

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL PROCESO DE ESCALADO PARA LA  
EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS PRESENTES EN  
*Chlorella vulgaris* UTEX 1803, CON VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO**

**DAVID EDUARDO CHAVARRO ACUÑA  
LILIANA KAROLINA ROJAS CELIS**

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

**2014**

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL PROCESO DE ESCALADO PARA LA  
EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS PRESENTES EN  
*Chlorella vulgaris* UTEX 1803, CON VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO**

**DAVID EDUARDO CHAVARRO ACUÑA 2053226  
LILIANA KAROLINA ROJAS CELIS 2073694**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR EL  
TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

**Director:**

**CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA  
Ingeniero Químico M.Sc**

**Codirector:**

**JANET BIBIANA GARCIA MARTINEZ**

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

**2014**

## Agradecimientos

A Dios ya que con El todo y sin El nada, por darnos fuerza y coraje para emprender este camino hacia el éxito.

Al centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía por su apoyo y colaboración.

Al doctor Crisóstomo Barajas por su dirección.

A los codirectores Bibiana Garcia y Andrés Barajas por sus conocimientos, sus consejos y buenas enseñanzas.

### Dedicatoria

Especialmente a nuestros padres; por todo el amor, confianza y apoyo incondicional en este proceso de formación integral como Ingenieros Químicos.

A todas y cada una de las personas que de alguna u otra manera, contribuyeron a que se lograra esta meta y que nos ha permitido crecer intelectualmente como persona y como ser humano.

A mi hija Emilie Andrea, quien es mi mayor motivo de seguir adelante, y de alcanzar mis sueños y cumplir los de ella. Te amo mi cielo. (Karolina) .

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	13
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA .....	18
1.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	18
1.2 MÉTODOS DE CULTIVO .....	18
1.3 CULTIVO EN VINAZAS .....	19
1.4 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS .....	19
1.4.1 Diseño experimental .....	20
1.5 BALANCE DE MASA .....	20
1.6 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS .....	21
1.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	21
2. ANÁLISIS Y RESULTADOS .....	22
2.1 SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS .....	22
2.2 EFICIENCIA TOTAL DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS .....	24
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	26
3. CONCLUSIONES .....	28
4. RECOMENDACIONES .....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
BIBLIOGRAFÍA .....	33
ANEXOS .....	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción Metodológica	18
Figura 2. Porcentaje de Proteínas	22
Figura 3. Porcentaje de Carbohidratos	23
Figura 4. Eficiencia proteínas	24
Figura 5. Eficiencia Carbohidratos	25
Figura 6. Análisis Estadístico	26

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Diseño de Experimentos	20

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. Eficiencia de proteínas y carbohidratos.	36

## RESUMEN

**TITULO:** Evaluación preliminar del proceso de escalado para la extracción de carbohidratos y proteínas presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, con vinazas como medio de cultivo.\*

**AUTORES:** David Eduardo Chavarro Acuña  
Liliana Karolina Rojas Celis\*\*

### **PALABRAS CLAVES:**

microalgas, extracción, carbohidratos, proteínas, biomasa, escalamiento.

### Descripción

El escalamiento de la producción de biomasa y la obtención de metabolitos es un paso importante para llevar la producción de biocombustibles a nivel industrial; es bien sabido que los combustibles fósiles tienen efectos nocivos para el ambiente por lo cual se busca en el biocombustibles una solución a este problema, las microalgas ofrecen una materia prima prometedora para la producción de este combustible amigable con el medio y biorremediadores de aguas residuales como las vinazas (aguas residuales obtenidas del proceso de producción de bioetanol).

Para los procesos de escalado se encontraron dos problemas claves en este tipo de procedimientos, debido que al aumentar la cantidad de biomasa obtenida, los tratamientos a realizar requieren altos volúmenes de soluciones lo que conlleva a problemas en la homogenización de la solución y la uniformidad de la temperatura en todo el volumen.

El objetivo de este estudio consiste en una evaluación preliminar para el escalamiento del proceso de extracción de carbohidratos y proteínas presentes en *Chlorella vulgaris* UTEX1803.

Se realizaron seis experimentos aumentando la cantidad de biomasa de *C. vulgaris* UTEX 1803 (5, 10, 15, 20, 30, y 40 g).

En los datos es apreciable que sin importar la cantidad de biomasa con la que se trabaje la eficiencia global de metabolitos (proteínas y carbohidratos) se mantiene, obteniendo una relación de 0.07 (g proteínas/g biomasa) para proteínas y 0.52 (g carbohidratos/g biomasa), esto conlleva a que el proceso sea fácilmente escalable si necesidad de adiciones extras de energía.

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ing. Químico M.Sc Barajas Crisostomo, codirectora: Ing. Química García Bibiana

## ABSTRACT

TITLE: Preliminary assessment of the escalation process for the extraction of carbohydrates and proteins in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 with vinasse as a culture medium.\*

AUTHORS: David Eduardo Acuña Chavarro  
Liliana Rojas Karolina Celis\*\*

### KEYWORDS:

microalgae, extraction, carbohydrates, protein, biomass scaling.

### DESCRIPTION

The scaling of biomass production and obtaining metabolites is an important step to bring biofuel production at industrial level; It is well known that fossil fuels have harmful effects on the environment and therefore are looking at biofuels a solution to this problem, microalgae offer a promising raw material for the production of this friendly fuel medium and bioremediation of wastewater as stillage (wastewater obtained from bioethanol production process).

Processes for escalated two key problems were encountered in this type of process, because that increasing the amount of biomass obtained, treatments to be performed require high volumes of solutions which leads to problems in the homogenization of the solution, and uniformity of temperature throughout the volume.

The objective of this study is a preliminary evaluation for scaling the extraction process of carbohydrates and proteins in *Chlorella vulgaris* UTEX1803.

Six experiments increasing the amount of biomass of *C. vulgaris* UTEX 1803 (5, 10, 15, 20, 30, and 40 g) were performed.

The data is appreciable that no matter the amount of biomass to the overall efficiency of metabolites (proteins and carbohydrates) will work remains, obtaining a ratio of 0.07 (g protein / g biomass) for proteins and 0.52 (g carbohydrates / g biomass), this implies that the process is easily scalable if you need extra energy additions.

\* Bachelor Thesis

\*\* Facultad de Ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ing. Químico M.Sc Barajas Crisostomo, codirectora: Ing. Química García Bibiana

## INTRODUCCIÓN

La maquinaria diésel es ampliamente utilizada hoy en día en varios campos como la industria del transporte, la alimentación de los equipos y la generación de electricidad. En cualquier caso, los combustibles diésel no son renovables y que contribuyen al calentamiento global. Debido a estas razones, es necesario un combustible alternativo que sea técnicamente factible, ambientalmente aceptable y económicamente competitivo. Esto conlleva a generar una línea investigativa fundamentada en la búsqueda de fuentes energéticas renovables y amigables con el medio; en los estudios y experimentos se analizan las microalgas como fuente prometedora de materia prima renovable para la producción de biocombustibles, la industria farmacéutica y alimentaria, debido a sus altas tasas de crecimiento y tiempos cortos de generación, eficiente captura de dióxido de carbono [1] y otros gases responsables del efecto invernadero, lo que reduce la emisión de dichos gases a la atmosfera [2].

La amplia gama de subproductos a partir de microalgas hace que sea una materia prima perfecta para un concepto de biorrefinería. Es probable que estas materias primas sean una fuente primaria de los futuros productos químicos industriales [3]. Trabajos de investigación se han llevado a cabo para el tratamiento de proteínas tales como anticuerpos y citoquinas a partir de microalgas [4]. Tanto la investigación como el desarrollo, la demostración y la comercialización están obligados a hacer de las biorrefinerías a gran escala una realidad. El enfoque de biorrefinería en la producción a gran escala va a reducir el costo en el futuro de la producción de biodiesel. El desarrollo de la biorrefinería tiene el potencial de contribuir a un estado tecno-económico favorable en la evaluación de la producción de biodiesel a partir de microalgas.

La composición y el metabolismo de carbohidratos (principalmente almidón y celulosa) en microalgas pueden diferir significativamente de especie a especie [12,13]. Por lo tanto, es de gran importancia seleccionar microalgas con alta productividad de carbohidratos así como la composición de azúcar adecuado para biocombustibles o la producción química. Por ejemplo, las microalgas que contienen carbohidratos a base de glucosa son la materia prima más factible para la producción de bioetanol. Sin embargo, se ha prestado cada vez más atención a las posibilidades de utilizar las microalgas (por ejemplo, las algas marinas) como una fuente de azúcar [14].

Para mejorar la viabilidad económica de la utilización de los carbohidratos de algas para la producción de biocombustibles, la productividad es el parámetro clave que necesita ser mejorado. Desafortunadamente, la acumulación de carbohidratos de microalgas generalmente ocurre cuando las células de microalgas enfrentan estrés ambiental (por lo general la limitación de nutrientes), que a menudo resulta en el crecimiento celular pobre (o menor productividad de la biomasa). Por lo tanto, la forma de mejorar el contenido de carbohidratos sin comprometer la tasa de crecimiento de las células es crucial para el éxito de la producción de carbohidratos a partir de microalgas. El contenido de carbohidratos de microalgas se podría mejorar mediante el uso de diversas estrategias de cultivo, tales como la irradiación [15], el agotamiento de nitrógeno [16], la variación de temperatura [17], cambio de pH [18], y el suplemento de CO<sub>2</sub> [19].

La cosecha y el secado de la biomasa son los mayores sumideros de energía en el procesamiento biológico de las algas para el diésel. Algunos mecanismos de ahorro de energía pueden ser implementadas por el uso de aguas residuales ricas en nutrientes [5] o de agua de mar filtrada en lugar de agua dulce, que es un recurso global escasos.

las vinazas son aguas residuales del proceso del bioetanol que se genera en altos volúmenes (entre 9 y 14 litros por litro de etanol producido), se caracterizan por poseer un fuerte olor, bajo pH, color marrón oscuro, una alta demanda química de oxígeno DQO (80,000 - 100,000) mg/L, al igual que una alta demanda bioquímica de oxígeno DBO (40,000 - 50,000) mg/L; además contienen altas cantidades de materia orgánica y nutrientes como nitrógeno (1,660- 4,200) mg/l, fósforo (225 - 3,038) mg/L y potasio (1,900 – 17,475) mg/L [6].

Gran parte de esas vinazas suelen utilizarse como fertilizantes de suelos pero este uso se ve limitado por los tipos de suelos y la cantidad de nutrientes que los cultivos necesitan, por esto es necesario almacenar cierta cantidad para su posterior tratamiento, ya que ocasionan un gran daño ambiental al ser vertidas directamente al ambiente.[7]

Diversos estudios realizados confirman la capacidad de las microalgas para remover sustancias fosforiladas, y asimilar nitrógeno inorgánico dentro de su biomasa, convirtiéndose en una gran opción para la biorremediación de aguas residuales, ya que conociendo los metabolitos que la componen es posible desarrollar una valoración integral de la misma y de este modo poder aprovecharlos correctamente. [7]

Las microalgas ofrecen un gran potencial para los productos de valor agregado, incluyendo la producción de biodiesel, pero el proceso requiere una gran cantidad de trabajo a escala piloto, lo que garantiza la neutralidad de carbono y la viabilidad comercial. A nivel mundial, los estudios de evaluación de ciclo de vida, a escala piloto son escasos, una consecuencia de la falta de enfoque multidisciplinario y tecnologías novedosas suficientes disponibles en el dominio público. El trabajo de los ingenieros, sería desarrollar sistemas industriales de bioprocesos para lograr un producto de valor agregado económicamente rentable [8].

Para los procesos de escalado se encontraron dos problemas claves en este tipo de procedimientos, debido que al aumentar la cantidad de biomasa obtenida, los tratamientos a realizar requieren altos volúmenes de soluciones lo que conlleva a problemas en la homogenización de la solución y la uniformidad de la temperatura en todo el volumen.

De la misma forma es imprescindible hacer un estudio de optimización completo a escala de laboratorio antes de considerar el escalamiento. El volumen en el que se debe establecer la capacidad de operaciones a gran escala y la cantidad correcta de cultivo de siembra para la inoculación deben ser calculados. [11]

La falta de habilidades en las operaciones de cultivo de microalgas es un gran obstáculo para el éxito de las operaciones. Por lo tanto todo el personal involucrado en el proyecto debe estar plenamente capacitado y que cuenten con todas las habilidades esenciales en el manejo de crecimiento de microalgas, monitoreo de parámetros y el uso de equipos tales como medidores de pH, espectrofotómetros, y sondas para evitar fallos en el sistema. El reto de la calidad y consistencia del producto debe ser abordado para el funcionamiento y la ejecución del proyecto con éxito. [11]

Por estas razones las líneas de investigación se centran hoy día en reducir dichos costos [6], 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 [9].

En la actualidad se han realizado varios estudios sobre cómo efectuar la extracción de metabolitos, tanto en medio alcalino como ácido, los trabajos realizados en el laboratorio de biomasa del grupo CIDES- UIS muestran que: para

el experimento con hidróxido de sodio (NaOH), las mayores eficiencias de extracción de ambos metabolitos(carbohidratos y proteínas) se obtienen en una prueba en la que se solubiliza un 98% de las proteínas iniciales y un 74% de los carbohidratos iniciales, por otro lado en otra prueba se solubilizan un 98% de las proteínas iniciales y un 95% de los carbohidratos iniciales, estos porcentajes se logran a una concentración de solvente de 3,67 M, temperatura de reacción 55°C y una relación solvente/biomasa 30mL/g; mientras que las mejores condiciones para proteínas se obtienen a una concentración de 3M, temperatura de reacción 85°C y relación solvente/biomasa 45 mL/g. [10].

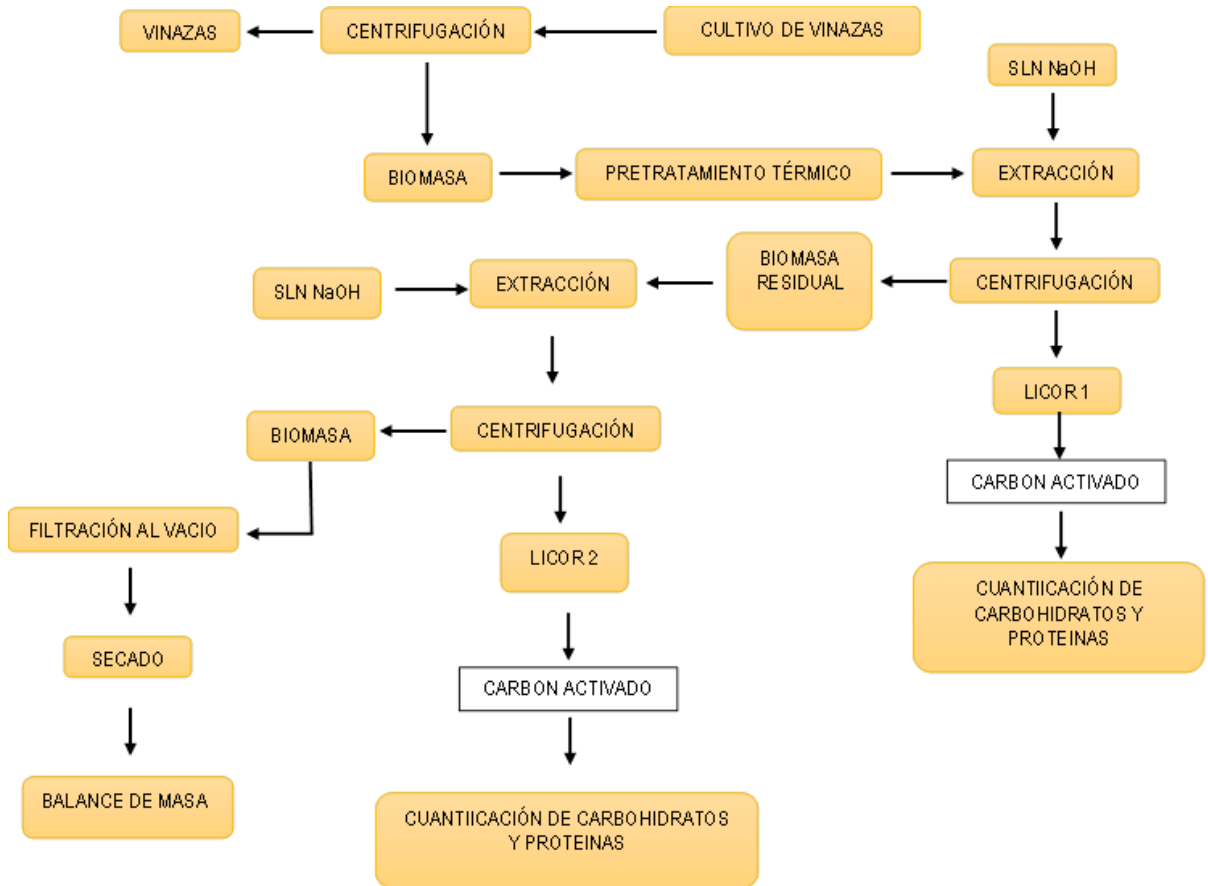
Se asocian costos adicionales con el uso de disolvente a gran escala con el fin de cumplir con los altos estándares requeridos para el diseño y operación de plantas en términos de prevención de riesgos tales como incendio, explosión y almacenamiento de materiales peligrosos y el manejo.

Por lo anterior el objetivo principal de este trabajo, consiste en un estudio preliminar para el escalamiento del proceso de extracción de carbohidratos y proteínas a partir de biomasa obtenida del cultivo de *Chlorella vulgaris* tomando como método de extracción el tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH), manteniendo la relación biomasa/solvente.

# 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

## 1.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura 1. Descripción Metodológica



## 1.2 MÉTODOS DE CULTIVO

*Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fue obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal.

Se utilizó como medio de cultivo las vinazas obtenida a partir de la producción de bioetanol utilizando melaza mediante evaporación (sin recirculación) en el laboratorio de procesos de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

### **1.3 CULTIVO EN VINAZAS**

400 mL de *C. vulgaris* fueron mezclados con 1600 mL de vinaza en reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y una altura de 35cm; dichos reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire constante de 0,6 mL/min y condiciones de temperatura de 25C° ± 2C° sin control de pH.

Debido a la oscuridad de las vinazas que impide el paso de la luz homogéneamente en todo el reactor, se recubrieron los reactores para impedir el paso de la luz y así evitar posibles ruidos en las mediciones por procesos fotosintéticos permitiendo un ciclo de oscuridad de 24 horas. Después de 18 días la biomasa producida fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos, luego se secó a 105°C durante 24 horas. Para mejorar la manejabilidad de esta se sometió a homogenización de tamaño de partícula mediante un mortero y se guardó en bolsas plásticas.

### **1.4 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS**

Para la extracción de carbohidratos y proteínas se utilizó el método de tratamiento alcalino previamente desarrollado en el laboratorio de biomazas del grupo de investigación CIDES [10].

Se toman inicialmente 5 g de biomasa seca y se adicionan 150 mL de una solución de NaOH 3,67M (primera extracción), la solución se lleva a 55°C en un baño termostataado durante 20 minutos; una vez transcurrido el tiempo se centrifuga la mezcla a 3400 rpm durante 15 minutos, teniendo así el primer extracto (licor 1) y biomasa residual, esta biomasa se diluye en 225 mL de una solución de NaOH a 3M y se calienta a 85°C durante 20 minutos, luego se separan el licor de la biomasa mediante centrifuga (3400 rpm, 15 minutos) y se obtiene el segundo extracto.

### 1.4.1 Diseño experimental

**Tabla 1. Diseño de Experimentos**

PRUEBA	BIOMASA (g)	SOLVENTE (L)	
		Ext 1	Ext 2
1	5	0,15	0,23
2	10	0,30	0,45
3	15	0,45	0,68
4	20	0,60	0,90
5	30	0,90	1,35
6	40	1,20	1,80

Se realizó original y replica de cada prueba con el objetivo de garantizar la veracidad de los datos.

### 1.5 BALANCE DE MASA

Para cuantificar la biomasa final, una vez terminado el proceso de extracción se procede a filtrar, para esto se tomó el papel filtro, se envió por 24 horas a horno a 105 °C, posteriormente se lleva al desecador por 12 horas y finalmente se pesó. La biomasa residual es filtrada por medio de una bomba de vacío a través del papel filtro previamente preparado, este filtro es llevado al horno y a luego al desecador con las mismas condiciones anteriores, en seguida se pesa este filtro,

el resultado de la diferencia entre peso final y el peso inicial del papel filtro es la biomasa residual del proceso.

## **1.6 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

Se utiliza el método calorimétrico Fenol-Ácido Sulfúrico, método que determina carbohidratos en una muestra. Se toma 1ml de cada extracto (el que ha pasado por el carbón activado); luego se adiciona 0,5 ml de fenol al 5%, se homogeniza la mezcla y se le añade 2,5 ml de Ácido Sulfúrico al 95%.

Por último la muestra es medida en un espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda (480, 485,487 y 490 nm) para identificar la Xilosa, Glucosa, Galactosa y Fructuosa respectivamente presentes en la biomasa.

## **1.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Se utiliza el método de Lowry que consiste en tomar 1ml de licor y se le adiciona 1,4 ml de solución Biuret (A-B-C), después de 20 minutos se le agrega 0,2 ml de reactivo de Folin y se homogeniza en el vortex por 30 minutos.

La mezcla se mide en el espectrofotómetro a 750 nm.

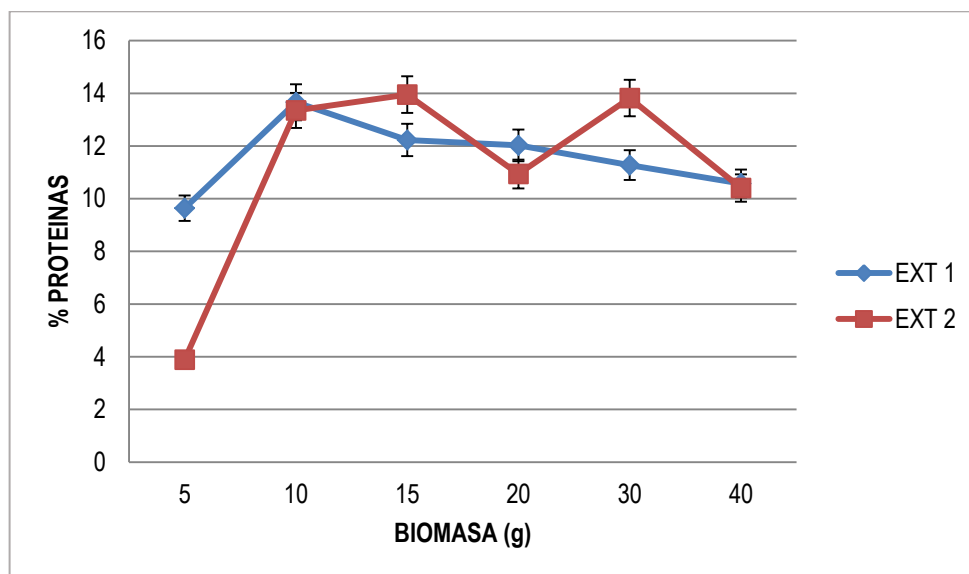
## 2. ANÁLISIS Y RESULTADOS

### 2.1 SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

En la figura 2 se presenta el promedio de los datos obtenidos en la solubilización de proteínas tanto en la extracción 1 como la extracción 2, de la prueba original y su réplica. Se observa que para la primera extracción, el mayor porcentaje de solubilización se presenta en la prueba 2 con un valor de 13,66% (prueba que corresponde a una cantidad inicial de biomasa de 10 gramos, 0,3 L de solución de NaOH 3,67 M a una temperatura de 55°C).

Para la segunda extracción se encuentra que el mayor porcentaje de solubilización está en la prueba 3 con un valor de 13,95% (prueba que corresponde a una cantidad inicial de biomasa de 15 gramos, 0,675 L de solución de NaOH 3 M a una temperatura de 85°C)

**Figura 2. Porcentaje de Proteínas**

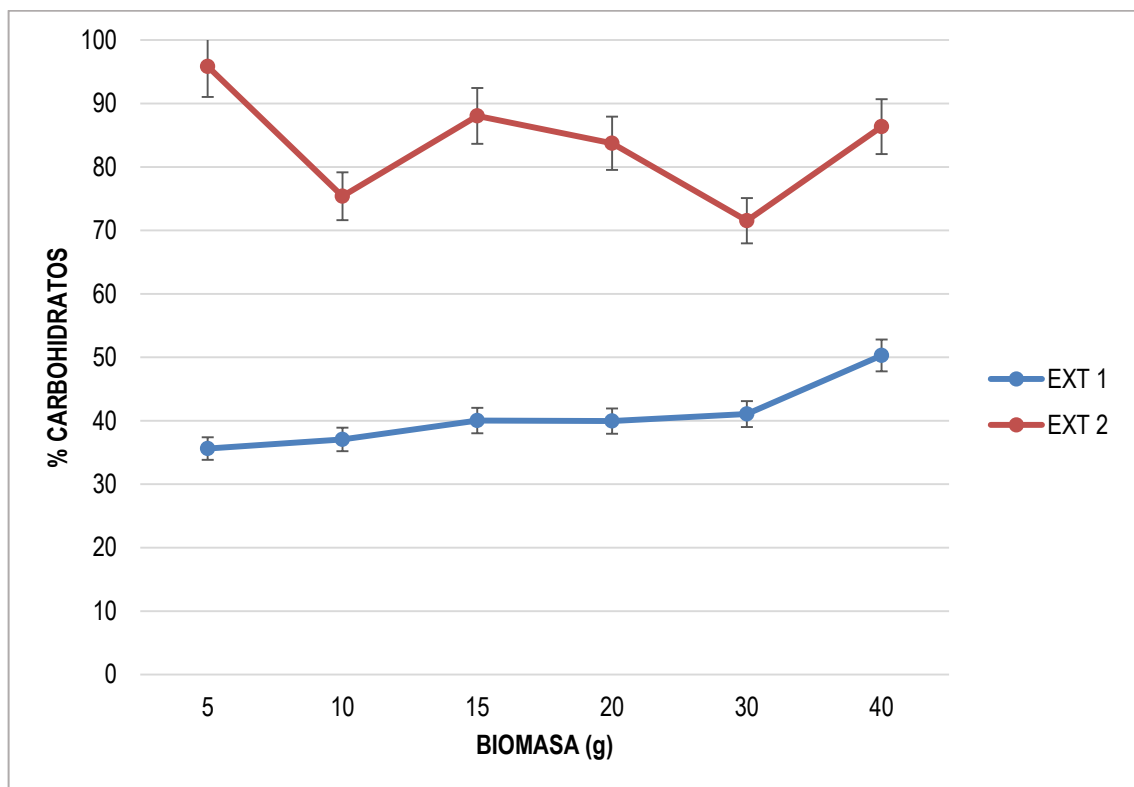


En la figura 3 se presenta el promedio de los datos obtenidos en la solubilización de carbohidratos tanto en la extracción 1 como la extracción 2, de la prueba original y su réplica.

Se evidencia que para la primera extracción se encuentra el mayor porcentaje de solubilización en la prueba 6 con un valor de 50,30% (prueba que corresponde a una cantidad inicial de biomasa de 40 gramos, 1,2 L de solución de NaOH 3,67 M a una temperatura de 55°C).

Para la segunda extracción se muestra que el mayor porcentaje está en la prueba 1, con un valor de 95,83 % (prueba que corresponde a una cantidad inicial de biomasa de 5 gramos, 0,225 L de solución de NaOH 3,67 M a una temperatura de 85°C).

**Figura 3. Porcentaje de Carbohidratos**

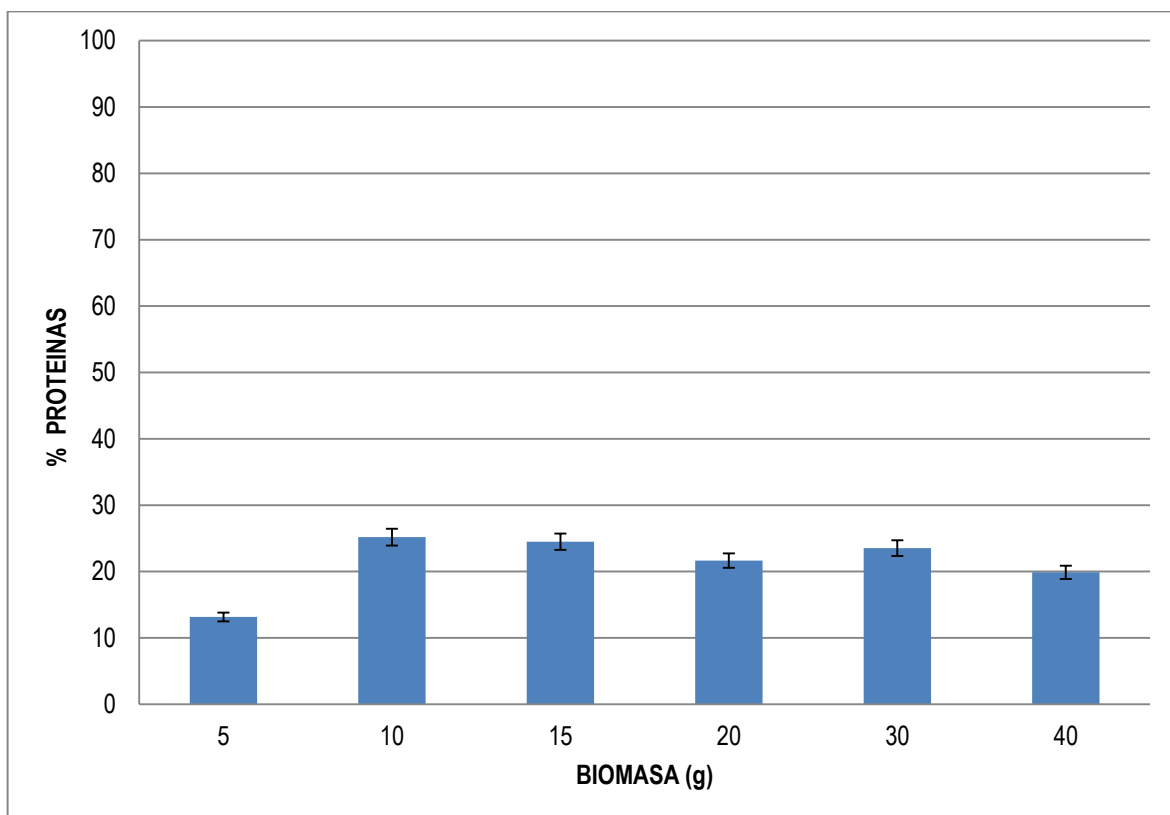


## 2.2 EFICIENCIA TOTAL DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

En la figura 4 se muestra la eficiencia total promedio de las proteínas extraídas en la extracción 1 y extracción 2 dando como mejor resultado la prueba 2, con un porcentaje de eficiencia de 25,2%, (prueba que corresponde a una biomasa inicial de 10 gramos).

Se observa que la eficiencia total tiene valores similares en todas las pruebas llevadas a cabo, con un promedio de 21,32% y con un valor de desviación estándar igual a 4,45. La baja eficiencia en la extracción de proteínas puede ser debido a que estas se degradan rápidamente por efectos de temperaturas altas.

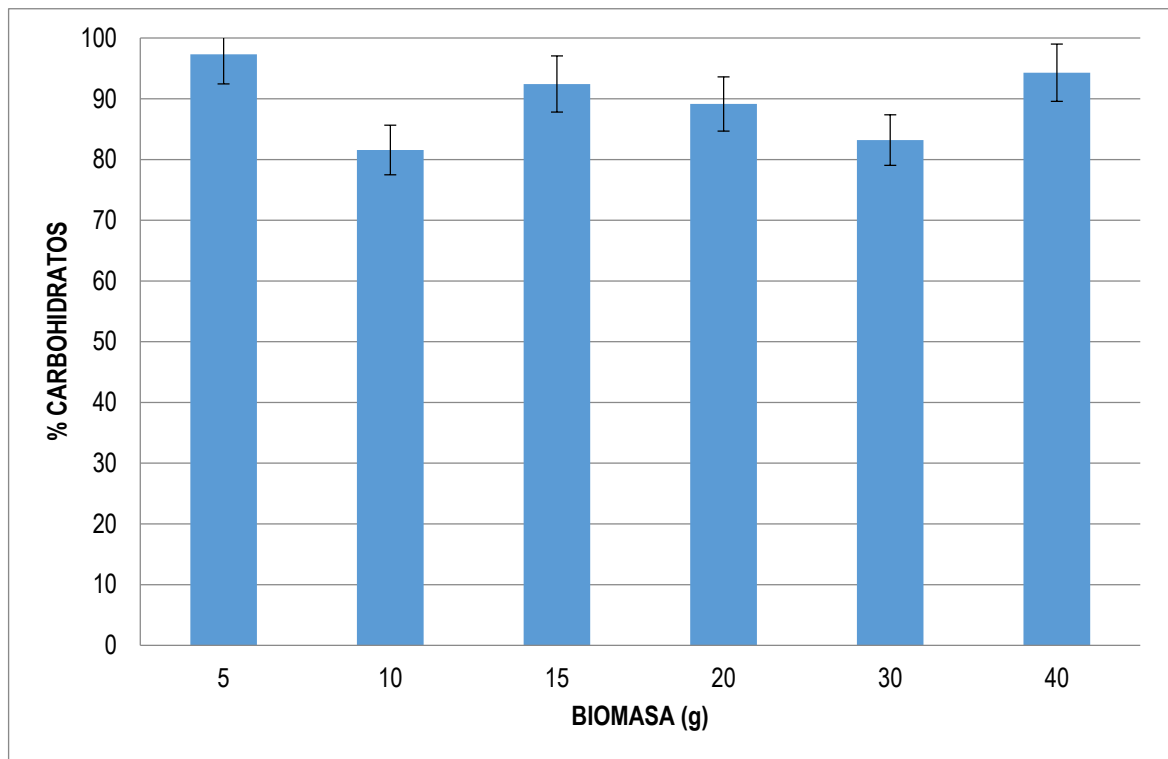
**Figura 4. Eficiencia proteínas**



En la figura 5 se muestra la eficiencia total promedio de los carbohidratos de la extracción 1 y la extracción 2; donde se evidencio que la mayor eficiencia se encuentra en la prueba 1, (prueba que corresponde a una biomasa inicial de 5 gramos).

Se observa que la eficiencia en la obtención de carbohidratos es alta y similar en todas las pruebas realizadas con un promedio de 89,6% y una desviación estándar de 6,25.

**Figura 5. Eficiencia Carbohidratos**

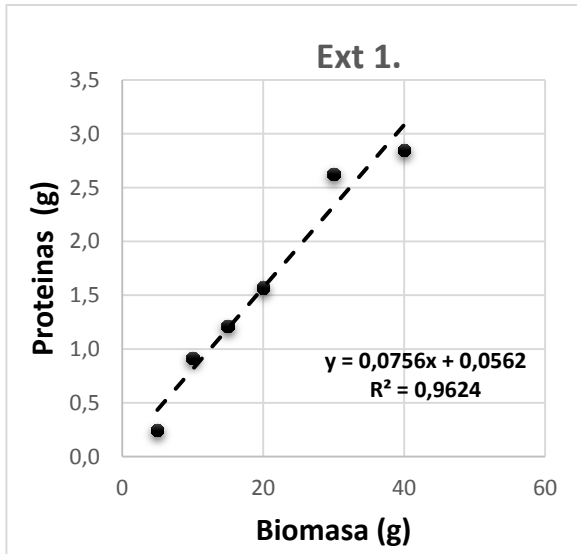


En el estudio se ha evidenciado que para la extracción de proteínas y carbohidratos el conservar la relación biomasa/solvente es suficiente para mantener los estándares de extracción sin necesidad de modificar agentes externos como la temperatura y la agitación. Esto es una base inicial importante

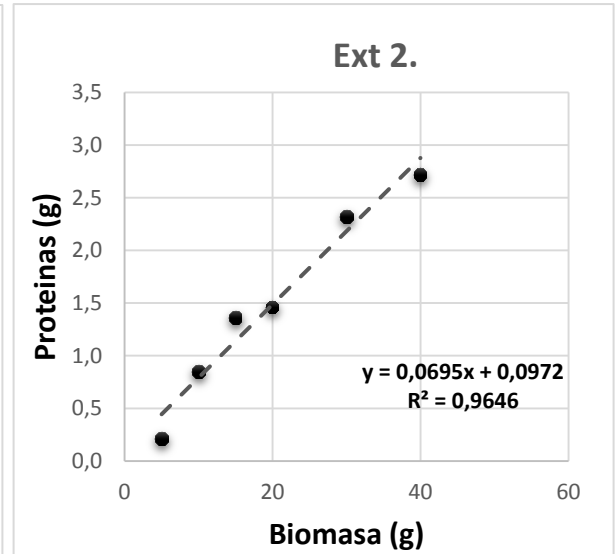
para el escalamiento de procesos de obtención de carbohidratos y proteínas a partir de la microalga *C. vulgaris* UTEX 1803.

## 2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

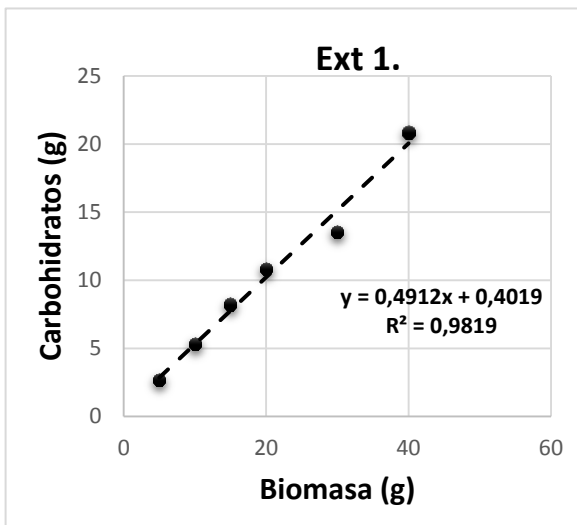
Figura 6. Análisis Estadístico



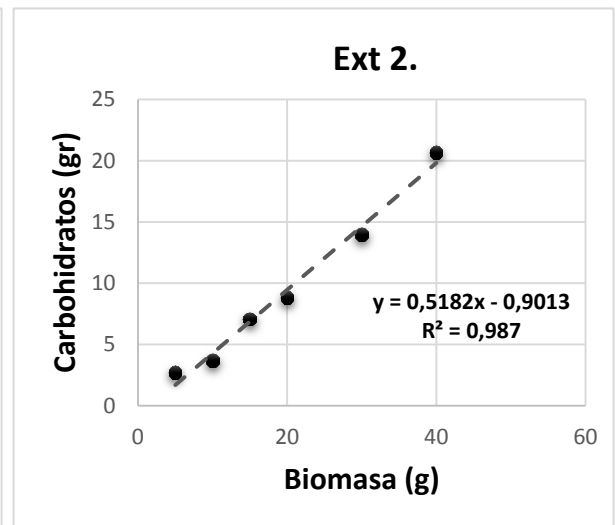
(A)



(B)



(C)



(D)

En la figura 6 se presenta un análisis estadístico de los datos mediante una regresión lineal, en donde se observa que la tendencia en la extracción 1 y 2 tanto de carbohidratos como de proteínas se mantiene, lo que evidencia que no hay una diferencia estadística en los resultados obtenidos. Por ende se confirma la presunción de que la cantidad inicial de biomasa usada no afecta la extracción siempre y cuando se mantenga la relación biomasa solvente.

### 3. CONCLUSIONES

La extracción de carbohidratos y proteínas no se ve influenciada por el cambio en la cantidad de biomasa, siempre y cuando se mantenga la relación solvente/biomasa que para este caso fue de 30mL/g para la primera extracción y 45mL/g para la segunda extracción

La linealidad de los resultados obtenidos demuestran que para el caso no se requieren de agentes externos como agitación o aumento de temperatura para mantener la eficiencia de extracción de carbohidratos y proteínas presentes en la biomasa microalgal, lo cual da un buen acercamiento preliminar para las condiciones de escalamiento del proceso.

Se realizó una segunda extracción, pues en esta se alcanza mayor porcentaje de solubilización, con un valor máximo de 13,95% en proteínas, de 95,83% en carbohidratos en las siguientes condiciones: una concentración 3 M, una solución de 45mL/g y una temperatura de 85 °C, con respecto a la primera extracción en la cual su porcentaje de solubilización más alto es de 13,66 % y 50,30 % respectivamente.

#### **4. RECOMENDACIONES**

Evaluar las condiciones de extracción de proteínas, porque se observó altos niveles de degradación de las mismas, debido a efectos de temperatura y del solvente utilizado, lo cual no permite realizar una valorización integral de la biomasa microalgal.

Valorar el pretratamiento térmico de la biomasa antes del proceso de extracción, con el fin de evaluar los efectos de la humedad de la biomasa de dicho proceso, además de la disminución de costos en el proceso.

Realizar pruebas con cantidades de biomasa superiores a 1 Kg con el fin de analizar los efectos de solubilización y eficiencia del proceso, que para el presente estudio no fue posible evaluar debido a efectos de limitantes de equipos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., F.-W. Bai, F.-W. & Chang, J.-S.. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal.*, 78, 1-10,2013.
- [2] Harun, R. & Danquah, M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry.*, 46,(1), 304–309,2011.
- [3] Haveren JV, Scott EL, Sanders J. Bulk chemical from biomass. *Biofuels Bioprod Biorefin*; 2:41-57, 2008.
- [4] Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol*; 22:1513-9, 2004.
- [5] Mutanda T, Karthikeyam S, Bux F. The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp, under batch conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 2011.
- [6] Singh., Nirbhay K. & Patel. D.B. Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. Department of Microbiology, C.P. College of Agriculture, S.D.A.U. S.K. Nagar, Palanpur, Gujarat 385506, India 2012.
- [7] 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.

- [8] Xu L, Brilman DWF, Withag JAM, Brem G, Kersten S. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. *Bioresour Technol* 2011.
- [9] 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 .
- [10] E. Ayala, O. Reyes, evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *Chlorella vulgaris* utex 1803, 2014.
- [11] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux. «Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production» *Applied Energy* 103 444–467, 2013.
- [12] H. Rismani-Yazdi, B.Z. Haznedaroglu, K. Bibby, J. Peccia, Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels, *BMC Genomics* 12,148, .2011.
- [13] C.D. Rangel-Yagui, E.D.G. Danesi, J.C.M. de Carvalho, S. Sato, Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process, *Bioresour. Technol.* 92, 133–141. 2004
- [14] A.J. Wargacki, E. Leonard, M.N. Win, D.D. Regitsky, C.N.S. Santos, P.B. Kim, S.R. Cooper, R.M. Raisner, A. Herman, A.B. Sivitz, A. Lakshmanaswamy, Y. Kashiyama, D. Baker, Y. Yoshikuni, An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae, *Science* 335, 308–313, 2012.

- [15] A. Sukenik, Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis*-Sp (Eustigmatophyceae), *Bioresour. Technol.* 35, 263–269, 1991.
- [16] F.M.L. D'Souza, G.J. Kelly, Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae, *Aquaculture* 181: 311–329, 2000.
- [17] M.A.C.L. De Oliveira, M.P.C. Monteiro, P.G. Robbs, S.G.F. Leite, Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures, *Aquacult. Int.* 7:261–275, 1999.
- [18] Z.I. Khalil, M.M.S. Asker, S. El-Sayed, I.A. Kobbia, Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:1225–1231, 2010.
- [19] S.D. Araujo, V.M.T. Garcia, Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels I. Protein, carbohydrates and lipids, *Aquaculture* 246:405–412, 2005.

## BIBLIOGRAFÍA

A. Sukenik, Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis*-Sp (Eustigmatophyceae), *Bioresour. Technol.* 35, 263–269, 1991.

A.J. Wargacki, E. Leonard, M.N. Win, D.D. Regitsky, C.N.S. Santos, P.B. Kim, S.R. Cooper, R.M. Raisner, A. Herman, A.B. Sivitz, A. Lakshmanaswamy, Y. Kashiyama, D. Baker, Y. Yoshikuni, An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae, *Science* 335, 308–313, 2012.

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 .

C.D. Rangel-Yagui, E.D.G. Danesi, J.C.M. de Carvalho, S. Sato, Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process, *Bioresour. Technol.* 92, 133–141. 2004

Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., F.-W. Bai, F.-W. & Chang, J.-S.. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal.*, 78, 1-10,2013.

E. Ayala, O. Reyes, evaluación de un sistema de extracción bifásico de carbohidratos y proteínas a partir de cultivos heterótrofos de *Chlorella vulgaris* utex 1803, 2014.

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.

F.M.L. D'Souza, G.J. Kelly, Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae, *Aquaculture* 181: 311–329, 2000.

H. Rismani-Yazdi, B.Z. Haznedaroglu, K. Bibby, J. Peccia, Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels, *BMC Genomics* 12,148, .2011.

Harun, R. & Danquah, M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry.*, 46,(1), 304–309,2011.

Haveren JV, Scott EL, Sanders J. Bulk chemical from biomass. *Biofuels Bioprod Biorefin*; 2:41-57, 2008.

M.A.C.L. De Oliveira, M.P.C. Monteiro, P.G. Robbs, S.G.F. Leite, Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures, *Aquacult. Int.* 7:261–275, 1999.

Mutanda T, Karthikeyam S, Bux F. The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp, under batch conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 2011.

Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol*; 22:1513-9, 2004.

Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux. «Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production» *Applied Energy* 103 444–467, 2013.

S.D. Araujo, V.M.T. Garcia, Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels I. Protein, carbohydrates and lipids, *Aquaculture* 246:405–412, 2005.

Singh., Nirbhay K. & Patel. D.B. Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. Department of Microbiology, C.P. College of Agriculture, S.D.A.U. S.K. Nagar, Palanpur, Gujarat 385506, India 2012.

Xu L, Brillman DWF, Withag JAM, Brem G, Kersten S. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. *Bioresour Technol* 2011.

Z.I. Khalil, M.M.S. Asker, S. El-Sayed, I.A. Kobbia, Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:1225–1231, 2010.

## ANEXOS

### ANEXO A. Eficiencia de proteínas y carbohidratos.

