

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE DOS ETAPAS PARA LA EXTRACCIÓN DE
PROTEÍNAS DE MICROALGAS**

**DIDIER ALEISSO GUTIÉRREZ LOZANO
CRISTIAN CAMILO MARMOLEJO CHAPARRO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**DISEÑO DE UN SISTEMA DE DOS ETAPAS PARA LA EXTRACCIÓN DE
PROTEÍNAS DE MICROALGAS**

**DIDIER ALEISSO GUTIERREZ LOZANO
CRISTIAN CAMILO MARMOLEJO CHAPARRO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

**Director
VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

**Codirector
ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIAS

En primer lugar, agradezco a **Dios** por hacer de mí una mejor persona día a día y por darme la oportunidad de cumplir una meta y un sueño más en mi vida.

A mi madre **Angelina**, que con su lucha, su amor y comprensión, ha contribuido de manera directa guiándome por el camino hacia el éxito haciendo posible este logro, porque aunque a estoy lejos de casa, nunca olvidó que tenía su hijo luchando por cumplir sus sueños.

A mi padre **Eliap**, por todo el sacrificio hecho con el fin de hacerme una persona de bien. Porque además de ser mi padre es un buen amigo, en el cual puedo depositar toda mi confianza, y porque sé que al igual que mi hermano, también soy su orgullo.

A mi hermano **Edward**, por ser un motivo para seguir adelante ya que cada vez que me dice que soy su mejor ejemplo a seguir, crea razones para continuar realizando cosas buenas en la vida, además porque sé que no falta mucho para que él también esté escribiendo cosas como estas por mis padres y por mí.

A mi tía **Cecilia y toda su familia**, porque además de ser mis tíos y primos, también son mis padres y hermanos, por cada concejo y por dar una mano las veces que necesité de su ayuda, a ustedes gracias, este éxito también es de ustedes.

A **mi familia de parte de papá**, por ser tan buenas personas con migo, por demostrarme todo su aprecio y cariño cada vez que tenemos la oportunidad de encontrarnos y por hacerme recordar que lo mas importante para una persona debe ser la familia.

A mis amigos **Javier Sánchez, Camilo Marmolejo y Diana Castrillón** por compartir día a día momentos de sus vidas con migo, por ayudarme a ser cada día mejor persona, porque sé que cada cosa que hacen y dicen, es con las mejores intenciones.

A mi compañero de trabajo de grado **Camilo Marmolejo**, por darme la oportunidad de realizar este trabajo con él, además por ser tolerante y por comprender cada momento de malgenio y angustia.

Didier Aleisso Gutiérrez Lozano

Primero que todo doy gracias a Dios por guiar mi vida y por permitirme aprender cada día mas de ella para así lograr ser mejor persona.

A mi madre Aura Mercedes, por su gran esfuerzo, comprensión y apoyo que me ha permitido salir adelante. Gracias a su espíritu luchador e incansable, que hace que cada día se valoren más las cosas.

A mi padre Donaldo, por sus esfuerzos durante este largo proceso y quien siempre me brindó su apoyo, su ayuda y me dio grandes lecciones de vida.

A mi hermana Adriana, que siempre estuvo pendiente de este largo proceso, dándome ánimos y comprensión.

A mi padrino José Omar, que siempre me ayudó en esos momentos difíciles de la carrera, gracias a sus consejos que me permitieron salir adelante.

A todos mis tíos, a mi abuela y primos, que aportaron su grano de arena para lograr que mi meta se haga realidad.

A mis compañeros Javier Sánchez, Didier Gutiérrez, Diana Castrillón, por su amistad incondicional y permitirme compartir con ellos esta gran experiencia en mi vida.

A Didier Gutiérrez quien fue mi compañero de tesis y es parte de este logro; por aguantar mis terquedades y ayudarme a salir adelante con este trabajo.

A mis compañeros durante toda la carrera Paola Ariza y Edinsson Castro, con quienes se pasaron momentos inolvidables de estudio, de alegría y de apoyo para lograr salir adelante.

Por último, agradezco al grupo de investigación de Biomasa, por confiar en nosotros, por sus valiosos conocimientos y permitirnos realizar el proyecto de grado con ellos

Cristian C. Marmolejo Chaparro

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como director del proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente trabajo.

QUÍMICA NATHALIA BEDOYA, por su ayuda, disposición y comprensión, y préstamos de equipos durante la ejecución de las etapas del proyecto.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su enseñanza, ayuda y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su atención y colaboración durante la ejecución de éste proyecto.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química y todas aquellas personas que hicieron parte de nuestra formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| 2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA..... | 20 |
| 2.1 Métodos de cultivo | 20 |
| 2.2 Diseño experimental | 21 |
| 2.3 Separación de clorofilas..... | 22 |
| 2.4 Cuantificación de proteínas totales | 22 |
| 2.5 Cuantificación de carbohidratos..... | 23 |
| 2.6 Balance de masa | 23 |
| 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS | 25 |
| 3.1 Análisis estadístico | 26 |
| 3.1.1 Análisis para resultados de extracción de proteínas | 26 |
| 3.1.2 Análisis para resultados de extracción de carbohidratos | 30 |
| 3.2 Mejores condiciones de extracción..... | 33 |
| 3.2.1 Propuesta de extracción de ambos metabolitos..... | 35 |
| 4. CONCLUSIONES | 39 |
| 5. RECOMENDACIONES..... | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 41 |
| ANEXOS..... | 44 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Diseño experimental | 22 |
| Tabla 2. Resultado de extracción de proteínas y carbohidratos | 25 |
| Tabla 3. Mejor condición de extracción de proteínas..... | 33 |
| Tabla 4. Mejor condición de extracción de carbohidratos | 34 |
| Tabla 5. Condición supuesta para la extracción de ambos metabolitos | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Metodología experimental..... | 20 |
| Figura 2. Diagrama de Pareto para la primera extracción de proteínas..... | 26 |
| Figura 3. Superficies de respuesta para la primera extracción de proteínas | 27 |
| Figura 4. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de proteínas | 28 |
| Figura 5. Superficie de respuesta para la segunda extracción de proteínas | 28 |
| Figura 6. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos | 30 |
| Figura 7. Superficies de respuesta para la primera extracción de carbohidratos .. | 31 |
| Figura 8. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de carbohidratos | 31 |
| Figura 9. Superficies de respuesta para la segunda extracción de carbohidratos . | 32 |
| Figura 10. Cantidad de proteínas obtenidas en la mejor extracción | 34 |
| Figura 11. Cantidad de carbohidratos obtenidos en la mejor extracción | 35 |
| Figura 12. Cantidad de ambos metabolitos obtenidos en condiciones supuestas . | 36 |
| Figura 13. Diagrama de flujo en condiciones supuestas de la mejor extracción.... | 37 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| ANEXO A. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS OBTENIDOS | 44 |
| ANEXO B CULTIVO DE MICROALGAS Y MONTAJES DE EXTRACCIÓN. | 45 |

RESUMEN

TITULO: DISEÑO DE UN SISTEMA DE DOS ETAPAS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MICROALGAS*

AUTORES: DIDIER ALEISSO GUTIÉRREZ LOZANO, CRISTIAN CAMILO MARMOLEJO CHAPARRO**

PALABRAS CLAVES: microalgas, proteínas, carbohidratos, selectividad, extracción

Las microalgas surgen como materia prima prometedora en la producción de biocombustibles ya que algunas de estas especies contienen hasta un 80% de lípidos en peso seco. Pero el problema fundamental que presentan, es el alto costo energético que requiere el cultivo y en la extracción de la biomasa, por estas razones las líneas de la investigación se centran en reducir dichos costos generando valor agregado mediante la extracción de los distintos metabolitos presentes en las microalgas como las proteínas, ya que el alga acumula desde un 28 hasta un 39% de proteínas en peso seco.

Este estudio evalúa un método que consta de dos etapas para la extracción de proteínas con pretratamiento alcalino y la influencia de variables tales como temperatura, concentración de NaOH y la relación solvente/biomasa, para mejorar la selectividad en cuanto a la obtención de proteínas a partir de biomasa de microalgas, se realiza un diseño de experimentos en el software STATISTICA 7.0 y se determina las mejores condiciones de extracción de proteínas.

Los resultados muestran que el diseño experimental propuesto, no es selectivo para la extracción de proteínas, ya que permite la extracción de otros metabolitos como carbohidratos, además el análisis estadístico de los resultados mostró que la mayor cantidad de proteínas se extrae a temperatura de 105°C, relación solvente/biomasa de 30 mL/g y molaridad de 2M y la mayor cantidad de carbohidratos se extrae a 85 °C, concentración molar 3M y 45 mL/g de relación solvente/biomasa.

* Proyecto de grado

** Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director. Dr. Sc Viatcheslav Kafarov. Codirector: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

ABSTRACT

TITLE: DESIGN OF A TWO STAGE SYSTEM FOR PROTEIN EXTRACTION MICROALGAE*

AUTHORS: DIDIER ALEISSO GUTIÉRREZ LOZANO, CRISTIAN CAMILO MARMOLEJO CHAPARRO**

KEYWORDS: microalgae, protein, carbohydrate, selectivity, extraction

Microalgae are emerging as promising feedstock in the production of biofuels, since some of these species contain up to 80% dry weight of lipids. But the fundamental problem resides in the high energy input required for the cultivation and extraction of biomass, for these reasons research focuses on the reduction of these costs via generation of added value by extraction of several metabolites such as protein, since the algae accumulates 28 to 39% protein by dry weight.

This study evaluates an alkaline two stage method proteins extraction and the influence of variables such as temperature, NaOH concentration and the solvent/biomass ratio, to improve the selectivity of the method a design of experiments was performed using the software STATISTICA 7.0 allowing the determination of the best conditions for protein extraction.

Results shown that the proposed experimental design is not selective for the extraction of proteins, since it allows the extraction other metabolites such as carbohydrates, also statistical analysis of the results, showed that most amount of protein are extracted at 105 °C, ratio solvent / biomass at 30 mL/g and molarity 2 M, while most amount of carbohydrates are extracted at 85 °C, ratio solvent / biomass at 45 mL/g and molarity at 3 M.

* Graduation proyect

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering. Departament. Director: Dr. Sc Viatcheslav Kafarov. Co-director: Ph.D student research assistant Andres Fernando Barajas Solano

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la demanda mundial energética ha tenido un crecimiento notable, que conduce a la comunidad científica a la investigación y desarrollo de fuentes de energía nuevas y eficientes, que aseguren un mejor rendimiento. En este escenario, las algas surgen como materia prima prometedora en la producción de biocombustibles, pues cuenta con características similares, deseables como la producción de lípidos, donde algunas especies pueden tener hasta un 80% de lípidos en peso seco de biomasa [1]. Esto se ha convertido en una fuente de investigación contemporánea mundial, ya que tiene el potencial de una solución renovable, escalable y de bajo carbono, sin perjudicar el suministro de alimentos y otros productos agrícolas afines [2].

Las microalgas hacen parte de una alta gama de microorganismos autótrofos que crecen a través de la fotosíntesis al igual que una planta terrestre, pero en una tasa 50 veces mayor. Su estructura unicelular les permite fácilmente convertir energía solar en energía química [3, 4]. Además de las ventajas mencionadas anteriormente, las microalgas cuentan con la capacidad de crecer en agua marina y dulce como también en aguas residuales disminuyendo costos de materias primas [5], también tienen la cualidad de reducir las emisiones de efecto invernadero en la fijación fotosintética del CO₂ liberados en procesos industriales [6], ayudando a reducir los índices de polución generados por las industrias y la quema de combustibles fósiles a manos del hombre [7, 8].

El problema fundamental que presenta la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal, es que los procesos usados actualmente no son económicamente viables dado que presentan costos de producción elevados, debido al gran requerimiento energético que necesita el cultivo cosechado y de recuperación de la biomasa, en comparación con el bajo precio de venta de algunos de estos productos, como el biodiesel o el bioetanol [9].

Por estas razones las líneas de investigación se centran hoy día en reducir dichos costos [9], donde una alternativa es el estudio de los distintos metabolitos de las microalgas que generan alto valor agregado como son los isoprenoides, alcaloides, toxinas, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, péptidos no ribosomales, carbohidratos y proteínas, que encuentran aplicaciones en la salud, la farmacología, nutrición y biotecnología [10].

Existen diferentes tipos de microalgas, entre ellas está *Chlorella vulgaris*, que es una de las cepas microalgales ampliamente disponibles en usos comerciales de fines alimentarios y nutricionales [3]. Sus aplicaciones actuales más importantes son la producción de biomasa para la alimentación, la acuicultura y los suplementos alimenticios, y muchos otros avances en el tratamiento de aguas residuales, la fijación de CO₂ industrial y futuras aplicaciones potenciales para propósitos relacionados con la energía y los sistemas de soporte de vida en el espacio [11]. Por otra parte, productos comunes como el biodiesel y los ésteres de alquilo son obtenidos a partir de los lípidos [3], y el bioetanol se logra mediante la fermentación de los azúcares disponibles de la biomasa [12].

Actualmente, la producción de metabolitos especialmente secundarios está creciendo significativamente [10], donde la obtención de proteínas es un ejemplo certero de ello, ya que el alga acumula cierto contenido de proteínas cuyo valor oscila entre el 28 y 39%(p/p) [13], despertando interés respecto a su valorización para producir suplementos alimenticios, tales como la proteína de la harina de pescado o en acuicultura [14] y productos benéficos para la salud o biofertilizantes [9].

Recientemente, se reportan estudios sobre métodos rápidos y simples sobre extracción de proteína de microalgas, pero estos pueden conllevar a problemas de sobrestimación proteica pues las microalgas contienen niveles de aminoácidos y otros compuestos orgánicos no proteicos como la clorofila [15]. La presencia de esta última hizo que, en un principio, la aplicación de proteína de microalgas no

ganara gran importancia puesto que conduce a cambios en color, sabor y estructura. Estos inconvenientes hacen necesaria la aplicación de técnicas que permitan obtener células de microalgas libres de agentes indeseados, sin modificar su estructura molecular, logrando también incrementar su valor comercial [16].

Uno de los principales obstáculos en la obtención de moléculas a partir de microalgas es la dificultad de extracción de metabolitos [17]. Es el caso de la cepa *Chlorella* que presenta en ocasiones dificultades de carácter general de extracción, posiblemente debido al pequeño tamaño de célula o paredes celulares resistentes, por ello se han creado diferentes técnicas de extracción, como la extracción en ácido, la extracción alcalina y otros procesos en caliente que ayudan a la lisis química, donde se obtienen mejores resultados en medio alcalino [18, 15].

El pretratamiento de la biomasa utilizada es una de las etapas más importantes y costosas en el proceso, siendo esto otra razón crucial de estudio, ya que el pretratamiento es necesario para reducir la cristalinidad de la biomasa y aumentar el área de superficie con el fin de mejorar la digestibilidad del sustrato, por consiguiente, el pretratamiento alcalino ha mostrado ser una alternativa favorable, debido a las bajas condiciones de temperatura y presión aplicadas, proporcionando así un menor coste de producción con respecto a otros métodos de pretratamiento [12].

Aunque las condiciones alcalinas ayudan a la extracción de proteínas, se debe tener en cuenta que la extracción en medio alcalino altamente concentrado, conduce a varios efectos adversos como la reducción de la digestibilidad de la proteína y el daño de algunos aminoácidos (lisina, cisteína) [18]. Por otra parte, la temperatura es otro factor importante debido a que puede actuar positivamente sobre moléculas resistentes al calor, pero también puede degradar moléculas termolábiles como las clorofilas [17].

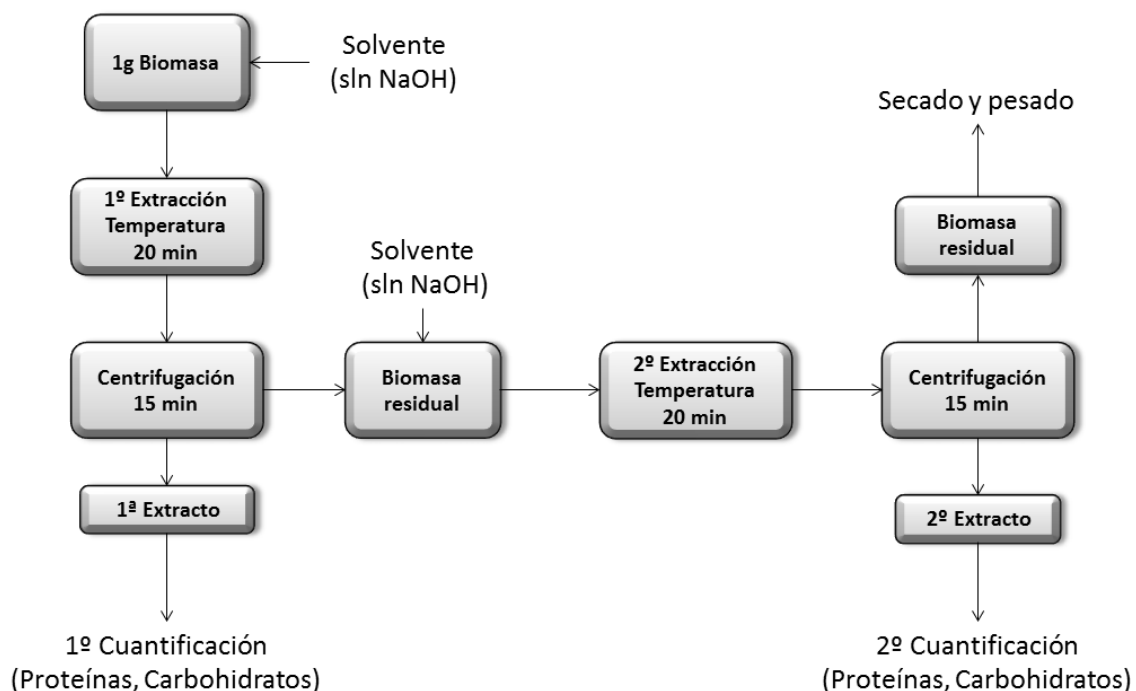
En la actualidad se encuentran numerosos trabajos sobre extracción de metabolitos con pretratamiento alcalino para otros tipos de biomasa [12], sin embargo (*Harun et al, 2010*) fue el primero en realizar éste tipo de extracción en biomasa de microalgas, con el fin de producir bioetanol, mas no para la obtención de proteínas.

Es por ello que el objetivo principal de esta investigación es evaluar un método que consta de dos etapas para la extracción de proteínas y la influencia de variables utilizadas en el pretratamiento alcalino, tales como temperatura, concentración del medio alcalino (NaOH) y la relación solvente/biomasa, para mejorar la selectividad en cuanto a la obtención de proteínas a partir de biomasa de microalgas.

2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Se evaluó el efecto de variables influyentes en la extracción de proteínas: temperatura, concentración molar de NaOH y relación solvente/biomasa, mediante un diseño experimental, el cual minimiza el número de pruebas, seguido del procedimiento ilustrado en la Figura 1. Finalmente, se realiza un análisis estadístico de los resultados obtenidos y se presentan las respectivas conclusiones.

Figura 1. Metodología experimental



Fuente: los autores

2.1 Métodos de cultivo

Se empleó *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/l es: NaNO₃ (2,94),

MgSO₄·7H₂O (3,04 X 10⁻¹) NaCl (4,28 X 10⁻¹), K₂HPO₄ (4,31 X 10⁻¹), KH₂PO₄ (1,29), CaCl₂·2H₂O (1,70 X 10⁻¹) y micronutrientes (mg/l) ZnSO₄·7H₂O (3,07 X 10⁻²), MnCl₂·4H₂O

(7,28 X 10⁻³), MoO₃ (4,93 X 10⁻³), CuSO₄·5H₂O (6,29 X 10⁻³), Co(NO₃)₂·6H₂O (1,68 X 10⁻³), H₃BO₃ (1,85 X 10⁻¹), EDTA (1,71 X 10⁻¹), KOH (5,53 X 10⁻¹), FeSO₄·7H₂O (1,79 X 10⁻²).

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y h=35 cm altura con un volumen del cultivo de 2000 cm³ (2 L). Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 mL/min y condiciones de temperatura de 25°C ± 2°C, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO₂, considerándose este cultivo como tratamiento control. Después de 5 días de cultivo la biomasa producida fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 20 minutos, posteriormente se secó a 105 °C durante 24 horas.

2.2 Diseño experimental

Para el desarrollo del diseño experimental se realiza en la herramienta informática STATISTIC 7.0. El diseño realizado está basado en composición central, no factorial 3³ de 17 experimentos con réplica (Tabla 1). Éste fue realizado para evaluar la influencia de las variables, concentración molar de NaOH (1, 2 y 3M), relación solvente/biomasa (15, 30 y 45 ml solvente /g biomasa) y temperatura (25, 55 y 85°C).

Para la extracción de proteínas mediante pretratamiento alcalino se tomó 1 gramo de biomasa seca y mediante el diseño experimental se adicionó la solución de NaOH para luego ser tratado térmicamente en baño de maría durante 20 minutos. Una vez transcurrida la etapa anterior, se centrifugaron las muestras a 3400 rpm

en una centrífuga (DYNAC) durante 15 minutos, obteniendo finalmente el primer extracto y biomasa residual, a la cual se le aplica el mismo procedimiento anteriormente escrito con el fin de lograr una segunda extracción y cuantificación.

Tabla 1. Diseño experimental

| Prueba | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------|--------|-----|----|-----|-----|----|
| Molaridad | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | 0,3266 | 3,6733 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| mL Solvente/ g biomasa | 15 | 45 | 15 | 45 | 30 | 15 | 45 | 15 | 45 | 30 | 30 | 30 | 4,9 | 55 | 30 | 30 | 30 |
| Temperatura (°C) | 25 | 85 | 85 | 25 | 55 | 85 | 25 | 25 | 85 | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 | 4,8 | 105 | 55 |

2.3 Separación de clorofilas

Aunque la temperatura es un factor importante, también puede degradar moléculas termolábiles como las clorofilas [17], produciendo problemas de sobrestimación proteica [15], cambios en el color y estructura molecular [16]. Para disminuir dicho problema, una vez culminados los 20 minutos de tratamiento térmico, se centrifugaron las muestras a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 15 minutos y se pasaron los extractos de muestras que desprenden clorofilas, sobre una columna vertical de diámetro interno 1,4 cm y altura 12,5 cm, rellena con carbón activado, obteniéndose un extracto libre de pigmentos.

2.4 Cuantificación de proteínas totales

Se usó 1 mL de solución de NaOH en concentración igual a la del pretratamiento alcalino, para la preparación del blanco y 1 mL de cada extracto y a estos se les adicionó por separado, 5 mL de reactivo biuret para de esta manera poder aplicar

el método de Biuret [19], descrito por Dorey & Draves (1998). Al cabo de 20 minutos se mide la absorbancia a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

2.5 Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se realiza con el fin de evaluar la selectividad del método, ya que a mayor cantidad de carbohidratos, el método de extracción de proteínas tiene selectividad baja.

El método utilizado fue el colorimétrico fenol-ácido sulfúrico propuesto por Dubois *et al.*, (1956). Este determina los diferentes carbohidratos presentes en la muestra [20]. Se adquirió 1 mL de solución de NaOH a concentración igual a la del pretratamiento alcalino, 1mL de cada extracto y a éstos se les adicionaron por separado, 0,5 mL de fenol al 5%, se homogeneizó la mezcla y se adicionó 2,5 mL de ácido sulfúrico al 95%. Por último la muestra se analizó empleando el espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a longitudes de onda de 480nm, 487nm, y 490nm para identificar Glucosa, Xilosa, Arabinosa, Galactosa y Fructosa (Dubois *et al.*, 1956).

2.6 Balance de masa

Con el fin de obtener datos cuantitativos de la cantidad de biomasa que entró, solubilizó y quedó como residuo del proceso, se realiza un balance de masa en cada una de las extracciones ilustrado en la Tabla A1 del anexo A, para de esta forma saber cuáles fueron los porcentajes de solubilización de proteínas y carbohidratos por cada gramo de biomasa solubilizada. Para esto se aplica la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Biomasa}_{(Inicial)} - \mathbf{Biomasa}_{(Solubilizada)} = \mathbf{Biomasa}_{(Residual)} \quad (1)$$

Donde la biomasa inicial es la arrojada por el diseño de experimentos reflejado en la Tabla 1.

Para cuantificar la biomasa residual, se toma el peso de un tubo de ensayo libre de humedad, donde se deposita tal biomasa, se envía por 24 horas a horno a 105 °C y 12 horas en desecador, finalmente se pesa el tubo de ensayo. La biomasa residual del proceso es el resultado de la diferencia entre peso final y el peso inicial del tubo.

La biomasa solubilizada, es la diferencia entre la biomasa inicial y la biomasa residual.

El porcentaje de solubilización tanto de carbohidratos como de proteínas fue calculado utilizando las ecuaciones 2 y 3

$$\% \text{ Solubilización proteínas} = \frac{g \text{ Proteína solubilizada}}{g \text{ Biomasa solubilizada}} * 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Solubilización carbohidratos} = \frac{g \text{ Carbohidrato solubilizado}}{g \text{ Biomasa solubilizada}} * 100 \quad (3)$$

Durante el pretratamiento alcalino se observan colores oscuros lo que indica la presencia de clorofila y compuestos fenólicos en combinación con proteínas, ésta combinación da lugar a bajos rendimientos en la extracción de proteínas de microalgas [18], y es la razón por la cual en algunas pruebas se obtienen porcentajes de extracción bajos.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La Tabla 2 contiene los resultados de cuantificación, en gramos por litro de la primera y segunda etapa de extracción de los metabolitos proteína y carbohidratos para cada una de las pruebas del diseño experimental.

Tabla 2. Concentración de proteínas y carbohidratos obtenidos (g/L)

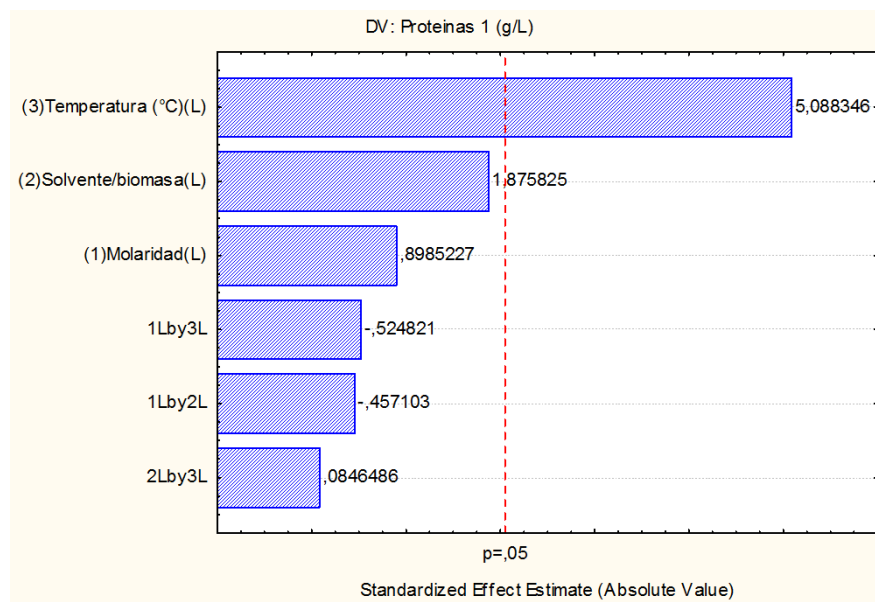
| Prueba | ORIGINAL | | | | REPLICA | | | |
|--------|-----------|--------|---------------|--------|-----------|--------|---------------|--------|
| | PROTEÍNAS | | CARBOHIDRATOS | | PROTEÍNAS | | CARBOHIDRATOS | |
| | 1º Ext | 2º Ext | 1º Ext | 2º Ext | 1º Ext | 2º Ext | 1º Ext | 2º Ext |
| 1 | 0,3131 | 0,6179 | 0,3538 | 0,0797 | 0,3131 | 0,5671 | 0,6428 | 0,1978 |
| 2 | 1,4308 | 1,7864 | 0,3706 | 0,1887 | 1,3546 | 1,6848 | 0,2086 | 0,1825 |
| 3 | 0,9735 | 1,2021 | 0,5950 | 0,3778 | 0,9989 | 1,4562 | 0,9959 | 0,0941 |
| 4 | 1,2275 | 1,7102 | 0,4202 | 0,1409 | 0,3893 | 0,8211 | 0,5726 | 0,2953 |
| 5 | 1,3546 | 1,4054 | 0,4516 | 0,2273 | 1,2275 | 1,3800 | 0,4278 | 0,4132 |
| 6 | 1,0751 | 1,1767 | 1,1784 | 0,8380 | 1,0243 | 1,2529 | 0,7076 | 0,4640 |
| 7 | 0,9735 | 1,2529 | 0,3725 | 0,1375 | 0,7195 | 0,8465 | 0,3835 | 0,1215 |
| 8 | 0,6687 | 1,0751 | 0,8252 | 0,4908 | 0,6687 | 1,1005 | 0,6144 | 0,3592 |
| 9 | 1,2783 | 1,4054 | 0,5839 | 0,2843 | 1,4816 | 1,7864 | 1,9057 | 1,0090 |
| 10 | 1,1513 | 1,3038 | 0,6191 | 0,2352 | 1,3546 | 1,5324 | 0,4039 | 0,3603 |
| 11 | 0,4401 | 0,8465 | 0,3614 | 0,0376 | 0,5163 | 0,6179 | 1,3496 | 0,1895 |
| 12 | 0,7703 | 0,9735 | 0,1444 | 0,0710 | 0,9481 | 1,0243 | 1,0641 | 0,5777 |
| 13 | 0,3385 | 0,4655 | 0,9276 | 0,6386 | 0,2623 | 0,5163 | 0,9452 | 0,6681 |
| 14 | 0,5417 | 0,6179 | 1,5092 | 0,1769 | 0,5671 | 0,5925 | 0,8177 | 0,1887 |
| 15 | 0,4147 | 0,9227 | 0,0386 | 0,0303 | 0,5163 | 0,6433 | 0,0729 | 0,0128 |
| 16 | 2,0658 | 2,3452 | 1,4044 | 0,8194 | 2,2182 | 2,2690 | 1,1223 | 0,8662 |
| 17 | 1,3292 | 1,4308 | 0,4566 | 0,3843 | 1,5324 | 1,5324 | 0,4834 | 0,4406 |

3.1 Análisis estadístico

3.1.1 Análisis para resultados de extracción de proteínas

Para diagnosticar la influencia que las variables (Temperatura, Molaridad, relación solvente/biomasa) ejercen sobre los datos obtenidos en la Tabla 2, se realizaron diagramas de Pareto, con el fin de conocer las variables significativas que afectan positiva o negativamente la extracción (Figura 2).

Figura 2. Diagrama de Pareto para la primera extracción de proteínas

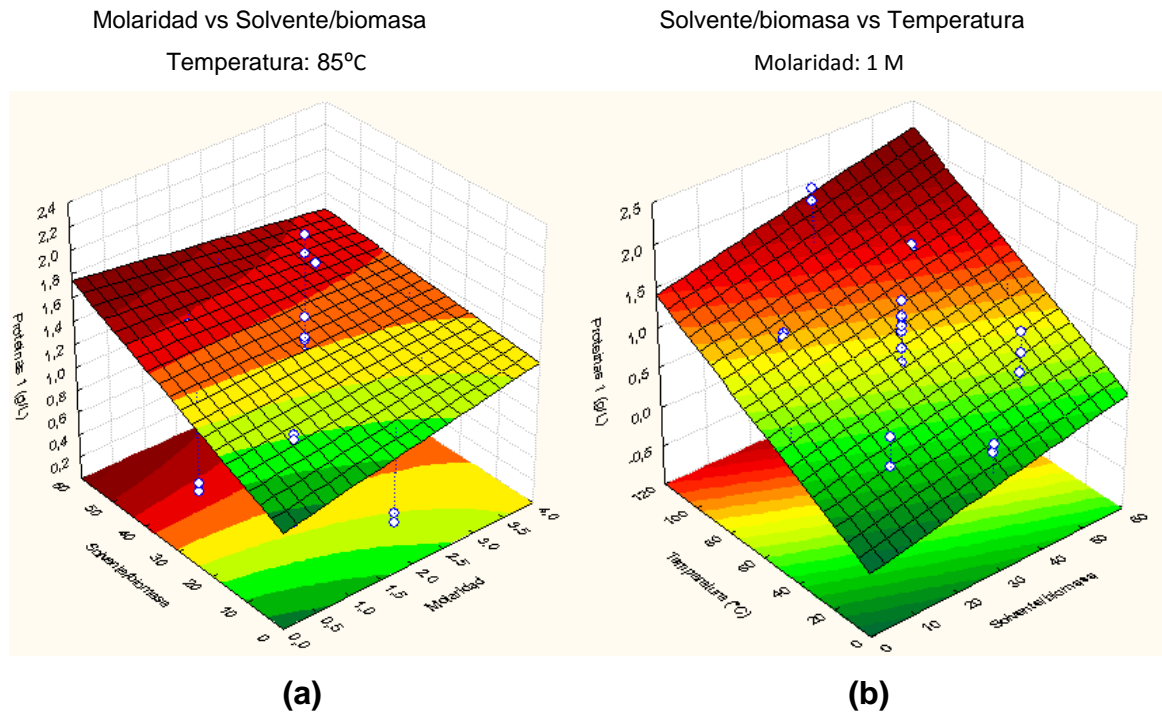


Fuente: los autores

Las variables más significativas son aquellas que pasen el umbral (línea roja punteada). En este caso, y de manera positiva, es la temperatura, es decir, al aumentar ésta, la extracción debe ser mayor. No obstante, la relación solvente/biomasa pese a no ser significativa, representa variaciones importantes en los resultados, al aumentar su valor. Para ello, se visualizan las superficies de

respuesta más representativas para obtener predicciones de las mejores condiciones de extracción de proteínas.

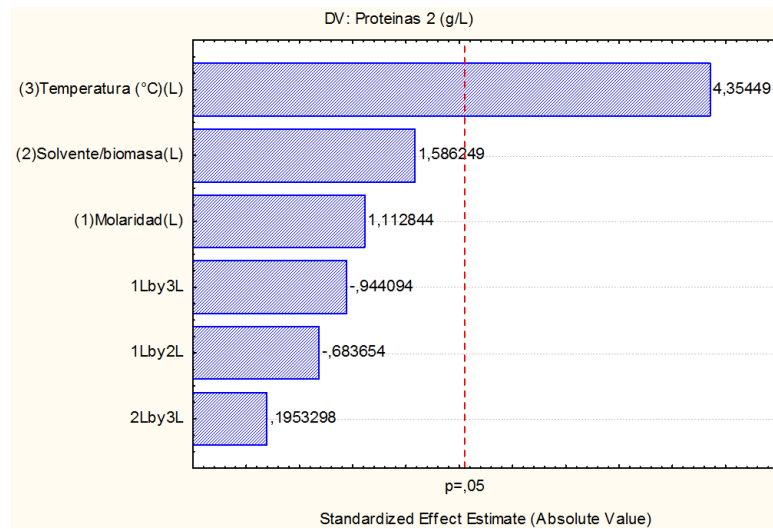
Figura 3. Superficies de respuesta para la primera extracción de proteínas



Las superficies de respuestas de las Figuras 3a y 3b reflejan que las mejores extracciones durante ésta etapa se presentaron cuando se usó molaridades bajas (1M), relaciones de solvente altas (45-55 mL) y temperaturas alrededor de los 85°C.

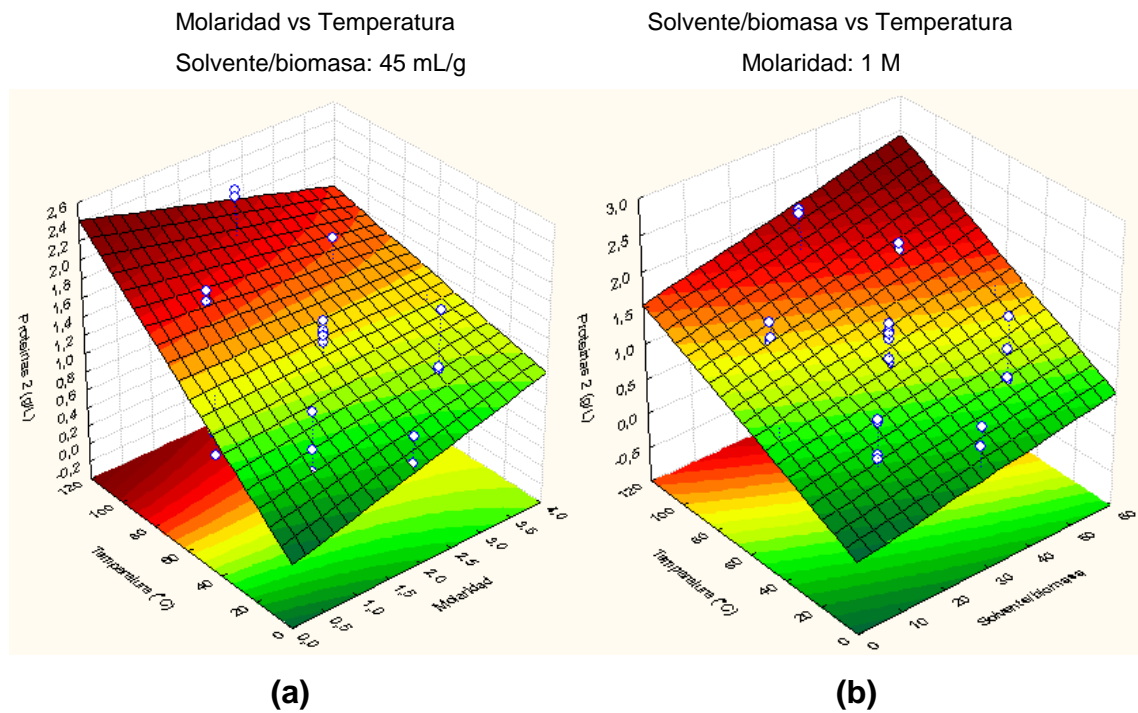
En la segunda extracción de proteínas nuevamente la temperatura fue la variable con mayor importancia en la extracción. Sin embargo, la relación solvente/biomasa se alejó un poco más del umbral, pero siguió influyendo de manera positiva (Figura 4).

Figura 4. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de proteínas



Fuente: los autores

Figura 5. Superficies de respuesta para la segunda extracción de proteínas



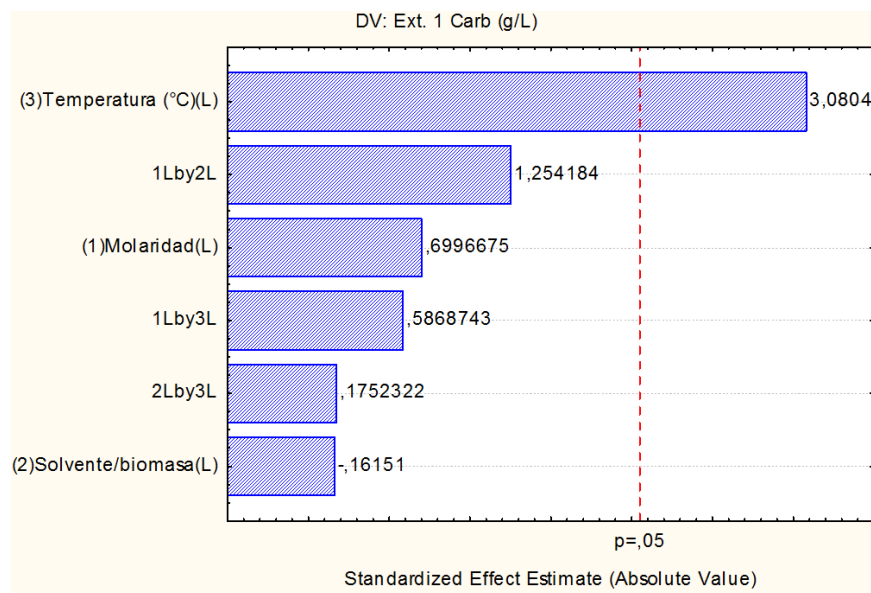
Las superficies de las Figuras 5a y 5b, muestran que a temperaturas altas (85-105°C) y molaridad baja (1M), se pueden llegar a extraer cerca de 2,4 g/L que corresponden al 10,8% de la biomasa inicial, siempre y cuando se mantenga una alta relación de solvente. A partir de estas dos superficies de respuesta y de los datos presentados en la Tabla 2, se determinó que las mayores cantidades de proteínas se obtuvieron en la segunda extracción, esto se debe a que el solvente tiene que penetrar en la célula y para ello debe solubilizar primero los componentes presentes en la pared celular [18].

Las proteínas solubilizadas en la primera y segunda etapa de extracción corresponden aproximadamente al 40% y 60% respectivamente de las proteínas totales extraídas, lo cual es congruente con el estudio de Rietschel & Rudolf (2012), quienes además determinaron que en una tercera etapa de extracción se presenta bajo contenido de proteínas [21]. Los porcentajes totales de solubilización de proteínas extraídas varía del 1 al 58% de la biomasa solubilizada, con lo cual se observó que está dentro del rango de extracción obtenido por Sari *et al* (2012) y éste puede variar dependiendo del tipo de microalga [18]. El método de separación de proteínas propuesto por Gerde *et al* (2013) es basado en el estudio del efecto del pH usando NaOH o HCl, con temperaturas entre 30-60°C y tiempos de extracción de 1, 5 y 16 horas en una sola etapa, donde se obtiene un rendimiento máximo del 12% de la biomasa, muy similar al obtenido en el presente estudio el cual es del 13,5% correspondiente a la máxima extracción, con la diferencia de que se lleva en dos etapas durante 20 minutos. Slocombe *et al*. (2013) Encontró que para la especie *Monodopsis subterranea*, se alcanzan rendimientos que van desde 6 hasta del 24%, los cuales son altamente dependientes del tiempo de incubación (3 horas) en medio alcalino a 55°C. A partir de esto se puede inferir que la variable tiempo es influyente en la extracción de las proteínas, haciendo interesante aplicar procesos de extracción que involucren altas temperaturas y tiempos largos de pretratamiento.

3.1.2 Análisis para resultados de extracción de carbohidratos

Para el caso de la primera extracción de los carbohidratos la variable significativa fue la temperatura afectando positivamente, y en segunda instancia aunque no representativa, fue la interacción entre la molaridad y la relación solvente/biomasa. Pero esta última fue la que tuvo mayor influencia positiva con respecto a las otras variables e interacciones no representativas (Figura 6).

Figura 6. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos



Fuente: los autores

De acuerdo las Figuras 7a y 7b, las mayores extracciones que se pueden alcanzar en esta primera etapa es alrededor de 1,8 g/L, (correspondiente al 8,1 % de la biomasa inicial) las cuales se logran con la mayor molaridad, temperatura y relación solvente presentados en el diseño.

Figura 7. Superficies de respuesta para la primera extracción de carbohidratos

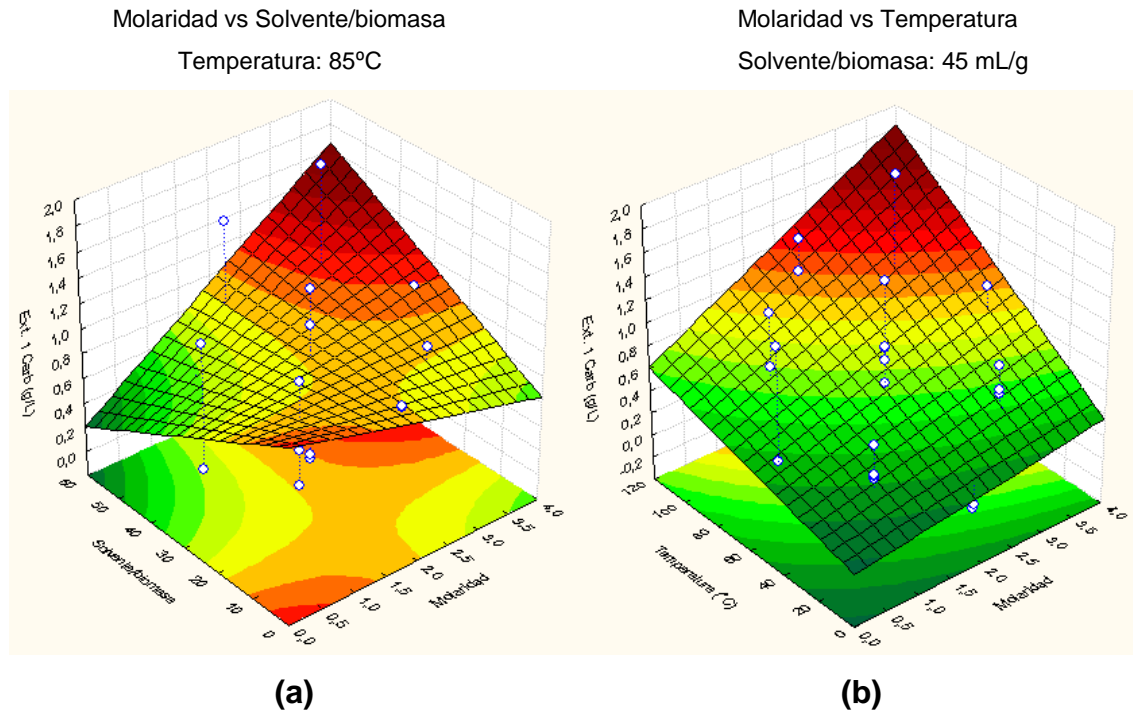
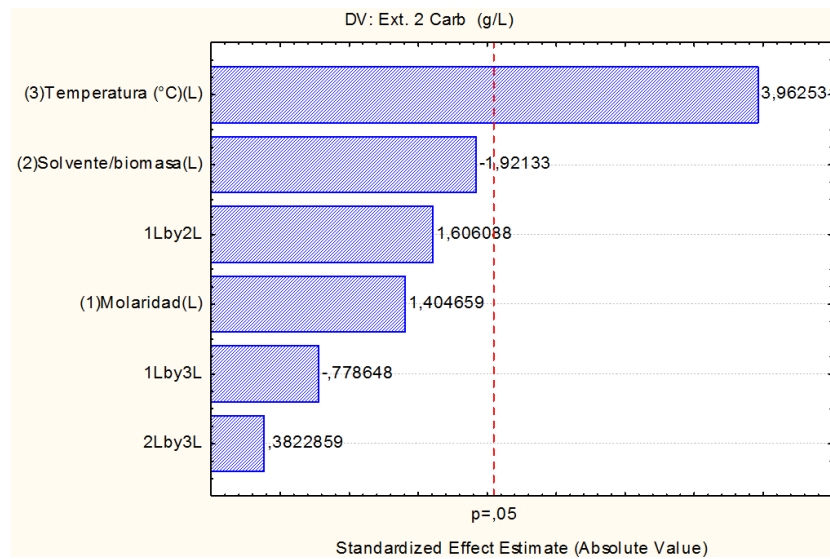


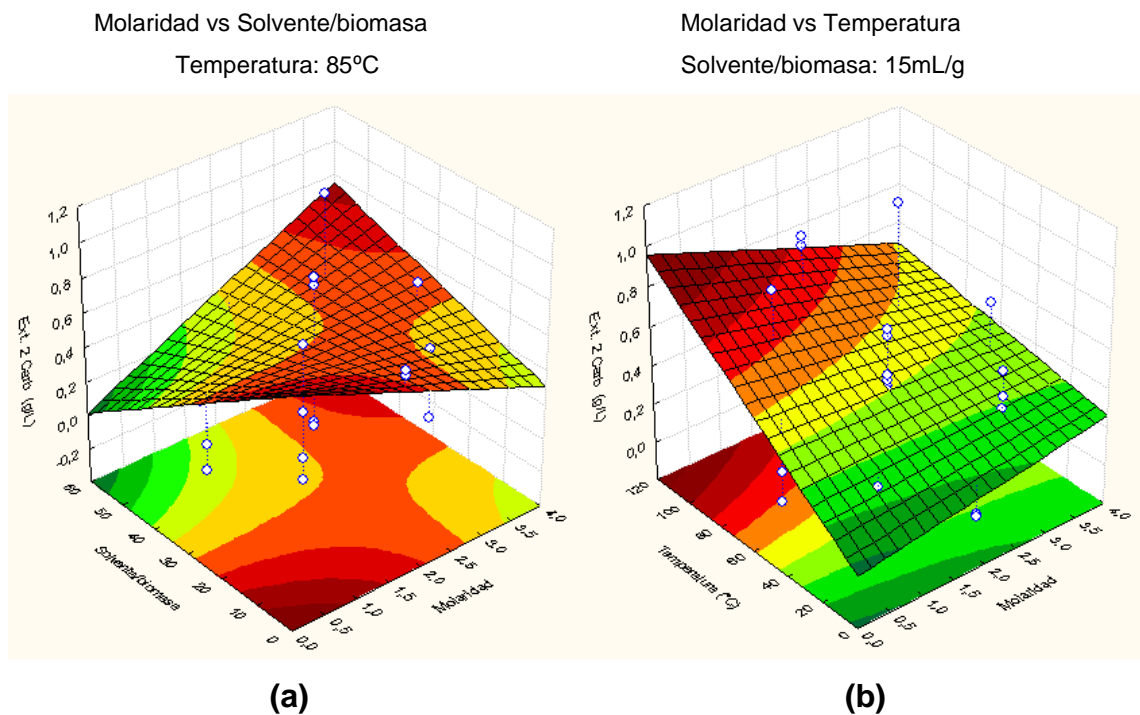
Figura 8. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de carbohidratos



Fuente: los autores

En la Figura 9a se visualiza una proporcionalidad directa entre la molaridad y la relación solvente/biomasa para la extracción, cuando esta es llevada a cabo a 85°C, aunque la cantidad extraída se presenta un poco más alta cuando se disminuye la relación de solvente. En la superficie de respuesta de la Figura 9b, es posible ver que las mejores obtenciones ocurren cuando se tiene baja molaridad y alta temperatura.

Figura 9. Superficies de respuesta para la segunda extracción de carbohidratos



Por otro lado, se logra evidenciar que durante la segunda etapa de extracción, la máxima cantidad de carbohidratos que se puede obtener corresponde aproximadamente a un 50% menos de la máxima a la que se puede llegar en la primera extracción, esto se debe a que la mayoría de estos se encuentran en la parte más exterior de la célula, y se alcanzan a retirar en su mayoría en la primera etapa de extracción.

La mayor cantidad de carbohidratos extraída fue 2,92 g/L a temperatura de 85°C, molaridad de 3M y relación solvente / biomasa de 45 mL/g, lo que corresponde a un rendimiento de 41,06 % de los carbohidratos iniciales, teniendo en cuenta que los carbohidratos corresponden al 32% de la biomasa total [12]. La extracción de carbohidratos realizada resulta ser más eficiente que la propuesta por Harun *et al.* (2011) donde el rendimiento máximo fue de 35,01% de los carbohidratos iniciales, trabajando a 120°C, 0,75% w/v de NaOH durante 30 minutos.

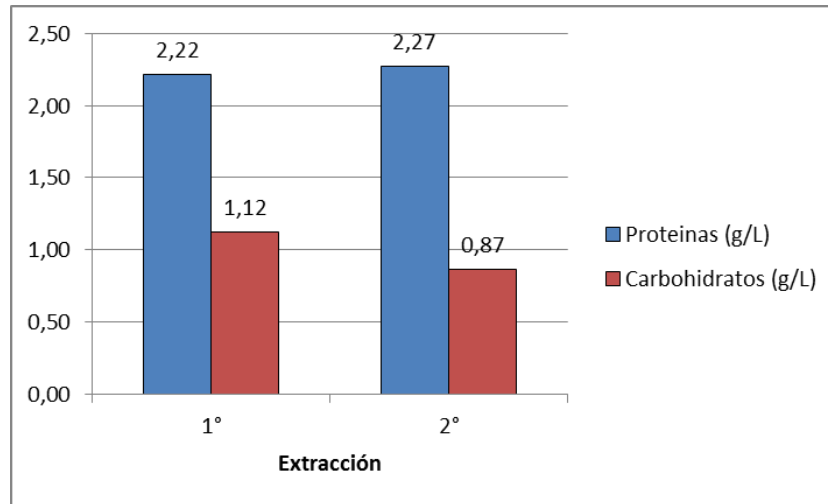
3.2 Mejores condiciones de extracción

Tabla 3. Mejor condición de extracción de proteínas

| Temperatura = 105 °C Relación solv / biomasa = 30 mL/g Molaridad = 2M | | |
|---|-----------------|---------------------|
| Extracción | Proteinas (g/L) | Carbohidratos (g/L) |
| 1° | 2,22 | 1,12 |
| 2° | 2,27 | 0,87 |
| Total extraído | 4,49 | 1,99 |

En la Tabla 3 y la Figura 10 se muestran las mejores condiciones y los resultados para la extracción de proteínas durante la primera y segunda etapa de extracción y los resultados de carbohidratos correspondientes a la misma prueba.

Figura 10. Cantidad de proteínas obtenidas en la mejor extracción



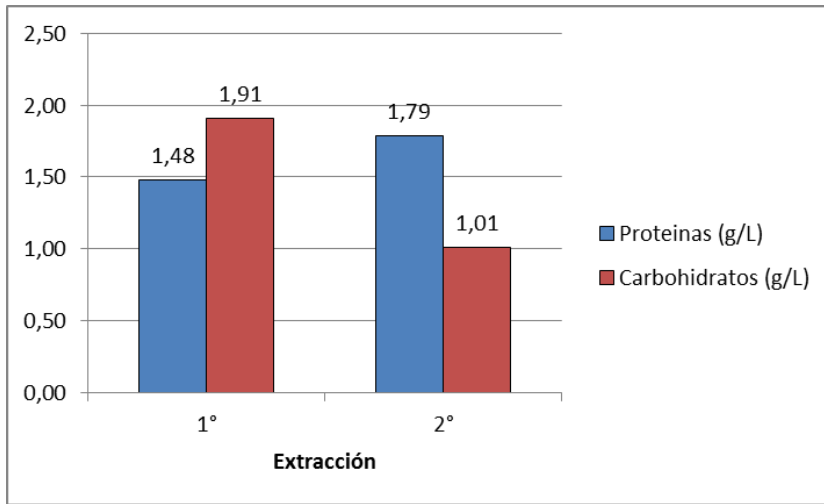
Fuente: los autores

Tabla 4. Mejor condición de extracción de carbohidratos

En la Tabla 4 se muestra la mejor condición para la extracción de carbohidratos en cada etapa y las respectivas extracciones de proteínas. Además en la Figura 11 se reflejan éstos resultados.

| Temperatura = 85 °C Relación solv / biomasa = 45 mL/g Molaridad = 3M | | |
|--|-----------------|---------------------|
| Extracción | Proteínas (g/L) | Carbohidratos (g/L) |
| 1° | 1,48 | 1,91 |
| 2° | 1,79 | 1,01 |
| Total extraído | 3,27 | 2,92 |

Figura 11. Cantidad de carbohidratos obtenidos en la mejor extracción



Fuente: los autores

3.2.1 Propuesta de extracción de ambos metabolitos

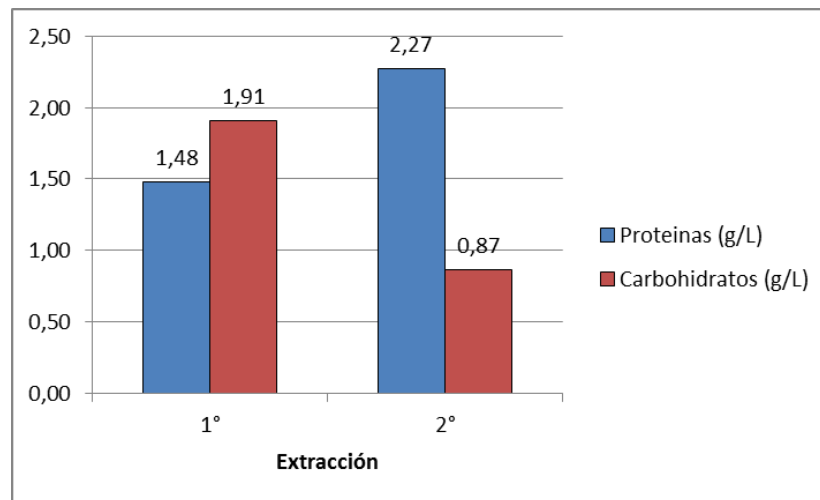
Debido a la no selectividad del método de extracción, se propone el sistema de la Tabla 5 donde se aprovechen de manera eficiente ambos metabolitos, teniendo en cuenta las mejores condiciones de extracción de cada uno. Para esto, en la primera extracción se opera a condiciones óptimas de extracción de carbohidratos y en la segunda a condiciones óptimas de extracción de proteínas.

Tabla 5. Condición supuesta para la extracción de ambos metabolitos

| | | |
|-----------------------|---|----------------------------|
| 1° Extracción | Temperatura = 85 °C Relación solv / biomasa = 45 mL/g Molaridad = 3M | |
| 2° Extracción | Temperatura = 105 °C Relación solv / biomasa = 30 mL/g Molaridad = 2M | |
| Extracción | Proteínas (g/L) | Carbohidratos (g/L) |
| 1° | 1,48 | 1,91 |
| 2° | 2,27 | 0,87 |
| Total extraído | 3,75 | 2,77 |

En la Figura 12 se observan cantidades ideales de obtención de cada metabolito, ya que se asume que cada metabolito solubiliza de manera óptima ante sus mejores condiciones de extracción.

Figura 12. Cantidad de ambos metabolitos obtenidos en condiciones supuestas

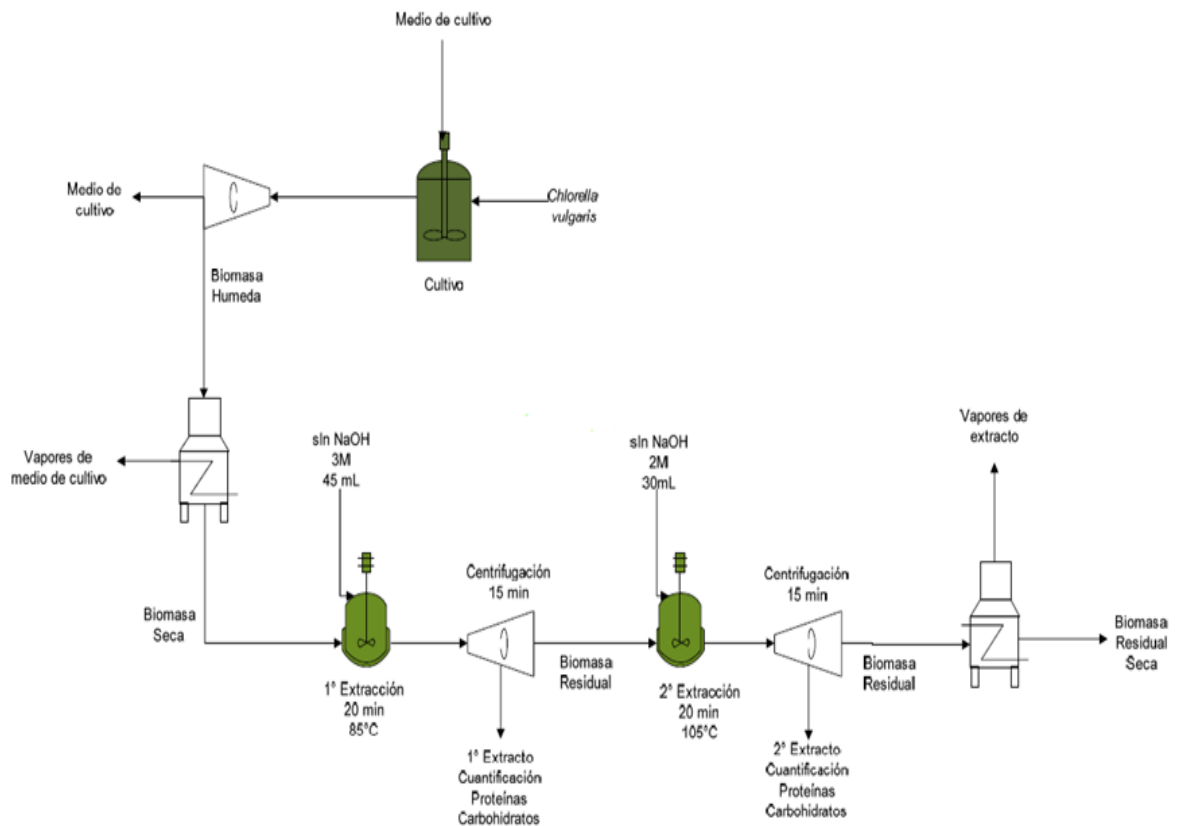


Fuente: los autores

En este supuesto, la cantidad total de proteínas solubilizadas, es menor a la total conseguida en el mejor método de extracción de proteínas, pero de esta manera se puede aprovechar los carbohidratos disponibles en la biomasa, lo que permitiría aumentar un poco el valor agregado del extracto. Este resultado puede variar positiva o negativamente al realizar la prueba realmente, ya que la biomasa puede o no contener carbohidratos y proteínas suficientes que mejoren la extracción.

En la Figura 13 visualiza todo el proceso de extracción aplicando las condiciones del supuesto anterior.

Figura 13. Diagrama de flujo en condiciones supuestas de la mejor extracción



Fuente: los autores

En la Figura 13 se ilustra el proceso de extracción de proteínas y carbohidratos bajo las mejores condiciones de extracción, por estas razones, la primera etapa de extracción se lleva a cabo a 85 °C agregando 45 mL de solución NaOH a 3 M, es decir a las mejores condiciones de extracción de carbohidratos; la segunda etapa de extracción se lleva a cabo a 105 °C, agregando 30 mL de solución NaOH a 2 M, decir las mejores condiciones de extracción de proteínas.

4. CONCLUSIONES

1. El diseño experimental propuesto no es selectivo para la extracción de proteínas, ya que permite la extracción de otros metabolitos como carbohidratos.
2. El análisis estadístico de los resultados mostró que la mayor cantidad de proteínas se extraen bajo condiciones de alta temperatura (105°C), relación solvente/biomasa de 30 mL/g y molaridad de 2M; la mayor cantidad de carbohidratos se extraen a 85 °C, concentración molar 3M y 45 mL/g de relación solvente/biomasa.
3. Los mayores resultados de proteínas obtenidas se consiguen en la segunda etapa de extracción con un porcentaje promedio de 60% del total de proteínas extraídas, mientras que los carbohidratos se extraen en su mayoría en la primera etapa con un porcentaje del 65% de los carbohidratos totales.

5. RECOMENDACIONES

1. Proponer un diseño experimental con temperaturas superiores a las estudiadas en el presente trabajo, con el fin de hacer que el método sea más selectivo y así poder obtener resultados de proteínas mayores.
2. Involucrar otras variables influyentes en la extracción de proteínas como el tiempo de extracción, con el objetivo de mejorar la selectividad y el rendimiento del método.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Sánchez, K. Ojeda, M. El-Halwagib y V. Kafarov, «Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pinch analysis of heat integration» *Chemical engineering journal*, pp. 211-216, 2011.
- [2] . T. T. Yen Doan , B. Sivaloganathan y J. P. Obbard, «Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock» *Biomass and Bioenergy*, pp. 2534-2544, 2011.
- [3] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde y M. K. Danquah, «Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, p. 1037–1047, 2010 .
- [4] E. Suali y R. Sarbatly, «Conversion of microalgae to biofuel» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 4316– 4342, 2012.
- [5] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, R. Ruan y B. Hu, «Mixotrophic cultivation of chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar material» *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, pp. 2 2 4 5-2 2 5 3, 2011.
- [6] C. Alcántara, P. A. García-Encina y R. Muñoz, «Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae» *Chemical Engineering Journal*, vol. 221, p. 238–246, 2013 .
- [7] J. A. Gerde, T. Wang, L. Yao, S. Jung, L. A. Johnson y B. Lamsal, «Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted Nannochloropsis» *Algal Research*, vol. 2, p. 145–153, 2013.

- [8] J. M. Pacheco Vega, M. A. Cadena Roa, M. d. P. Sánchez Saavedra, D. Tovar Ramírez y C. Rangel Dávalos, «Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*» *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, vol. 1, nº 1, pp. 6-15, 2010.
- [9] F. García-Cuadra , N. Jawiarczyk , C. González-López , J. Fernández-Sevilla y F. Acien Fernández , «Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas carbohidratos y lipidos» *Revista Latinoamericana en Biotecnología Ambiental y Algal*, vol. 3, nº 2, pp. 147-161, 2012.
- [10] B. Serive, R. Kaas, J. B. Bérard, V. Pasquet y L. Picot, «Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae» *Bioresource Technology*, vol. 124, p. 311–320, 2012 .
- [11] F. Hadj-Romdhane, P. Jaouen, J. Pruvost, D. Grizeau, G. Van Vooren y P. Bourseau, «Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture» *Bioresource Technology*, nº 123, p. 366–374, 2012 .
- [12] R. Harun, W. Jason, T. Cherrington y M. K. Danquah, «Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production» *Applied Energy*, vol. 88, p. 3464–3467, 2011.
- [13] M. Reboloso Fuentes, G. Acien Fernandez, J. Sanchez Perez y J. Guil Guerrero, «Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*» *Food Chemistry*, nº 70 , pp. 345-353, 2000.
- [14] Z. Yong Ju, D. F. Deng y W. Dominy, «A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931)» *Aquaculture*, nº

354–355, p. 50–55, 2012 .

- [15] S. P. Slocombe, M. Ross, N. Thomas, S. McNeill y M. S. Stanley, «A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass» *Bioresource Technology*, nº 129 , p. 51–57, 2013.
- [16] A. Schwenzfeier, P. A. Wierenga y H. Gruppen, «Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp.» *Bioresource Technology*, nº 102 , p. 9121–9127, 2011.
- [17] B. Serive, R. Kaas, J. B. Bérard, V. Pasquet, L. Picot y J.-P. Cadoret, «Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae» *Bioresource Technology*, nº 124 , p. 311–320, 2012 .
- [18] Y. W. Sari, M. E. Bruins y J. P. Sanders, «Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals» *Industrial Crops and Products*, nº 43 , p. 78– 83, 2013 .
- [19] F. Dorey y G. Draves, «Quantitative Analysis Laboratory» *Approach Funded by the nacional science Foundation* , nº 1-3, 1998.
- [20] M. Dubois, K. Gilles, P. Rebers y F. Smith, «Colorimetric Method for Dtermination of Sugars and Related Substances» *Analytical Chimestry*, vol. 3, nº 28, pp. 350-356, 1956.
- [21] C. Rudolf y S. Rietschel, «Influence of extraction parameters on protein and carbohydrate yield,» pp. 36-47, 2012.

7. ANEXOS

ANEXO A. CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS EXTRAIDOS

Tabla A1. Resultados generales del balance de masa

| | Prueba | Biomasa inicial g | Solvente ml | Biomasa residual | Biomasa solubilizada g | % de solubilización | Biomasa solubilizada g/L | proteínas totales g/L | Proteínas % | carbohidratos totales g/L | Carbohidratos % |
|----------|--------|-------------------|-------------|------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|-----------------|
| ORIGINAL | 1 | 1 | 15 | 0,70 | 0,30 | 29,80 | 19,87 | 0,93 | 4,69 | 0,43 | 2,18 |
| | 2 | 1 | 45 | 0,70 | 0,30 | 29,65 | 6,59 | 3,22 | 48,83 | 0,56 | 8,49 |
| | 3 | 1 | 15 | 0,75 | 0,25 | 24,60 | 16,40 | 2,18 | 13,27 | 0,97 | 5,93 |
| | 4 | 1 | 45 | 0,43 | 0,57 | 57,00 | 12,67 | 2,94 | 23,19 | 0,56 | 4,43 |
| | 5 | 1 | 30 | 0,79 | 0,21 | 21,10 | 7,03 | 2,76 | 39,24 | 0,68 | 9,65 |
| | 6 | 1 | 15 | 0,78 | 0,22 | 21,67 | 14,44 | 2,25 | 15,59 | 2,02 | 13,96 |
| | 7 | 1 | 45 | 0,25 | 0,75 | 75,40 | 16,76 | 2,23 | 13,29 | 0,51 | 3,04 |
| | 8 | 1 | 15 | 0,61 | 0,39 | 39,15 | 26,10 | 1,74 | 6,68 | 1,32 | 5,04 |
| | 9 | 1 | 45 | 0,53 | 0,47 | 47,15 | 10,48 | 2,68 | 25,61 | 0,87 | 8,29 |
| | 10 | 1 | 30 | 0,54 | 0,46 | 46,40 | 15,47 | 2,46 | 15,87 | 0,85 | 5,52 |
| | 11 | 1 | 30 | 0,62 | 0,38 | 38,40 | 12,80 | 1,29 | 10,05 | 0,40 | 3,12 |
| | 12 | 1 | 30 | 0,77 | 0,23 | 23,35 | 7,78 | 1,74 | 22,41 | 0,22 | 2,77 |
| | 13 | 1 | 4,90 | 0,61 | 0,39 | 38,54 | 78,65 | 0,80 | 1,02 | 1,57 | 1,99 |
| | 14 | 1 | 55,10 | 0,62 | 0,38 | 38,00 | 6,90 | 1,16 | 16,81 | 1,69 | 24,45 |
| | 15 | 1 | 30 | 0,64 | 0,36 | 35,90 | 11,97 | 1,34 | 11,18 | 0,07 | 0,58 |
| | 16 | 1 | 30 | 0,72 | 0,29 | 28,50 | 9,50 | 4,41 | 46,43 | 2,22 | 23,41 |
| | 17 | 1 | 30 | 0,84 | 0,16 | 15,70 | 5,23 | 2,76 | 52,74 | 0,84 | 16,07 |
| REPLICA | 1 | 1 | 15 | 0,75 | 0,25 | 25,30 | 16,87 | 0,88 | 5,22 | 0,84 | 4,98 |
| | 2 | 1 | 45 | 0,77 | 0,23 | 23,20 | 5,16 | 3,04 | 58,95 | 0,39 | 7,59 |
| | 3 | 1 | 15 | 0,77 | 0,23 | 22,72 | 15,15 | 2,46 | 16,21 | 1,09 | 7,19 |
| | 4 | 1 | 45 | 0,79 | 0,21 | 20,80 | 4,62 | 1,21 | 26,19 | 0,87 | 18,78 |
| | 5 | 1 | 30 | 0,70 | 0,30 | 30,20 | 10,07 | 2,61 | 25,90 | 0,84 | 8,35 |
| | 6 | 1 | 15 | 0,78 | 0,22 | 22,42 | 14,95 | 2,28 | 15,23 | 1,17 | 7,84 |
| | 7 | 1 | 45 | 0,46 | 0,54 | 54,20 | 12,04 | 1,57 | 13,00 | 0,51 | 4,19 |
| | 8 | 1 | 15 | 0,55 | 0,45 | 44,65 | 29,77 | 1,77 | 5,94 | 0,97 | 3,27 |
| | 9 | 1 | 45 | 0,66 | 0,34 | 34,47 | 7,66 | 3,27 | 42,66 | 2,91 | 38,05 |
| | 10 | 1 | 30 | 0,63 | 0,37 | 36,66 | 12,22 | 2,89 | 23,62 | 0,76 | 6,25 |
| | 11 | 1 | 30 | 0,57 | 0,43 | 43,30 | 14,43 | 1,13 | 7,86 | 1,54 | 10,66 |
| | 12 | 1 | 30 | 0,51 | 0,49 | 48,60 | 16,20 | 1,97 | 12,18 | 1,64 | 10,13 |
| | 13 | 1 | 4,90 | 0,67 | 0,34 | 33,50 | 68,36 | 0,78 | 1,14 | 1,61 | 2,36 |
| | 14 | 1 | 55,10 | 0,83 | 0,17 | 16,70 | 3,03 | 1,16 | 38,26 | 1,01 | 33,21 |
| | 15 | 1 | 30 | 0,64 | 0,36 | 36,20 | 12,07 | 1,16 | 9,61 | 0,09 | 0,71 |
| | 16 | 1 | 30 | 0,41 | 0,59 | 59,10 | 19,70 | 4,49 | 22,78 | 1,99 | 10,09 |
| | 17 | 1 | 30 | 0,46 | 0,54 | 53,70 | 17,90 | 3,06 | 17,12 | 0,92 | 5,16 |

ANEXO B. CULTIVO DE MICROALGAS Y MONTAJES DE EXTRACCIÓN A 105 Y 4,8 °C



a. Cultivo de microalgas



b. Baño de maría a 105°C



c. Baño de maría a 4,8°C

