del reactivo DNS .....	36
Figura 3-14 Espectrofotómetro "SPEKOL 1500" .....	37
Figura 3-15 Recta de calibrado DNS 0-2 (Tabla A1-4) .....	37
Figura 3-16 Ajuste recta calibrado DNS 0-0,5 (Tabla A1-4) .....	38
Figura 3-17 Incubador "OVAN" con inóculo y concentrado de nutrientes en su interior .....	39
Figura 3-18 Medidor "HANNA CHECKER DIGITAL PH METER" .....	39
Figura 3-19 Airlock .....	40
Figura 3-20 Montaje de destilación simple .....	40

Figura 3-21 Esquema pasos del método de la densidad.....	41
Figura 3-22 Recta de calibrado de la densidad (Tabla A2-2).....	42
Figura 3-23 Recta de calibrado índice de refracción del etanol (Tabla A2-3).....	42
Figura 3-24 Esquema pasos del método del dicromato.....	43
Figura 3-25 Muestras método del dicromato .....	43
Figura 3-26 Recta de calibrado del dicromato 0-1 (Tabla A2-5).....	44
Figura 3-27 Recta de calibrado del dicromato 0-11 (Tabla A2-5).....	44
Figura 3-28 Turbidímetro marca “Butech” modelo “LW-TN3024 X5” .....	45
Figura 4-1 Alga y residuo antes y después del proceso .....	48
Figura 4-2 Gráfica Ratio frente a DNS (Ecuación 3-4).....	49
Figura 4-3 Comparativa DNS con concentración .....	51
Figura 4-4 Comparativa DNS con tiempo.....	52
Figura 4-5 Comparativa DNS con ratio .....	52
Figura 4-6 Diagrama de Pareto del efecto estimado de variables en valor absoluto.....	53
Figura 4-7 Valores observados vs valores predichos (Tabla A3-1).....	54
Figura 4-8 Valores ratio (V/P) vs tiempo (min) a concentración 7% .....	55
Figura 4-9 Valores ratio (V/P) vs concentración (%) a tiempo 70 min .....	55
Figura 4-10 Valores tiempo (min) vs concentración (%) a ratio 7.....	56
Figura 4-11 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 2 (II).....	62
Figura 4-12 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 2 (III) .....	62
Figura 4-13 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 16.....	63
Figura 4-14 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 16 (II).....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Demanda Global por regiones [7].....	10
Tabla 1-2 Proporción mundial en porcentaje de producción de biocombustibles por región [7] ....	14
Tabla 1-3 Producción anual de etanol en millones de galones [24].....	14
Tabla 1-4 Comparativa de generaciones de bioetanol [33].....	16
Tabla 2-1 Estudios de bioetanol en hidrólisis enzimática .....	25
Tabla 2-2 Estudios de bioetanol en hidrólisis ácida .....	26
Tabla 3-1 Experiencias realizadas .....	33
Tabla 4-1 Valores de humedad.....	47
Tabla 4-2 Resultados cálculo de celulosa.....	48
Tabla 4-3 Desglose de datos para optimizar ratio .....	49
Tabla 4-4 Parámetros con los que optimizar .....	49
Tabla 4-5 Matriz de ensayos .....	50
Tabla 4-6 Resultados matriz de ensayos .....	50
Tabla 4-7 Resultados de glucosa y DNS con rectas de calibrado .....	51
Tabla 4-8 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación .....	56
Tabla 4-9 Rendimiento de los ensayos.....	57
Tabla 4-10 Parámetros para la fermentación.....	57
Tabla 4-11 Valores de etanol obtenidos .....	57
Tabla 4-12 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido.....	58
Tabla 4-13 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación .....	58
Tabla 4-14 Rendimiento de los ensayos.....	58
Tabla 4-15 Parámetros para la fermentación.....	59
Tabla 4-16 Valores de etanol obtenidos .....	59
Tabla 4-17 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido.....	59
Tabla 4-18 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación .....	59
Tabla 4-19 Rendimiento de los ensayos.....	60
Tabla 4-20 Parámetros para la fermentación.....	60
Tabla 4-21 Valores de etanol obtenidos .....	60
Tabla 4-22 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido.....	61
Tabla 4-23 Resultados de la segunda destilación.....	61
Tabla 4-24 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido segunda destilación por dicromato .....	62
Tabla 4-25 Resultados de turbidez .....	63
Tabla 4-26 Análisis elemental.....	64

Tabla 4-27 Análisis elementos inorgánicos.....	64
Tabla 4-28 Análisis inmediato .....	64
Tabla 4-29 Poder calorífico .....	65
Tabla A1-1 Preparación muestras glucosa para índice de refracción.....	74
Tabla A1-2 Valores recta de calibrado de la glucosa .....	74
Tabla A1-3 Preparación muestras glucosa para DNS .....	74
Tabla A1-4 Valores recta de calibrado de DNS .....	75
Tabla A2-1 Preparación muestras etanol para densidad .....	76
Tabla A2-2 Cálculo recta del método de densidad.....	76
Tabla A2-3 Cálculo recta índice de refracción.....	76
Tabla A2-4 Preparación muestras etanol para método del Dicromato.....	77
Tabla A2-5 Cálculo recta del método del Dicromato.....	77
Tabla A3-1 Valores observados y predichos.....	78
Tabla A3-2 Valores de factores para fórmula del DNS .....	78

# 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Tanto la rápida industrialización como el gran aumento de la población mundial han representado los dos factores críticos de la actual crisis energética. Como consecuencia de la gran dependencia de la humanidad de los combustibles fósiles, coexisten un considerable número de problemas medioambientales. Ejemplo de ello son el calentamiento global, el deterioro de la calidad del aire o la lluvia ácida, entre otros.

Por todo ello, se han incrementado el número de estudios con el objetivo de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, así como para disminuir la producción de contaminantes. Además, las reservas de petróleo y carbón se agotan día a día sin posibilidad de regenerarse. Este hecho provoca, a su vez, problemas económicos que conviven con las complicaciones de carácter medioambiental.

Por lo tanto, el reto actual no es otro que el desarrollo de un combustible que provenga de una fuente renovable.

## 1.1 Paradigma energético

Hace 400000 años, los neandertales tenían un dominio del fuego incluso mejor que el de algunas de las herramientas que ellos mismos habían creado [1]. Tomando este dato como punto de partida, resulta necesario puntualizar que la raza humana ha mudado la forma de obtener energía en su beneficio, debido al crecimiento demográfico de la misma, dando lugar a múltiples maneras de conseguirla:

China utilizaba carbón en torno al 1000 A.C. para la fundición de cobre, datando su uso en la antigua Grecia, aproximadamente, en el 300 A.C. [2]. Posteriormente, los británicos lo utilizarían como combustible desde el 400 D.C. [3]. Un punto de inflexión lo representa la expansión de su uso a finales del siglo XVIII debido a la revolución industrial originada en Gran Bretaña.

Junto al carbón, en Europa, desde el Imperio Romano y la antigua Grecia, se utilizaban molinos hidráulicos para el aprovechamiento de la fuerza motriz del agua [4]. En el caso del Imperio Persa, se comenzó a utilizar molinos de viento a partir del año 1000.

El petróleo, fue usado en China durante siglos para la cocción con gas, o las lámparas. Sin embargo, no sería hasta 1859 cuando comenzaría a popularizarse, gracias al coronel Edwin L. Drake quien sustituyó el aceite de ballena de las lámparas por este combustible fósil [5]. Con la aparición del automóvil en 1895, y la consecuente necesidad de gasolina, el petróleo empezó a ser consumido en grandes cantidades, extendiéndose hasta llegar a nuestros días [6].



## 1.2 Crisis energética

El panorama energético actual está dominado por los combustibles fósiles, concretamente por el carbón y el petróleo, dando lugar a una agravante crisis energética. La evolución de consumo y extracción de ambos recursos, carbón y petróleo, han sido abarcados a continuación.

### 1.2.1 Carbón

El carbón consumido a nivel mundial en el año 2016 ascendió a 7700 Mt. De esta cantidad, 3080 Mt fueron utilizadas para obtención de energía eléctrica, mientras que el resto se utiliza para la manufactura de hierro o acero, uso en transportes, etc [7].

De hecho, es la segunda fuente de energía global, incrementando su uso un 64% entre los años 2000-2014. China es el mayor consumidor de carbón a nivel mundial, consumiendo casi tanto como la suma total del resto de países, como se reseña en la Figura 1-1:

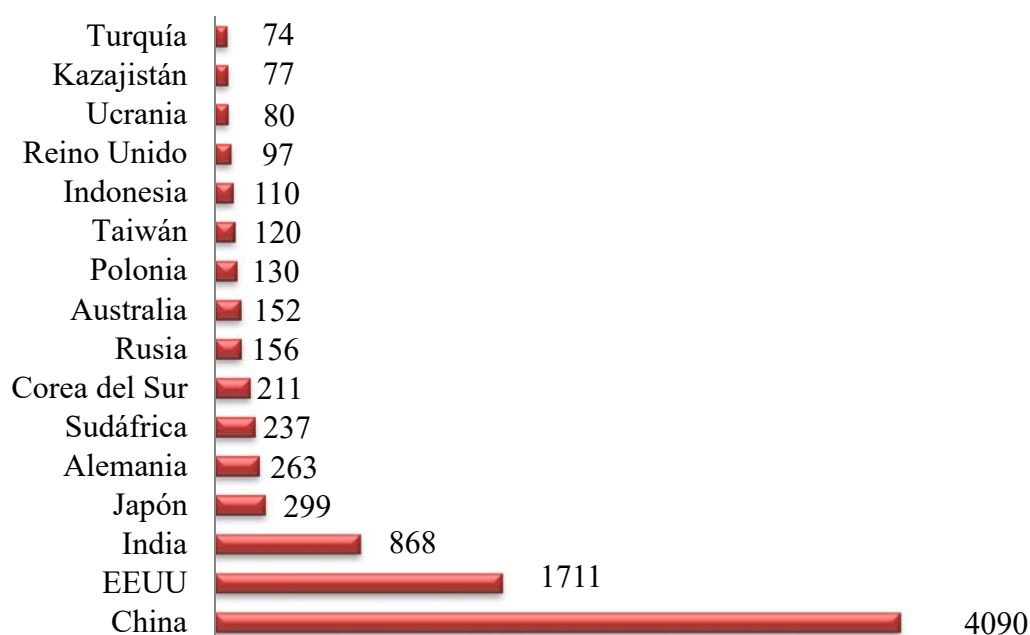


Figura 1-1 Ranking Global generación de energía eléctrica por carbón en TW/h [7]

### 1.2.2 Petróleo

El petróleo constituye la principal fuente de energía mundial, representando el 32,9% del combustible. El principal motivo de su crecimiento reside en la aparición de economías emergentes. Además, se prevé que en los próximos cuatro años, la demanda llegue a ascender al 100%, según las estimaciones del consejo mundial de la energía, tal y como reflejan los datos de la Tabla 1-1:

Si tomamos como base las previsiones realizadas en el año 2014 por parte del consejo mundial de la energía no es tan descabellada la posibilidad de que las reservas de petróleo vayan a agotarse en los próximos años [7].

REGIÓN	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2014-2020
OECD América	24,1	24,2	24,3	24,4	24,5	24,4	24,4	0,3
OECD Asia oceánica	8,1	8,0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,8	-0,3
OECD Europa	13,4	13,3	13,3	13,2	13,1	13,0	12,9	-0,5
Estados postsoviéticos	4,8	4,6	4,7	4,7	4,8	4,9	5,0	0,1
Resto de Europa	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,1
China	10,4	10,6	10,9	11,2	11,5	11,8	12,1	1,7
Resto de Asia	12,1	12,5	12,9	13,3	13,7	14,1	14,5	2,4
América Latina	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2	7,3	7,4	0,6
Oriente Medio	8,1	8,3	8,5	8,8	9,0	9,2	9,5	1,4
África	3,9	4,1	4,2	4,4	4,5	4,6	4,8	0,9
<b>MUNDIAL</b>	<b>92,4</b>	<b>93,3</b>	<b>94,5</b>	<b>95,7</b>	<b>96,9</b>	<b>98,0</b>	<b>99,1</b>	<b>6,6</b>

Tabla 1-1 Demanda Global por regiones [7]

En lo que al petróleo respecta, todo apunta a que se cumplirán las predicciones del geofísico Marion Hubbert, quien enunció la teoría del pico de Hubbert. Según dicha teoría, tras llegar al cenit de la producción de petróleo a nivel mundial, se estima que la caída del mismo será directamente proporcional al crecimiento exponencial que ha tenido este anteriormente a su producción. Todo apunta a que se está muy próximo a alcanzarlo, si no se cambia el modelo de producción y consumo [8]. Esta teoría es extensible al resto de combustibles fósiles, y según las estimaciones, en el año 2010 se alcanzó la pendiente negativa de Hubbert, tal y como se puede apreciar en la Figura 1-2:

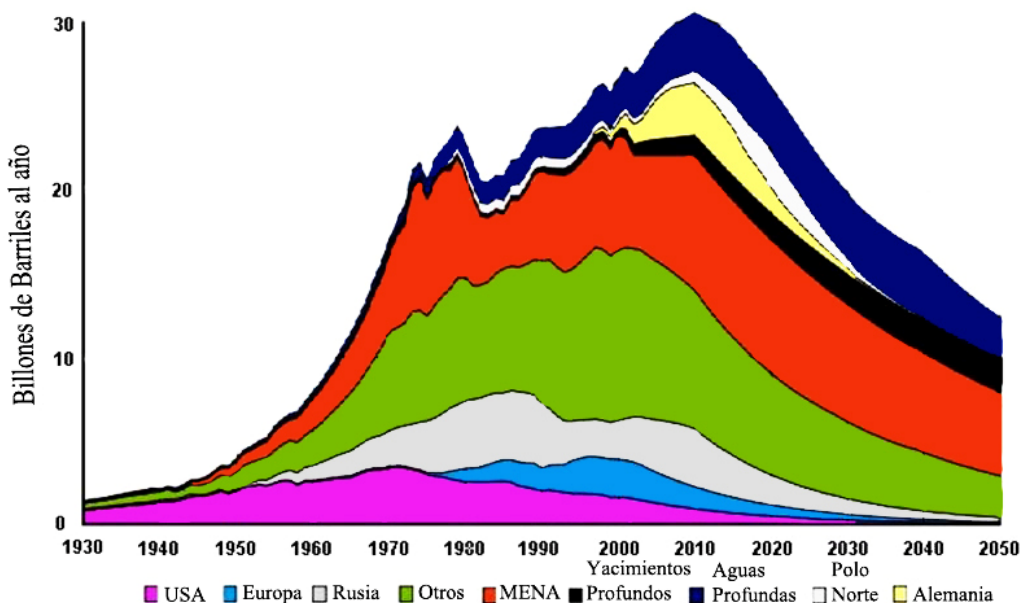


Figura 1-2 Gráfica de la teoría del pico de Hubbert [9]

Estos datos cambian constantemente a causa del descubrimiento de nuevos pozos o mejoras en las técnicas de extracción, por lo que, a pesar de que el futuro puede aún ser cambiante, no es descabellado pensar que la concepción actual del panorama energético pueda llegar a modificarse súbitamente en los próximos años, teniendo que dejar atrás los combustibles fósiles en pro de otras fuentes de energía alternativas; sobre todo, tras observar la posición en la gráfica anterior del presente año.

### 1.3 Crisis medioambiental

Otro factor a tener en cuenta, junto con el posible agotamiento de los combustibles fósiles, es el gran impacto ambiental que generan. La contaminación generada a causa del consumo del carbón y del petróleo, se trata en los siguientes subapartados:

#### 1.3.1 Carbón

La gran acumulación de CO<sub>2</sub> provoca el calentamiento global, instaurando en nuestro planeta cambios que perdurarán durante siglos, y aún puede ir a peor. Este hecho puede apreciarse mejor en la Figura 1-3. En ella se representan distintas temperaturas que se pueden llegar a alcanzar según el aumento anual de las ppmv de CO<sub>2</sub>:

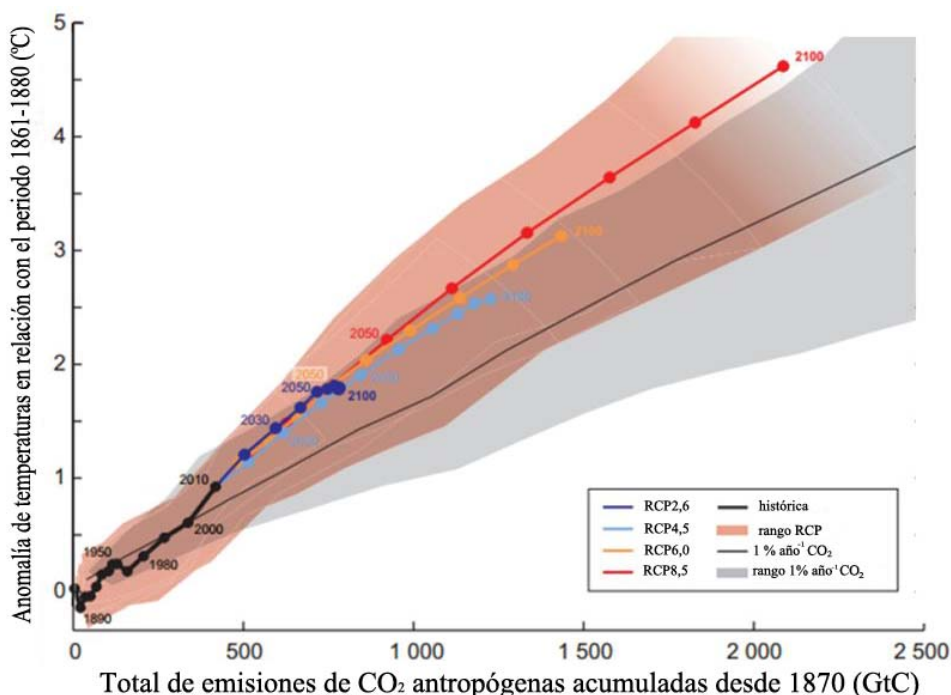


Figura 1-3 Proyección del aumento de temperatura global [10]

El carbón, en mayor medida que el petróleo a causa de su gran uso como fuente de energía eléctrica en países como China (Figura 1-1), es causante de un gran número de emisiones de CO<sub>2</sub>, siendo casi el doble que el transporte (petróleo). De manera que, de no ser por los combustibles fósiles, la atmósfera no poseería actualmente tal cantidad gases de efecto invernadero, siendo la principal fuente de estas emisiones de CO<sub>2</sub> las centrales energéticas, seguidas del transporte y la industria, y por último, el uso doméstico (Figura 1-4):

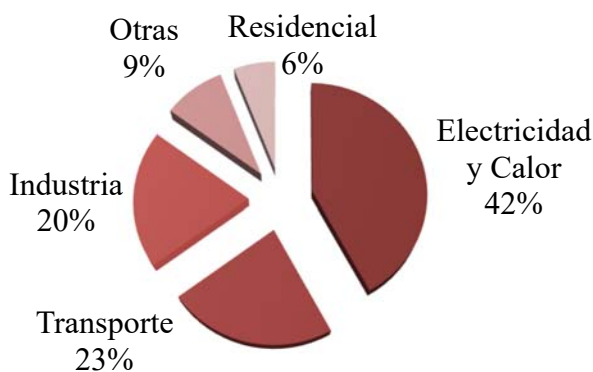


Figura 1-4 Emisiones de CO<sub>2</sub> mundiales por sectores en 2012 [11]

### 1.3.2 Petróleo

Tres mil ochocientos millones de litros son derramados a las aguas de nuestros océanos anualmente, mayoritariamente, por vertidos de aguas residuales. Esto daña tanto la fauna como la flora, dificultando la fotosíntesis y la reproducción, haciendo grandes estragos en los ecosistemas, pudiendo incluso llegar al hombre a través de la cadena alimenticia [12].

La concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico se ha elevado considerablemente desde el pasado siglo, pasando de las 280 ppmv (partes por millón en volumen) a 369 ppmv en 2013, con un crecimiento de 2 ppmv anualmente. Este aumento representa un 40% más de las primeras mediciones tomadas de la década de 1800 [11]. No solo el CO<sub>2</sub>, también el CH<sub>4</sub> y los NO<sub>x</sub> presentes en la atmósfera aumentan día tras día [10].

Numerosas fuentes abalan ambas crisis, con datos como los que se citan a continuación:

*“Sólo el 10% de la energía producida a nivel mundial proviene de fuentes renovables.”* [13]

*“Entre los años 2000 y 2007, más del 85% de la producción global de biodiesel procedía del bioetanol.”* [14]

*“Los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico estimados de 2010 rondaron los 350-380 ppm, y se predice que alcanzarán los 450 ppm de no tomase acciones correctivas.”* [15]

*“Se estima que en 2050, los biocombustibles líquidos como el bioetanol serán los que reemplacen el uso de la gasolina en el sector transporte.”* [16]

Ante esta situación de agotamiento y contaminación asociado a las principales fuentes de energía mundial, se buscan nuevas energías renovables que posean poco impacto medioambiental, además de ser competitivas económicamente frente a las anteriores. De ahí, surge la expansión de la bioenergía.

## 1.4 Bioenergía

Dentro de las energías renovables, se encuentra la denominada bioenergía, que se define como la compuesta por la biomasa, y los biocombustibles, que consiste en la transformación de materia orgánica en una fuente de energía [7].

Hoy en día, supone el 10% de la energía global en el panorama energético, siendo la fuente de energía renovable con mayor porcentaje. En países que todavía se encuentran en vías de desarrollo, la biomasa representa una alternativa más que prometedora frente a los combustibles fósiles, especialmente para el uso de esta en el transporte, como es el bioetanol.

Ahora bien, tampoco se puede descartar su extensión a la vida doméstica y la generación de energía eléctrica en zonas rurales debido a la dificultad de instalación de tendido eléctrico. El aumento de la producción a nivel mundial del etanol y del biodiesel para 2024 se estima que serán de 134,5 y 39 mil millones de litros respectivamente [7].

### 1.4.1 Biomasa

En cuanto a la biomasa, se pueden distinguir distintos tipos, dependiendo del origen de la materia prima utilizada para su obtención. En el siguiente diagrama (Figura 1-5), se puede ver la biomasa vegetal, y como esta puede provenir de residuos agrícolas o forestales, así como cultivos dedicados:

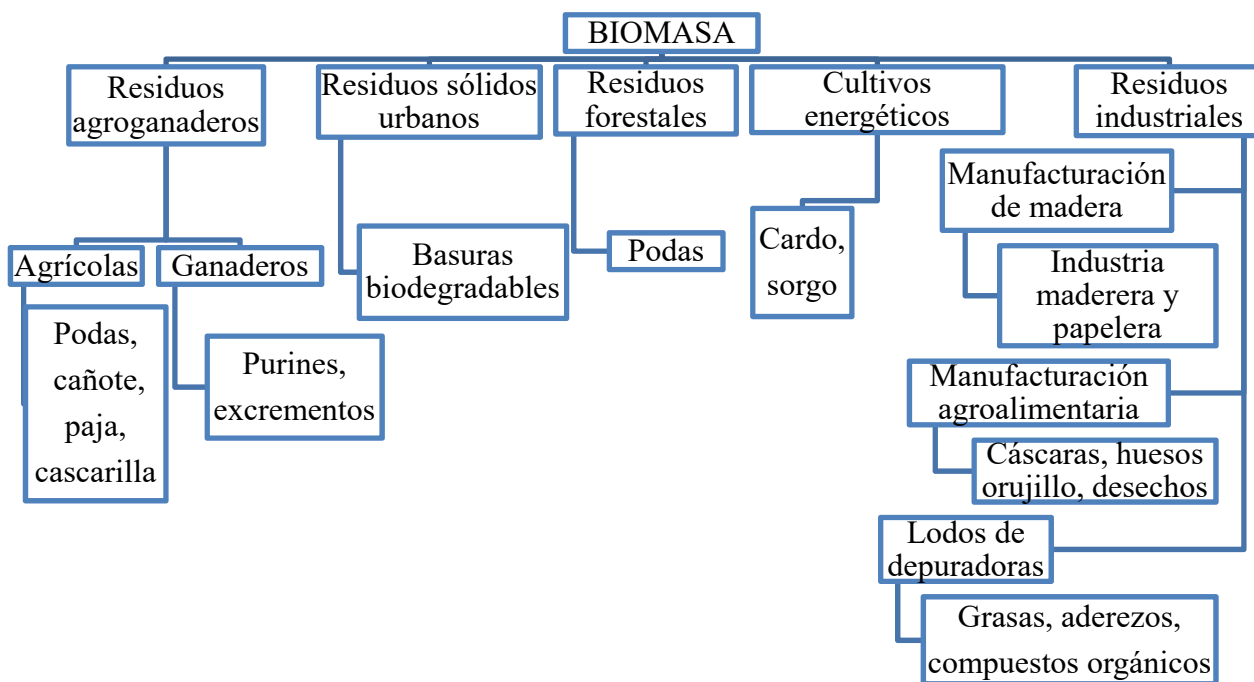


Figura 1-5 Tipos de biomasa [17]

A su vez, si se hace referencia a la biomasa vegetal (Figura 1-6), resulta coherente proceder a otra clasificación. Así pues, como se aprecia en el diagrama, dependiendo lo utilizado de la misma y el tratamiento a ejecutar, el resultado será un tipo de biocombustible u otro:

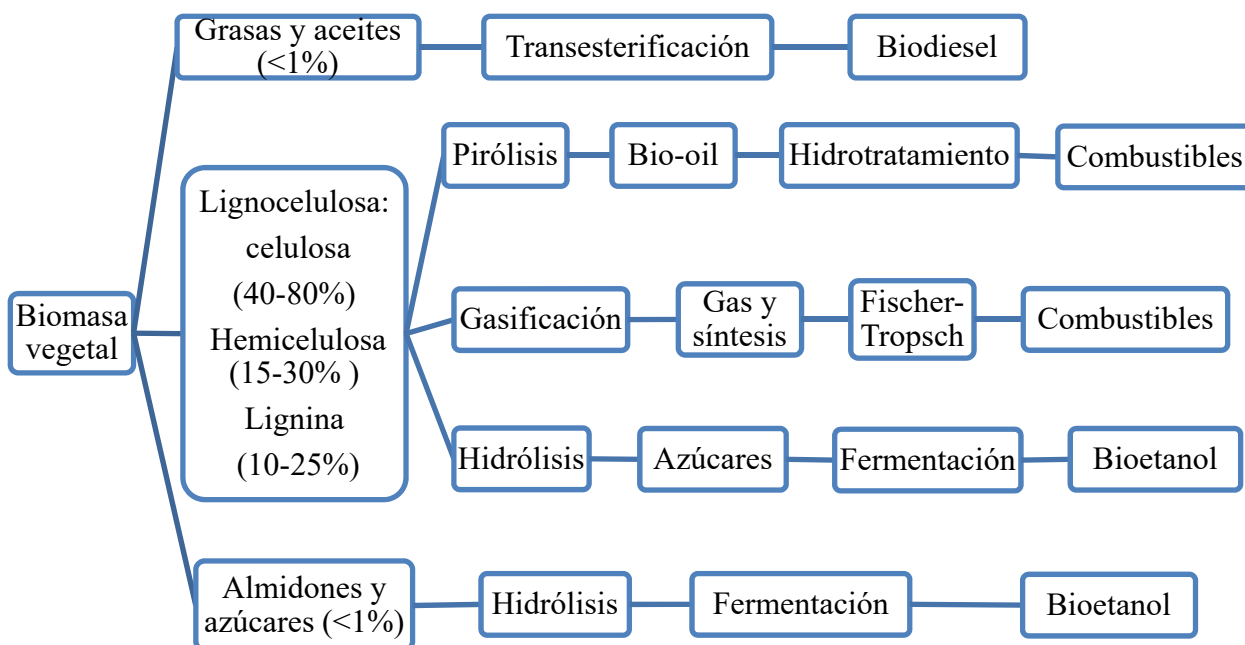


Figura 1-6 Tipos de biomasa vegetal [18]

### 1.4.2 Biocombustibles

Inicialmente, su producción mayoritaria procedía de países en vías de desarrollo en Sudamérica, pero a partir del 2003, Europa y Norteamérica encontraron su potencial y aumentaron las explotaciones de este tipo de energía, tal y como puede observarse en la Tabla 1-2:

REGIÓN	1993	2003	2013	2014
Asia-Pacífico		3,30%	9,50%	10,50%
África				1,0%
Oriente Medio				
Europa y Euroasia	1,10%	11,10%	17,10%	16,50%
Sudamérica y Centroamérica	71,40%	49,20%	28,50%	28,70%
Norteamérica	27,40%	36,40%	44,80%	44,10%

Tabla 1-2 Proporción mundial en porcentaje de producción de biocombustibles por región [7]

Los biocombustibles emergen como una panacea frente a la crisis energética surgida del agotamiento de los combustibles fósiles desde las pasadas décadas [19], siendo su principal atractivo la capacidad de reducir la presencia de gases de efecto invernadero en la atmósfera debido a las emisiones producidas por derivados del petróleo y carbón principalmente.

Junto con esta ventaja, cabe destacar la facilidad de cultivo, cosechado y transporte de la materia prima utilizada para su obtención, lo que aumenta su eficiencia [20].

Teniendo en cuenta la proyección que se espera de esta fuente de energía, y en concreto del bioetanol [16], es necesario establecer un procedimiento para su obtención.

## 1.5 Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible obtenido a partir de materia orgánica vegetal rica en azúcares, que se consigue por medio de la fermentación de los mismos. Como materias primas para la elaboración del bioetanol, se emplean cultivos agrícolas, residuos forestales o algas, y que se caracterizan por ser materias primas ricas en glucosa.

Resulta adecuado puntualizar que hoy en día no se utiliza el 100% del etanol en un motor convencional. Se mezcla con otro combustible y actúa como fuente potenciadora de octanaje por su gran contenido en octano. Actualmente, el etanol usado en motores de combustión se encuentra mezclado con gasolina, en concentraciones que rondan entre el 5% y 10%, siendo llamadas estas mezclas B5 y B10 [21].

Entre las ventajas del uso del bioetanol, un hecho contrastado es que conlleva una disminución en el precio del combustible. Además aumenta su índice de octano, lo cual mejora la eficiencia de la combustión del motor, junto con su carácter biodegradable, lo que favorece la manera de abordar los problemas medioambientales que existen a nivel global [22]. Otro beneficio es su versátil cultivo, lo que permite su distribución geográfica, jugando este factor un rol importante en los apartados de desarrollo y comercialización del mismo, abriendo un gran abanico de posibilidades socioeconómicas para múltiples sectores [23].

País	2004	2005	2006	2007	2008	2015
Estados Unidos	3535	4264	4855	6499	9000	54000
Brasil	3989	4227	4491	5019	6472	27000
China	964	1004	1017	486	502	2800
India	462	449	502	52,8	66	600
Canadá	61	61	153	211	238	1800
Tailandia	74	79	93	79,2	90	1200
Australia	33	33	39	26	26	220
<b>Total</b>	9118	10117	11150	12373	16394	87620

Tabla 1-3 Producción anual de etanol en millones de galones [24]

En la Tabla 1-3, se muestran los datos registrados de los países con mayor producción de bioetanol a escala mundial. Destacar el crecimiento exponencial que ha tenido en la pasada década, conclusión que se extrapola comparando los datos registrados entre los años 2008 y 2015 [24].

En función de la materia prima utilizada para la obtención de bioetanol, puede clasificarse en tres grupos: De primera, segunda y tercera generación.

### *1.5.1 Primera generación*

El bioetanol de primera generación se obtiene de la fermentación de la glucosa que se encuentra en el almidón de cereales o cultivos de azúcar [25]. Estados Unidos y Brasil son los mayores productores de esta generación a través de la caña de azúcar y el maíz, mientras que en Europa son los cultivos de patata, remolacha y trigo los elegidos para el bioetanol [26]. La principal desventaja del empleo de estas materias primas, residiría en la amenaza de limitar y encarecer el acceso de la población a productos básicos de la alimentación como puede ser el trigo. Así pues, teniendo en cuenta el elevado número de personas que a nivel mundial pasan hambre o están mal nutridas, el uso de estos recursos podrían llegar a considerarse ni ético ni humano.

### *1.5.2 Segunda generación*

Como posible alternativa al empleo materias primas comúnmente empleadas como alimentos básicos, se han investigado otras vías de obtener bioetanol, y que se ha denominado bioetanol de segunda generación [27].

También conocido como biocombustible avanzado, su producción se basa en un innovador proceso que utiliza como principal recurso la lignocelulosa de residuos agrícolas y forestales [28], aportando un menor impacto medioambiental. Como consecuencia de la composición de la lignina, el rendimiento de esta generación es medio. Por ello, se precisa de un gran avance tecnológico para corregir este defecto.

Por tanto, esta generación no es del todo atractiva. Es más, de usarse en exceso los recursos forestales, se generaría una nueva problemática. Así pues, surge el reto de obtener bioetanol a partir de otro nuevo recurso, lo que da lugar a la tercera generación de bioetanol [29].

### *1.5.3 Tercera generación*

Teniendo en cuenta las peyorativas de sus predecesoras, esta generación emerge con más beneficios en comparación con las dos anteriores, centrándose en el uso de organismos marinos como recurso para su obtención, como son las algas. Estas, además de poseer la habilidad de generar bioetanol, la acción en si misma de usarlas, permiten limitar el conflicto con los cultivos [30].

Representan una esperanzadora alternativa por su alto contenido en lípidos e hidratos de carbono, fácil cultivo en un gran abanico de ambientes acuáticos y gran absorción de CO<sub>2</sub>. Además, poseen un bajo nivel de lignina y hemicelulosa. Este hecho aumenta su importancia con respecto a su uso para la obtención de bioetanol [31].

En lo respecta a su producción, el máximo rendimiento registrado fue de 365 toneladas de biomasa seca por hectárea por año [32]. A pesar de la poca cantidad de estudios en este campo, el potencial es innegable, tal y como se ve en la Tabla 1-4.

Analizando la comparativa del bioetanol de tercera generación con respecto a sus antecesoras, lo más destacable es su alto rendimiento, que ha originado un mayor número de investigaciones, junto con la facilidad de cultivo, que no solo acelera el proceso de obtención del biocombustible, sino que plantea una alternativa al empleo materias primas comúnmente empleadas como alimentos básicos.

COMPARATIVA	1° GENERACIÓN	2° GENERACIÓN	3° GENERACIÓN
<b>Materia prima</b>	Cultivos aptos para el consumo humano	Residuos forestales y lignocelulosa	Biomasa algal
<b>Tierra para cultivo</b>	Cultivos agrícolas	Terreno apto para el cultivo o tierras marginales	Agua dulce, salada o residual
<b>Conversión tecnológica</b>	Extracción de azúcar, fermentación y destilación	Pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación	Hidrólisis, fermentación y destilación
<b>Rendimiento bioetanol</b>	Bajo	Medio	Alto
<b>Impacto medioambiental</b>	Baja contribución a la mitigación de CO <sub>2</sub>	Alta contribución a la mitigación de CO <sub>2</sub>	Alta contribución a la mitigación de CO <sub>2</sub>
<b>Principal Ventaja</b>	Proceso de conversión simple	Elimina el conflicto combustible vs comida	Alto ritmo de expansión
<b>Principal Inconveniente</b>	Combustible vs comida	Estructuras de materia prima recalcitrantes	Inversiones limitadas y dificultades en el diseño de procesos

Tabla 1-4 Comparativa de generaciones de bioetanol [33]

Teniendo en cuenta el rendimiento de esta generación respecto de las anteriores, se justifica el motivo de este trabajo, en el que se utilizará residuo algal para la destilación de bioetanol.

## 1.6 Algas para la obtención de bioetanol

Las algas, que provienen de un amplio grupo de organismos fotosintéticos, poseen una clasificación un tanto controvertida, particularmente en el estado de cianobacteria [34], pero pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: Unicelulares y multicelulares.

Las designadas como microalgas (unicelulares), son aquellas que flotan en la superficie marina (citoplacton) a causa de su contenido lípido.

Las llamadas macroalgas (multicelulares), comúnmente denominadas algas marinas o algas simplemente, se suelen encontrar en rocas u otras estructuras [35].

En lo referido a la producción de bioetanol, las microalgas ya han captado la atención de la industria energética, generando un alto número de estudios y publicaciones científicas, en los últimos años.

### 1.6.1 Macroalgas

Países asiáticos como China, Japón o Corea, llevan siglos utilizando las algas como vegetales para sus hábitos alimenticios, pues son ricas en proteínas, aminoácidos, hormona de crecimiento y minerales [36]. Por otro lado, los países occidentales optan por usar las algas en la industria alimenticia para producir carragenano o agar, además de agentes gelificantes [37].

El poder disponer de las semillas de alga a lo largo de un año, la convierte en uno de los más importantes cultivos marinos para la biomasa. Las paredes celulares consisten en una matriz compuesta de polímeros de galactano sulfatados lineales.



Dentro de las macroalgas, se puede hacer la siguiente clasificación: Pardas (*Phaeophyceae*), rojas (*Rhodophyceae*) y verdes (*Chlorophyceae*) [38].

El contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos difiere entre los tres grupos. Las algas pardas están compuestas de laminarin, manitol, fuicodan, celulosa y alginato, las rojas se forman de polisacáridos como agar, celulosa, xileno, carragenano y manoproteínas, mientras que las verdes poseen celulosa, manosa y xileno [39].

De todas ellas, las algas rojas son las que poseen una mayor concentración de carbohidratos en su composición. Este último dato es muy importante, pues recientes estudios demuestran que un gran contenido de los mismos es crucial para una mayor obtención de bioetanol [40].

### 1.6.2 Hábitat y distribución de las algas

La principal ventaja de las algas para su cultivo, reside en el hecho de que se adaptan a cualquier tipo de ambiente (Tabla 1-4). Los hábitats marinos donde crecen son el intermareal y submareal, sujetas a estructuras, como por ejemplo el fondo marino. Al desprenderse de este, pasan a ser algas a la deriva de las corrientes y mareas, viéndose reducida su esperanza de vida [41].

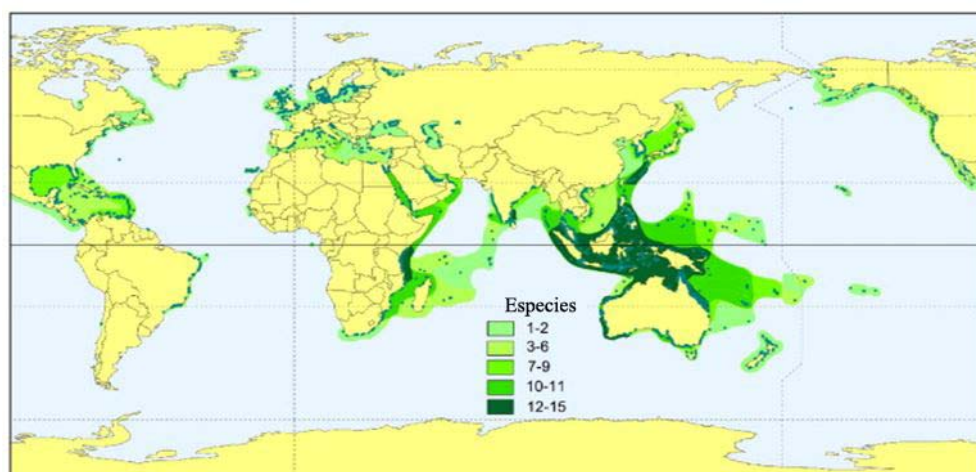


Figura 1-7 Distribución global de las algas [42]

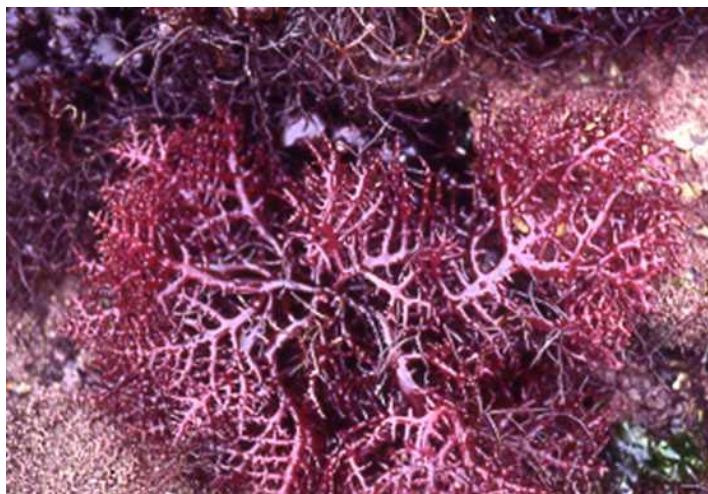
En la Figura 1-7 se puede observar que la mayor parte de las especies se encuentran en Asia. Este hecho justifica, a su vez, la gran extensión del uso de las algas en este continente respecto del resto, siendo China el mayor productor de algas a nivel mundial, seguido de Corea del Sur y Japón. Por tanto, estos países poseen un gran potencial respecto del resto para hacer inversiones en bioetanol. Con respecto a los cultivos, estos suponen el 90% de la producción total de algas a nivel global, siendo la mayoritaria la laminaria japonesa, con un 60%, seguida de otras especies como *Porphyra*, *Kappaphycus*, *Undaria*, *Eucheuma* y *Gracilaria* [43].

### 1.6.3 *Eucheuma Denticulatum (Spinosum)*

Tomando en consideración el potencial de las algas rojas dentro de las macroalgas, en lo que se refiere a la obtención de bioetanol por su composición (1.6.1), la que se utilizará en este trabajo como recurso será la *Zaus Spinosum*, de origen tailandés y con la siguiente clasificación: Del imperio *Eukaryota*, reino *Plantae*, subreino *Biliphyta*, phylum *Rhodophyta*, subphylum *Eurhodophytina*, clase *Florideophyceae*, subclase *Rhodymeniophycidae*, orden *Gigartinales*, familia *Solieriaceae* y género *Eucheuma* [44].

Respecto a su composición, el 56,9% es de ceniza, un 25,9% de fibra, 15,2% de carbohidratos, 2% de proteínas y 0,1% de fósforo. Es la tercera macroalga que más contenido tiene de carbohidratos, sólo siendo superada por la *Ulva reticulata* y la *Gracilaria crassa*, que poseen un 23,1% y 28,2% respectivamente [45]. Su utilización actual en el mundo occidental, se encuentra relacionada con el

ámbito alimenticio. En la Figura 1-8 se puede apreciar el hábitat comentado anteriormente (1.6.2), así como su aspecto en estado natural:



**Figura 1-8 Eucheema denticulatum (spinosum) [46]**

Otro de los datos que caracterizan la determinación del potencial de las algas para la obtención de bioenergía, es su contenido en un polisacárido que supone entre el 60 y el 80 por ciento del material lignocelulósico: La celulosa.

Esta, contiene un elevado peso en hidratos de carbono, y es insoluble en agua y muchos de los disolventes orgánicos. Se encuentra en la pared celular formando moléculas Beta y D de glucosa, en forma de cadenas lineales con puentes de hidrógeno en los grupos hidroxilo y fuerzas de Van der Waals intramoleculares [47].

Tras un proceso de hidrólisis, se obtiene D-celulosa. Sin embargo, si se llegara a efectuar un proceso de degradación lo suficientemente intenso, se podría llegar a tener productos como la celotetrosa, la celotriosa o la celobiosa [48].

A tal punto llega la importancia de la celulosa que numerosos estudios experimentales, pretenden llegar a concluir la cantidad de esta y almidón contenida tanto en microalgas como en magroalgas [33]. Una investigación [45] observó una alta tasa de crecimiento de 20 a 30 gramos de biomasa seca por metro cuadrado al día, con más de un 20% de almidón.

De todos estos datos, se deduce la importancia de investigar y generar un procedimiento óptimo para la producción de bioetanol de tercera generación utilizando las algas como materia prima.

En la Figura 1-9, puede apreciarse dónde se encuentra la celulosa en la estructura de las plantas, algo que ayuda a comprender el proceso de extracción de esta y de su contenido en glucosa, que se tratará en puntos más adelante del presente trabajo:

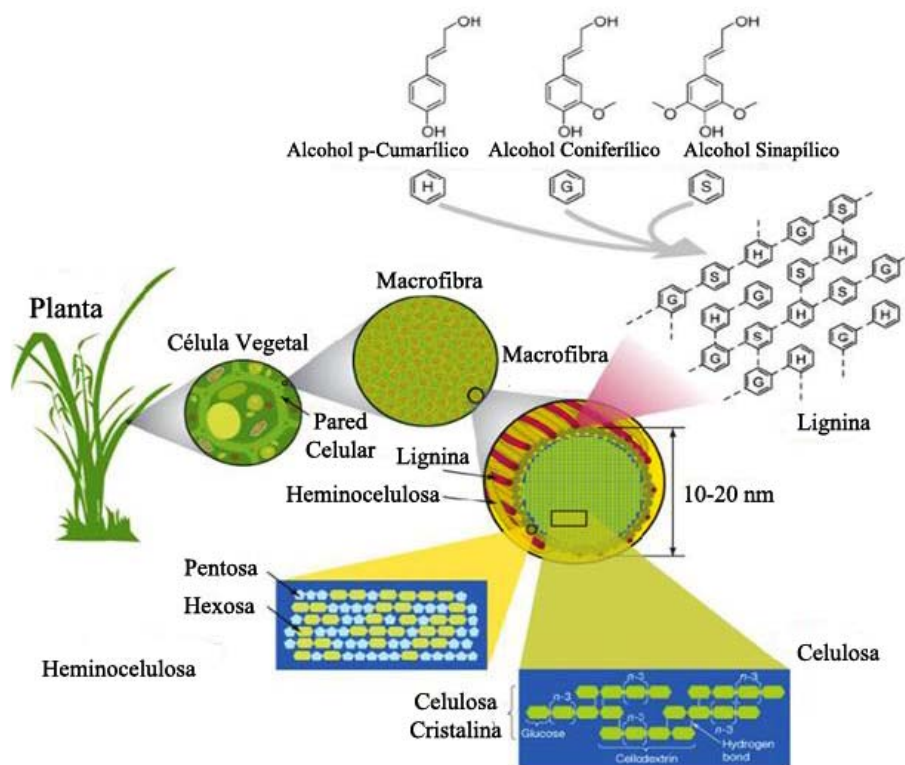


Figura 1-9 Estructura de biomasa lignocelulósica [49]

## 1.7 Objetivos

El principal objeto del trabajo se centra en obtener bioetanol utilizando como recurso residuo algal, de manera que se marcan los siguientes hitos:

- \* Determinación de la posibilidad de obtener bioetanol a partir de residuo algal.
- \* Optimización de la hidrólisis a partir de la modificación de parámetros conocidos: Concentración, tiempo y ratio (volumen de ácido/peso de residuo algal).
- \* Fermentación y destilación de la óptima hidrólisis conseguida en el apartado anterior.
- \* Caracterización del bioetanol obtenido.
- \* Análisis del residuo después del proceso para su posible aprovechamiento energético.
- \* Estudio de la afectación del proceso industrial al que se ha sometido el residuo algal sobre la producción de bioetanol.

## 2 ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Producción de etanol a partir de algas

Con el paso de los años, la bioenergía gana terreno a sus actuales competidores. Empresas como Solazyme, de hecho, estudian combinar la energía aportada por el bioetanol de las celulosas, junto con el biodiesel algal [45].

Desgraciadamente, no existen proyectos comerciales con el objetivo de utilizar las algas como recurso energético, a pesar de que este tipo de algas tienen un rápido crecimiento en contenido de celulosa, entre un 7 y un 30% [45].

En comparación con las otras generaciones, las algas poseen un abordaje distinto, concretando en la igualación de levadura con azúcares, la extracción de este azúcar, y eficiencia en términos de concentración del mismo.

En cuanto al procedimiento a seguir, todos se basan en la extracción por medio de métodos termoquímicos y biológicos [50]. Los pasos a seguir para ello, varían en función de la especie utilizada como recurso, pero el primer paso, y uno de los más importantes, es el secado de las algas, consiguiendo evitar la gelificación de las mismas, además de salvaguardar el extracto crudo [51].

Tras este pretratamiento de secado, siempre sigue una hidrólisis, luego una fermentación, y por último, destilación y recuperación del bioetanol.

Decir también, que las investigaciones en el campo del aprovechamiento de residuo algal, son inexistentes, siendo la mayoría de estudios, cultivos de algas con el único propósito de obtener energía, sin haber por tanto datos registrados de la cantidad de bioetanol producida a partir de residuo algal.

### 2.2 Hidrólisis

En el ámbito de la química orgánica, la hidrólisis es una reacción en la que una molécula orgánica, en un ambiente de condensación, reacciona con el agua, lo cual rompe enlaces covalentes, dando lugar a moléculas con grupos funcionales OH.

Para la catálisis, se necesita añadir una base o un ácido [52]. En las paredes celulares de las plantas, esta reacción afecta a los componentes lignocelulósicos, dando lugar a glucosa, según la reacción mostrada en la Figura 2-1.

Con objeto de obtener bioetanol, se necesita exponer los componentes intracelulares de las algas, para lo que se necesita una despolimerización de sus paredes celulares, y así, conseguir los polisacáridos, como son laminarins, alginatos, carragenanos y fucanos. La hidrólisis de estos, da lugar a monómeros [53].

Ahora bien, se puede diferenciar entre una hidrólisis química, o también conocida como ácida, o una hidrólisis enzimática. En un esquema de química orgánica, puede explicarse mejor la reacción de hidrólisis viendo la Figura 2-1, viendo como se separa la glucosa de la celulosa:

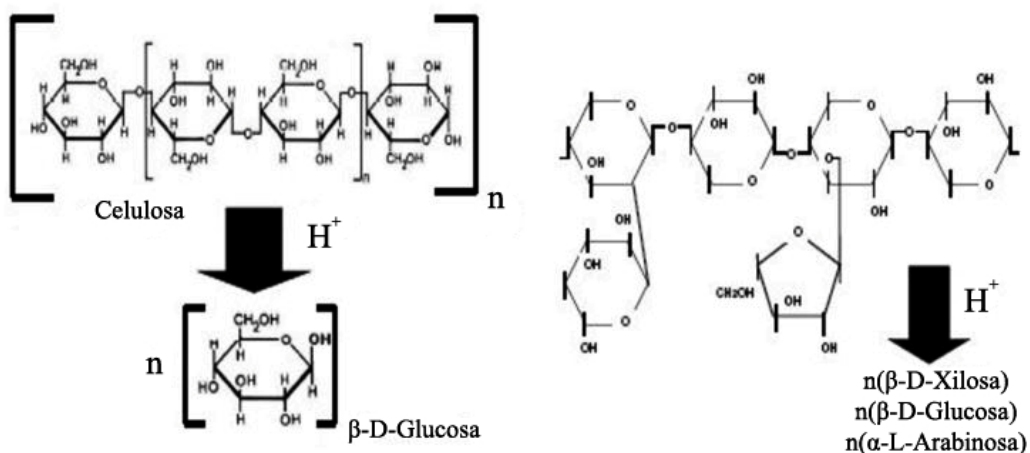


Figura 2-1 Hidrólisis de Celulosa [54]

### 2.2.1 Hidrólisis enzimática

Esta técnica se basa en la conversión de azúcares complejos en simples a través de enzimas. Los principales motivos por los que se ha extendido su estudio en los últimos años, son su mayor rendimiento respecto a la hidrólisis ácida, consiguiendo resultados un 80% mejores, y su bajo impacto ambiental, pues no genera corrosión [55].

Entre los enzimas utilizados, las celulasas, especializadas en la descomposición de la celulosa, se pueden clasificar 3 tipos: Endo-glucanasas, exo-glucanasas y  $\beta$ -glucosidasa. Las endo, atacan el interior de las paredes de la celulosa, mientras que las exo degradan la celulosa en celobiosa, hasta reducir las fibras de celulosa a unidades imposibles de atacar enzimáticamente.

Si alguna de las dos anteriores, se combina con  $\beta$ -glucosidasa, la celobiosa se divide en dos unidades de glucosa, de forma que la reacción orgánica seguiría el de la Figura 2-2 [56]:

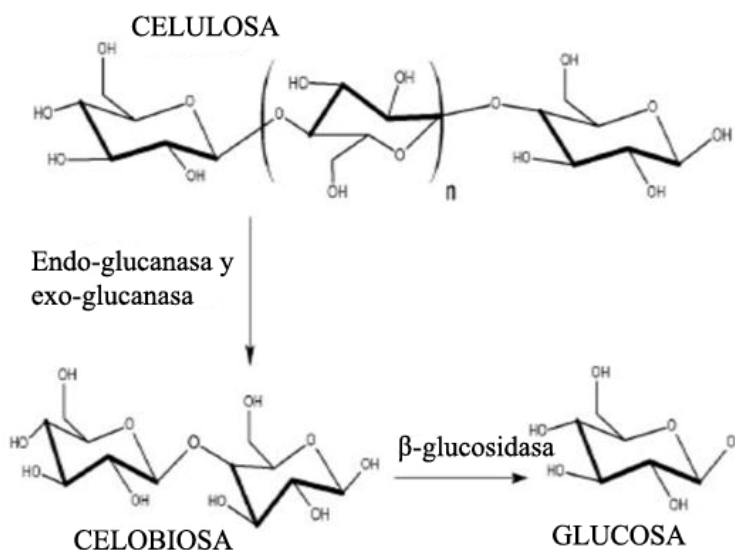


Figura 2-2 Hidrólisis enzimática de la celulosa [57]

La estructura física del alga y su interacción con el enzima constituyen factores a tener en cuenta, pues afectan a la eficiencia del proceso, siendo lo más crítico la formación de sustratos enzimáticos

complejos, generados por la absorción de enzimas, que romperán las paredes celulares para formar más monosacáridos [58].

Dicha unión enzima-alga rompe la vinculación de esta con los polisacáridos, y en consecuencia, la concentración de enzimas decrecerá en la glucosa obtenida al finalizar la hidrólisis, algo muy beneficioso para el siguiente paso, la fermentación. Otra ventaja de los enzimas con las algas, es la porosidad de estas, que aumenta la eficiencia de los enzimas [59].

### 2.2.2 Hidrólisis ácida

También conocida como hidrólisis química. Se trata del método actual más utilizado para la obtención de bioetanol, pues mejora de manera significativa la obtención de azúcares simples a partir de polisacáridos. En él, el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), es el preferido de todos.

De hecho, existen estudios que demuestran su eficacia con las macroalgas en la hidrólisis a monosacáridos, diluyendo las muestras a una elevada temperatura en una atmósfera ácida. Se rompen así, gracias al rol que desempeña el ácido, las cadenas de los polisacáridos [60].

El primer paso es la destrucción de los enlaces de hidrógeno, para luego poder con ello romper las cadenas de los polisacáridos, pasando todo a un estado amorfo. El polisacárido, llegados a este momento del proceso, es muy susceptible a ser hidrolizado.

Más tarde, el ácido actúa como catalizador, extendiéndose a los polisacáridos, hidrolizando los enlaces glicosídicos. Finalmente, la incorporación de agua permite la hidrólisis que luego generará los monosacáridos. La reacción orgánica se puede apreciar de forma más clara en la Figura 2-3 [61]:

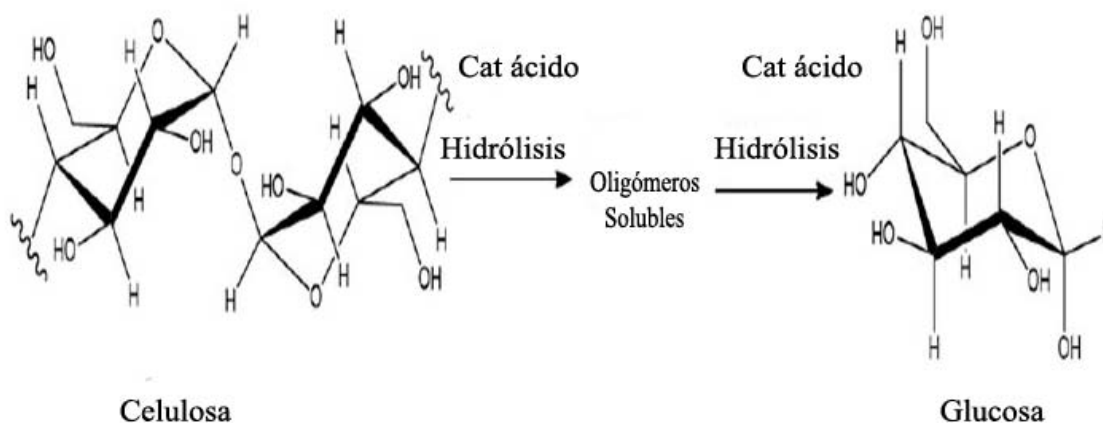


Figura 2-3 Despolimerización de la celulosa [62]

## 2.3 Fermentación

Una vez se obtengan los azúcares simples al final del proceso de hidrólisis, estos pueden convertirse en bioetanol gracias a una serie de microorganismos. El producto final, además de ser bioetanol principalmente, contiene también  $CO_2$  y agua [63].

Los microorganismos utilizados son uno de los factores más cruciales de todo el proceso. Entre las que se encuentran las bacterias, los hongos y las levaduras, siendo esta última la más utilizada de todas, debido a su alta selectividad, baja acumulación, lo que genera una menor cantidad de subproductos; y posee un gran rendimiento de etanol producido y ratio de fermentación. Dos de los más habituales métodos son el camino de Leloir y el camino de Emben-Melyerhof, utilizados para la transformación de galactosa y glucosa respectivamente, en etanol. Estos, se representan en la siguiente ruta metabólica, llegando en ambos al etanol:

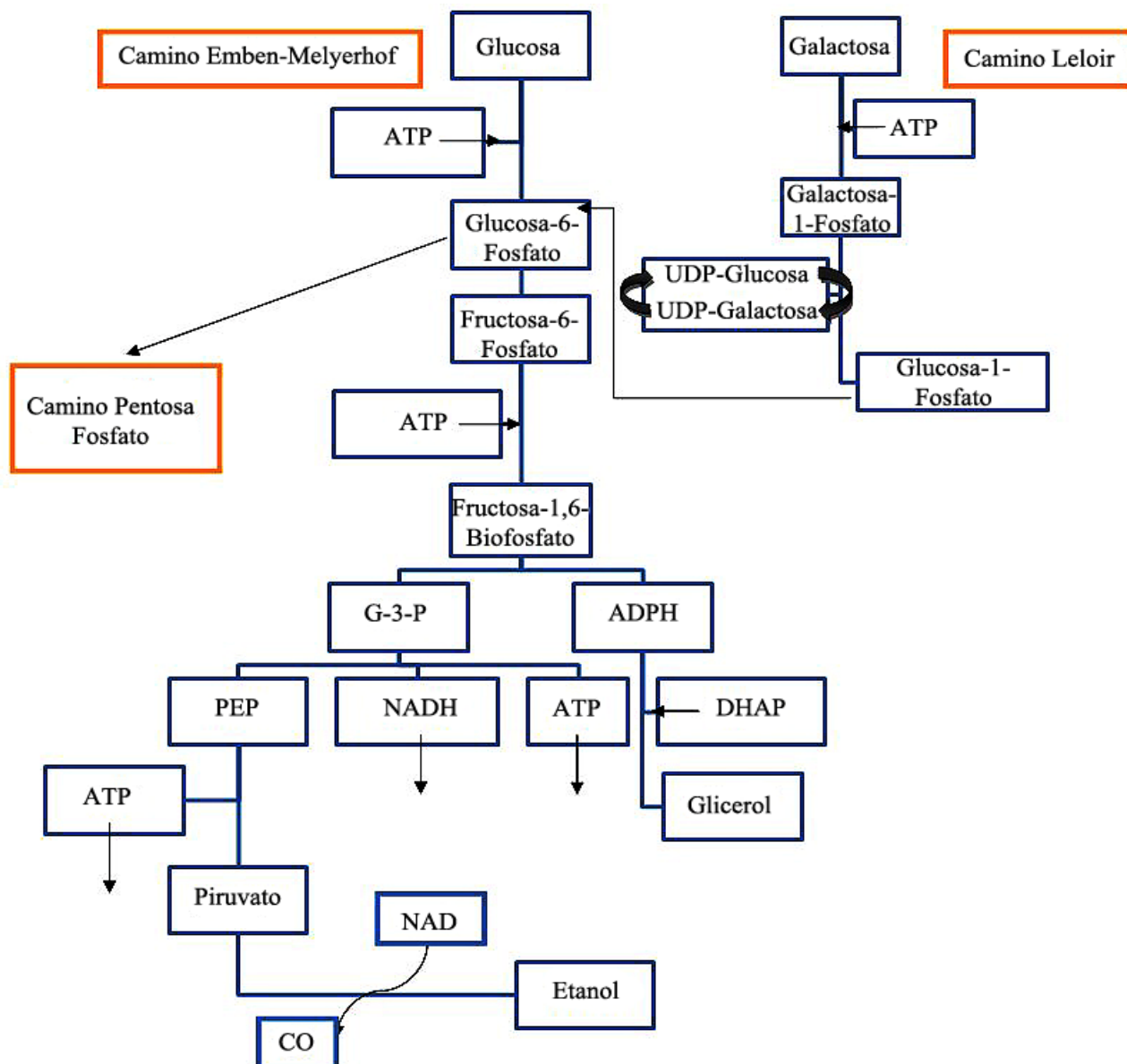


Figura 2-4 Rutas metabólicas en fermentación [33]

Haciendo referencia al esquema anterior, en una primera etapa la glucosa es fosforilada pasando a glucosa-6-fosfato, que se isomeriza a fructosa-6-fosfato. Esta, se fosforila a nivel del carbono 1 pasando a fructosa-1,6- bifosfato, la cual se rompe, dando lugar a dos moléculas de 3 carbonos: DHAP (dihidroxietonafosfato) y G3P (gliceraldehido3P). El DHAP se isomeriza a G3P, y a lo largo de todo este proceso, se consume ATP (molécula utilizada por todos los organismos vivos para proporcionar energía en las reacciones químicas degradando en ADP), ya que es dador de los fosfatos en ambas fosforilaciones.

Una segunda etapa comienza con la oxidación del G3P, que es fosforilada por fosfato inorgánico del medio, pasando a 1-3 bifosfoglicerato, que realiza una transferencia del grupo fosfato de ADP para formar ATP y así tener 3-fosfoglicerato. Este se deshidrata y se convierte en fosfoenilpiruvato, que transfiere fosfato al ADP, obteniendo ATP y se libera piruvato, que en condiciones anaeróbicas y a través de la fermentación alcohólica, se libera etanol. En este último paso, entra el NAD (Nicotamin-Adenin-dinucleótido), nucleótido transportador de H. La ecuación global sería:



Año tras año, surgen innovaciones en el campo de la producción del bioetanol, con el objetivo de aumentar la productividad y economizar el proceso. Dentro de estos avances, existen dos formas de plantearse cómo ejecutar la hidrólisis y la fermentación, siendo posible: Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF) o Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF) [64].

El mecanismo de SHF, procedimiento a emplear más habitual, diferencia los de hidrólisis y fermentación, degradando la materia prima en monómeros de azúcar en primer lugar, gracias a la sacarificación; para luego obtener etanol, por medio de la fermentación de glucosa. Por otro lado, SSF conduce ambos procesos a la vez, en un solo reactor y como un único paso. Para ello, la hidrólisis debe hacerse con enzimas; y, la fermentación con levaduras, de manera que los azúcares se conviertan rápidamente en bioetanol. Si se hace correctamente, puede llegar a obtener mejores resultados que SHF. Tras esta división, se pueden clasificar en tres grupos las fermentaciones a realizar: De biomasa de algas, de extracto de algas sobrante después de la extracción de aceite, y de gas síntesis.

### 2.3.1 Fermentación de biomasa de algas.

Tras la cosecha de las mismas para obtener biomasa, y la desintegración celular en un ambiente anaeróbico, se fermenta con levadura la biomasa para obtener el etanol. La desintegración celular se busca con la finalidad de romper las paredes celulares y obtener los carbohidratos presentes en ellas.

Con el objetivo de facilitar el proceso, previamente se efectúa un cortado, trituración, mezcla y extrusión de las algas, facilitando el ataque con enzimas o del ácido para separar la glucosa del material lignocelulósico. Tras esto, se fermenta y se separa el etanol de la solución resultante de la fermentación, que contendrá agua, biomasa y el bioetanol. Lo más habitual es la destilación para conseguir separar los productos finales del proceso. Este etanol, no es de calidad suficiente para ser combustible, pero tras una segunda destilación, podemos conseguir hasta una concentración en volumen del 95% [45]. Esta es la más estandarizada y extendida a nivel mundial.

### 2.3.2 Fermentación de extracto de algas sobrante después de la extracción de aceite.

La biomasa algal no sólo puede producir bioetanol, también es posible extraer aceite de esta para poder generar biodiesel. De este modo, se obtiene dos combustibles de una misma materia prima, gracias a la reutilización del CO<sub>2</sub> liberado al extraer el etanol. Este, se redirige a la planta de etanol, y con las algas del reactor, producimos aceite, que será utilizado para obtener biodiesel. El nombre con el que la empresa Veridium ha bautizado a este sistema de recirculación es Veridium BioStarch. En la Figura 2-5 puede apreciarse con claridad [45]:

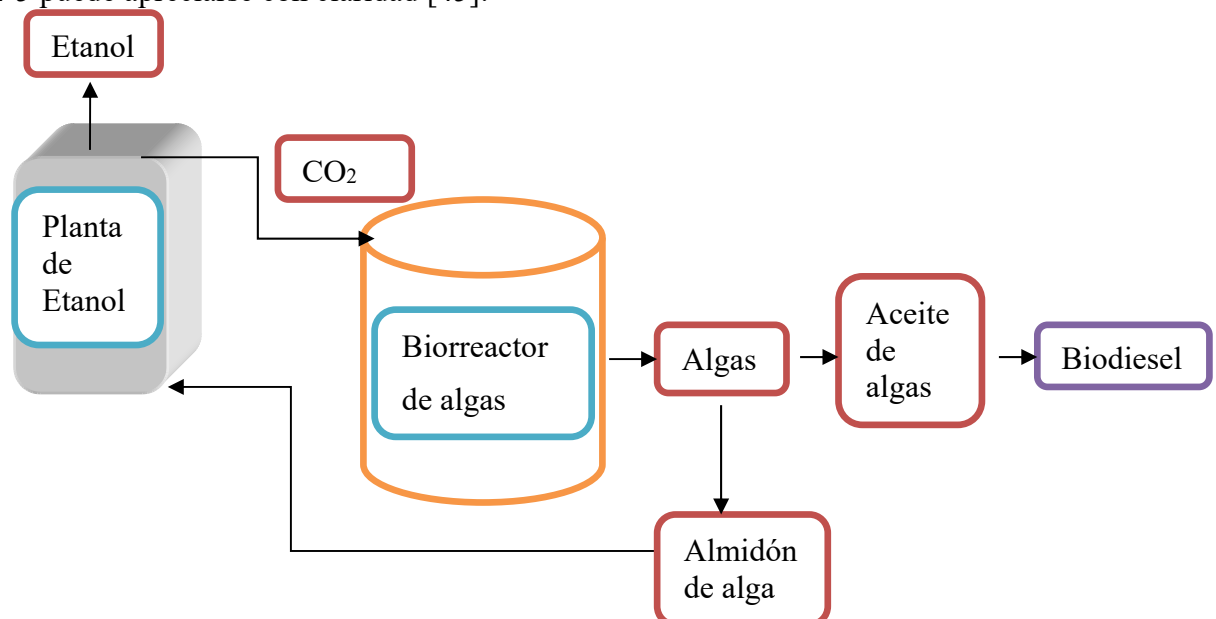


Figura 2-5 Esquema sistema de reutilización [45]



### 2.3.3 Fermentación de gas de síntesis.

Otra forma de producir bioetanol, es la gasificación de biomasa algal, que luego se fermenta para obtener el biocombustible. Esta técnica ha obtenido resultados satisfactorios utilizando una biomasa diferente como materia prima, y aún se encuentra en vías de desarrollo en el campo del bioetanol de tercera generación, utilizando las algas como recurso, pero ello no quita el posible potencial que puede llegar a tener en los próximos años [65].

El procedimiento de gasificación se divide en dos pasos: Conversión y destilación. En el primer paso, se convierte el syngas en bioetanol gracias a la intervención de microorganismos como, por ejemplo, el *Clostridium Ijungdahlii*. En el segundo paso, se separa el etanol del agua, destilándolo.

## 2.4 Comparativa de producción de bioetanol bajo distintas condiciones

Una vez expuestos los procesos por los que debe de pasar la materia prima para llegar a obtener bioetanol de la misma, se puede hacer una comparativa entre los resultados obtenidos con unas técnicas u otras, particularmente, en el apartado de la hidrólisis, donde existe una gran diferencia entre la hidrólisis ácida y la enzimática.

Existen estudios acerca de diversas experiencias con microalgas y macroalgas, tanto con una hidrólisis ácida como enzimática. Es necesario puntualizar que al comparar ambas, en cuanto a parámetros se refiere, la ácida requiere menos tiempo, es menos costosa, precisa de más temperatura, tiene menor rendimiento y genera corrosión en los equipos y productos indeseados [33]. En la Tabla 2-1, se muestran los resultados obtenidos en investigaciones de distintas macroalgas a las que se les ha efectuado una hidrólisis enzimática:

Especie	Hidrólisis Concentración Encimas/T <sup>a</sup> /rpm/tiempo/ pH	Fermentación	Concentración (l/l)/T <sup>a</sup> /tiempo/r pm/pH	Bioetanol (g/g)	Ref.
<i>Gracilaria salicornia</i>	0,5%celulosa/40°C/- /26h/5.0	<i>Eschericia coli</i>	-/30°C/-/48h/-	0,079	[66]
<i>Gracilaria verrucosa</i>	20FPU/g celulosa, 60CBU/g βglusolidasa/50°C/150/36 h/5.0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6%/30°C/- /16h/6,0	0,430	[67]
<i>Sargassum spp.</i>	10FPU/g celulosa, 250CBU/g β- glusolidasa/50°C/100/96h/ 4.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5%/40°C/- /48h/4,5	0,170	[68]
<i>Ulva fasciata Delile</i>	2%celulosa/45°C/150/36h /4.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- /28°C/120/48h/6 ,8	0,450	[69]
<i>Gelidium amansii</i>	8,4EGU/ml celulosa, 1,2FGB/mlβ- glusolidasa/45°C/30/60h/4 .5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia stipitis</i>	- /30°C/30/96h/6, 4	S: 0,44 P: 0,50	[70]
<i>Gracilaria sp.</i>	1%celulosa/50°C/100/6h/ 4.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%/30°C/- /48h/4,5	0,470	[71]
<i>Eucheuma cottonii</i>	15FPU/g celulosa, 52CBU/g β- glusolidasa/30- 60°C/150/72h/7.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- /35°C/130/6h/5, 0	SHF 0,559 SSF 0,909	[72]

**Tabla 2-1 Estudios de bioetanol en hidrólisis enzimática**

A fin de comparar estos resultados con los de la hidrólisis ácida, con ácido sulfúrico, en la Tabla 2-2 se exponen los resultados obtenidos en otros estudios, existiendo en ocasiones coincidencia en la especie de alga utilizada como recurso en este trabajo:

Espece	Concentración (g/l)/T <sup>a</sup> /tiempo/pH	Fermentación	Parámetros fermentación Concentración (l/l)/T <sup>a</sup> /rpm/tiempo/pH	Bioetanol (g/g)	Referencia
<i>Eucheuma cottonii</i>	5%/100°C/30-120min/5,0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%/28-30°C/-/36-128h/-	0,046	[73]
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	5%/100°C/60min/5,5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5%/30°C/150/48h/6,4-6,8	0,39	[74]
<i>Gelidium amansii</i>	2%/150°C/240min/-	<i>Brettanomyces custersii</i>	8%/30°C/150/39h/4,8-5,5	0,38	[75]
<i>Undaria pinnatifida</i>	10-20%/121°C/15-60min/-	<i>Pichia angophorae</i>	10%/30°C-+2°C/220/72h/7,0	0,33	[76]
<i>Eucheuma cottonii</i>	3%/121°C/30min/5,0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-/Ambiente/-/144h/-	0,025	[77]

Tabla 2-2 Estudios de bioetanol en hidrólisis ácida

Teniendo en cuenta ambas tablas, y haciendo una comparativa de las mismas, se pueden deducir una serie de conclusiones: Para una misma especie, como es la *Eucheuma cottonii*, vemos que la hidrólisis con enzimas es mucho más beneficiosa a la hora de obtener una mayor cantidad de bioetanol, así como el hacer simultáneamente la fermentación y sacarificación, también aumenta aún más la cantidad de producto generado. La mayoría de las experiencias habituales usan levadura de cerveza para la fermentación, y el ácido sulfúrico en las hidrólisis químicas. Las concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oscilan entre el 5% y 10%, y el pH casi siempre es ácido, variando entre 4,5-7.

## 2.5 Situación global de producción

Una vez expuestas las técnicas relacionadas con el trabajo que se va a desarrollar, y comparar los resultados obtenidos bajo distintas condiciones y especies de algas utilizadas como recurso; resulta adecuado proceder a una reflexión sobre lo que han hecho el resto de países para explotar el potencial de esta fuente de energía.

### 2.5.1 Proyección de Asia

Debido al gran número de especies de algas que se encuentran en Asia (Figura 1-7), no es de extrañar que números estudios hayan sido promulgados en este continente [45].

Vietnam ha puesto en marcha proyectos para investigar la rentabilidad económica y productiva de diversos tipos de macroalgas, midiendo la cantidad de carbohidratos en porcentaje en peso de estos, estando el alga completamente seca, para estimar su calidad: *Sargassum* 48%, *Glacilaria* 45%, *Kappaphycus* 35% y *Eucheuma* 45%.

Japón comenzó a investigar la especie *Sargassum* en 2007, y ahora desarrollan el proyecto “Ocean Sunrise”, donde pretenden crear granjas de esta especie en una superficie total de 4,47 millones de kilómetros cuadrados. Se trata de una zona del mar de Japón que no tiene ninguna proyección económica. Se participa, así, en el proyecto global de combate contra las energías de combustibles fósiles con energías renovables.

Corea del Sur ha centrado sus investigaciones en la hidrólisis con enzimas, desarrollando uno que por sí solo es capaz de romper por completo las paredes celulares y obtener azúcares simples.

### 2.5.2 Ejemplos de empresas productoras

Empresas privadas investigan día a día la viabilidad de múltiples especies, buscando la mejor fórmula calidad precio. Algunos de los resultados registrados de estas investigaciones lo constituyen la laminaria *Hyperborea* y *AscophyllumNodosum*, ambas algas pardas que pueden producir metano y etanol como combustible [78].

Green Gold Algae and Seaweed Sciences Inc (GGASS), investigan sobre el modo en que se puede obtener biocombustible con macroalgas, basando su desarrollo en tecnología israelita de NoriTech Seaweed Biotechnologies Ltd, que incluye el uso de CO<sub>2</sub> para aumentar la biomasa algal para combustibles. Esta vía de aprovechamiento de residuo generado tras el proceso de fermentación, condiciona el crecimiento de cultivos, y por ende, al contenido de carbohidratos. De tener éxito, se conseguiría aumentar el bioetanol obtenido en especies con valores registrados [45].

Algenol Biofuels [79] es una compañía dedicada a la obtención de bioetanol de tercera generación a partir de algas. Esta empresa se dedica a obtener combustible a escala industrial, a base de macroalgas, luz solar, agua del mar, y CO<sub>2</sub>, haciendo ventas comerciales desde el 2009. El proceso de obtención, vincula la fotosíntesis de enzimas dentro de células vegetales, mejorando estas metabólicamente al estar a alta temperatura y salinidad, lo que aumenta su producción de bioetanol. Sus instalaciones en México, producen un galón por un coste de 3 dólares. Tienen una producción de 6000 galones al año, y consumiendo 1,5 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>, por cada 100 millones de galones producidos.

Por último, en varios lugares de Estados Unidos, surgen cada vez más estudios dedicados a desarrollar técnicas para la obtención de bioetanol a partir de algas:

En la universidad de Hawaii, el profesor Fu modificó genéticamente la especie *Synechocystis*, con la finalidad de producir etanol a partir del CO<sub>2</sub> de la fotosíntesis, utilizando una solución de aqueous cyanobacteria con energía solar en un fotobiorreactor, y obteniendo 15 mM en un tiempo de 5 días. El problema que encontró fue que el etanol en gran concentración mataba a la bacteria, poniendo así final al proceso [80].

Greenstar USA [81], produce etanol y biodiesel aprovechando la fermentación de extracto de algas sobrante después de la extracción de aceite (Figura 2-5). Por otro lado, la universidad Western Michigan también está realizando investigaciones con esta tecnología.

Teniendo en cuenta todas las peyorativas de los apartados anteriores, es innegable la proyección del bioetanol de tercera generación que utiliza como recurso las algas. Por ello, resulta necesario el desarrollo de una metodología que permita el aprovechamiento del residuo algal para la obtención de este biocombustible.

### 3 DESARROLLO DEL TFG

En este capítulo, se describe la metodología empleada para el desarrollo de este trabajo, el pretratamiento al que se somete el alga, el proceso de obtención de bioetanol a partir del residuo algal, y su posterior caracterización. El proceso conlleva una serie de etapas que serán descritas a continuación.

#### 3.1 Metodología

En este apartado se procede a exponer las distintas fases que componen la metodología del proceso, el cual, se ha llevado a cabo durante la ejecución de este trabajo. Con la finalidad de facilitar una mejor comprensión, en la Figura 3-1, se muestra un diagrama de flujo de las distintas etapas que conforman la producción de bioetanol a partir del residuo algal:

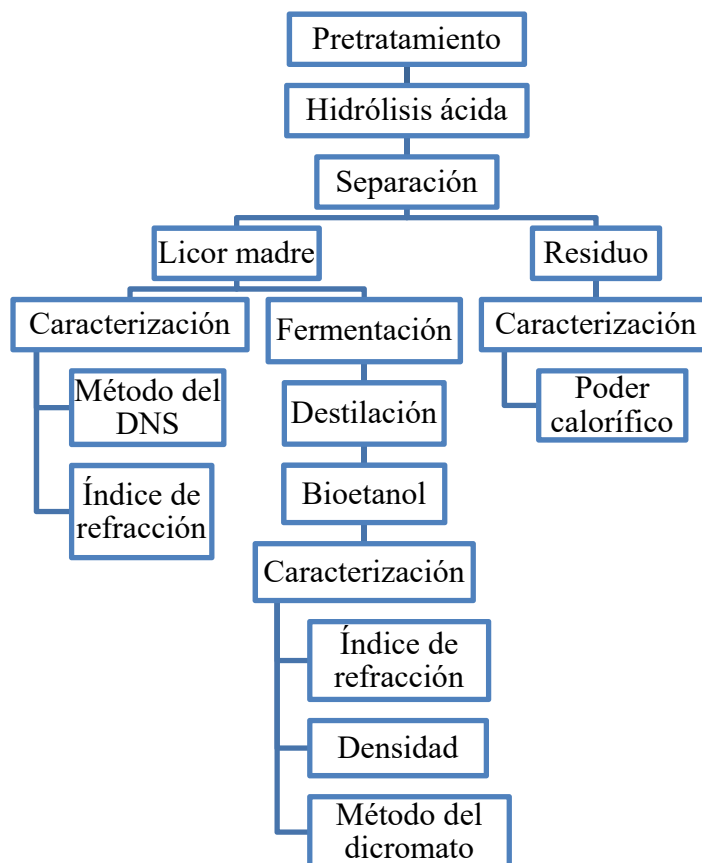


Figura 3-1 Plan de trabajo

En primer lugar, se ejecuta un pretratamiento al alga, concretamente a la variedad *Eucheuma Denticulatum Spinosum*, y a su residuo, para seguidamente poder someterlos a hidrólisis ácida, proceso que permitirá transformar la celulosa en azúcares. El producto resultante se separará en licor madre y residuo, siendo caracterizados ambos una vez obtenidos.

Por una parte, el licor madre se fermentará con el objetivo de transformar los azúcares en etanol, para posteriormente ser destilado y poder separar el bioetanol producido, siendo el último paso del proceso la caracterización del mismo.

Por otro lado, el residuo será caracterizado para estudiar su posible reaprovechamiento.

## **3.2 Pretratamiento y caracterización del alga**

Para la realización de este trabajo, se ha partido del alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum*. El alga procede de la empresa CEAMSA, ubicada en As Gandaras, en el ayuntamiento de O Porriño (Pontevedra). Dicho alga ha sido facilitada tanto en su forma original, como en forma de residuo, una vez empleada industrialmente por dicha empresa.

Previamente a la hidrólisis ácida a la que se va a someter el residuo, es necesario realizar un pretratamiento, tanto del residuo como del alga original, con el objetivo de adecuar la materia prima, de manera que la celulosa presente en las paredes celulares, sea más fácilmente atacada por el ácido, y así, obtener la mayor cantidad de glucosa posible.

### *3.2.1 Pretratamiento al residuo algal*

En el caso del residuo algal, este presenta un elevado contenido en agua debido al proceso al que se ha visto sometido para la extracción de gelificantes, por lo que se precisa realizar un secado para disminuir su contenido en humedad. Para ello, se deposita el residuo en recipientes abiertos, y se deja a temperatura ambiente durante un par de días, con el objetivo de que se pierda una gran parte del contenido de agua.

Posteriormente, con un mortero se tritura y almacena, para evitar la alteración en su contenido de humedad, a fin de que los resultados al final del proceso sean lo más uniformes posibles.

### *3.2.2 Pretratamiento al alga*

El alga, debido a su alto contenido en sales, precisa de un lavado en agua fría, para su total eliminación. A continuación, debido al contenido de humedad, se realizará una etapa de secado a temperatura ambiente, almacenando las muestras tras una semana en envases cerrados con el mismo objetivo que el residuo algal.

### *3.2.3 Determinación de la humedad*

Una vez pretratado el residuo y el alga, se medirá la humedad de cada una de las muestras, previamente al proceso de hidrólisis. Para ello se utilizará un analizador de humedad (Figura 3-2). Para ello, se deposita una pequeña muestra en un plato metálico previamente tarado, y se determina el peso final de la muestra tras ser secada con energía infrarroja.



Figura 3-2 Analizador de humedad "RADWAG MA 110.R"

### 3.2.4 Cálculo de la celulosa

Una vez realizado el pretratamiento del alga y residuo, y analizada su humedad, previamente al proceso de hidrólisis, se caracterizará la cantidad de celulosa contenida en el alga y residuo.

Este dato permitirá calcular el rendimiento de dicho proceso, así como determinar si el proceso industrial realizado por la empresa CEAMSA al alga ha afectado a su composición de celulosa.

La cantidad de celulosa presente tanto en el alga como el residuo, la cual será sometida al proceso de hidrólisis, fue medida por medio del método de Van Soest Wine [82]. Este dato permite calcular el rendimiento de dicho proceso, junto con poder determinar si el proceso industrial realizado por la empresa CEAMSA al alga, ha afectado a su composición.

En el siguiente esquema (Figura 3-3) queda detallado la metodología a seguir con este método:

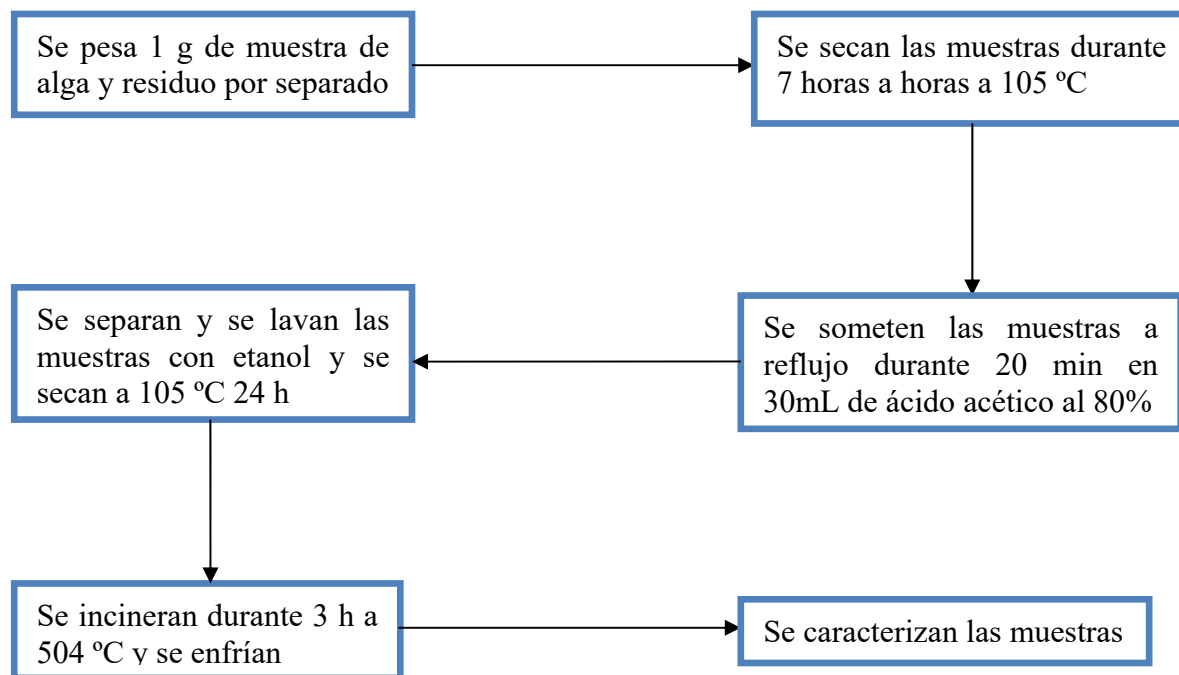


Figura 3-3 Esquema pasos a seguir para el cálculo de la celulosa

Una vez realizadas todas estas etapas, se calcula la cantidad de celulosa contenida en el alga y en su residuo mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Masa}_{1^{\circ} \text{ secado}} - \text{Masa}_{\text{incinerado}}}{\text{Masa}_{\text{muestra}}} \times 100$$

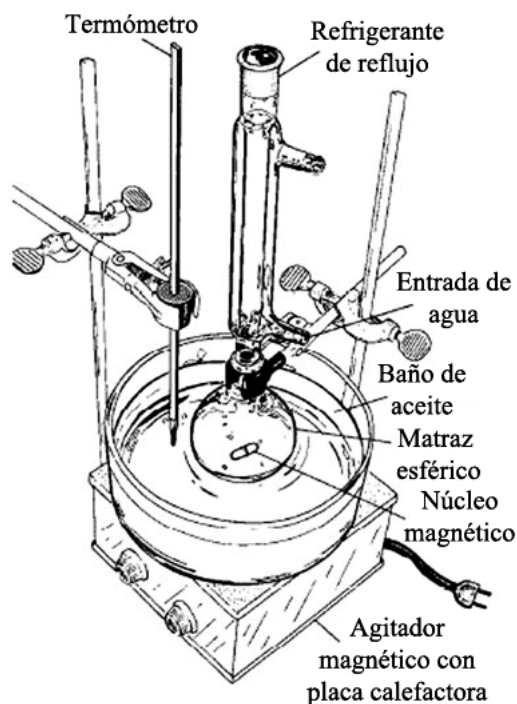
**Ecuación 3-1**

El control de masa al final de cada paso especificado en el esquema anterior, se efectúa por medio de una placa cerámica y una balanza con una precisión de  $\pm 0,001$ . Para eliminar el contenido en humedad, se utilizará una estufa (Figura 3-4) en la que se introducen las placas cerámicas con las muestras.



**Figura 3-4 Estufa “INDELAB”**

Una vez secas, se someten a reflujo. El montaje de reflujo (Figura 3-5) mantiene la reacción a temperatura constante para evitar tener pérdida alguna de disolvente, pues este se evapora y se condensa por el refrigerante del reflujo, retornando al matraz.



**Figura 3-5 Montaje a reflujo**

Pasado ese tiempo, la muestra sometida a reflujo se separa del disolvente mediante filtración a vacío, con un montaje que consta de un embudo Büchner, un matraz Kitasato y un filtro de microfibra de vidrio, en el que quedan retenidas las muestras una vez separadas.

Una vez filtradas las muestras contenidas en el filtro, se calcinarán ubicando dicho filtro en placas cerámicas, para evitar la contaminación por ceniza en el interior de la mufla; y finalmente, se dejan enfriar en un desecador (Figura 3-6) para evitar la humedad ambiental. Posteriormente, se pesarán para calcular el porcentaje de celulosa (Ecuación 3-1).



Figura 3-6 Mufla “NABERTHERM” y desecador

### 3.3 Hidrólisis ácida

Una vez pretratados y caracterizados tanto el alga como el residuo, se procede a realizar la hidrólisis ácida, con el fin de poder llevar a cabo la reacción para la producción del licor madre. Para ello, se emplearon 10 g de residuo algal en cada experiencia, y se sometieron bajo diferentes condiciones de concentración, tiempo y ratio de ácido.

Previamente a la puesta en práctica de las experiencias, resulta necesario calcular la concentración de ácido a utilizar en los ensayos, y determinar cuál utilizar. En base a la información obtenida de estudios anteriores, el ácido será el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ya que ha producido mejores resultados [60] con valores de concentración que oscilan entre el 2% y el 20% (Tabla 2-2). Partiendo de este rango, se toman 3 valores equidistantes: 3%, 5% y 7%.

Respecto del tiempo (Tabla 2-2), los valores oscilan entre los 30 y 120 minutos; por lo que si se parte de esta premisa, se vuelven a tomar 3 valores equidistantes: 35, 70 y 105 minutos.

Por último, para el establecimiento del ratio no existen datos, por lo que se parte de un rango entre el 5 y 15, tomando de nuevo 3 valores equidistantes: 5, 10 y 15 registrados del porcentaje óptimo de volumen de disolución ácida respecto de la masa de recurso (residuo algal en este trabajo).

De esta manera, para la consecución del proyecto, se han efectuado un total de 25 experiencias, reseñadas en la Tabla 3-1:



Ensayo	Tiempo (min)	Ratio (V/P)	Concentración (%)	Materia prima
Ratio 5	70	5	5	Residuo
Ratio 10	70	10	5	Residuo
Ratio 15	70	15	5	Residuo
1	35	7	5	Residuo
2	70	13	5	Residuo
3	35	10	7	Residuo
4	70	7	7	Residuo
5	105	10	7	Residuo
6	70	7	3	Residuo
7	70	13	3	Residuo
8	105	10	3	Residuo
9	35	10	3	Residuo
10	35	13	5	Residuo
11	70	10	5	Residuo
12	70	10	5	Residuo
13	70	10	5	Residuo
14	105	13	5	Residuo
15	105	7	5	Residuo
2 (II)	70	13	5	Residuo
4 (II)	70	7	7	Residuo
5 (II)	105	10	7	Residuo
16	70	7	9	Residuo
2 (III)	70	13	5	Alga
5 (III)	105	10	7	Residuo
16 (II)	70	7	9	Alga

**Tabla 3-1 Experiencias realizadas**

### 3.3.1 Ensayos

Una vez realizados los pasos previos de la hidrólisis, se procede a la realización de la misma. Para ello, en todas las experiencias, tal como se ha detallado anteriormente, se le añaden a los 10 g de residuo algal constante para todas las muestras, y se añade volumen de disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a concentración dada, en función del ratio deseado.

Se pesa la muestra de residuo de alga, y se introduce en un matraz Erlenmeyer donde se añadirá el ácido, y posteriormente será cerrado mediante un tapón de celulosa y papel de aluminio. Finalmente, la reacción a vapor (Figura 2-1) será llevada a cabo en un autoclave (Figura 3-7), configurándolo a 121 °C, un tiempo determinado.



Figura 3-7 Autoclave "P SELECTA MED 20"

La función del tapón de celulosa y el aluminio es evitar que se altere la reacción que tiene lugar en el interior del matraz, aislando del ambiente corrosivo que genera la atmósfera ácida en el interior del equipo a causa de la disolución ácida. Una vez finalizado el proceso de hidrólisis, se separa el licor madre del sólido. Para ello, existen dos posibilidades:

- **Filtración a vacío:** Que separa el licor madre del residuo para su posterior caracterización, como se ve en la Figura 3-8:

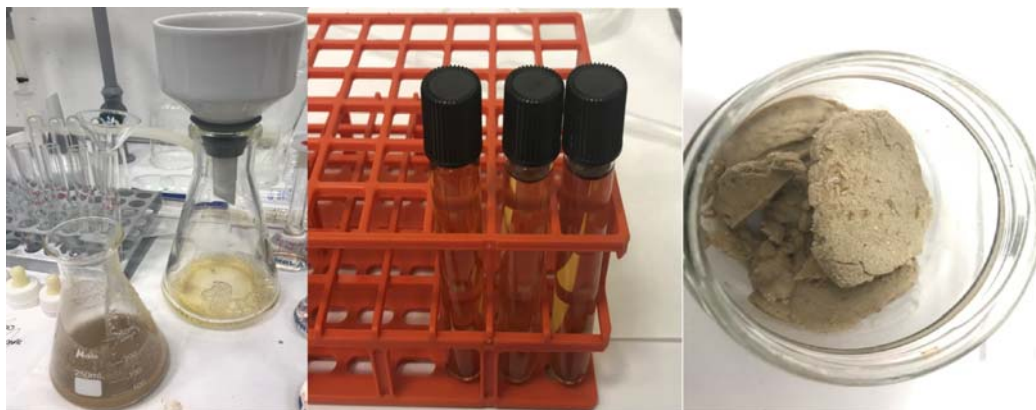


Figura 3-8 Montaje del filtrado, muestra obtenida de licor madre y residuos

- **Centrifugación:** Para ello se empleará una centrifugadora (Figura 3-9) configurada a 4000 rpm durante 4 minutos. este tipo de separación permite separar fácilmente y de forma más eficaz el licor madre del residuo sólido.



Figura 3-9 Centrifugadora "SIGMA 2-7"

La filtración a vacío ha sido utilizada en los primeros ensayos con el único propósito de caracterizar el licor madre a través de los métodos del siguiente apartado. Por otro lado, para las

últimas fases de experimentación, la centrifugación de las muestras permite extraer el mayor volumen de licor madre posible, dato necesario para concluir cuál es el mejor ensayo.

### 3.4 Caracterización del licor madre

Una vez realizada la separación, se procede a realizar la caracterización del licor madre. El objetivo de este paso del plan de trabajo, es determinar la cantidad de azúcares obtenidos y por tanto el rendimiento de la hidrólisis. Para ello, se establecen dos métodos:

- *Determinación de la glucosa por medio del índice de refracción.*
- *Determinación de la cantidad de azúcares reducidos por medio del método del DNS.*

Ambos métodos se emplearon en todos los casos, y su descripción y justificación es abordada en los siguientes apartados:

#### 3.4.1 Recta de calibrado del índice de refracción

El índice de refracción es un término de óptica de valor adimensional resultante del cociente de la velocidad de la luz en el vacío entre la velocidad de la luz en el medio. Para poder calcularlo, se usa un refractómetro (Figura 3-10), que mide el ángulo límite, siendo este la separación entre el ángulo del material y el ángulo conocido del aire [83].



Figura 3-10 Refractómetro “ABBE-REF 1”

Para construir una recta de calibrado de glucosa, se preparan 15 muestras de concentración conocida y se obtiene el índice de refracción todas ellas. La recta obtenida se representa a continuación en la Figura 3-11, junto con la ecuación asociada a la misma:

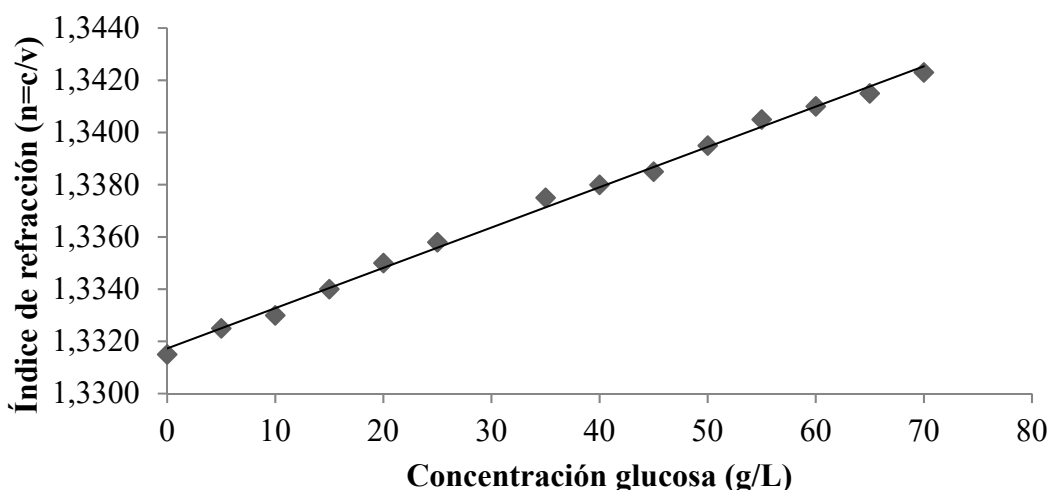


Figura 3-11 Recta de calibrado índice de refracción de la glucosa (Tabla A1-2)

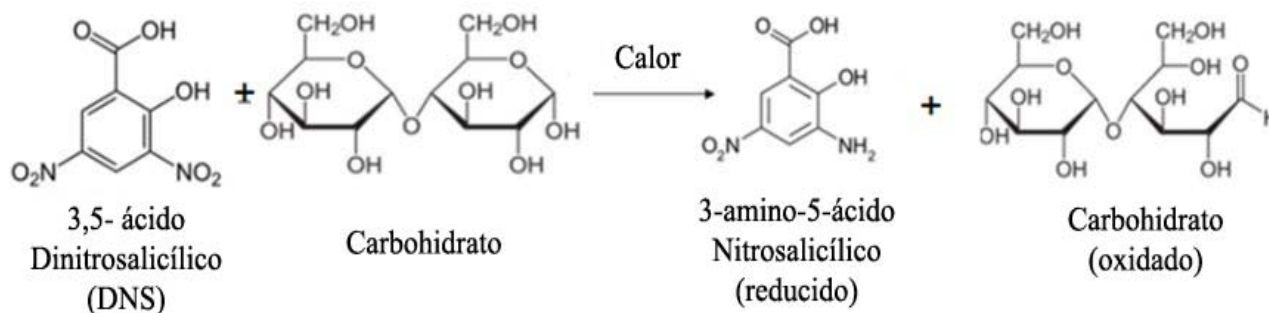
$$y = (1,54 \times 10^{-4})x + 1,33 \quad R^2 = 0,996$$

**Ecuación 3-2**

Al medir el índice de refracción de los ensayos hidrolizados de residuo algal o alga, se despeja la glucosa contenida en las muestras por medio de la ecuación obtenida a través método.

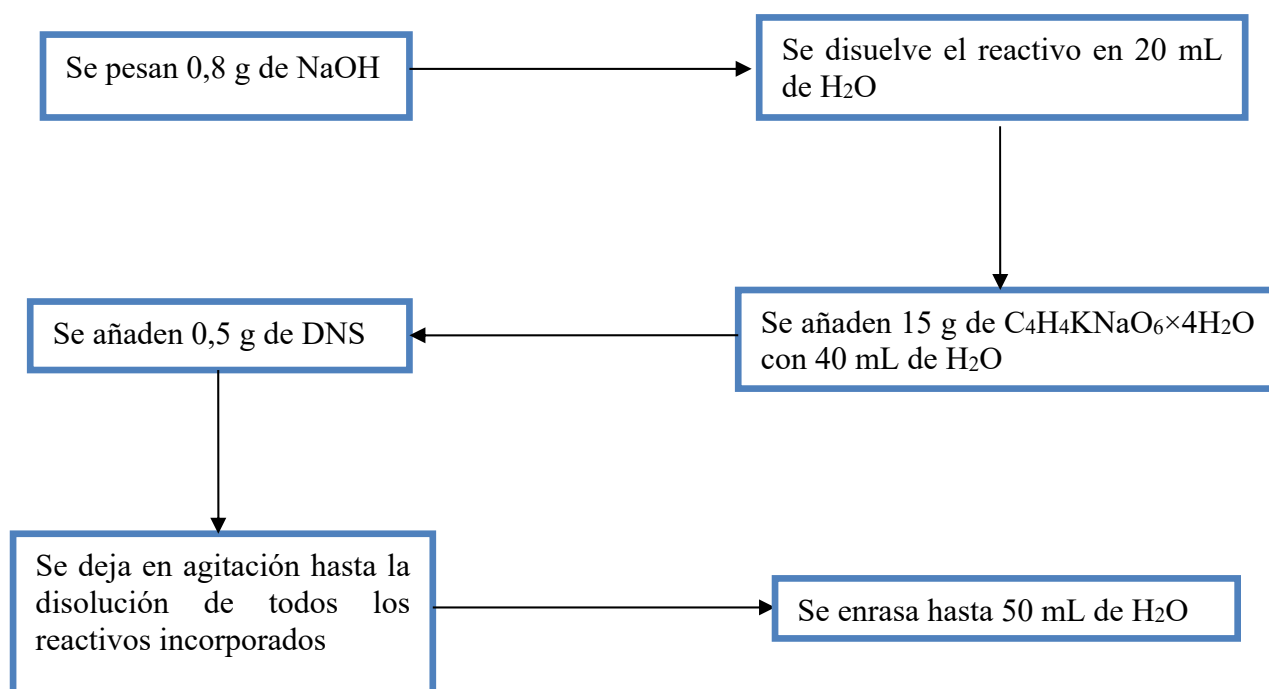
**3.4.2 Método de DNS**

Este método utiliza una técnica colorimétrica basada en una reacción de óxido-reducción (Figura 3-12), que se indica a continuación, donde el radical OH<sup>-</sup> libre en los azúcares reductores se oxida mientras se reduce el 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) cuando se calienta [84]:



**Figura 3-12 Reacción redox DNS y azúcares reductores [85]**

Se precisa de la preparación de un reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico en frío, detallando a continuación los pasos a seguir para la obtención del mismo (Figura 3-13):



**Figura 3-13 Esquema obtención del reactivo DNS**

Para efectuar esta disolución, se usa de una balanza para pesar los reactivos, junto con un agitador magnético para disolverlos.

Una vez obtenido el reactivo, se preparan 10 muestras de concentración conocida. Se vierten 0,5 mL de cada una en un tubo de vidrio que se colocarán en un baño de arena, a 100 °C durante 5 minutos.

Tras ser enfriados a temperatura ambiente, se añade a cada tubo 5 mL de agua y se agita, para poder medir su absorbancia con un espectrofotómetro (Figura 3-14) con lecturas a 540 nm. Este, tras iluminar la muestra con luz blanca, mide la cantidad de luz que es reflejada por una superficie en función de la longitud de onda, generando un espectro de reflectancia.

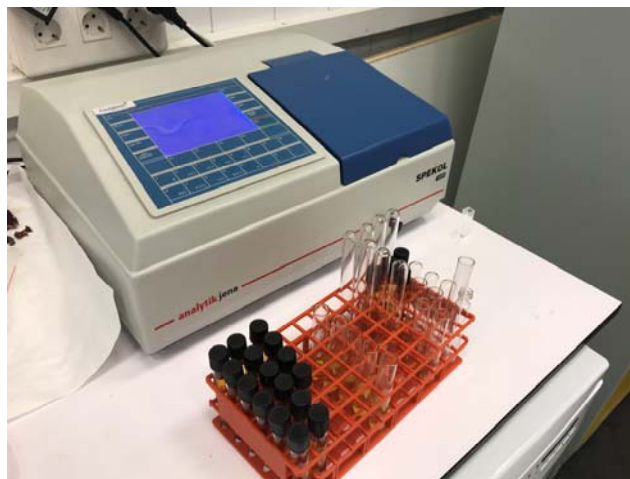


Figura 3-14 Espectrofotómetro “SPEKOL 1500”

Para obtener una mayor precisión de los resultados obtenidos en los ensayos, se han efectuado dos rectas, una de ellas para concentraciones altas (Figura 3-15), y otra para concentraciones bajas (Figura 3-16). A continuación, se representan tanto las gráficas como las ecuaciones asociadas a las mismas:

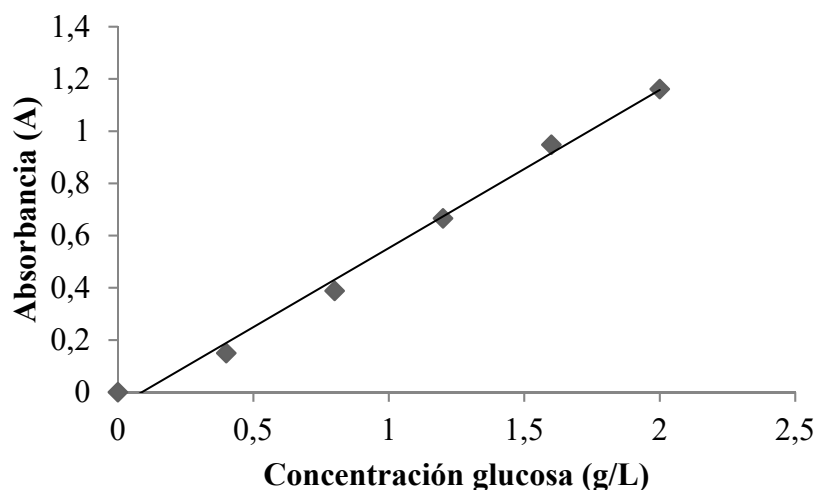


Figura 3-15 Recta de calibrado DNS 0-2 (Tabla A1-4)

$$y = 0,605x - 0,053 \quad R^2 = 0,992$$

**Ecuación 3-3**

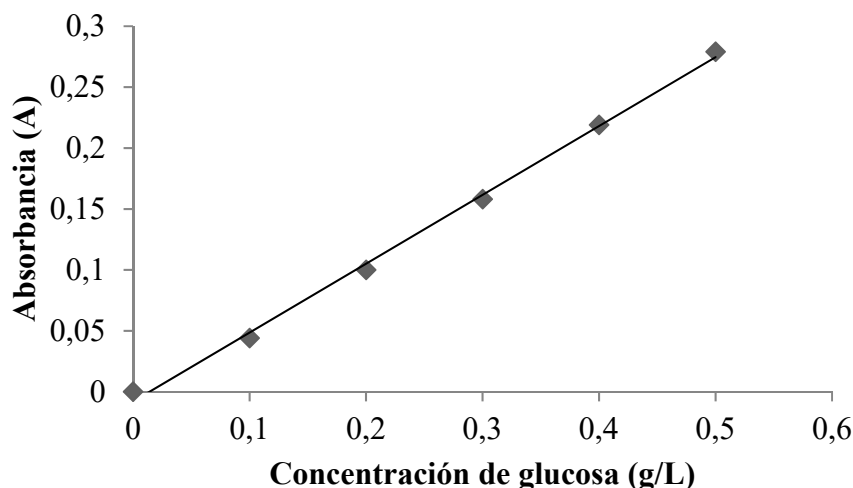


Figura 3-16 Ajuste recta calibrado DNS 0-0,5 (Tabla A1-4)

$$y = 0,565x - 0,008 \quad R^2 = 0,993 \quad \text{Ecuación 3-4}$$

Si se tiene en cuenta el cálculo de la cantidad de celulosa de las muestras de residuo y alga (Ecuación 3-1), y se hace la suposición de que la cantidad total de glucosa es equivalente a la masa de celulosa calculada, se puede obtener el rendimiento de la hidrólisis a través de los azúcares reducidos de la siguiente manera:

$$Celulosa_{Disponible}(g) = Glucosa_{teóricamente\ obtenida}(g) \quad \text{Ecuación 3-5}$$

$$Azúcares\ reducidos\ (mg) = Concentración_{DNS} \left( \frac{mg}{ml} \right) \times Volmen_{ensayo}\ (ml) \quad \text{Ecuación 3-6}$$

$$Rendimiento\ (\%) = \frac{Cantidad\ de\ azúcares\ reducidos\ (g)}{Glucosa_{teóricamente\ obtenida}\ (g)} \times 100 \quad \text{Ecuación 3-7}$$

### 3.5 Fermentación

Una vez caracterizado el licor madre, se procede a realizar la fermentación. Este proceso radica en la transformación de los azúcares presentes en el licor madre en etanol. Para poder llevar a cabo este proceso, se precisa de un medio inóculo y un concentrado de nutrientes.

El inóculo es un conjunto de microorganismos o células que garantizan las condiciones idóneas para la fermentación, mientras que el concentrado de nutrientes es el alimento de los microorganismos del inóculo durante la fermentación. De este modo, es posible obtener etanol, agua y dióxido de carbono al final del proceso.

Para la preparación del inóculo, se necesita una solución de 3 g de glucosa, 2 g peptona y 1 g de extracto de levadura, que se pesan en un vaso de precipitados con una balanza, y se disuelven con un agitador magnético para luego esterilizarlos durante 15 minutos a 121 °C. Una vez esterilizado, se deja enfriar y se añaden 0,5 g de levadura fresca *Saccharomyces cerevisiae*, por su capacidad de crecer tanto en ambientes anaerobios como aeróbicos [86].

Para la preparación del concentrado de nutrientes, se pesan 15 g peptona y 7,5 g de extracto de levadura, se disuelven en 20 mL de agua y se enrasa hasta 50 mL. Este matraz se esteriliza 15 minutos a 121 °C.

Ambos se prepararán simultáneamente, para finalmente introducirlos en un incubador (Figura 3-17) con agitación orbital durante 24 horas a 30 °C y 120 rpm, como se observa en la siguiente imagen.



**Figura 3-17 Incubador “OVAN” con inóculo y concentrado de nutrientes en su interior**

Tras la separación del licor madre de cada ensayo de hidrólisis, se determina el volumen obtenido, que indicará la cantidad de medio inóculo y concentrado de nutrientes que se debe añadir para la fermentación según las siguientes ecuaciones. Adicionalmente, se realizó un ensayo disminuyendo estos volúmenes a la décima parte para cuantificar la influencia de ambos en el rendimiento de la fermentación:

$$V_{\text{Inóculo}} = \frac{V_{\text{Hidrolizado}}}{10} \quad \text{Ecuación 3-8}$$

$$V_{\text{Concentrado nutrientes}} = \frac{V_{\text{Hidrolizado}}}{15} \quad \text{Ecuación 3-9}$$

Previo a este paso, es necesario ajustar el pH hasta que se alcancen un valor comprendido entre 4,5 y 5. Para ello, se utiliza una disolución de hidróxido sódico (NaOH) 5M, con objeto de reducir la acidez del licor madre resultante tras la hidrólisis hasta valores adecuados para la fermentación.

Una vez preparada, se ajusta el pH del licor madre con la disolución de hidróxido sódico en el matraz. La lectura se hace utilizando un pHmetro (Figura 3-18), hasta que este alcance el valor deseado.



**Figura 3-18 Medidor “HANNA CHECKER DIGITAL PH METER”**

Una vez ajustado el pH del licor madre resultante, se le añade un 10% de volumen de medio inóculo y un quinceavo de volumen del concentrado de nutrientes a la muestra respecto del volumen

hidrolizado de cada ensayo, y se tapan los matraces con un airlock (Figura 3-19), que contiene agua en su interior. La finalidad de este, no es otra que proteger los ensayos contra la oxidación y la contaminación, además de expulsar el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) liberado durante la fermentación del etanol.



Figura 3-19 Airlock

Se introducen los matraces en el incubador (Figura 3-17), configurándolo 24 horas a 120 rpm con una temperatura de 30 °C. Al finalizar la fermentación, se puede pasar al último paso necesario para la obtención de bioetanol: La destilación.

### 3.6 Destilación

Finalmente, para separar el bioetanol producido se lleva a cabo una destilación. Para ello, se utiliza un equipo de destilación simple como el que se puede ver en la Figura 3-20.

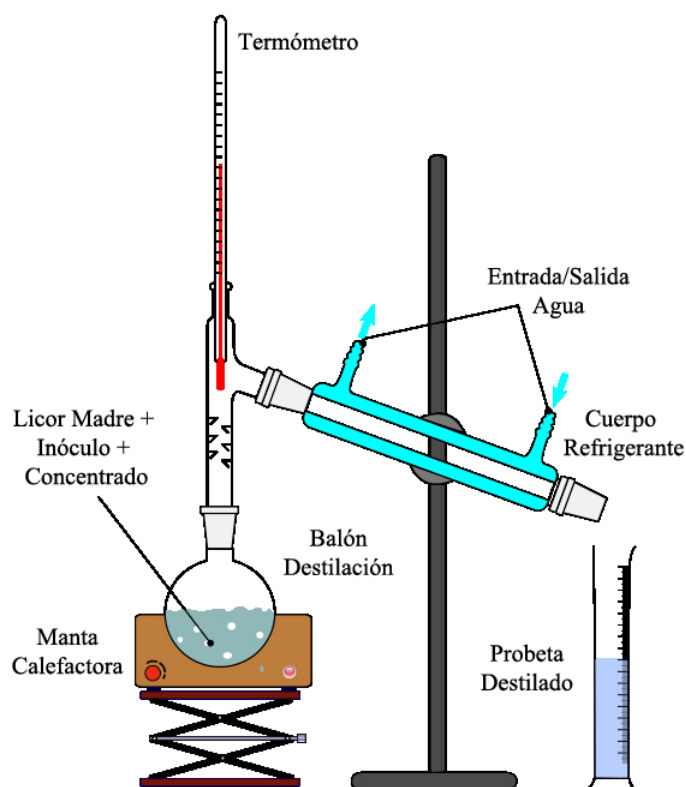


Figura 3-20 Montaje de destilación simple

El resultado de la fermentación se vierte en su totalidad en un balón de 250 mL con perlas de vidrio en su interior, para que las burbujas que se formen no asciendan con el vapor de destilado, contaminando el producto de la destilación. Este balón, se introduce en una manta calefactora “NAHITA SERIE 655”, encargada de aportar calor a la muestra. La cabeza de destilación contiene una salida al tubo refrigerante, y también un termómetro. Dicho termómetro mide la temperatura del



destilado, de manera que si esta llega a alcanzar una temperatura muy próxima a 100 °C, se descartaría dicha destilación, ya que en ese caso se estaría destilando mayoritariamente agua.

Por otro lado, el tubo refrigerante condensa los vapores liberados en el interior del balón, gracias a una entrada y salida de agua a contracorriente. A la salida del tubo, un goteo constante cae en un matraz Erlenmeyer.

La destilación se mantuvo mientras la temperatura no alcanzaba los 95 °C, con el objetivo de evitar llegar a obtener un producto destilado de mala calidad, con presencia de moléculas de H<sub>2</sub>O.

### 3.7 Caracterización del bioetanol

Una vez finalizado el proceso, resulta necesario saber la cantidad de bioetanol obtenida en el proceso. Para ello, se plantean tres métodos:

- *Método de la densidad.*
- *Método del índice de refracción.*
- *Método del dicromato.*

Estos tres métodos se usan indistintamente en la bibliografía [85], para la caracterización del bioetanol. Además, esto permite poder efectuar una comparativa de los resultados obtenidos con cada método, y por tanto, llegar a conclusiones más precisas y fehacientes.

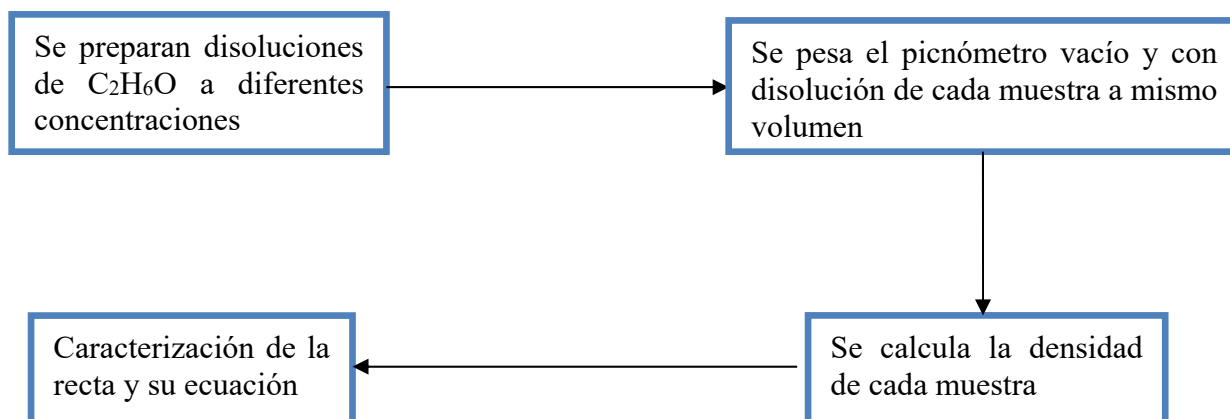
#### 3.7.1 Método de la densidad

El objeto de este método es determinar la concentración de las muestras destiladas. Se basa en la medida de la densidad por método del picnómetro, un instrumento calibrado a 10 mL [87]:

Si se supone que la destilación es ideal, la masa total sería equivalente al sumatorio de la masa del agua y la masa del etanol, y por lo tanto, se puede despejar el volumen de bioetanol destilado a través de la siguiente ecuación:

$$V_{etanol}(mL) = \frac{m_t(g) - (10mL \times \rho_{H_2O} \left(\frac{mg}{ml}\right))}{\rho_{etanol} \left(\frac{mg}{ml}\right)} \quad \text{Ecuación 3-10}$$

Se plantea obtener una recta de calibrado con diferentes densidades obtenidas en las diferentes concentraciones volumen/volumen de etanol y agua. En la siguiente Figura 3-21, se exponen los pasos a seguir para la obtención de la misma:



**Figura 3-21 Esquema pasos del método de la densidad**

Para efectuar el control de masas, se utiliza una balanza configurada con una precisión de ±0,001.

En la Figura 3-22, se muestra la recta obtenida tras la caracterización, junto con la ecuación de la misma:

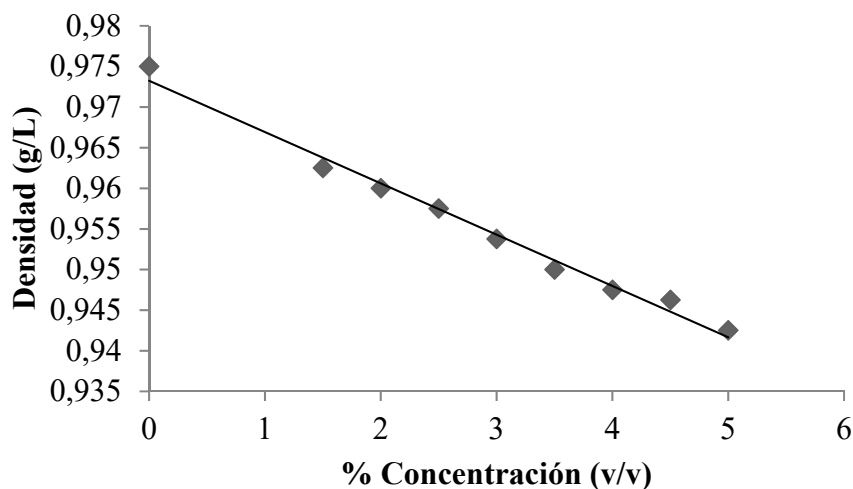


Figura 3-22 Recta de calibrado de la densidad (Tabla A2-2)

$$y = -0,006x + 0,973 \quad R^2 = 0,962$$

**Ecuación 3-11**

En esta recta, se ha omitido la representación del punto de concentración 96% de etanol, para facilitar su interpretación. El valor de densidad del agua destilada difiere de 1 por el error que posee la báscula en la que se pesó el picnómetro.

### 3.7.2 Método del índice de refracción

Este método es equivalente al que se hizo con la glucosa para su recta de calibrado en el apartado:

Tomando las mismas muestras preparadas para el método de la densidad, se mide el índice de refracción de cada una de ellas con un refractómetro, tomando una gota de cada, y así, obtener la recta de calibrado; siendo la recta del método la que se representa en la Figura 3-23, y la ecuación a continuación:

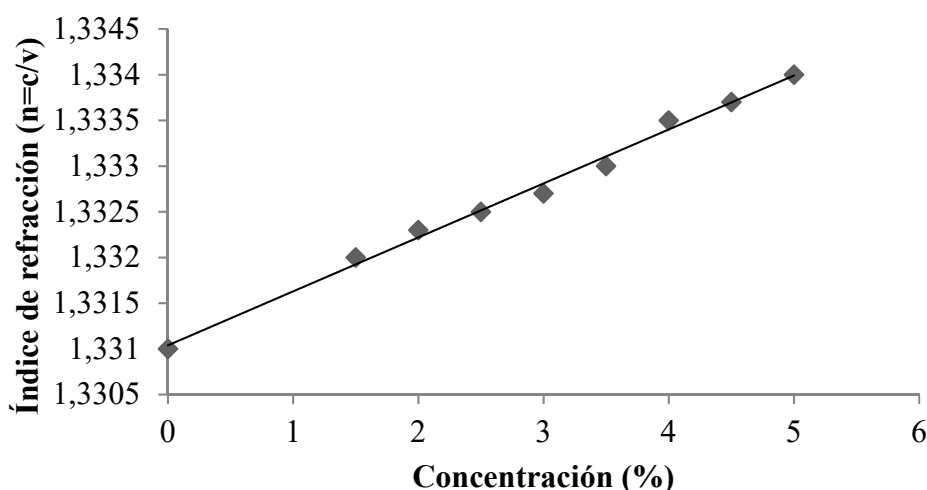


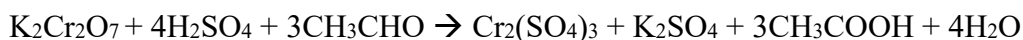
Figura 3-23 Recta de calibrado índice de refracción del etanol (Tabla A2-3)

$$y = 0,0005x + 1,331 \quad R^2 = 0,993$$

**Ecuación 3-12**

### 3.7.3 Método del dicromato

El método del dicromato de potasio [88], es una técnica colorimétrica basada en una reacción de óxido-reducción, que se indica a continuación, que reconoce la cantidad de etanol de una muestra gracias a la oxidación del mismo, como consecuencia de la reducción del dicromato al aplicar calor:



En la Figura 3-24 se exponen los pasos a seguir para la obtención de la misma:

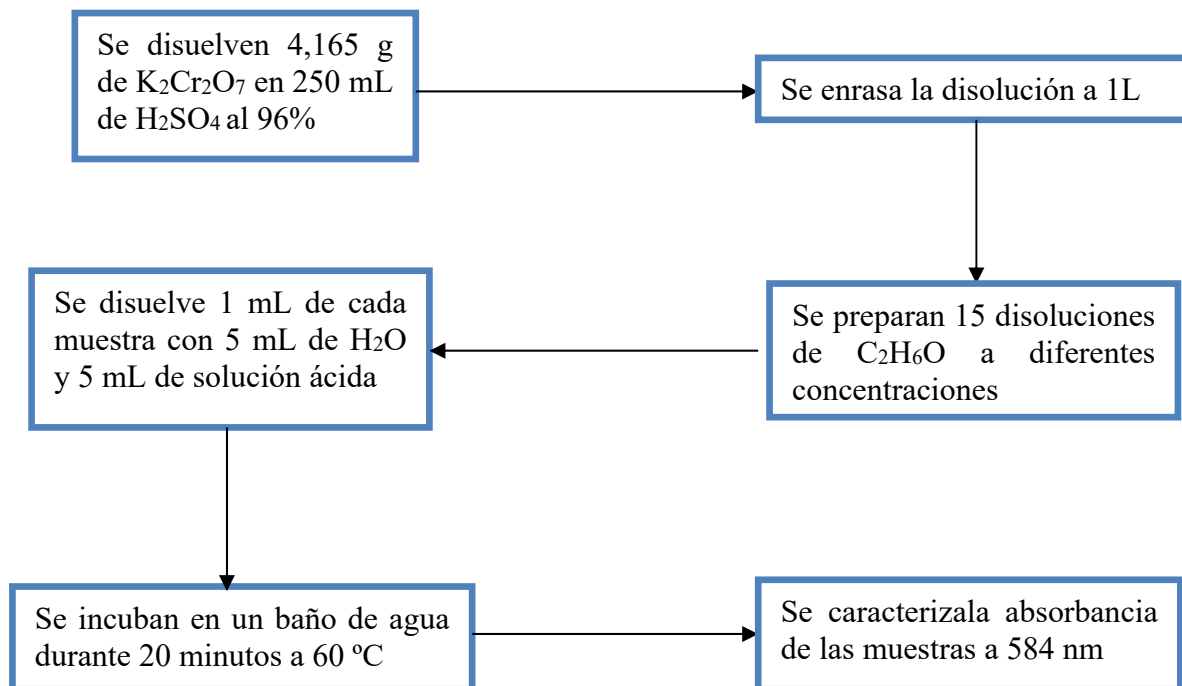


Figura 3-24 Esquema pasos del método del dicromato

Respecto a los resultados obtenidos, hay que destacar que el aumento cuantitativo se produce en el punto de concentración 1% en volumen, algo que coincide con el cambio de colores de las muestras, como se ve en la Figura 3-25, donde el amarillo es la muestra utilizada como blanco, el verde es el punto de concentración 0,5%, y el azul el de concentración 1%.



Figura 3-25 Muestras método del dicromato

Para una mayor precisión de los resultados a obtener por este método, se plantean dos rectas, con sus dos ecuaciones correspondientes: Una primera de 0-1% (Figura 3-26) y la otra de 0-11% (Figura 3-27).

El motivo por el que ambas gráficas no poseen el punto 0, es por culpa del gran cambio de coloración es casi inapreciable con una ínfima cantidad de etanol (Figura 3-25), evitando provocar errores en el apartado de resultados:

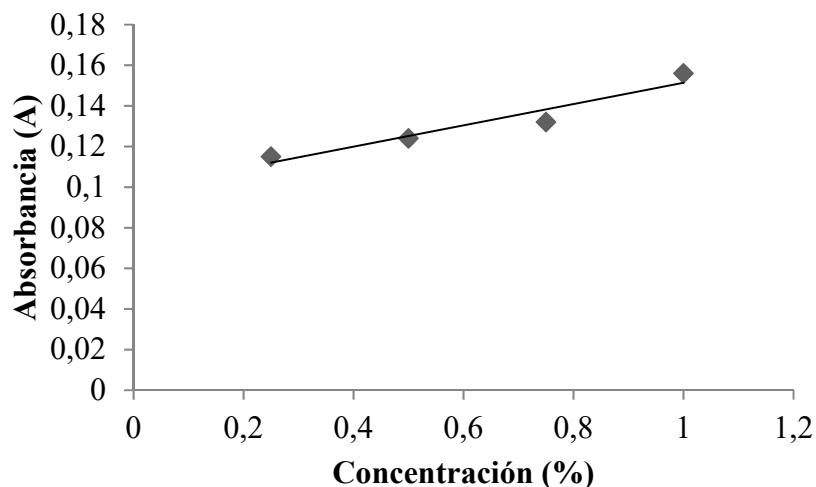


Figura 3-26 Recta de calibrado del dicromato 0-1 (Tabla A2-5)

$$y = 0,052x + 0,99$$

$$R^2 = 0,998$$

**Ecuación 3-13**

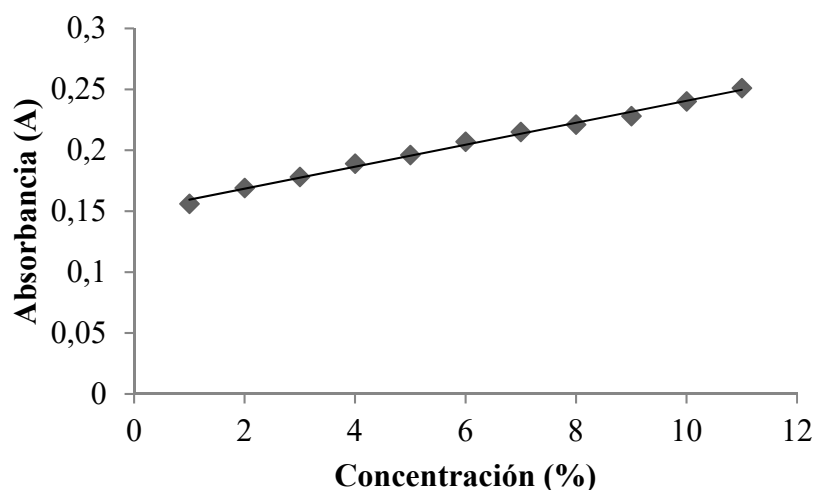


Figura 3-27 Recta de calibrado del dicromato 0-11 (Tabla A2-5)

$$y = 0,009x + 0,150$$

$$R^2 = 0,995$$

**Ecuación 3-14**

### 3.7.4 Rendimiento del bioetanol y la fermentación

Una vez hallada la masa y el volumen de bioetanol que se ha destilado de cada ensayo, por medio de los métodos descritos en los apartados anteriores; se puede calcular el rendimiento del bioetanol, definiendo este como la cantidad de etanol producida a partir del recurso utilizado:

$$\text{Rendimiento (g/g)} = \frac{\text{Volumen}_{\text{hidrolizado}}(\text{L}) \times \text{Concentración}_{\text{bioetanol}}(\text{g/L})}{10 \text{ g de materia prima}}$$

**Ecuación 3-15**

Junto con este rendimiento, también se puede parametrizar el rendimiento que ha tenido la fermentación, efectuando un cociente de la biomasa generada a partir de la cantidad de sustrato utilizado, donde el producto de etanol es el peso del volumen destilado de bioetanol, y el sustrato no es

más que la cantidad de azúcares consumidos, coinciden con los reducidos que se calcularon por medio del DNS, que se recogen en el apartado de resultados:

$$Y_{P/s} = \frac{\text{Producto de etanol}(g/g)}{\text{Consumo de sustrato}(g)} \quad \text{Ecuación 3-16}$$

La temperatura, pH, concentración de oxígeno y las fuentes de carbono y nitrógeno afectarán notablemente al resultado, pudiendo comparar, en este trabajo, si la cantidad de sustrato afecta o no al rendimiento.

### 3.7.5 Turbidez y coloración

Para el cálculo de la nitidez se ha empleado la norma UNE-EN 15769 [89], se determina la nitidez del bioetanol midiendo la turbidez o grado de opacidad, comparando las muestras con agua destilada y etanol al 96% de pureza. Se utiliza un turbidímetro (Figura 3-28) previamente calibrado con la disolución que viene con el equipo.



**Figura 3-28 Turbidímetro marca “Butech” modelo “LW-TN3024 X5”**

Para obtener un resultado en NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez), el equipo mide las partículas que se encuentran en suspensión en una muestra de 10 mL previamente introducida en el mismo. Esta medición la efectúa con un haz de luz y un detector a 90° del haz, de manera que a mayor densidad de partículas, menor será la luz reflejada, y por tanto más elevado el valor en NTU de la muestra.

En cuanto a la coloración, la norma UNE-EN 15769 [89], establece que se comparen visualmente muestras de agua destilada con las de bioetanol, utilizando fondo blanco y negro para la inspección y posterior interpretación de resultados.

## 3.8 Caracterización del residuo

El residuo generado tras la separación del licor madre después de la hidrólisis ácida, ha sido caracterizado por el laboratorio de caracterización de residuos biomásicos de la Universidad de Badajoz, a través de la metodología descrita a continuación.

### 3.8.1 Preparación de las muestras

En primer lugar, se seleccionaron de forma aleatoria muestras del residuo para su secado, estableciendo previamente el contenido de humedad. Debido al tamaño del residuo, no fue necesario su triturado, siendo idóneo para su manipulación y homogenización.

Luego, se distribuyó la muestra formando una hilera de la misma que tendría una dimensión de 1 m de largo por 0,15 m de ancho, de dicha hilera se extrajeron fracciones de 0,15 m alternas y se

procedió a su mezcla, obteniendo de dicha mezcla la cantidad necesaria para la realización de los análisis solicitados.

### 3.8.2 Caracterización de la humedad

Se secaron las muestras en una estufa a 105 °C hasta pesada constante. La pérdida de masa de expresada en % es el contenido de humedad. El procedimiento se ejecutó conforme a la norma UNE-EN 14774- 2 [90].

### 3.8.3 Análisis elemental

Se determinó el contenido en porcentaje en peso de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre mediante un equipo “TRUE SPEC LECO CHNS MOD 4084”, analizando los gases de combustión por rayos infrarrojos, de acuerdo a la norma UNE-EN 15104 [91].

### 3.8.4 Análisis inmediato

Expresado también en porcentaje en peso, se estiman los siguientes valores:

Las cenizas contenidas tras calcinación de las muestras a 815 °C, basando el procedimiento en la combustión de la biomasa de acuerdo a la norma UNE-EN 15403 [92].

El contenido en volátiles a 900 °C en una atmósfera pobre en oxígeno gracias a crisoles con tapaderas, ejecutando el procedimiento de acuerdo a la norma UNE-EN 15148 [93].

Por último, el carbono fijo se calcula por diferencia de los contenidos de cenizas, humedad y volátiles respecto del peso original de la muestra.

### 3.8.5 Poder calorífico en base seca

El límite superior (PSC) se determina por medio de una bomba calorimétrica “PARR 1351”, en la que una combustión de la biomasa se ejecuta a presión de oxígeno de 30 bar, midiendo la temperatura del agua en el equipo antes y después de la combustión, según la norma UNE-EN 14918 [94].

El límite inferior se obtiene restando el PSC al calor de vaporización del agua a partir del hidrógeno elemental:

$$PCI_S = PCS_S - 5400H \quad \text{Ecuación 3-17}$$

### 3.8.6 Poder calorífico en base húmeda

El límite superior (PSC) se calcula con el mismo procedimiento que en el apartado anterior, pero sin secar previamente la muestra.

El límite inferior se obtiene restando el PSC al calor de vaporización del agua a partir del hidrógeno elemental y del agua que acompaña:

$$PCI_H = PCS_H - 5400H - 600X \quad \text{Ecuación 3-18}$$

### 3.8.7 Análisis de elementos inorgánicos

A partir de la calcinación a 815 °C, se utiliza la técnica de Fluorescencia de rayos X por dispersión de longitud de onda WDXRF, gracias al equipo “BRUKER MODELO S8 TIGER”.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterización del alga

Según lo descrito en apartados anteriores, se caracteriza tanto el alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* como su residuo a través de la determinación de la humedad y el cálculo de la celulosa contenida en ambos.

#### 4.1.1 Caracterización de la humedad

La humedad de las muestras tanto del alga como del residuo algal fueron caracterizadas para cada ensayo previamente a la hidrólisis de los mismos. En la Tabla 4-1 se recogen los valores obtenidos para cada uno (Tabla 3-1), donde se puede observar que los valores varían entre 2,8 y 6,9% para el residuo algal. El valor para el alga es mucho mayor, en torno a un 17%.

Ensayo	Humedad (%)	Ensayo	Humedad (%)	Ensayo	Humedad (%)
<b>Ratio 5</b>	2,832	<b>7</b>	4,286	<b>15</b>	4,717
<b>Ratio 10</b>	2,832	<b>8</b>	6,957	<b>2 (II)</b>	3,334
<b>Ratio 15</b>	2,832	<b>9</b>	5,612	<b>4 (II)</b>	3,334
<b>1</b>	4,717	<b>10</b>	4,054	<b>5 (II)</b>	3,334
<b>2</b>	5,612	<b>11</b>	5,612	<b>16</b>	3,334
<b>3</b>	6,957	<b>12</b>	4,054	<b>2 (III)</b>	16,837
<b>4</b>	4,054	<b>13</b>	4,054	<b>5 (III)</b>	4,521
<b>5</b>	4,717	<b>14</b>	4,717	<b>16 (II)</b>	16,837
<b>6</b>	4,286				

Tabla 4-1 Valores de humedad

Una vez se analizan los porcentajes de humedad, se extrapola como conclusión que el pretratamiento de secado que se efectuó al residuo algal ha sido efectivo, además de que su almacenaje en un envase herméticamente cerrado ha favorecido a no alterar en gran medida la cantidad de vapor de agua presente en él. Junto con ello, se puede afirmar que la humedad en el residuo algal no será un factor que vaya a alterar en gran medida los resultados tras hidrolizar cada ensayo.

Por otro lado, se aprecia por los valores del alga que la cantidad de vapor de agua contenido en ella sí que es significativa con respecto al residuo, pues el secado del residuo es más sencillo debido al menor tamaño de partícula.

#### 4.1.2 Caracterización de la celulosa

Una vez calculada la humedad, se pasa a caracterizar la cantidad de celulosa contenida en el alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* y su residuo, haciendo el control de pesos pertinente y aplicando la Ecuación 3-1, obteniendo los resultados planteados en la Tabla 4-2:

Muestra	Masa (g)	1ºsecado (g)	Reflujo y secado (g)	Incinerado (g)	Celulosa (%)
Residuo	1	0,985	0,805	0,615	37
Alga	1	0,825	0,17	0,055	77

Tabla 4-2 Resultados cálculo de celulosa

Como conclusión al resultado obtenido, se aprecia que sí existe una gran diferencia entre ambos a la vista de la Figura 4-1, pero también se da el caso en términos de resultados obtenidos tras el cálculo, pues el proceso industrial al que se somete al alga en la empresa CEAMSA ha provocado la pérdida del doble de celulosa, y por tanto de glucosa, que puede llegar a repercutir en el resultado del proceso de obtención de bioetanol.



Figura 4-1 Alga y residuo antes y después del proceso

Si se compara el porcentaje de celulosa del alga roja *Eucheuma Denticulatum Spinosum*, con el de investigaciones anteriores, en donde los valores registrados son del 70% de contenido de celulosa [95], se puede verificar que los resultados obtenidos en este trabajo están dentro del orden de magnitud de los de otros estudios.

De hacer la comparativa con otras especies, su contenido sigue siendo superior: El alga verde *Ulva lactuca* posee solo un 9% de celulosa [96], y el alga parda *Sargassum*, posee un 41,61% [97].

Por ello, se demuestra que las algas rojas son más idóneas que otras macroalgas para la obtención de bioetanol, corroborando los estudios previos otros autores [40].

#### 4.2 Establecimiento de las condiciones iniciales

Una vez decididos los parámetros a optimizar (concentración, tiempo y ratio), se plantea la siguiente premisa: Se conoce que el rango la concentración adecuado para el proceso, según investigaciones anteriores, se encuentra entre el 3%-20%, y el tiempo varía desde 20 minutos hasta las 2 horas (Tabla 2-2), pero el ratio (volumen de ácido/masa de materia prima) es desconocido.

Conociendo, pues, los rangos de la concentración a utilizar, tomando 3 valores equidistantes: 3%, 5% y 7%; y el tiempo, donde se vuelven a tomar 3 valores equidistantes (35min, 70min y 105min), solo falta por calcular cuáles serán los ratios a preparar.



Por ello, se decide proceder, en primer lugar, a tres experiencias, con ratios 5, 10 y 15. De este modo es posible estimar el rango de valores entre los que se encontrará el ratio óptimo.

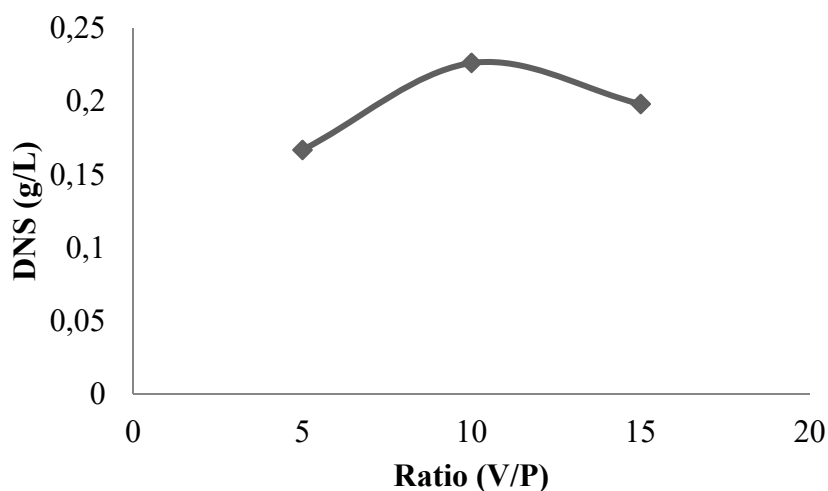
En la siguiente tabla, se muestran los resultados de las concentraciones de glucosa y azúcares reducidos de los ensayos de la caracterización del licor madre, obtenidos con las rectas de calibrado correspondientes (Ecuación 3-2, Ecuación 3-4):

Experiencia	Índice de refracción (n=c/v)	Concentración g/L (glucosa/agua)	Absorbancia (A)	DNS(g/L)
<b>Ratio 5</b>	1,338	46,784	0,048	0,167
<b>Ratio 10</b>	1,339	52,631	0,084	0,226
<b>Ratio 15</b>	1,34	58,480	0,067	0,200

**Tabla 4-3** Desglose de datos para optimizar ratio

Se llega a la conclusión de que el índice de refracción no es significativo para determinar si el rango de ratios es óptimo o no, pues son valores crecientes en todo momento, directamente proporcional al aumento del ratio. Junto con esta premisa, el índice de refracción presenta una mayor imprecisión por la ínfima diferencia de una concentración a otra.

Sin embargo, el método del DNS, se muestra más cuantitativo y preciso, variando en mayor medida de una concentración a otra, a pesar del bajo valor de la absorbancia (A). Por ello, se representan los valores de la cantidad de azúcares reducidos (DNS) de las muestra, lo que otorga un resultado similar a una parábola invertida donde el máximo se encuentra en torno a 10:



**Figura 4-2** Gráfica Ratio frente a DNS (Ecuación 3-4)

En base a esto, se modifican los valores de la relación entre el volumen de disolución ácida y la cantidad de residuo algal a introducir en los parámetros a optimizar. De este modo, como resultado final, las combinaciones de variables serían las siguientes (Tabla 4-4):

Equivalencia	Tiempo (min)	Ratio(V/P)	Concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)
<b>-1</b>	35	7	3
<b>0</b>	70	10	5
<b>1</b>	105	13	7

**Tabla 4-4** Parámetros con los que optimizar

### 4.3 Resultado y análisis de los ensayos de hidrólisis ácida

La metodología del diseño de superficie de respuesta utiliza técnicas de diseño de experimentos (DOE) para obtener curvaturas que permitan parametrizar la mayor o menor influencia de una serie de variables en una experiencia dada. Esta, difiere del diseño factorial por el empleo de valores cuadráticos, lo que da lugar a la curvatura de las superficies, buscando la optimización de los valores establecidos. Existen dos diseños de respuesta: Los centrales compuestos, y los de Box-Behnken. Este último será el utilizado en este trabajo para el modelado usando el software Statistica. Gracias al software Statistica, se obtiene una matriz de ensayos a realizar para la optimización de la hidrólisis, que ofrece el siguiente código de combinaciones con la equivalencia indicada en la tabla anterior:

Ensayo	Tiempo (min)	Ratio (V/P)	Concentración (%)
1	-1	-1	0
2	0	1	0
3	-1	0	1
4	0	-1	1
5	1	0	1
6	0	-1	-1
7	0	1	-1
8	1	0	-1
9	-1	0	-1
10	-1	1	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	1	1	0
15	1	-1	0

Tabla 4-5 Matriz de ensayos

Con el objetivo de establecer las condiciones más adecuadas para el proceso de hidrólisis ácida se realizaron una totalidad de 15 ensayos variando las condiciones de operación en función de los valores establecidos por Statistica (Tabla 4-6):

Ensayo	Tiempo (min)	Ratio (V/P)	Concentración (%)	Índice refracción (n=c/v)	Absorbancia (A)
1	35	7	5	1,3405	0,1030
2	70	13	5	1,3390	0,1100
3	35	10	7	1,3415	0,0860
4	70	7	7	1,3420	0,1280
5	105	10	7	1,3410	0,1210
6	70	7	3	1,3370	0,0560
7	70	13	3	1,3360	0,0360
8	105	10	3	1,3360	0,0520
9	35	10	3	1,3360	0,0360
10	35	13	5	1,3400	0,0550
11	70	10	5	1,3405	0,1010
12	70	10	5	1,3405	0,0800
13	70	10	5	1,3405	0,0820
14	105	13	5	1,3400	0,0800
15	105	7	5	1,3410	0,0860

Tabla 4-6 Resultados matriz de ensayos

Además, en la Tabla 4-6 se recogen los resultados de índice de refracción y absorbancia, así como las condiciones de operación, de cada uno de los ensayos:

Teniendo en cuenta las rectas de calibrado de índice de refracción y DNS (Ecuación 3-2, Ecuación 3-4), se calcula la concentración de glucosa y azúcares reducidos en cada ensayo, siendo los resultados obtenidos los planteados en la siguiente tabla:

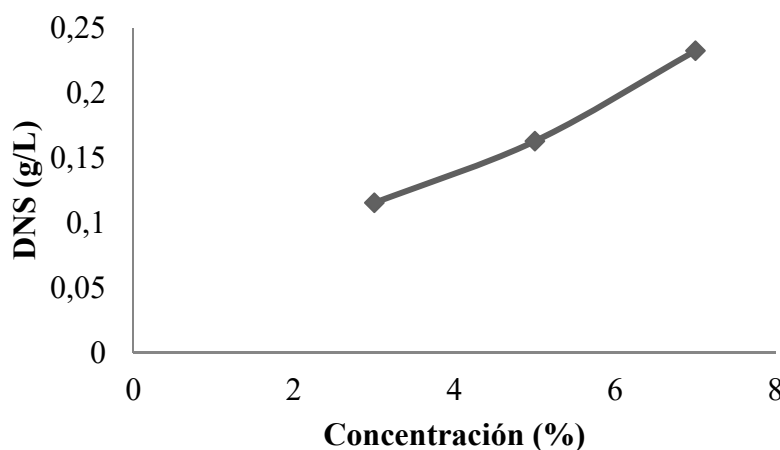
Ensayo	Glucosa (g/L)	DNS(g/L)	Ensayo	Glucosa (g/L)	DNS (g/L)
1	61,404	0,257	9	35,088	0,147
2	52,632	0,269	10	58,480	0,178
3	67,252	0,229	11	61,404	0,255
4	70,175	0,299	12	61,404	0,219
5	64,328	0,287	13	61,404	0,223
6	40,936	0,180	14	58,480	0,219
7	35,088	0,147	15	64,328	0,229
8	35,088	0,173			

**Tabla 4-7 Resultados de glucosa y DNS con rectas de calibrado**

Una vez realizados los ensayos se analizó la influencia de cada una de las variables del proceso, y utilizando los resultados de la cantidad de azúcares reducidos en cada ensayo, por la precisión de los mismos (4.2), para observar cómo afecta cada parámetro analizado sobre el DNS.

#### 4.3.1 Influencia de la concentración

A fin de determinar la influencia de la concentración en la cantidad de azúcares reducidos, si se comparan los ensayos 5 (7% de concentración), 8 (3% de concentración) y 12 (5% de concentración) (Figura 4-3); se observa que manteniendo el mismo ratio, una pendiente positiva caracteriza que el aumento de la concentración es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reducidos.



**Figura 4-3 Comparativa DNS con concentración**

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies, como es el alga parda *Sargassum* [97], donde a mayor acidez del ensayo hidrolizado, mayor era la cantidad de azúcares reducidos, y lo mismo ocurre con especies rojas como la *Kappaphycus alvarezii*, o la *Gracilaria verrucosa*, las cuales, a partir de concentraciones superiores al 8%, disminuyen la cantidad de azúcares reducidos [98].

La pendiente positiva es debida a que a mayor cantidad de ácido, mayor celulosa reaccionará con el mismo, siendo el máximo de los estudios anteriores el punto de saturación, donde hay más ácido que celulosa con la que pueda llegar a reaccionar.

#### 4.3.2 Influencia del tiempo

Por otro lado, con objeto de caracterizar la influencia del tiempo en la hidrólisis, se representaron los valores de los ensayos 2 (70 minutos), 10 (35 minutos) y 14 (105 minutos) (Figura 4-4); que fueron realizados para los mismos valores de concentración y ratio. Como se puede observar en la gráfica se genera una parábola invertida con máximo centrado en 70 minutos, de manera que se establece un máximo en 70 minutos, momento a partir del cual la cantidad de azúcares invertidos disminuye.

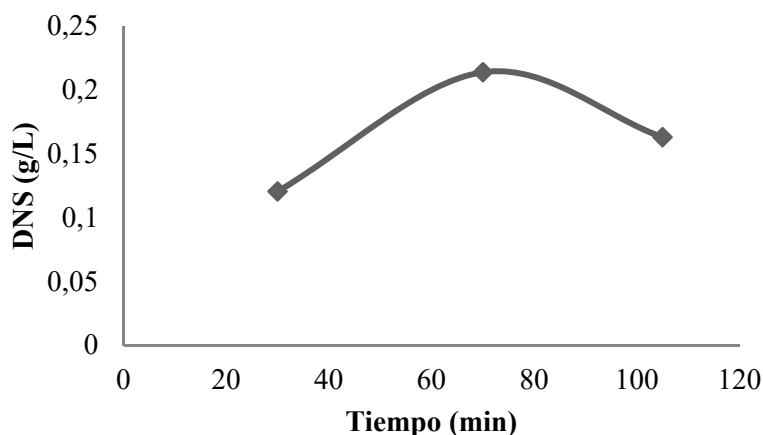


Figura 4-4 Comparativa DNS con tiempo

Respecto a otras especies de alga roja, como la *Kappaphycus alvarezii*, o la *Gracilaria verrucosa*, tienen la misma tendencia, pero con el máximo de la parábola en 90 minutos [98], concordando por tanto con este resultado. Esta tendencia es debida a que, una vez se haya hidrolizado toda la celulosa contenida en la muestra, el ácido continúa reaccionando mientras no disminuye la temperatura, provocando la degradación de la glucosa extraída.

#### 4.3.3 Influencia del ratio

Por último, a fin de determinar la afectación del ratio en los resultados obtenidos, los ensayos 1 (7 V/P), 3 (10 V/P) y 10 (13 V/P) (Figura 4-5), a igual tiempo, demuestran que el DNS es inversamente proporcional al aumento del ratio, pudiendo afirmar que el ratio óptimo es el mínimo los parametrizados.

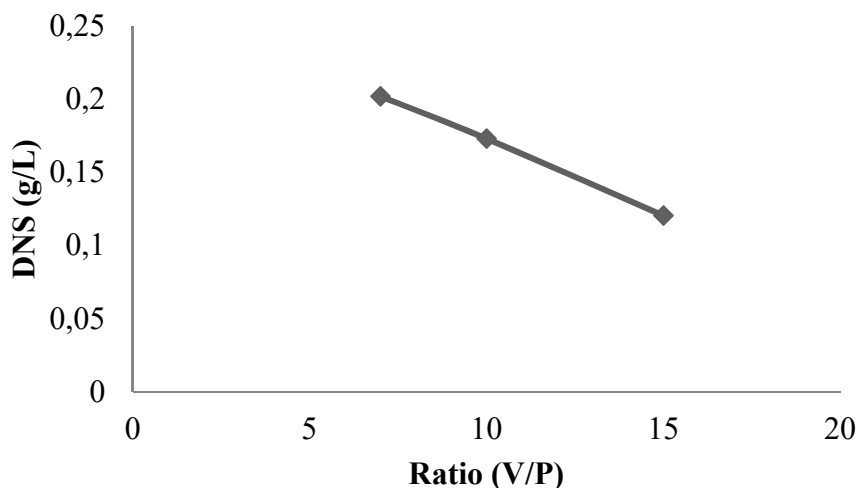


Figura 4-5 Comparativa DNS con ratio

Esta tendencia negativa también se ha observado en el alga parda *Sargassum* [97].

El motivo de que esto se produzca, no es otro que la relación entre la celulosa contenida en la muestra y el volumen de disolución ácida añadido, pues de haber una mayor cantidad de ácido, se degradará la cantidad de azúcares reducidos.

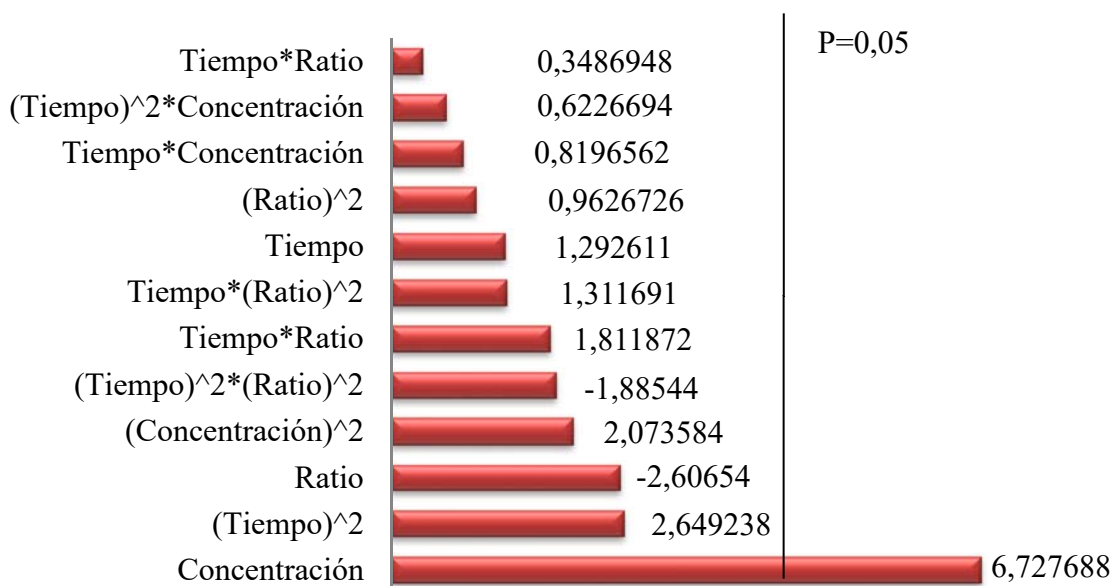
#### 4.3.4 Diseño de experimentos

Los diseños Box-Behnken [99], son menos costosos que los centrados por usar un menor número de datos, y lo cual permite estimar los coeficientes de primer y segundo orden, sin usar diseño factorial.

Para este trabajo, las tres variables tomadas para optimizar afectan en gran medida a la cantidad de glucosa extraída tras la hidrólisis. Por ello, en base a los datos obtenidos, y utilizando de nuevo el software Statistica, se representan en numerosas gráficas los resultados con objeto de facilitar su interpretación y extracción de conclusiones. Todos ellos, se basarán en el valor de DNS obtenido, tratando de maximizar su valor. Además, si se denominan x, y, z a tiempo, ratio y concentración respectivamente, en función de los coeficientes de regresión de las variables nombradas, se obtiene la siguiente ecuación para obtener la cantidad de azúcares reducidos (DNS) en función de ellas (Tabla A3-2):

$$\begin{aligned}
 \text{DNS} = & 0,11859x - 0,0009x^2 + 0,72345y - 0,03745y^2 + 0,16256z & \text{Ecuación 4-1} \\
 & - 0,01613z^2 - 0,02565xy + 0,0013xy^2 + 0,00019x^2y \\
 & - 0,00001x^2y^2 + 0,00072xz
 \end{aligned}$$

Se representa a continuación el diagrama de Pareto (Figura 4-6) con los factores de la Tabla 4-5:



**Figura 4-6 Diagrama de Pareto del efecto estimado de variables en valor absoluto**

El diagrama de Pareto es una gráfica que permite clasificar los datos en función de lo triviales o vitales que sean para el problema o función que se plantee.

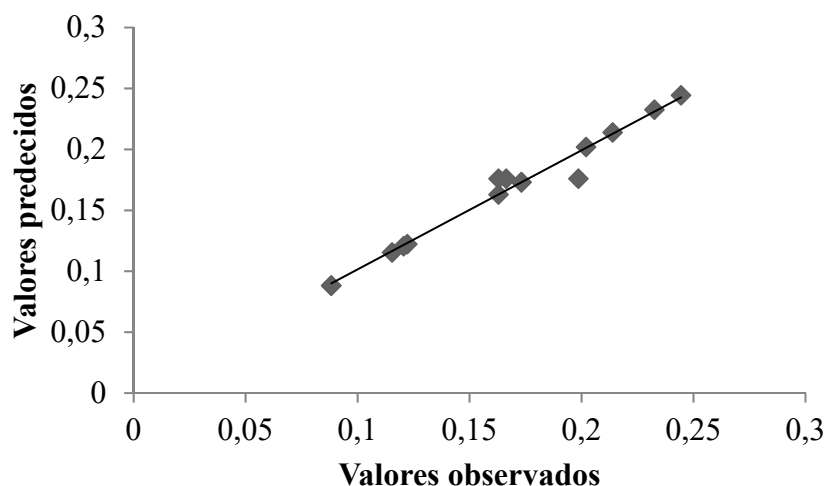
A la vista de los valores obtenidos, se ve que la concentración de ácido es el factor que más afecta a la optimización de la cantidad de azúcares reducidos con una significancia mayor de 0,05, algo que concuerda con los valores obtenidos para los distintos ensayos, donde las concentraciones del 5 y 7% daban resultados más elevados que en el 3%. Esto indica que una mayor cantidad de ácido extrae una mayor cantidad de glucosa de las paredes de celulosa, debiendo existir un valor límite para ello, algo que concuerda con una de las conclusiones extraídas tras comparar los resultados de este trabajo con

otros estudios (4.3.1). Respecto al cuadrado del tiempo, es el segundo factor más determinante, seguido del ratio, que afecta negativamente, implicando ello que un mayor ratio no va a aumentar la cantidad de glucosa, pues no reaccionará la totalidad del ácido con el alga.

A continuación, se utiliza la Ecuación 4-1, se obtiene la cantidad de azúcares reducidos de cada ensayo supuesta para cada ensayo. Si se comparan dichos resultados con los obtenidos realmente en cada ensayo, se puede representar la comparativa entre los valores observados y predichos, obteniendo la siguiente recta de la Figura 4-7 y ecuación asociada a la misma:

$$y = 0,977x + 0,003 \quad R^2 = 0,977$$

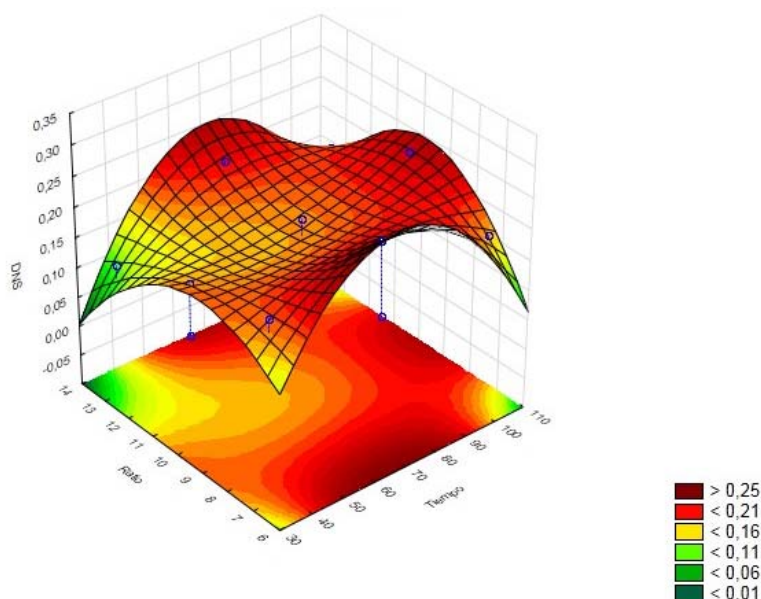
**Ecuación 4-2**



**Figura 4-7 Valores observados vs valores predichos (Tabla A3-1)**

Como se puede observar en la Figura 4-7, el modelo predice bastante bien los valores experimentales.

Las superficies de respuesta con diseño Box-Behnken buscan demostrar lo mismo que las conclusiones extraídas con las gráficas de los apartados anteriores, además de determinar en especial si la concentración posee un punto máximo o si la pendiente continúa creciendo con carácter exponencial:



**Figura 4-8 Valores ratio (V/P) vs tiempo (min) a concentración 7%**

En lo que respecta a los resultados, la superficie respuesta de la Figura 4-8, se ha obtenido manteniendo la concentración constante a 7%. En ella se puede apreciar que el máximo se produce cuando el tiempo es de 70 minutos y el ratio cercano a 10.

Estos puntos, coinciden con las conclusiones extraídas de estudios anteriores de algas rojas [98] respecto a la concentración, y la misma tendencia que el alga parda *Sargassum* [97] en lo que respecta al tiempo.

Por ello, se hace una segunda superficie de respuesta (Figura 4-9) donde se fija el tiempo a 70 minutos frente a la variación del ratio y la concentración, dando lugar a dos máximos, ambos con una concentración próxima a 7%, pero con un ratio máximo y mínimo.

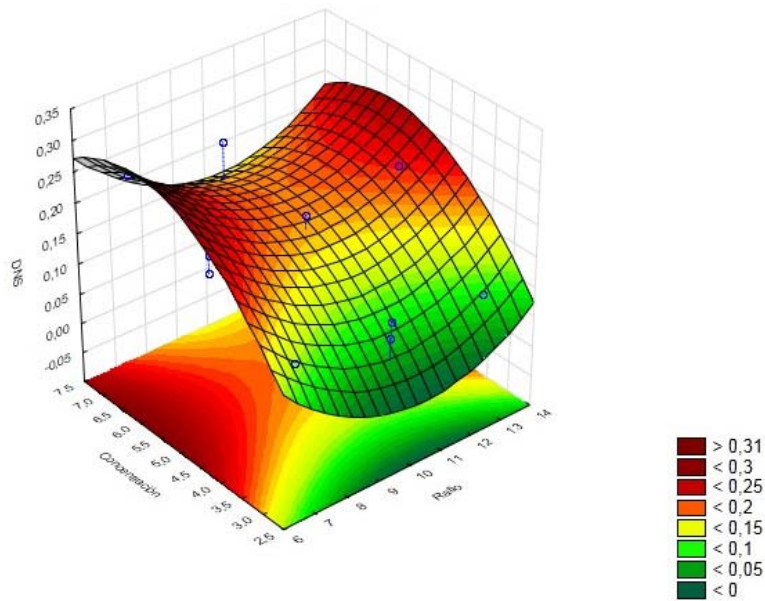


Figura 4-9 Valores ratio (V/P) vs concentración (%) a tiempo 70 min

Gracias a las conclusiones extraídas del diagrama de Pareto y la influencia negativa del ratio (4.3.3), se descarta el máximo ratio, y se efectúa una tercera gráfica a mínimo ratio 7. Al igual que antes, existe concordancia con investigaciones previas de algas rojas [98], como la *Kappaphycus alvarezii*, en lo que respecta al tiempo, y la misma tendencia negativa en el ratio del alga parda *Sargassum* [97].

Por este motivo, se efectúa una última superficie de respuesta para predecir el punto óptimo a mínimo ratio, como se aprecia en la Figura 4-10. En ella, se observa que se sigue cumpliendo que el máximo se produce con una concentración elevada, pero la pendiente creciente no llega a determinar el valor máximo de concentración, mientras que el tiempo, con 70 minutos, sí es óptimo. De nuevo, al igual que en las anteriores superficies de respuesta, se cumplen los resultados de estudios anteriores con algas rojas como la *Kappaphycus alvarezii*, o la *Gracilaria verrucosus* [98], tanto para la concentración, como para el tiempo.

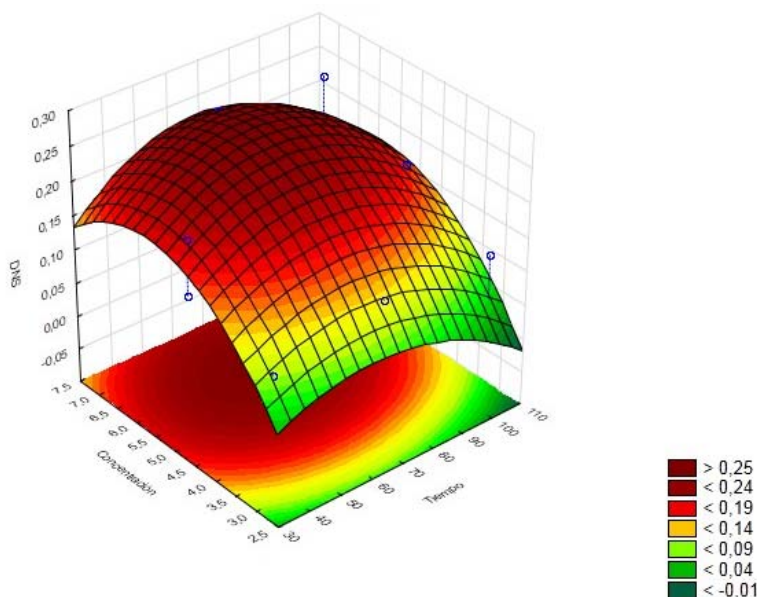


Figura 4-10 Valores tiempo (min) vs concentración (%) a ratio 7

A raíz de las conclusiones extraídas tras este análisis, se decide hacer un ensayo a mayores, en el que se preparará una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 9%, con un ratio de 7 (70 mL/10 g), y un tiempo de 70 minutos, que se denomina ensayo 16 en el trabajo, con objeto de demostrar si el punto predicho como óptimo por Statistica se cumple de manera experimental.

Decir además que esta optimización solo ha buscado la mejor forma de maximizar los azúcares reducidos calculados por el método del DNS, pero no se ha tenido en cuenta la cantidad de volumen extraído.

La cuantificación del volumen de licor madre hidrolizado se efectuará para los ensayos que se vayan a fermentar y destilar, con objeto de determinar si el punto valor de ratio más elevado de la Figura 4-9 es veraz, debido a que estudios anteriores en especies de alga parda como la *Sargassum* [97] no se cumple esa predicción.

#### 4.4 Resultado y análisis de los ensayos óptimos

Un objetivo de este trabajo es obtener la mayor cantidad de etanol posible y de gran pureza. Con esta premisa, se repiten los ensayos 2, y 4, llamados ahora ensayos 2 (II), y 4 (II); pues son los que poseen las mayores cantidades de azúcares reducidos, respecto del resto de ensayos (Tabla 4-7).

Además, se realiza a mayores el ensayo 16, con las condiciones establecidas como óptimas en la hidrólisis: Concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 9%, con un ratio de 7 V/P (70 mL/10 g), y un tiempo de 70 minutos. Una vez realizada la hidrólisis ácida de los nuevos ensayos, el licor madre fue separado del residuo por centrifugación, extrayendo más volumen de licor madre que el obtenido en la filtración a vacío.

La caracterización del licor madre de cada ensayo, queda reflejada en la Tabla 4-8, que muestra la cantidad de glucosa y de azúcares reducidos en cada uno:

Nº	T (min)	Ratio (V/P)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Vol (mL)	(n=c/v)	Abs.(A)	Glucosa (g/L)	DNS (g/L)
2 (II)	70	130	5	93,700	1,339	0,105	52,632	0,205
4 (II)	70	70	7	28	1,342	0,128	70,175	0,244
16	70	70	9	29,500	1,346	0,159	93,567	0,297

Tabla 4-8 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación



Teniendo en cuenta estos valores, se puede calcular rendimiento de la hidrólisis, utilizando la Ecuación 3-7:

El porcentaje de celulosa del residuo algal es 37%, de manera que en 10 gramos de residuo, hay 3,7 gramos de celulosa (Ecuación 3-5).

Los resultados obtenidos de rendimiento de la hidrólisis son los de la Tabla 4-9:

Nº	Volumen (mL)	DNS (g/L)	Glucosa teórica (g)	Azúcares reducidos (mg)	Rendimiento (%)
<b>2 (II)</b>	93,700	0,205	3,700	19,250	0,520
<b>4 (II)</b>	28	0,244	3,700	6,845	0,185
<b>16</b>	29,500	0,297	3,700	8,765	0,237

**Tabla 4-9 Rendimiento de los ensayos**

Esto indica que con un mayor ratio, sí se consigue un mayor rendimiento respecto de la glucosa obtenida, pues la experiencia 2 (II) posee mayor ratio (13 mL de disolución por cada gramo de residuo) que los ensayos 4 (II) y 16 (7 mL de disolución por cada gramo de residuo).

No existen registros de rendimientos de residuo algal, por lo que no se puede hacer valoración alguna respecto a investigaciones predecesoras a este trabajo.

Con los valores de volúmenes obtenidos, se añade el medio inóculo y el concentrado de nutrientes a cada ensayo (Ecuación 3-8, Ecuación 3-9) preparado 24 horas antes de la hidrólisis, además de ajustar el pH de cada uno.

En la Tabla 4-10, se muestran los volúmenes añadidos a cada ensayo, junto con el pH de los mismos:

Nº	pH	Inóculo (mL)	Concentrado (mL)
<b>2 (II)</b>	4,60	8,95	5,97
<b>4 (II)</b>	4,68	2,65	1,77
<b>16</b>	4,51	2,80	1,87

**Tabla 4-10 Parámetros para la fermentación**

Tras la fermentación y destilación de los ensayos, en la Tabla 4-11 se reseñan los resultados de concentración de bioetanol, conseguidos por medio de los métodos de la densidad, y del índice de refracción (Figura 3-22, Figura 3-23):

Nº	Vol <sub>dest</sub> (mL)	n=c/v	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>f</sub> (g)	P <sub>f</sub> -P <sub>0</sub> (g)	ρ(g/mL)	mtd n=c/v (v/v)	mtd ρ (v/v)
<b>2 (II)</b>	88	1,3320	9,8040	13,6500	3,8460	0,9615	1,5000	1,3000
<b>4 (II)</b>	29,9500	1,3320	9,5050	13,3500	3,8450	0,9612	1,5000	1,3500
<b>16</b>	34,8000	1,3330	9,6700	13,4500	3,7800	0,9450	3,5000	4,6000

**Tabla 4-11 Valores de etanol obtenidos**

La concentración de bioetanol obtenida por el método de la densidad (mtd ρ (v/v)) ofrece una mayor precisión que la del índice de refracción (mtd n=c/v (v/v)), ya que existe una diferencia más cuantitativa de un valor a otro de la recta.

Por tanto, con la concentración del método de la densidad, se calcula el volumen obtenido de etanol (Vol<sub>et</sub>) (Ecuación 3-10), y su rendimiento (Rend. (g/g)) (Ecuación 3-15).

Se calcula también el rendimiento de la fermentación (Y<sub>(P<sub>S</sub>)</sub>) (Ecuación 3-16), siendo los resultados obtenidos los de la Tabla 4-12:

N°	mtd $\rho(v/v)$	Vol <sub>dest</sub> (mL)	Vol <sub>et</sub> (mL)	Conc.(g/L)	Rend. (g/g)	Y <sub>(PS)</sub>
2 (II)	1,300	88,000	1,144	10,335	0,092	4,805
4 (II)	1,350	29,950	0,400	10,733	0,028	4,154
16	4,600	34,800	1,600	36,570	0,102	11,682

Tabla 4-12 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido

En base a los resultados obtenidos, se extrapola que ratio (V/P) no influye ni en el rendimiento del bioetanol, ni en el rendimiento de la fermentación. El motivo por el cual no es beneficioso, es debido a que no hay una gran concentración de celulosa en el residuo algal.

Otra conclusión es que el ensayo 16 (concentración 9%, ratio 7 mL/g y tiempo 70 min) se ha producido una mayor cantidad de bioetanol, y mejores rendimientos.

Debido a la inexistencia de líneas de investigación en el campo de la obtención de bioetanol con residuo algal, no existe ninguna posible comparativa con estudios relacionados con el presente trabajo en lo referido a la cantidad de bioetanol destilada, así como de los rendimientos obtenidos.

#### 4.5 Comparativa de la eficiencia del rendimiento de fermentación

Con objeto de comparar la diferencia de rendimientos de la fermentación, y saber si el utilizar diferentes volúmenes de medio inóculo y concentrado de nutrientes afecta a la destilación; se plantean a continuación los ensayos 5 (II) y 5 (III), los cuales poseen las mismas variables que el ensayo 5, pero se diferenciarán en el volumen de inóculo y concentrado de nutrientes que se les añadirá previamente a la fermentación.

En la Tabla 4-13 se caracteriza el licor madre de cada ensayo:

N°	T (min)	Ratio (V/P)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Vol (mL)	(n=c/v)	Abs.(A)	Glucosa (g/L)	DNS (g/L)
5 (II)	105	100	7	63,500	1,342	0,117	70,175	0,225
5 (III)	105	100	7	68	1,342	0,115	70,175	0,222

Tabla 4-13 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación

Teniendo en cuenta estos valores, se puede calcular rendimiento de la hidrólisis, utilizando la Ecuación 3-7. Los resultados obtenidos de rendimiento de la hidrólisis son los de la Tabla 4-14:

N°	Volumen (mL)	DNS (g/L)	Glucosa teórica (g)	Azúcares reducidos (mg)	Rendimiento (%)
5 (II)	63,500	0,225	3,700	14,338	0,387
5 (III)	68	0,225	3,700	15,124	0,408

Tabla 4-14 Rendimiento de los ensayos

Con los valores de volúmenes obtenidos, se añade el medio inóculo y el concentrado de nutrientes a cada ensayo (Ecuación 3-8, Ecuación 3-9) preparado 24 horas antes de la hidrólisis, además de ajustar el pH de cada uno.

En el ensayo 5 (III), se utilizará el volumen total de inóculo y concentrado de nutrientes, pero en el ensayo 5 (II), se utilizará la décima parte del total, para comprobar cómo afecta al potencial del proceso.

En la Tabla 4-15, se muestran los volúmenes añadidos a cada ensayo, junto con el pH de los mismos:

Nº	pH	Inóculo (mL)	Concentrado (mL)
5 (II)	4,50	0,620	0,410
5 (III)	4,63	6,500	4,330

**Tabla 4-15 Parámetros para la fermentación**

Tras la fermentación y destilación de los ensayos, en la Tabla 4-16 se reseñan los resultados de concentración de bioetanol, conseguidos por medio de los métodos de la densidad, y del índice de refracción (Figura 3-22, Figura 3-23):

Nº	Vol <sub>dest</sub> (mL)	n=c/v	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>f</sub> (g)	P <sub>f</sub> -P <sub>0</sub> (g)	ρ(g/mL)	mtd n=c/v (v/v)	mtd ρ (v/v)
5 (II)	42	1,3315	9,6900	13,5500	3,8600	0,9650	0,7500	0,6000
5 (III)	31,3000	1,3320	9,5150	13,3500	3,8350	0,9587	1,5000	1,8500

**Tabla 4-16 Valores de etanol obtenidos**

Con las mismas premisas que el apartado anterior, con la concentración del método de la densidad, se calcula el volumen obtenido de etanol (Vol<sub>et</sub>) (Ecuación 3-10), y su rendimiento (Rend. (g/g)) (Ecuación 3-15).

Se calcula también el rendimiento de la fermentación (Y<sub>(PS)</sub>) (Ecuación 3-16), siendo los resultados obtenidos los de la Tabla 4-17:

Nº	mtd ρ(v/v)	Vol <sub>dest</sub> (mL)	Vol <sub>et</sub> (mL)	Conc.(g/L)	Rend. (g/g)	Y <sub>(PS)</sub>
5 (II)	0,600	42,000	0,252	4,770	0,029	2,062
5 (III)	1,850	31,300	0,579	14,700	0,095	6,321

**Tabla 4-17 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido**

Teniendo en cuenta los rendimientos de la fermentación en los ensayos 5 (II) y 5 (III), se confirma que sí afecta la cantidad de medio inóculo y concentrado de nutrientes añadidos al licor madre: A mayor cantidad de ambos, mayores son los rendimientos del bioetanol y la fermentación, además de que se destila más cantidad del mismo.

## 4.6 Comparativa entre alga y residuo

Una vez analizados los resultados de los apartados anteriores, y como los ensayos 2 (II) y 16 poseen los mejores rendimientos; se busca comprobar, en este apartado, si el alga ha sido afectada por el tratamiento que recibe hasta que se convierte en residuo.

Usando el alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* como materia prima, en lugar de residuo algal, se realizan los ensayos 2 (III) y 16 (II), que poseen las mismas variables que el 2 (II) y 16.

En primer lugar, la hidrólisis de los ensayos, junto con la caracterización del licor madre obtenido (Tabla 4-18):

Nº	T (min)	Ratio (V/P)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Vol (mL)	n=c/v	Abs. (A)	GLUCOSA (g/L)	DNS (g/L)
2 (III)	70	130	5	97	1,3425	0,2330	73,0994	0,4220
16 (II)	70	70	9	45	1,3460	0,2490	143,2748	0,4490

**Tabla 4-18 Valores de glucosa y DNS previos a fermentación**

En lo referente a los resultados de azúcares reducidos y glucosa, si se comparan los ensayos 2 (III) y 16 (II) del alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum*, con el mismo ensayo del residuo algal (Tabla 4-8), es apreciable un gran aumento en ambos.

La cantidad de azúcares reducidos es el primer indicativo de que una mayor cantidad de bioetanol puede llegar a ser destilado del alga respecto del residuo.

Respecto a los valores de glucosa obtenidos, todos los ensayos poseen valores muy superiores a los de otras especies que no sean algas rojas, como el alga parda *Sargassum* [97]. En concreto, de llegar a comparar el ensayo 16 (II) con otras algas rojas, como *Kappaphycus alvarezii*, o la *Gracilaria verrucosus* [98]; el alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* posee mucha más concentración de glucosa.

La causa de esta gran diferencia es que en estudios anteriores, no se había llegado a aplicar una disolución de ácido sulfúrico con una concentración tan alta (9%).

Teniendo en cuenta que el alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* contiene un 77% de celulosa, en 10 gramos de alga hay 7,7 gramos de celulosa. Utilizando las mismas fórmulas que en el apartado anterior (Ecuación 3-4, Ecuación 3-5), se obtienen los siguientes rendimientos (Tabla 4-19):

Nº	Volumen (mL)	DNS (g/L)	Glucosa teórica (g)	Azúcares reducidos (mg)	Rendimiento (%)
2 (III)	93,700	0,233	7,700	41,006	0,532
16(II)	29,500	0,297	7,700	20,246	0,263

Tabla 4-19 Rendimiento de los ensayos

Tanto los ensayos 2 (III) y 16 (II), como sus homólogos de residuo (2 (II) y 16), poseen casi el mismo rendimiento. Este dato, permite extrapolar como conclusión que, bajo las condiciones sobre las que se está ejecutando la hidrólisis, no se puede llegar a reducir más cantidad de azúcares que los ya calculados.

Una vez efectuada la separación del licor madre y medido su volumen, se calcula la cantidad de medio inóculo y concentrado de nutrientes de los ensayos (Ecuación 3-8, Ecuación 3-9), junto con el ajuste de pH (Tabla 4-20):

Nº	pH	Inóculo(mL)	Concentrado(mL)
2 (III)	4,55	9,50	6,33
16(II)	4,63	4,30	2,86

Tabla 4-20 Parámetros para la fermentación

Tras la fermentación y destilación, se obtienen los siguientes resultados (Tabla 4-21) utilizando los métodos de la densidad, y el índice de refracción (Figura 3-22, Figura 3-23):

Nº	Vol <sub>dest</sub> (mL)	n=c/v	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>f</sub> (g)	P <sub>f</sub> -P <sub>0</sub> (g)	ρ(g/mL)	mtd n=c/v (v/v)	mtd ρ(v/v)
2 (III)	56	1,3325	9,6850	13,5050	3,8200	0,9550	2,5000	2,600
16(II)	19	1,334	9,5750	13,3200	3,7450	0,9362	5	6,3500

Tabla 4-21 Valores de etanol obtenidos

En primera instancia, si se comparan las concentraciones en volumen de los ensayos 2 (III) y 16 (II) del alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum* con el mismo ensayo del residuo algal (ensayo 2 (II) y 16); es notable que la conclusión extraída de la Tabla 4-18 era correcta, y una mayor cantidad de etanol es directamente proporcional a la presencia de celulosa en la materia prima.

Para afianzar esta afirmación, se efectúan los mismos cálculos de rendimiento y volumen extraído, a través de concentración obtenida por medio del método de la densidad (Ecuación 3-15, Ecuación 3-16), siendo los resultados los planteados en la Tabla 4-22:

N°	mtd $\rho$ (v/v)	Vol <sub>dest</sub> (mL)	Vol <sub>et</sub> (mL)	Conc.(g/L)	Rend. (g/g)	Y(pS)
2 (III)	2,600	56	1,456	20,670	0,196	4,788
16 (II)	6,350	19	1,200	50,480	0,217	10,721

**Tabla 4-22 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido**

En este caso, debido a la mayor concentración de celulosa, se concluye que sí afecta la cantidad de ratio respecto del volumen obtenido, a diferencia de lo que pasaba con el residuo algal. Por tanto el proceso industrial al que se ha visto sometido el alga si ha afectado a su eficiencia para obtener biocombustible.

Por ello, se puede extrapolar la siguiente relación lineal: A mayor ratio, mayor contenido de glucosa, y por tanto, mejor resultado; lo cual tiene sentido, pues al haber más celulosa, se precisa de una mayor cantidad de ácido para que esta se pueda desprender del alga.

El volumen destilado de bioetanol es mayor que el obtenido en algas pardas como la *Sargassum* [97].

En concreto, el ensayo 16 (II), de llegar a compararlo con otras algas rojas, como *Kappaphycus alvarezii*, o la *Gracilaria verrucosus* [98], posee una mayor concentración que otras especies en hidrólisis ácida, debido a la mayor concentración del ácido sulfúrico utilizada con respecto de otras investigaciones.

#### 4.7 Segunda destilación

Según estudios anteriores, se establece que realizando una segunda destilación se produce un aumento de la eficiencia del proceso (25). Con objeto de confirmar que el punto óptimo predicho por las superficies de respuesta de Estadística era correcto, se redestilan los ensayos 2 (II) y 16 de residuo, además de los ensayos 2 (III) y 16 (II) de alga; con los siguientes resultados:

N°	Vol <sub>0</sub> (mL)	Vol <sub>f</sub> (mL)	n=c/v	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>f</sub> (g)	P <sub>f</sub> -P <sub>0</sub> (g)	$\rho$ (g/mL)	mtd n=c/v (v/v)	mtd $\rho$ (v/v)	Mtd dicromato (v/v)
2 (II)	88	41,300	1,3325	9,7000	13,5100	3,8150	0,9530	2,5000	2,8500	0,4110
2 (III)	56	38,800	1,3355	9,8950	13,6000	3,7100	0,9270	8,5000	8,1000	5,8800
16	34,800	24,250	1,334	9,6650	13,3900	3,7330	0,9330	5	6,9500	2,7780
16 (II)	19	15,400	1,3365	9,7850	13,4500	3,6650	0,9160	10	10,3500	9,1100

**Tabla 4-23 Resultados de la segunda destilación**

En la Tabla 4-18, se aprecia una mejora en la concentración de todas las muestras. Además, tras la segunda destilación, todas ellas poseen una densidad que sobrepasa el límite establecido por la norma ASTM 4806-11a de 0,99 g/mL [100]. Junto con los métodos de la densidad y del índice de refracción, se ha efectuado el método del dicromato (Mtd dicromato (v/v)) como tercera confirmación de los resultados obtenidos.

En los ensayos 2 (II) y 2 (III), si se compara el valor de la concentración de bioetanol del método del dicromato, con la concentración del método de la densidad; se aprecia que dicha concentración es muy baja. Esto es más coherente que los resultados de apartados anteriores, teniendo en cuenta el análisis de las superficies de respuesta y las conclusiones extraídas en el apartado 4.3.4.

Por tanto, para el cálculo del rendimiento, se toman como datos en esta ocasión las concentraciones del método del dicromato, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 4-24):

N°	mtd dicro (v/v)	Vol <sub>dest</sub> (mL)	Vol <sub>et</sub> (mL)	Conc.(g/L)	Rend. (g/g)	Y <sub>(PS)</sub>
<b>2 (II)</b>	0,411	41,3	0,170	3,273	0,029	1,522
<b>2 (III)</b>	5,88	38,8	2,284	46,816	0,444	10,845
<b>16</b>	2,778	24,25	0,673	22,083	0,061	7,054
<b>16(II)</b>	9,11	15,4	1,403	72,433	0,311	15,383

Tabla 4-24 Rendimiento bioetanol, fermentación y volumen obtenido segunda destilación por dicromato

Una mejora en volumen y rendimientos respecto de la primera destilación demuestra que el proyecto ha sido correctamente ejecutado, cumpliendo con las expectativas predichas, concluyendo con rotundidad que el mejor ensayo es el 16 (concentración 9%, ratio 7 mL/g y tiempo 70 min).

#### 4.8 Caracterización del bioetanol

Efectuando lo indicado en el apartado de turbidez y coloración, se busca que se cumplan los requisitos de bioetanol nítido e incoloro según lo especificado en la norma UNE-EN 15376. En las siguientes figuras (Figura 4-11 hasta Figura 4-14), se puede extrapolar como conclusión que todas las muestras si cumplen esta especificación, siendo en todas ellas la muestra del bioetanol el tubo de ensayo de la izquierda, y el agua destilada el de la derecha:



Figura 4-11 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 2 (II)



Figura 4-12 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 2 (III)



Figura 4-13 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 16



Figura 4-14 Comparación de turbidez y coloración para el ensayo 16 (II)

En la Tabla 4-25, se muestran a continuación los resultados de turbidez obtenidos con el turbidímetro marca “Butech” modelo “LW-TN3024 X5” (Figura 3-28), donde se obtienen resultados que se encuentran entre los valores del agua destilada y el etanol, confirmando el cumplimiento de la norma. Las unidades son NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez):

Muestra	NTU	Muestra	NTU	Muestra	NTU
Agua destilada	0,98	2 (III)	0,71	16 (II)	0,59
2 (II)	0,75	16	0,61	Etanol	0,43

Tabla 4-25 Resultados de turbidez

## 4.9 Caracterización del residuo

La caracterización del residuo obtenido tras la separación del licor madre, se fundamenta en los siguientes apartados:

### 4.9.1 Análisis elemental

Respecto de la composición elemental del residuo obtenido tras la hidrólisis, en la Tabla 4-26 se detallan los porcentajes en masa de cada elemento:

Elemento	Porcentaje en masa (%)
C	0,43
H	0,02
N	0,13
S	0,2007

Tabla 4-26 Análisis elemental

Destacar de este análisis que el mayor porcentaje es de carbono, dato coherente, pues la mayor parte del residuo es materia orgánica, células vegetales del alga *Eucheuma Denticulatum Spinosum*.

#### 4.9.2 Análisis de elementos inorgánicos

Respecto de la composición de elementos inorgánicos, en la Tabla 4-27 se detallan los porcentajes en masa o en partes por millón (ppm) de cada elemento:

Elemento	Porcentaje en masa (% y ppm)
Na <sub>2</sub> O	3,49%
MgO	0,46%
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	13,10%
SiO <sub>2</sub>	74,50%
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	963 ppm
BaO	0,22%
CaO	1,33%
TiO <sub>2</sub>	0,16%
SO <sub>3</sub>	0,59%
K <sub>2</sub> O	5,03%
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,93%
SrO	173 ppm
Rb <sub>2</sub> O	145 ppm
MnO	544 ppm
ZrO <sub>2</sub>	112 ppm

Tabla 4-27 Análisis elementos inorgánicos

Al observarse la carencia de compuestos derivados del ácido sulfúrico, se concluye que no han quedado residuos de la disolución empleada en la hidrólisis.

#### 4.9.3 Análisis inmediato

En la Tabla 4-28, se detallan los porcentajes en masa de humedad, volátiles, carbono fijo y cenizas, contenidas en las muestras de residuo analizadas:

Variable	Porcentaje en masa (%)
Humedad	49,42
Volátiles	6,04
Carbono fijo	3,77
Cenizas	40,77

Tabla 4-28 Análisis inmediato

Reseñar que a causa del elevado contenido en humedad, es posible que el residuo posea bajo potencial para su aprovechamiento energético. Además, su contenido en ceniza es el casi el doble que otras algas rojas como la *Calliblepharis Ciliata* [101], pero hay que tener en cuenta que es un residuo,



y no un alga, lo que se está analizando. Además de poseer un menor porcentaje en volátiles y carbono fijo que esta misma especie.

#### 4.9.4 Poder calorífico

En la Tabla 4-29, se especifican los valores de poder calorífico de los residuos:

<b>Poder calorífico</b>	<b>(kcal/kg)</b>
<b>PCS seco</b>	543,28
<b>PCI seco</b>	245,706
<b>PCS húmedo</b>	389,61
<b>PCI húmedo</b>	92,0394

**Tabla 4-29 Poder calorífico**

De comparar estos poderes caloríficos con otras algas rojas como la *Calliblepharis Ciliata* [101], posee menos de la mitad de poder calorífico, por lo que estos residuos, poseen un bajo aprovechamiento energético.

## 5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

### 5.1 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que es posible la obtención de bioetanol a partir del aprovechamiento de residuo algal. Este resultado podría ser de interés para la comunidad científica debido a la carencia de estudios similares.

Este estudio se centró en la optimización de diferentes variables del proceso (concentración de ácido, tiempo de operación y relación volumen de ácido/cantidad de alga) y que permiten maximizar la cantidad de azúcares reductores obtenidos en el proceso de la hidrólisis ácida de la celulosa. Los ensayos realizados permitieron concluir que los mejores resultados se consiguieron con una concentración de ácido del 9%, 75 min y 7 mL de disolución por cada gramo de residuo algal, llegando a obtener mejores resultados incluso que con otras especies de algas rojas [98].

Paralelamente, se han comparado ensayos de residuo algal y alga bajo las mismas condiciones, observando que el rendimiento del alga es mayor que el del residuo algal. Por tanto, se puede afirmar que el proceso industrial sí ha afectado al proceso de obtención de bioetanol. A pesar de este hecho, es fehaciente que el residuo algal sí podría llegar a ser utilizado para la obtención de biocombustible.

Dado que la empresa CEAMSA genera 50 toneladas de residuo algal diariamente, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este proyecto, se obtendría un total de 114 m<sup>3</sup> de bioetanol puro.

Se puede afirmar también que la cantidad de medio inóculo y concentrado de nutrientes son factores determinantes a la hora de obtener un mayor volumen de bioetanol tras la destilación.

La segunda destilación confirmó la mejor configuración de variables para la optimización de la hidrólisis ácida, descartando que un mayor ratio llegue a obtener mejores resultados.

En lo que respecta al cumplimiento de las normas para ser componente de mezcla de combustible, cumple las normas de nitidez y coloración (norma UNE-EN 15376 [102]), así como la de densidad (norma ASTM 4806-11a [100]).

Respecto al poder calorífico del residuo generado tras la hidrólisis de la materia prima, su bajo poder calorífico es un indicativo de la baja proyección de estos como pellets. Sin embargo, debido a su alto contenido en carbono, y bajo contenido en azufre; podría ser utilizado para compostaje, o como corrector de suelos.

### 5.2 Líneas futuras

A continuación, se detallan las posibles futuras líneas de investigación en las que puede derivar este trabajo.

### *5.2.1 Aplicación a otras algas y/o residuos*

Este proyecto se ha centrado en un único espécimen de alga y su residuo, por lo tanto se podrían estudiar otros tipos de algas o residuos derivados de las mismas. Por otra parte, se podría aumentar la cantidad de masa algal y disolución añadida, manteniendo el ratio constante, analizando si existe o no variación en la cantidad de azúcares reducidos.

### *5.2.2 Hidrólisis*

En el caso modificar las condiciones de la hidrólisis ácida, además de comprobar si volver a aumentar la concentración a más del 9% da un mejor resultado en el DNS, manteniendo el ratio y el tiempo; otros ácidos, como el clorhídrico, podrían llegar a convertirse en objeto de estudio, así como el variar otros parámetros que no fueron objeto del análisis de optimización de la matriz de ensayo, como son la temperatura y el pH.

En este apartado, existen múltiples variables a modificar con objeto de mejorar la hidrólisis ácida. Una de ellas, es la de utilizar enzimas en lugar de una disolución ácida. Estudios previos han demostrado que para una misma especie, los rendimientos podrían ser más elevados [73].

### *5.2.3 Fermentación*

Los parámetros de fermentación fueron optimizados, más sería conveniente estipular el mejor volumen de medio inóculo y de concentrado de nutrientes para llegar a aumentar todavía más la cantidad de biocombustible destilado.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, *On the earliest evidence for habitual use of fire in Europe*, 2011.
- [2] J. Menéndez, *El carbón y la vida cotidiana*.
- [3] T. Valdés-Solís, Instituto Nacional del Carbón, CSIC, *El carbón y la ciencia del carbón*.
- [4] J. P. Oleson, *Greek and Roman Mechanical Water-Lifting Devices: The History of a Technology*, University of Toronto Press, 1984.
- [5] H. Puchta, *Stranks, Jeff, «It'll never happen» English in Mind*, 2010.
- [6] Pangtay, S. Chow, *Petroquímica y sociedad*, Fondo de cultura económica, 1998.
- [7] World Energy Council, *«World Energy Resources»* 2016.
- [8] I. Luz Sant'Ana, P. Román Román, F. Torres-Ruiz, *Modeling oil production and its peak by means of a stochastic diffusion process based on the Hubbert curve*, 2017.
- [9] Association for the Study of Peak Oil and Gas (ASPO), 2015.
- [10] IPCC, *Cambio climático (2013), bases físicas*, 2013.
- [11] International Energy A.I. Statistics, *CO2 emissions from fuel*, 2014.
- [12] Greenpeace, *Impacto ambiental del petroleo*, 2012.
- [13] JP. Haity, CP. Hou, J. Bundschuh, TR. Kulp, CY. Chen, LT. Chuang, *The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae*.

- [14] JK. Saini , R. Saini, L. Tewari , *Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments*, 2014.
- [15] S. Kraan, *Mass cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production*, 2010.
- [16] M. Guo, W. Song, J. Buhain , *Bioenergy and biofuels: history status and perspective*.
- [17] La orden, «Centro de Investigación Agraria,» [En línea].
- [18] L. Faba, E. Díaz, S. Ordóñez, *La biomasa como materia prima para la obtención de combustibles líquidos*.
- [19] MA .Scaife, A. Merckx-Jacques, DL. Woodfall, RE. Armenta , *Algal biofuels in Canada: status and potential.*, 2015.
- [20] AA. Adenle, GE. Haslam, L. Lee , *Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustable development in developing countries*, 2013.
- [21] C. García, Biocombustible: ¿Energía o alimento?.
- [22] Renewable Fuel Association (RFA), *Ethanol industry statistics*, 2014.
- [23] T. Silalertruksa, SH. Gheewala, K. Hünecke, UR. Fritsche, *Biofuels and employment effects: Implications for socioeconomic development in Thailand*, 2012.
- [24] VA. Castro, *Biorrefinerías e integración industrial-El mercado de biocombustibles*, 2015.
- [25] BE. Ribeiro, *Beyond commonplace biofuels: social aspects of ethanol*, 2013.
- [26] P. Havik, OA Schneider, E. Schmid, H. Bottcher, S.Fritz, R. Skalsky, *Global land-use implications of firstand second biofuel targets*, 2011.
- [27] BG. Subhadra, *Sustainability of algal biofuel production using intergrated renewable energy pack (IREP) and algal biorefinery aproach*, 2010.
- [28] A. Mohr, S. Raman , *Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels*, 2013.
- [29] SP. Govumoni, S. Koti, SY. Kothagouni, S. Venkateshwar, VR. Linga, *Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production.*, 2013.
- [30] MA. Carriquiry, X. Du, GR. Timilsina, *Second generation biofuels: economics and policies.*, 2011.
- [31] A. Singh, SI. Olsen, *A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels*, 2011.
- [32] P. Schenk, S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, *Second*

- generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*, 2008.
- [33] S. Azmah Jambo, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016.
- [34] Food and Agriculture Organization (FAO), *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture*, 2013.
- [35] MY. Menetrez, *An overview of algae biofuel production and potential enviromental impact*, 2012.
- [36] J. Ortiz, N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. López-Hernández, C. Bozzo , *Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds*, 2006.
- [37] L. Paiva, E. Lima, RF. Patarra, AI. Neto, J. Baptista , *Endible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health*, 2014.
- [38] A. Jiménez Escrig, FJ. Sánchez Muñiz , *Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism*, 2000.
- [39] IK. Hong, H. Jeon, BS. Lee , *Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process*, 2014.
- [40] JH. Park, JY. Hong, HC. Jang, SG. Oh, SH. Kim, JJ. Yoon , *Use of Gelidium amansii as a promising resource for bioethanol: a practical approach for continuous dilute acid hydrolysis and fermentation*, 2012.
- [41] A. Millar, *Macroalgae: the facts. England: 5m Publishing Enterprises Inc*, 2011.
- [42] PL. Reynolds, E. Duffy, N. Knowlton, *Seagrass and Seagrass Beds*.
- [43] SI. Khan, SB. Satam, *Seaweed mariculture: scope and potential in India*, 2003.
- [44] NL. Burman, C. Hervey, *Euचेuma denticulatum*, 1917.
- [45] Oligae, *Composition of Macroalgae Collected from Wild Stocks at Chwaka Bay and Matemwe, Zanzibar, Tanzania*, 2010.
- [46] GC. Trono, *Field guide and atlas of the seaweed resources of the Philippines*, 1997.
- [47] B. Díez , *Obtención de Bioetanol 2g a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stiptis*, Valladolid: Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales, 2013.
- [48] W. Walter, *Carbohidratos. En curso Breve de Química Orgánica. Reverte Linstromberg*, 1977.
- [49] EM. Rubin, *Genomics of cellulosic biofuels*, 2008.
- [50] J. Costa, MG. de Morrais, *The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae*, 2011.

- [51] THM. Nguyen, VH. Vu, *Bioethanol production from marine algae biomass: prospect and troubles*, 2012.
- [52] J. Morcillo, *Temas básicos de química*, Alhambra Universidad., 1989.
- [53] J. Vera, J. Castro, A. Gonzales, A. Moenne, *Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants*, 2011.
- [54] Rivera Aguilar, Univerddidad Militar nueva Granada, 2010.
- [55] M. Balat, *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review*, 2010.
- [56] AL. Demain, M. Newcomb, JHD. Wu , *Cellulase, clostridia and ethanol*, 2005.
- [57] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, *Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas*, 2014.
- [58] KJ. Gabriel, MM. El-Halwagi, *Modelling and optimization of bioethanol production facility*, 2013.
- [59] X. Meng, AJ. Ragauskas, *Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates*, 2014.
- [60] SS. Jang, Y. Shirai, M. Uchida, M. Wakisaka, *Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed*, 2012.
- [61] P.Binod, KU. Janu, A. Sindhu R Pandey, *Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production*, Elsevier INC, 2011.
- [62] R. Silvia Morales de la, *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos*, Madrid: Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2015.
- [63] N. Wei, J. Quarterman, SJ. Yong, *Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals*, 2013.
- [64] F. Alfani, A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, M. Cantarella, *Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw*, 2000.
- [65] PC. Munasinghe, SK. Khanal, *Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges*, 2010.
- [66] X. Wang, X. Liu, G. Wang , *Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation*, 2011.
- [67] S. Kumar, R. Gupta, G. Kumar, D. Sahoo, RC. Kuhad , *Bioethanol production from Gracilaria verrucosa, a red alga, in a biorefinery approach*, 2013.
- [68] MG. Borines, RI. de León, JL. Cuello , *Bioethanol production from the macroalgae Sargassum spp*, 2013.
- [69] N. Trivedi, V. Gupta, CRK. Reddy, B. Jha, *Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga Ulva fasciata Delile*, 2013.

- [70] H. Cho, CH. Ra, SK. kim , *Ethanol production from the seaweed Gelidium amansii using specific sugar acclimated yeasts*, 2014.
- [71] FC. Wu, JY. Wu, YJ Liao, MY. Wang, II. Shih , *Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from Gracilaria biomass*, 2014.
- [72] IS. Tan, KT. Lee, *Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: an optimization study*, 2014.
- [73] KP. Candra, S. Sarwono, *Study of bioethanol production using red seaweed Eucheema cottonii from Botang sea water*, 2011.
- [74] Y. Khambhaty, K. Mody, MR. Gandhi, S. Thampy, P. Maiti, H. Brahmabhatt, *Kappaphycus alvarezii as a source of bioethanol*, 2012.
- [75] JH. Park, JY. Hong, HC. Jang, SG. Oh, SH. Kim, JJ. Yoon , *Use of Gelidium amansii as a promising resource for bioethanol: a poractical approach for continuous dilute acid hydrolysis and fermentation*, 2012.
- [76] YK. Cho, H. Kim, SK. Kim, *Bioethanol production from brown seaweed, Undaria pinnatifida using NaCl acclimated yeast*, 2013.
- [77] J. Fakhrudin, D. Setyaningsih, M. Rahayuningsih, *Bioethanol production from seaweed Eucheema cottonii by neutralization and detoxification of acidic catalyzedhydrolysate*, 2014.
- [78] «<http://www.diva-portal.org/ntnu/abstract.xsql?dbid=547%20->,» [En línea].
- [79] Algenol, «<http://algenol.com/biofuelproducts/>,» [En línea].
- [80] J. Lü, C. Sheahan, P. Fu, *Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production*, 2011.
- [81] GREENSTAR USA, *Hybrid Algae Production System (HAPS) to Advance Timetable for Commercial Production*, 2013.
- [82] N. Abdullah, N. Ejaz, M. Abdullah, A. Un Nisa, S. Firdous, *Lignocellulosic degradation in solid-state fermentation of sugar cane bagasse by termitomyces sp.*, 2006.
- [83] Olsen, Eugene D, *Métodos ópticos de análisis*, Reverté S.A, 1986.
- [84] ICIDCA, *Manual de técnicas analíticas*, 1974.
- [85] J. Santos Aguilar, DA. Zabala García, *Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos SAS S.A.S.*, 2016.
- [86] Drapcho, M. Caye, Nghim, PH. Nhuan, W. Terry, *Ethanol Production*, 2008.
- [87] L. Atarés Huerta, *Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro*, ETSIAMN (Universidad Politécnica de Valencia) Departamento de Tecnología de Alimentos.
- [88] A. Caputi, MT. Ueda Brown, *Spectrophotometric determination of ethanol in wine*,



- American Journal of Enol. Vitic.
- [89] AENOR, *UNE-EN 15376*, Febreo 2015.
- [90] AENOR, *Norma UNE-EN 14774- 2*, 2010.
- [91] AENOR, *Norma UNE-EN 15104*, 2011.
- [92] AENOR, *UNE-EN 15403*, 2011.
- [93] AENOR, *Norma UNE-EN 15148*, 2010.
- [94] AENOR, *Norma UNE-EN 14918*, 2011.
- [95] CS. Goh, KT. Lee , *A visionary and conceptual macroalgae macroalgae based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development*, 2014.
- [96] H. Yaicha, H. Garnaa, S. Besbesa, M. Pa-quotb, C. Bleckerc, H. Attia, *Chemical composition and functional properties of Ulva lactuca sea-weed collected in Tunisia*, 2011.
- [97] MG. Borines, RL. de León, JL. Cuello, *Bioethanol production from the macroalgae Sargassum spp*, 2013.
- [98] I. Yung Sunwoo, C. Hun Ra, GT. Jeong, SK. Kim, *Evaluation of ethanol production and bioadsorption of heavy metals by various red seaweeds*, 2016.
- [99] G. Box, D. Behnken, *Some new three level designs for the study of quantitative variables*, 1960.
- [100] Refinering and Marketing Company Ltd, *ASTM D 4806-11a*.
- [101] R. Maceiras, L. Ortiz, A. Cancela, A. Sánchez, *Analysis of Combustion Products of Seaweeds Rsidue Pellets*, 2015.
- [102] AENOR, *UNE-EN 15376*, 2015.
- [103] T. H. Suchanek, *Oil Impacts on Marine Invertebrate Populations and Communities*, 1993.

## ANEXO I: RECTAS DE CALIBRADO HIDRÓLISIS

Para construir la recta de calibrado la glucosa y de la cantidad de azúcares reducidos, y teniendo en cuenta las disoluciones preparadas en la tabla que las precede, se obtienen los siguientes resultados:

g/l	ml Dis	ml H <sub>2</sub> O	g/l	ml Dis	ml H <sub>2</sub> O	g/l	ml Disol	ml H <sub>2</sub> O
0	0	7	25	2,5	4,5	50	2	5
5	0,5	6,5	30	3	4	55	1,5	5,5
10	1	6	35	3,5	3,5	60	1	6
15	1,5	5,5	40	3	4	65	0,5	6,5
20	2	5	45	2,5	4,5	70	0	7

Tabla A1-1 Preparación muestras glucosa para índice de refracción

Concentración g/l (glucosa/agua)	Índice de refracción $n=c/v$
0	1,3315
5	1,3325
10	1,3330
15	1,3340
20	1,3350
25	1,3358
35	1,3375
40	1,3380
45	1,3385
50	1,3395
55	1,3405
60	1,3410
65	1,3415
70	1,3423

Tabla A1-2 Valores recta de calibrado de la glucosa

g/l	ml Dis	ml H <sub>2</sub> O	g/l	ml Dis	ml H <sub>2</sub> O
0	0	10	0,5	2,5	8
0,1	0,5	8	0,8	4	6
0,2	1	8	1,2	6	4
0,3	1,5	4	1,6	8	2
0,4	2	8	2	10	0

Tabla A1-3 Preparación muestras glucosa para DNS

<b>Concentración g/l(glucosa/agua)</b>	<b>Absorbancia (A)</b>
0	0
0,4	0,15
0,8	0,388
1,2	0,666
1,6	0,948
2	1,161
0,1	0,044
0,2	0,1
0,3	0,158
0,4	0,219
0,5	0,279

**Tabla A1-4 Valores recta de calibrado de DNS**

## ANEXO II: RECTAS DE CALIBRADO DE DESTILACIÓN

Para poder obtener la recta de calibrado de la densidad, se efectúan los siguientes cálculos:

Primero el cálculo de volúmenes para cada concentración, y luego, el cálculo de la densidad:

l/l	ml C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	ml H <sub>2</sub> O	l/l	ml C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	ml H <sub>2</sub> O	l/l	ml C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	ml H <sub>2</sub> O
1,5	0,15	10	3	0,3	10	4,5	0,45	10
2	0,2	10	3,5	0,35	10	5	0,5	10
2,5	0,25	10	4	0,4	10	96	10	0

Tabla A2-1 Preparación muestras etanol para densidad

Concentración (v/v) etanol/agua	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia (g)	Densidad (g/mL)
0	9,65	13,55	3,9	0,975
1,5	9,65	13,5	3,85	0,9625
2	9,65	13,49	3,84	0,96
2,5	9,65	13,48	3,83	0,9575
3	9,65	13,465	3,815	0,95375
3,5	9,65	13,45	3,8	0,95
4	9,65	13,44	3,79	0,9475
4,5	9,65	13,435	3,785	0,94625
5	9,65	13,42	3,77	0,9425
96	9,65	12,83	3,18	0,795

Tabla A2-2 Cálculo recta del método de densidad

Por otro lado, para calcular la del índice de refracción, al igual que en el apartado anterior, se utiliza los siguientes datos:

Concentración (v/v) etanol/agua	índice refracción n=c/v
0	1,331
1,5	1,332
2	1,3323
2,5	1,3325
3	1,3327
3,5	1,333
4	1,3335
4,5	1,3337
5	1,334
100	1,36

Tabla A2-3 Cálculo recta índice de refracción

Por otro lado, para el método del dicromato de potasio se prepararon las siguientes muestras para construir la recta de calibrado, junto con los puntos resultantes con el espectrofotómetro:

APROVECHAMIENTO DE RESIDUO ALGAL PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL DE TERCERA GENERACIÓN

<b>l/l</b>	<b>ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b>	<b>ml H<sub>2</sub>O</b>	<b>l/l</b>	<b>ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b>	<b>ml H<sub>2</sub>O</b>	<b>l/l</b>	<b>ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b>	<b>ml H<sub>2</sub>O</b>
<b>0,25</b>	0,0125	5	<b>3</b>	0,15	5	<b>8</b>	0,4	5
<b>0,5</b>	0,025	5	<b>4</b>	0,2	5	<b>9</b>	0,45	5
<b>0,75</b>	0,0375	5	<b>5</b>	0,25	5	<b>10</b>	0,5	5
<b>1</b>	0,05	5	<b>6</b>	0,3	5	<b>11</b>	0,55	5
<b>2</b>	0,1	5	<b>7</b>	0,35	5			

**Tabla A2-4 Preparación muestras etanol para método del Dicromato**

<b>Concentración (v/v) etanol/agua</b>	<b>Absorbancia (A)</b>
<b>0,25</b>	0,115
<b>0,5</b>	0,124
<b>0,75</b>	0,132
<b>1</b>	0,156
<b>2</b>	0,169
<b>3</b>	0,178
<b>4</b>	0,189
<b>5</b>	0,196
<b>6</b>	0,207
<b>7</b>	0,215
<b>8</b>	0,221
<b>9</b>	0,228
<b>10</b>	0,24
<b>11</b>	0,251

**Tabla A2-5 Cálculo recta del método del Dicromato**

## ANEXO III: VALORES STATISTICA

Para la representación del enfrentamiento entre valores observados y predichos, y el cálculo de la fórmula del DNS, se han utilizado los siguientes datos:

Ensayo	Observado X	Predecido Y
1	0,2020373	0,202037
2	0,2139219	0,213922
3	0,1731749	0,173175
4	0,2444822	0,244482
5	0,2325976	0,232598
6	0,1222411	0,122241
7	0,08828523	0,088285
8	0,1154499	0,11545
9	0,08828523	0,088285
10	0,1205433	0,120543
11	0,1986418	0,176005
12	0,1629881	0,176005
13	0,1663837	0,176005
14	0,1629881	0,162988
15	0,1731749	0,173175

Tabla A3-1 Valores observados y predichos

Factor	Regr. Coefficients; Var.:Var7; R-sqr=,97719; Adj:,84033 (Spreadsheet1) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Residual=,0003872 X : TIEMPO Y : RATIO Z : CONCENTRACIÓN DV:DNS					
	Regressn (Coeff.)	Std.Err.	t(2)	p	-95,% (Cnf.Limt)	+95,% (Cnf.Limt)
Mean/Interc.	-3,60324	2,466550	-1,46084	0,281520	-14,2159	7,009474
X	0,11859	0,073640	1,61034	0,248618	-0,1983	0,435431
X <sup>2</sup>	-0,00090	0,000525	-1,71454	0,228564	-0,0032	0,001359
Y	0,72345	0,464354	1,55797	0,259558	-1,2745	2,721401
Y <sup>2</sup>	-0,03745	0,022775	-1,64420	0,241861	-0,1354	0,060545
Z	0,16256	0,091771	1,77140	0,218506	-0,2323	0,557423
Z <sup>2</sup>	-0,01613	0,007778	-2,07358	0,173848	-0,0496	0,017338
X*Y	-0,02565	0,014789	-1,73414	0,225030	-0,0893	0,037985
X*Y <sup>2</sup>	0,00130	0,000723	1,80174	0,213376	-0,0018	0,004412
X <sup>2</sup> *Y	0,00019	0,000105	1,82728	0,209181	-0,0003	0,000646
X <sup>2</sup> *Y <sup>2</sup>	-0,00001	0,000005	-1,88544	0,200027	0,0000	0,000012
X*Z	0,00072	0,000984	0,73338	0,539643	-0,0035	0,004955
X <sup>2</sup> *Z	0,00000	0,000007	-0,62267	0,597036	0,0000	0,000026

Tabla A3-2 Valores de factores para fórmula del DNS