

**SECUENCIA DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN BIOMASA
MICROALGAL OBTENIDA A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS
COMO MEDIO DE CULTIVO.**

**JANET BIBIANA GARCÍA MARTÍNEZ
CÓDIGO: 2138032**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRIA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**SECUENCIA DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN BIOMASA
MICROALGAL OBTENIDA A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS
COMO MEDIO DE CULTIVO.**

JANET BIBIANA GARCÍA MARTÍNEZ
CÓDIGO: 2138032

**Trabajo de grado presentado como
requisito para optar al título de
Magister en Ingeniería Química**

Director:
CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA
Mcs Ingeniería Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRIA EN INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A la vida

A mi familia

A ti Andrés Fernando Barajas Solano

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3. HIPÓTESIS	20
4. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CANTIDAD DE INÓCULO DE <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 1803 EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO, EN UN MEDIO DE CULTIVO DESARROLLADO A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS	21
4.1 INTRODUCCIÓN	21
4.2 METODOLOGÍA	22
4.2.1 Medio de Cultivo	22
4.2.2 Producción de vinazas	23
4.2.3 Caracterización de la vinaza producida	24
4.2.4 Montaje experimental	24
4.2.5 Cuantificación de biomasa	26
4.2.6 Determinación de proteínas totales	26
4.2.7 Cuantificación de carbohidratos	27
4.2.8 Extracción de lípidos	27
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.3.1 Producción y productividad de la biomasa	28

4.3.2 Composición de las vinazas	29
4.3.3 Caracterización de los metabolitos	31
4.4 CONCLUSIONES	37
 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO TÉRMICO EN LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS	 38
5.1 INTRODUCCIÓN	38
5.2 METODOLOGÍA	40
5.2.1 Métodos de cultivo	40
5.2.2 Pretratamiento térmico: efecto del tiempo y temperatura	40
5.2.3 Pretratamiento térmico	40
5.2.4 Método organosolv	41
5.2.5 Método de hidrólisis ácida	41
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.3.1 Resultados organosolv e hidrólisis ácida	42
5.4 CONCLUSIONES	52
 6. SISTEMA DE EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN CARBOHIDRATOS.	 53
6.1 INTRODUCCIÓN	53
6.2 METODOLOGÍA	56
6.2.1 Solución NaOH	56
6.2.2 Solución acidificada de clorito de sodio	57
6.2.3 Solución acidificada de hipoclorito de sodio	57
6.2.4 Cuantificación de carbohidratos	58
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	58
6.3.1 Extracción con NaOH	58
6.3.2 Extracción empleando una solución acidificada de clorito de sodio	59
6.3.3 Solución acidificada de hipoclorito	63
6.4 CONCLUSIONES	69

7. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL PROCESO DE ESCALADO PARA LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS PRESENTES EN <i>Chlorella vulgaris</i>	
UTEX 1803, CON VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO	70
7.1 INTRODUCCIÓN	70
7.2 METODOLOGÍA	72
7.2.1 Extracción de carbohidratos y proteínas	72
7.2.2 Cuantificación de carbohidratos	72
7.2.3 Cuantificación de proteínas	73
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
7.3.1 Cantidad de proteínas y carbohidratos	73
7.4 CONCLUSIONES	76
8. CONCLUSIONES GENERALES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Producción de biomasa en función del tiempo los 5 tratamientos	29
Figura 2. Variación de la composición de las vinazas con el tiempo	30
Figura 3. Composición de la biomasa durante los 18 días	33
Figura 4. Total de azúcares liberados para la biomasa pretratada para los dos métodos de hidrólisis: Organosolv (O1, O2, O3) e hidrólisis ácida (HA1, HA2, HA3) para cada uno de los pretratamientos térmicos	42
Figura 5. Porcentaje de azúcares fermentables liberados por el método Organosolv para cada uno de los pretratamientos.	46
Figura 6. Porcentaje de azúcares liberados por el método de hidrólisis ácida para cada uno de los pretratamientos.	46
Figura 7. Cantidad promedio del tipo de azúcares liberados por el método Organosolv a 75 °C.	47
Figura 8. Concentración de carbohidratos extraídos	49
Figura 9. Eficiencia de extracción de carbohidratos	50
Figura 10. Concentración de carbohidratos	51
Figura 11. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos con NaOH	59
Figura 12. Superficies de respuesta para la extracción de carbohidratos empleando NaOH	59
Figura 13. Porcentaje de monosacáridos extraídos en el tratamiento para cada experimento realizado	60
Figura 14. Diagrama de Pareto de los efectos estándares teniendo como variable de repuesta: rendimiento del tratamiento	61
Figura 15. Superficies de respuesta: Variables independientes a. Temperatura y 1/R; b. Tiempo y 1/R; c. Tiempo y Temperatura.	62

Figura 16. Porcentaje de monosacaridos extraidos en cada experimento	63
Figura 17. Diagrama de Pareto para la extracción de Carbohidratos Totales	64
Figura18. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa (Eje Z) Vs Temperatura (Eje X), Tiempo= 4 h.	65
Figura19. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa (Eje Z) Vs Tiempo (Eje X), Temperatura= 70 °C	65
Figura 20. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Temperatura (Eje Z) Vs Tiempo (Eje X), Solvente/biomasa = 80 mL/g.	66
Figura 21. Porcentaje de proteínas extraídas	74
Figura 22. Porcentaje de carbohidratos extraídos.	75
Figura 23. Eficiencia extracción carbohidratos y proteínas.	76

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña	24
Tabla 2. Composición de los experimentos.	25
Tabla 3. Composición experimentos, parte 2.	26
Tabla 4. Temperatura y tiempo de pretratamiento.	41
Tabla 5. Humedad para la biomasa de cada uno de los pretratamientos térmicos.	43
Tabla 6. Temperatura y tiempo de pretratamiento.	48
Tabla 7. Diseño de experimentos para la extracción empleando NaOH	56
Tabla 8. Diseño experimental extracción con clorito de sodio	57
Tabla 9. Diseño Experimental extracción con hipoclorito de sodio	58
Tabla 10. Diseño de Experimentos	72

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. PRINCIPALES PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN	95
Anexo B. Manual de interpretación del diagrama de Pareto el software Statistic 7.0	98

RESUMEN

TITULO: SECUENCIA DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN BIOMASA MICROALGAL OBTENIDA A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS COMO MEDIO DE CULTIVO*.

AUTORES: Janet Bibiana García Martínez**

PALABRAS CLAVES: Microalga, *Chlorella vulgaris*, Vinazas, Extracción.

La producción de biocobustibles a partir de biomasa microalgal, es un proceso que requiere un gran gasto energético debido a dificultades en el proceso de recuperación de biomasa y a los actuales procesos de extracción de los metabolitos de interés. El desarrollo de múltiples tecnologías orientadas a la rentabilidad del proceso, a tomado gran fuerza debido al conocimiento de la gran variedad de compuestos aprovechables presentes en la biomasa microalgal.

Se hizo necesario entonces evaluar métodos de cultivo y de extracción de metabolitos que permitan la valorización integral de todos los metabolitos de interés generados a partir de microalgas. El uso de vinazas (residuo industrial de la producción de alcohol), como medio de cultivo, presenta productividades de 0,73 g/L*d), con el tratamiento C2 (2000 mL de vinazas y 2 g de inóculo en base húmeda). Se evaluó el pretratamiento térmico necesario para la extracción de carbohidratos y se se identificó que según los resultados obtenidos, la biomasa debe contener una humedad del 8% para permitir una mayor liberación de azúcares. La evaluación del método de extracción a partir NaOH (85°C, 3M y 45 mL/g de relación solvente/biomasa) permitió la obtención del 65% de carbohidratos totales, además se observó que el proceso de extracción llevado hasta 40 g de biomasa inicial mantiene una continuidad en la cantidad de carbohidratos y proteínas extraídas, sin el uso de agentes extra como el aumento de temperatura o agitadores

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingeniería Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: M.Sc. Crisostomo Barajas Ferreira

ABSTRACT

TITLE: STRING EXTRACTION OF METABOLITES PRESENT IN MICROALGAL BIOMASS OBTAINED FROM HARNESSING VINASSES AS CULTURE MEDIUM*.

AUTHORS: Janet Bibiana García Martínez**

KEYWORDS: Microalga, Chlorella vulgaris, Vinasses, extraction.

Biocobustibles microalgal biomass production is a process that requires a large energy expenditure due to difficulties in the process of recovery of biomass and the current processes of extraction of metabolites of interest. The development of multiple technologies oriented to the profitability of the process, taken great strength due to the knowledge of the wide variety of usable compounds in microalgal biomass. It became necessary to then evaluate methods of cultivation and extraction of metabolites allowing the comprehensive valuation of all the metabolites of interest generated from microalgae. The use of vinasses (industrial alcohol production residue), as a means of cultivation, presents productivities of 0.73 g/L * d), with treatment C2 (vinasses 2000 mL and 2 g of inoculum on wet base). Assessed the necessary thermal pretreatment for the extraction of carbohydrates and are identified that according to the results obtained, the biomass must contain 8% humidity to allow a greater release of sugars. The evaluation of the method of extraction from NaOH (85° C, 3M and 45 mL/g ratio solvent / biomass) allowed the obtaining of 65% of total carbohydrate, furthermore it was observed that the extraction process up to 40 g of initial biomass maintains a continuity in the amount of carbohydrates and proteins extracted, without the use of extra such as an increase in temperature or mixing agents.

*Research project

**Physical-Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisor: M.Sc. Crisostomo Barajas Ferreira

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que utilizan la luz y dióxido de carbono como energía, con una producción de biomasa fotosintéticamente más eficiente que las plantas (Miao, Wu 2006, Benemann 1997). Usadas en la producción de alimentos y farmacéutica, además poseen gran potencial para la producción de biocombustibles renovables como biodiesel, biohidrógeno y biogás, ya que algunos de estos microorganismos pueden acumular 70% o más de su biomasa seca como hidrocarburos (Chisti 2006a).

Teniendo en cuenta todo el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas, la extracción de lípidos, junto con la deshidratación de la biomasa, son los procesos que requieren de gran gasto energético lo que genera dificultades para la producción a gran escala (Chisti, 2007; Halim, Danquah y Webley, 2012). El elevado gasto energético se debe a que las microalgas poseen una pared celular rígida y gruesa, compuesta por carbohidratos complejos y las glicoproteínas con alta resistencia mecánica y química. El consumo de energía asociado a la pared celular, genera un problema de costos, por lo cual la producción de biodiesel aún no se considera un proceso económicamente viable. Como resultado, hay muchos desafíos que deben ser superados. (Kim, Yoo, Lim, Kim, Kim y Yang, 2013).

Además de los lípidos, las microalgas también producen otros compuestos de gran valor económico (Olguín, 2012). Las proteínas de algas son una alternativa para complementos alimenticios convencionales debido a su valor nutricional y tipos de aminoácidos (Becker, 2007). Del mismo modo, los polisacáridos de algas pueden ser hidrolizados reducidos a azúcares, los cuales tienen gran aplicación en la producción de bioetanol (Fu *et al.*, 2010; Sun and Cheng, 2002).

La biomasa algal residual después de la extracción de lípidos puede ser usada para otras aplicaciones, puede reducir el costo de producción de cultivo y el costo de biocombustibles de algas (Rashid *et al.*, 2013). La extracción simultánea de otros productos de valor, además de los lípidos de la biomasa algal, puede resultar en una tecnología algal económicamente beneficiosa. Este es un objetivo importante del acercamiento de biorrefinería integrada de algas para biocombustibles (Subhadra., 2010). Las biorrefinerías son instalaciones donde se integran procesos de conversión de biomasa e infraestructuras para producir combustibles, energía, materiales y otras sustancias químicas tomando como materia prima la biomasa. Una biorrefinería toma ventaja de las diferencias de los metabolitos existentes en la biomasa para maximizar el valor derivado de esta (Demirbas., 2009).

Esfuerzos recientes se han focalizado en lograr el doble objetivo de hacer un tratamiento de aguas residuales y producir biocombustibles a partir de microalgas (Park *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). Una gran variedad de estudios confirman la capacidad de las microalgas para remover sustancias fosforiladas (Aslan & Kapdan., 2006), y de asimilar nitrógeno inorgánico dentro de su biomasa, convirtiéndose en una gran opción para la biorremediación de aguas residuales (An *et al.*, 2003),

Dentro de los potenciales efluentes a aprovechar se encuentran los provenientes de la producción de biocombustibles de primera y segunda generación como el glicerol y las vinazas. Las vinazas (subproducto del proceso del bioetanol) se caracterizan por poseer un bajo pH, fuerte olor, 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. (Singh & Patel., 2012). Valderrama *et al* (2002) utilizaron cultivos de *C. vulgaris* por 4 días y luego

macrófitos por 6 días en el tratamiento de vinazas logrando una disminución en el color del 52 %. Travieso *et al* (1999) utilizaron cultivos de *C. vulgaris* SR/2 para el tratamiento de vinazas después de un pretratamiento anaeróbico, dando como resultado un excelente medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas; además removieron hasta un 85% del nitrógeno y fósforo presente y redujeron los sólidos totales en un 90%.

El proceso de asimilación de nitrato por partes de microalgas posee 2 ventajas: en primera medida el nitrato puede ser convertido en biomasa sin la necesidad de una fuente externa de carbono, y como segundo es posible extraer productos de alto valor agregado como xantoxantinas y otros compuestos de la biomasa producida (Kang *et al.* 2006).

En investigaciones desarrolladas recientemente por el Centro de Investigaciones CIDES, las vinazas han sido utilizadas directamente como medio de cultivo para la *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, obteniendo altas productividades de biomasa, además de neutralizar el pH de las vinazas (Castro & Parra., 2011). Sin embargo, no existen estudios donde se evalúe el desarrollo de un sistema eficiente de extracción que permita una valoración integral de todos los metabolitos presentes en la biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales industriales, específicamente vinazas. Por todo lo anterior el objetivo de este estudio consistió en evaluar las metodologías de extracción de metabolitos presentes en la biomasa microalgal, obtenida a partir del aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las metodologías de extracción de metabolitos presentes en biomasa microalgal, obtenida a partir del aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo, con el fin de determinar las mejores condiciones para la valorización integral de la biomasa.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la variación de la cantidad de inóculo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en la producción de biomasa y productos de valor agregado, en un medio de cultivo desarrollado a partir del aprovechamiento de vinazas.
- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de pretratamiento térmico en la eficiencia de extracción de carbohidratos.
- Evaluar la eficiencia de las metodologías de extracción de carbohidratos.
- Realizar una evaluación preliminar del proceso de escalado para la extracción de carbohidratos y proteínas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una consideración importante en la extracción simultánea de todos los productos valiosos de algas es el efecto de diferentes tratamientos sobre los rendimientos individuales de dichos productos. La biomasa algal sufre muchos procesos durante la extracción de lípidos que invariablemente afecta estos co-productos (Ansari *et al.*, 2015).

Uno de los principales cuellos de botella en la obtención de moléculas de microalgas es la dificultad en la extracción de metabolitos, lo cual pueden comprometer resultados de alto rendimiento. El desarrollo de técnicas de extracción de microalgas se ha convertido en un campo de creciente interés para la comunidad científica. Debido a la gran apuesta económica para la producción de biocombustibles de microalgas, muchos estudios han procurado encontrar maneras eficientes y económicas para recuperar los lípidos (Lee *et al.*, 2010; Balasubramanian *et al.*, 2011; Halim *et al.*, 2011). Las técnicas desarrolladas fueron únicamente para las moléculas estables al calor, sin embargo no son adecuados para moléculas termosensibles. Para estos últimos, se han realizado pocos estudios para extraer productos naturales bioactivos de microorganismos desde el comienzo de la década de 1980. Esta investigación está progresando y muchas técnicas de extracción han sido desarrolladas (Mendes *et al.*, 2003; Barbarino y Lourenço, 2005; Wiyarno *et al.*, 2010; Palavra *et al.*, 2011).

Por lo anterior se hace necesario evaluar un proceso de extracción eficiente y económico, que permita obtener cada uno de los metabolitos presentes en las microalgas, sin afectar las características de las demás sustancias de interés presentes en la biomasa.

3. HIPÓTESIS

A partir de una adecuada caracterización de la biomasa microalgal, obtenida del aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo, es posible evaluar diferentes metodologías de extracción de metabolitos de valor agregado, con el fin de determinar las mejores condiciones para la valorización integral, alto rendimiento en la extracción de cada una de los compuestos de interés y un menor costo en el proceso.

4. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CANTIDAD DE INÓCULO DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO, EN UN MEDIO DE CULTIVO DESARROLLADO A PARTIR DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS

4.1 INTRODUCCIÓN

La producción a gran escala de las aguas residuales es una consecuencia inevitable de las sociedades contemporáneas, la cual ha dejado una huella en los ciclos bioquímicos globales, principalmente del nitrógeno y fósforo (Aslan & Kapdan., 2006). La composición de estas aguas residuales es significativamente variable, haciendo cada vez más difícil un diseño unificado para su tratamiento, esto se debe a que diferentes industrias descargan sus residuos en piscinas o lagos comunitarios, haciendo más difícil el tratamiento de estas (Montaigne & Essick, 2002).

El proceso de producción de bioetanol genera un tipo de agua residual conocida como vinazas, las cuales se generan en altos volúmenes (entre 9 y 14 litros por litro de etanol producido) (Brennan & Owende, 2010), y se caracterizan por poseer un pH bajo, fuerte olor, una alta demanda química de oxígeno DQO, alta demanda bioquímica de oxígeno DBO, altas cantidades de materia orgánica, nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, además de un color marrón oscuro el cual dificulta la fotosíntesis de la flora acuática nativa, por lo tanto deteriora la calidad del agua y es perjudicial para la existencia de vida en ella (Demain, 2009).

En búsqueda de estrategias para el uso de vinazas se han ensayado métodos físico-químicos, tal como el uso de solventes, adsorción con carbón activado e incluso oxidación avanzada (Uğurlu, Kula 2007). Sin embargo, las tecnologías de

extracción o tratamiento fisicoquímico tienen desventajas inherentes, debido a su alto costo y la tendencia a formar intermedios tóxicos secundarios (Singh & Patel., 2012).

C. vulgaris ha sido propuesta para el tratamientos de este tipo de efluentes debido a su fácil adaptabilidad y su rápido crecimiento (Brennan & Owende, 2010).

Solo hasta el 2012, han comenzado a publicarse trabajos evaluando la posibilidad de integrar el tratamiento de las vinazas con la producción de biocombustibles; Singh & Patel (2012) describen un diseño conceptual de tratamiento integrando de vinazas y la producción de biocombustibles (principalmente biodiesel), por otro lado Liu *et al* (2012) evaluaron la posibilidad de utilizar melazas de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de astaxantinas utilizando *Chlorella zofingiensis*, obteniendo una alta concentración de este pigmento y de lípidos con miras a la producción de biocombustibles. Sin embargo aún no se conoce que efecto puede tener esta agua residual en la composición total de la microalga cultivada; por esto, fue necesario evaluar el efecto de la variación de la cantidad de inóculo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en la producción de biomasa y productos de valor agregado, en un medio de cultivo desarrollado a partir del aprovechamiento de vinazas.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Medio de cultivo. *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas de la Universidad de Texas (UTEX, Austin, Texas, USA); Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L es: NaNO_3 (2,94), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-1}$) NaCl ($4,28 \times 10^{-1}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-1}$), KH_2PO_4 (1,29), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-1}$) y micronutrientes (mg/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-2}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-3}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-3}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times$

10^{-3}), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-3}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-1}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-1}$), KOH ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura con un volumen de cultivo de 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 $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO_2 considerándose este cultivo como tratamiento control, durante 18 días de cultivo.

4.2.2 Producción de vinazas. La vinaza utilizada fue obtenida como residuo del proceso de producción del alcohol a partir de melaza fermentada, mediante evaporación sin recirculación en el laboratorio de procesos de la escuela de ingeniería química de la Universidad Industrial de Santander.

Para la fermentación se diluyeron 45 Kg de melaza comercial en 151 litros de agua hasta alcanzar aproximadamente 18° Brix, esta mezcla fue pasteurizada a una temperatura de $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora, posteriormente se enfrió hasta los $40\text{ }^\circ\text{C}$ y se ajustó el pH a 4,2 mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado (95%). El inóculo fue preparado utilizando 20 litros de la mezcla y adicionando cloruro de amonio (144 g), sulfato de magnesio (24 g), urea (24 g) y roca fosfórica (10 g), utilizados para la activación de 500 g de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan). El inóculo se añade al tanque donde se encuentra la demás melaza diluida, es aireada por una hora y tapada, para que inicie el proceso de fermentación, llevado a cabo durante 3 días. Transcurrido este periodo de tiempo se procede a la evaporación del mosto con el uso de un evaporador el cual trabaja a $94\text{ }^\circ\text{C}$, realizándose en dos etapas cada una con un tiempo promedio de 210

minutos. Los residuos que se obtienen de este proceso de evaporación son las denominadas vinazas.

4.2.3 Caracterización de la vinaza producida. Las vinazas contienen principalmente materia orgánica, potasio, azufre, magnesio, nitrógeno y calcio, además de colorantes fenólicos, caramelo y melanoidina que le dan su color oscuro característico; pero esta composición varía según su procedencia. Estudios realizados por Filho *et al* (1983), demostraron que las vinazas provenientes de la melaza presentan mayores contenidos de materia orgánica y elementos minerales. En la Tabla 1 se muestra la composición de las vinazas utilizadas para el cultivo, este análisis se llevó a cabo en el laboratorio químico de consultas industriales de la UIS.

Tabla 1. Composición química de la vinaza proveniente de la melaza de caña

CARACTERÍSTICAS DE LA VINAZA	
Fósforo (g P/L)	0,055 – 0,057
Potasio (g K/L)	24,60 – 24,62
Sodio (g Na/L)	0,57 – 0,58
Nitrógeno total (g N/L)	2,32 – 2,38
Carbono Orgánico Total (g/L)	2,13 – 2,14

4.2.4 Montaje experimental. Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura con un volumen de cultivo de 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 $\pm$ 2 °C, sin control de pH. Debido al color oscuro de las vinazas que impiden el paso de luz

homogéneamente en todo el reactor y al bajo proceso fotosintético de las microalgas en este medio no hubo iluminación.

Con el fin de comprobar el efecto de diferentes diluciones de inóculo en vinaza en la composición de la biomasa microalgal se probaron diferentes experimentos (Tabla 2 y 3). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado durante un periodo de 18 días.

En el primer experimento se utilizó un inóculo de una concentración aproximada de 0,6 g/L, y se evaluó el efecto de la concentración final del inóculo en el tratamiento de vinazas, para esto se emplearon diferentes cantidades de inóculo en tres volúmenes de vinazas (basados en estudios previos no reportados), con el fin de mantener un volumen constante de 2 litros de cultivo, se compensa el volumen de vinazas como el del inóculo (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los experimentos.

Vinazas (mL)	Inóculo <i>C. vulgaris</i> (mL)	Conc. final inóculo (g/L)	Tratamiento
1500	500	0,150	D1
1650	350	0,105	D2
1800	200	0,060	D3

En el segundo experimento evaluó el efecto de la cantidad de inóculo, en este caso se usaron diferentes cantidades (gramos) de biomasa en base húmeda, (disminución en un 75% la humedad del inóculo), para determinar su efecto en las vinazas (Tabla 3).

Tabla 3. Composición experimentos, parte 2.

Vinazas (mL)	Inóculo de <i>C. vulgaris</i> (g base húmeda)	Tratamiento
2000	1	C1
2000	2	C2
2000	3	C3

4.2.5 Cuantificación de biomasa. Para las mediciones de concentración de biomasa cada 2 días se tomó una muestra de 10 mL de cada reactor, se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos y retiró el sobrenadante, el pellet fue re-suspendido en 10 mL de agua destilada, posteriormente filtrado con filtros de celulosa de 1 µm previamente pesados. Los filtros con la muestras fueron llevados a horno a 105 °C durante 24 horas y luego en un desecador hasta alcanzar peso constante.

4.2.6 Determinación de proteínas totales. Para determinar la cantidad de proteínas totales producidas, se partió del método descrito por Illman *et al.* (2000). Se tomó 1 mL de muestra de cada uno de los tratamientos, se centrifugó (centrífuga DYNAC) a 3400 rpm durante 15 minutos, se removió el sobrenadante con precaución de no retirar el pellet, se adicionó 5 ml de agua destilada agitándose con el fin de hacer una mezcla homogénea, se volvió a centrifugar para retirar el sobrenadante, esto se realizó con el fin de retirar en su totalidad rastros del medio de cultivo que pueda alterar la medición. Al pellet obtenido se le adicionó 1mL de solución de NaOH 1 M y homogenizó, se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos y se procedió a retirar el sobrenadante, al pellet se repitió el procedimiento anteriormente descrito pero esta vez se tomó el sobrenadante teniendo cuidado que en este proceso no se fuera arrastrar biomasa; a este se le adicionó 5 mL de reactivo biuret y de esta manera poder aplicar el método de Biuret, descrito por Dorey & Draves (1998), al cabo de 20 minutos se midió la

absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

4.2.7 Cuantificación de carbohidratos. El método utilizado fue el colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), este determina los diferentes carbohidratos presentes en la muestra. Para este método, se tomó 1 mL de muestra para cada uno de los tratamientos, se centrifuga a 3400 rpm en una centrífuga (DYNAC) durante 15 minutos, fue removido el sobrenadante con precaución de no retirar el pellet, se adicionó 5 mL de agua destilada y se mezcla, luego se volvió a centrifugar y retiró el sobrenadante, esto se realiza con el fin de retirar en su totalidad rastros del medio de cultivo que me pueda alterar la medición. Posteriormente se adicionó al pellet 1mL de fenol al 5%, se homogenizó la mezcla y adicionó 5 mL de ácido sulfúrico al 95%. Por último se hicieron las diluciones necesarias para que la muestra pudiera ser mediada por el espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a longitudes de onda de 480 nm 485 nm 488 nm y 490 nm para identificar xilosa, arabinosa, fructosa y glucosa (Dubois *et al.*, 1956)

4.2.8 Extracción de lípidos. Esta extracción se realizó mediante el protocolo Soxhlet a base de hexano, modificado por el CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE EN INDUSTRIA Y ENERGÍA (CIDES) de la Universidad Industrial de Santander (González., 2010). Se tomó 5 g de muestra, se llevó al horno durante 3 horas y posteriormente al desecador por 1 hora, se pesaron 2 g poniéndolos en bolsas hechas con papel filtro, la muestra se montó al Soxhlet, el cual tenía un balón de 250 mL aforado con hexano. La muestra permaneció en el Soxhlet por 16h, tiempo establecido en el protocolo para lograr una completa extracción de los lípidos; luego el balón se llevó al horno a 105°C por 24 horas para garantizar la evaporación total del hexano y el agua, se pasó a un desecador por 12 horas se pesó en una balanza analítica; por diferencia de

peso entre el balón antes y después de la extracción, se determinó la cantidad de lípidos extraídos.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

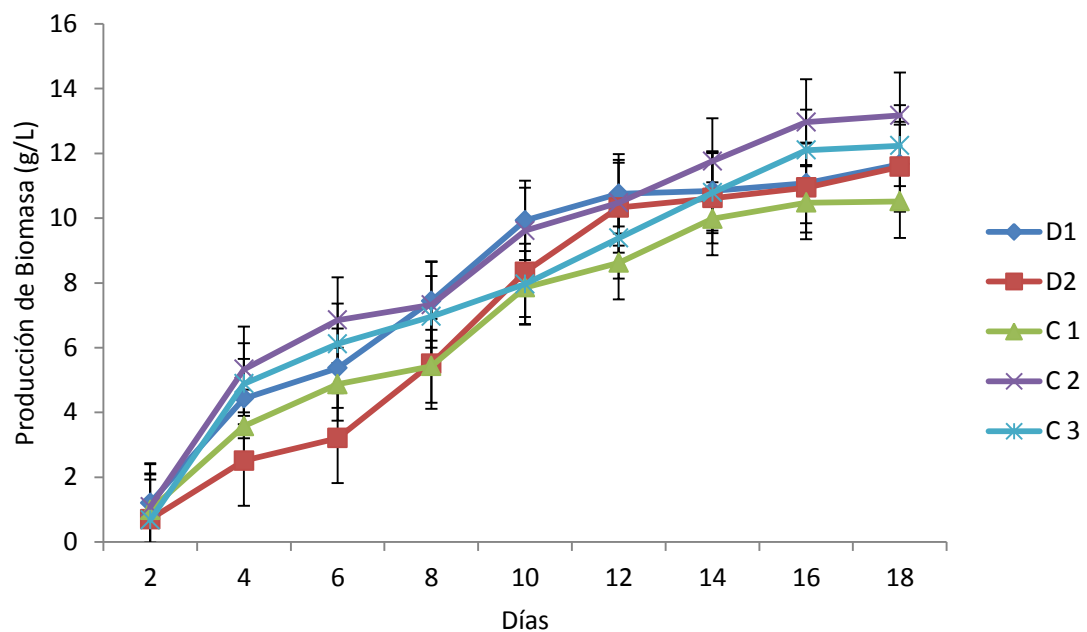
4.3.1 Producción y productividad de la biomasa. Las microalgas tienen la capacidad de absorber rápidamente nutrientes y CO₂, esto genera tasas de crecimiento altas, permitiéndoles desarrollarse en diferentes ambientes. Se ha estudiado la capacidad que tienen estas para degradar contaminantes como fenoles, compuestos aromáticos, colorantes sintéticos y biopolímeros recalcitrantes como la melanoidina (Singh & Patel, 2012).

Durante el tiempo de experimentación en los cinco tratamientos el comportamiento mostrado por todos estos es muy similar, sin embargo la mayor producción (13,2 g/L) y productividad (0,73 g/L*d) se obtuvo con el tratamiento C2, por otro lado la menor producción (10,5 g/L) y productividad (0,58 g/L*d) se alcanzó en el tratamiento C1 (Figura 1). Pathak *et al.*, (1999) determinó que el aumento en la producción de biomasa, se debe al aprovechamiento de los nutrientes en las vinazas como fosfatos, nitratos, carbono orgánico, entre otros.

Liu *et al* (2012) utilizaron molasas diluidas y pre tratadas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella zofingiensis*, adicionando cantidades específicas de molasas para mantener una concentración estable de nutrientes, debido a que según los autores un aumento de los nutrientes de las molasas disminuye la producción de la biomasa, con este tipo de cultivo obtuvieron una producción de 3 g/L al 3º día de cultivo y una productividad de 1 g/L*d. En el sistema empleado con vinazas no fue necesaria la dilución, porque las microalgas no se veían afectadas por la concentración de nutrientes de las vinazas, logrando una producción (3,03 g/L) y productividad (1,01 g/L*d) al 3º día. Otros estudios con cultivos heterótrofos

de *C. vulgaris* donde fue utilizada glucosa como sustrato se llegaron a obtener 117,2 g/L con un inóculo de 65 g/L en un periodo de tiempo de 36 horas (Doucha & Livansky, 2011) esto significa la duplicación de la biomasa en este lapso de tiempo, la producción es mayor al compararla con la biomasa a partir de vinazas, pero la duplicación ocurre en un tiempo similar.

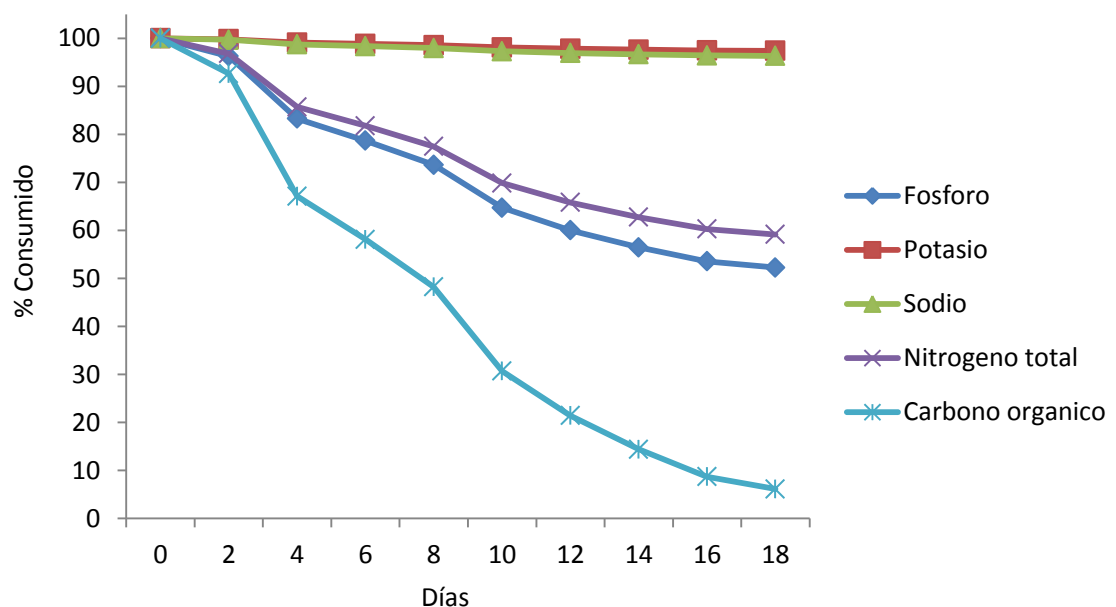
Figura 1. Producción de biomasa en función del tiempo los 5 tratamientos



4.3.2 Composición de las vinazas. El consumo de los principales nutrientes (fósforo, potasio, nitrógeno) y carbono orgánico presente en las vinazas por parte de las microalgas se presenta en la Figura 2; se puede observar que es el nitrógeno, el fósforo y el carbono orgánico son los compuestos que más se consumen. El consumo de todos los compuestos es proporcional a la producción de biomasa, siendo el carbono orgánico el que sufre la mayor reducción llegando

hasta un 94% de eliminación del valor inicial, esto se debe a que este compuesto conforma el 50% de la biomasa (Bumbak *et al.*, 2011). El nitrógeno consumido es aproximadamente el 40% del total de las vinazas lo que significa 947 mg/L; Travieso (2008) logró la eliminación entre 600-1000 mg/L de nitrógeno en un fotobioreactor continuo con vinazas pre tratadas anaeróbicamente y con ciclo de luz/oscuridad de 12/12, comparado con estos resultados la eliminación en los dos tratamientos es muy cercana, aunque a las vinazas utilizadas en este estudio no se le realizó ningún tipo de pretratamiento. Valderrama *et al* (2002) realizaron cultivos de *C. vulgaris* en efluentes de destilería pre tratadas anaeróbicamente, estos cultivos permitieron la eliminación de fósforo el cual se encontraba en una concentración de 1,5-3,5 mg/L, en promedio se logró remover el 28% del fósforo total equivalente a 0,42-0,98 mg/L, para el caso de estudio de vinazas no tratadas la eliminación de fósforo fue mayor, lográndose una reducción del 52% lo que equivale a una eliminación de 27,2 mg/L.

Figura 2. Variación de la composición de las vinazas con el tiempo

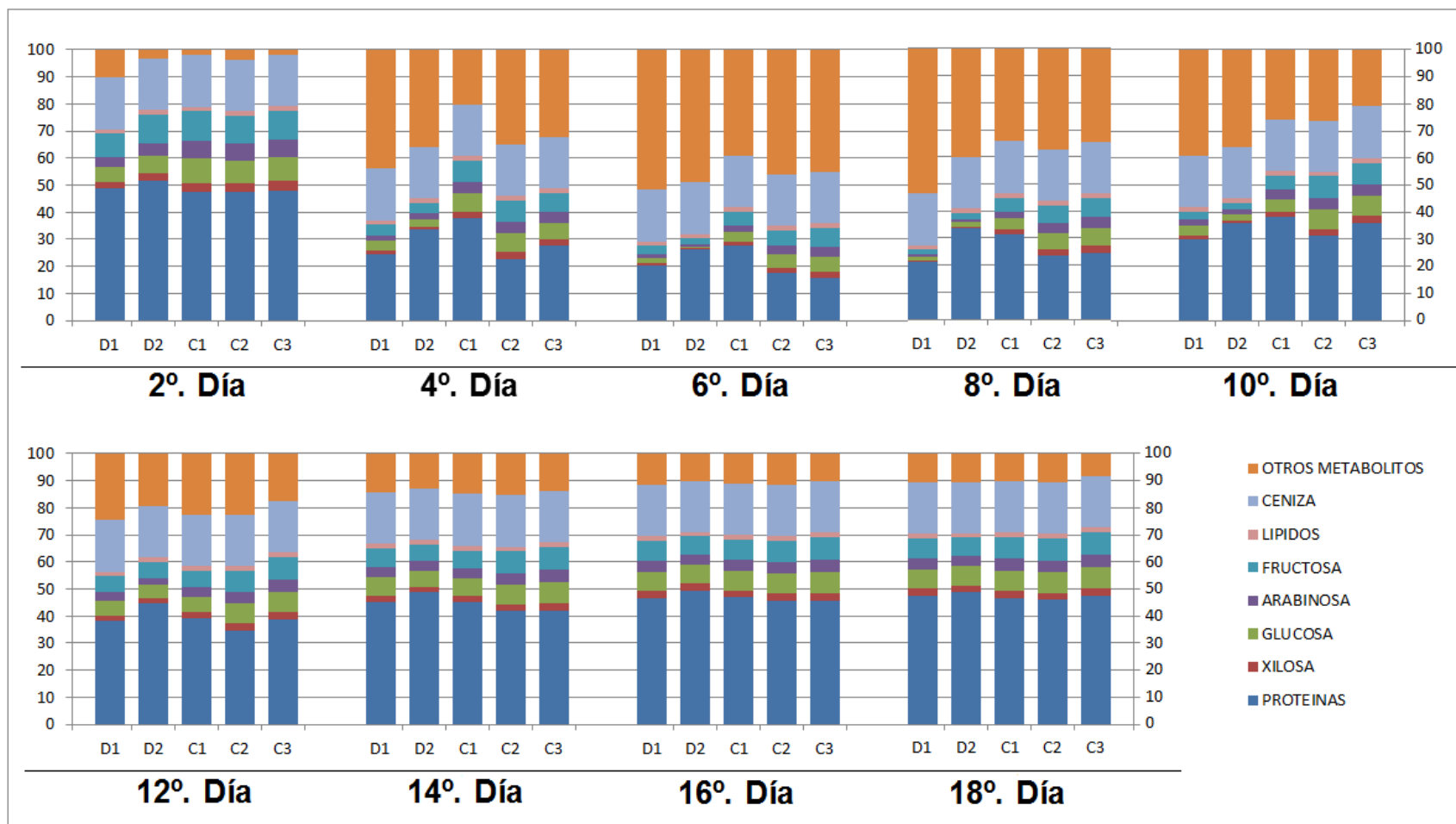


Al finalizar el experimento se observó que la vinaza obtenida no presentó ningún cambio de su color oscuro característico. Valderrama *et al* (2002) realizó cultivos conjuntos de microalgas *C. vulgaris* y *Lemma minuscule* en efluentes de destilería pre tratadas anaeróbicamente, estos estudios concluyeron que al tratar los efluentes solo con *L. minuscule* se reducía la coloración solo en un 10%, pero al realizar el tratamiento conjunto inicialmente con *C. vulgaris* y después con *L. minuscule* la reducción en la coloración llegaba a un 52%. La degradación de la melanoidina que da el color oscuro de las vinazas se da por procesos fotobioreductores, o por algunas cianobacterias que degradan la melanoidina debido a la producción peróxido de hidrógeno durante el proceso llegando a una reducción en la coloración de un 75% (Kalavathi *et al*,. 2001), en casos donde se han utilizado un conjunto de estas cianobacterias la reducción en el color ha llegado a un 98% (Patel *et al*,. 2001). Este estudio se centró en la producción y análisis de la biomasa con cultivos heterotróficos, debido a que en estos se obtenía una mayor producción; para este tipo de cultivos el tratamiento de las vinazas no es tan eficiente porque no se pueden retirar todos los compuestos dañinos de estas como la melanoidina debido a la falta de luz.

4.3.3 Caracterización de los metabolitos. En la Figura 3 se puede observar como para los 5 tratamientos se evidencia una disminución en la concentración de las proteínas durante los 6 primeros días, transcurrido este período de tiempo la presencia de las proteínas empieza a mostrar un aumento significativo hasta estabilizarse para todos los tratamientos alrededor del décimo cuarto día. Del 4º al 10º día se evidencia una mayor diferencia en los valores de la concentración de proteínas entre todos los tratamientos, siendo el 6º día donde se presentan los puntos mínimos con valores de D1: 20,47%, D2: 26,37%, C1: 27,78%, C2: 17,90% y C3: 15,90%, esto se debe a que durante este período de tiempo las microalgas sufren un cambio en su composición interna debido a la adaptación al nuevo medio de cultivo, donde pasan de ser fotoautótrofas a heterótrofas.

Como se observa en la Figura 3 a partir del 12º día la concentración (p/p) de proteína empieza a tender a un valor estable para todos los tratamientos, con valores máximos de concentración de D1: 47,53%, D2: 48,95%, C1: 46,67%, C2: 45,95% y C3: 47,37%. Estudios han logrado una presencia del 54% (p/p) de la proteína en la biomasa, cultivada en medio Bol Basal al 5º día (Porrás y Prada 2012), esto en comparación a lo obtenido en el cultivo con vinazas significa una disminución en promedio del 6%.

Figura 3. Composición de la biomasa durante los 18 días



Fábregas *et al.*, (1989) demostraron que la concentración de nitrógeno en forma de nitrato afecta de manera directamente proporcional la producción de proteínas, lo cual concuerda con las altas concentraciones de nitrógeno y la presencia de proteínas.

Con respecto a los carbohidratos el grupo de monosacáridos evaluados fueron: xilosa, glucosa, arabinosa y fructosa. Todos estos presentaron un comportamiento muy similar entre ellos; esta similitud se hace más evidente entre los cultivos con inoculados con microalgas diluidas (D1 y D2), pero en los 5 tratamientos no presentan diferencias significativas en la presencia de los carbohidratos al final del experimento como se puede ver en la Figura 3.

Todos los monosacáridos evidencian una disminución en la presencia de estos en la biomasa durante los 8 primeros días, alcanzando también sus valores mínimos para los tratamientos C1, C2 y C3 al 6º día y D1 y D2 al 8º día, esta disminución de los metabolitos se debe a un período de adaptación al nuevo medio y al cambio en su metabolismo al cambiar a una alimentación heterótrofa, en este periodo es donde se evidencia las mayores diferencias en los valores de los distintos tratamientos. A partir del 10º día comienza un aumento gradual de la presencia de estos metabolitos en la biomasa hasta estabilizarse en sus valores máximos alrededor del 16º día.

La xilosa es el carbohidrato de menor presencia en la biomasa, durante los primeros 8 días se alcanzan los valores mínimos para los distintos tratamientos los cuales son: D1: 0,53%, D2: 0,61%, C1: 1,43%, C2: 1,91% y C3: 2,2% (p/p). Del 10º al 18º día la concentración de la xilosa en la biomasa empieza a aumentar y posteriormente a estabilizarse en el valor máximo de cada tratamiento D1: 2,57%, D2: 2,39%, C1: 2,85%, C2: 2,64% y C3: 2,88% (p/p). Jerez *et al.*, (2012) en medios de cultivo Bol-Basal enriquecidos con acetato de sodio y nitratos de sodio como principales fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, obtuvieron una

presencia máxima de xilosa en la biomasa de 9,70%(p/p) con una producción de biomasa de 0,8 g/l al 5º día, comparado con la biomasa obtenida a partir de vinazas se puede observar una menor presencia de este metabolito, pero tasas de producción mayores.

La glucosa junto con la fructosa son los monosacáridos de mayor presencia en la biomasa, al igual que los demás metabolitos durante los primeros 8 días alcanzan los valores mínimos para después del 10º día empezar a aumentar la presencia de estos en la biomasa. Los valores mínimos obtenidos para los tratamientos son: D1: 1,02%, D2: 1,71%, C1: 3,70%, C2: 4,82% y C3: 5,84% (p/p), el aumento de este metabolito comienza a partir del 10º día hasta sus valores máximos alcanzados para cada tratamiento D1: 7,07%, D2: 6,97%, C1: 7,29%, C2: 7,40% y C3: 7,82% (p/p). Otros estudios han logrado una presencia de 9,30% (p/p) de glucosa en la biomasa, utilizando nitrato de sodio y acetato de sodio como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente (Jerez *et al*, 2012).

La arabinosa presentó los mismos cambios mostrados por los demás carbohidratos alcanzando los valores mínimos durante los primeros 8 días con valores de: D1: 0,94%, D2: 0,88%, C1: 2,39%, C2: 3,09% y C3: 3,57% (p/p). A partir del 10º día cuando la concentración de este metabolito aumenta, alcanzando valores máximos de concentración (p/p) de D1: 4,07%, D2: 3,78%, C1: 4,50%, C2: 4,17% y C3: 4,54%.

La fructosa es el monosacárido de mayor concentración en la biomasa, alcanzando al 16º día la mayor concentración, presentando un período de disminución en la concentración durante los 8 primeros días. Los valores mínimos son D1: 1,83%, D2: 2,13%, C1: 4,94%, C2: 5,62% y C3: 6,77% (p/p), los valores máximos son D1: 7,52%, D2: 6,85%, C1: 7,87%, C2: 8,41% y C3: 8,28% (p/p).

Los hidratos de carbono a partir de microalgas son adecuados para la producción de bioetanol, aunque aún debe crearse una tecnología más económica para la recolección de células y así hacer factible la producción comercial de etanol basado en microalgas (Chen *et al.*, 2013). Algunas cepas de *C. vulgaris* han logrado concentraciones en la biomasa de 55% (Illman *et al.*, 2000, Brennan & Owende, 2010) y 41% (Dragone *et al.*, 2011). Los monosacáridos estudiados componen un 22% del total de la biomasa al 18º día, con una producción de biomasa de 13,17 g/L, la menor presencia de los hidratos de carbono en la biomasa se debe a la alta presencia de nitrógeno en el medio de cultivo ya que estudios han demostrado que para una mayor presencia de carbohidratos en la biomasa se hace necesario una baja presencia de nitrógeno en el medio (Illman *et al.*, 2000, D'Souza & Kelly, 2000).

A diferencia de los otros metabolitos, los lípidos presentes en la biomasa representan las menores concentraciones con valores de D1: 1,72%, D2: 1,63%, C1: 1,79%, C2: 1,67% y C3: 1,83% (p/p) como se observa en la Figura 3, estos valores son bajos comparados con otros estudios en los cuales se alcanzan presencias del metabolito del 21% con un medio de cultivo Bol Basal modificado con nitrato de sodio y acetato de sodio (Porrás y Prada 2012). La producción de determinados metabolitos depende de la cantidad y tipo de nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo. Estudios demostraron que la cantidad total de lípidos presentes en la biomasa es característica de cada tipo de microalgas, además de factores ambientales como la intensidad de luz, pH, temperatura y nitrógeno, siendo este último uno de los de mayor influencia tiene debido a que a valores altos de nitrógeno en el medio disminuye la producción de lípidos en la biomasa (Álvarez, 1989), esto coincide con la baja concentración de lípidos a causa de las altas concentraciones de nitrógeno presentes en las vinazas.

La alta producción de biomasa y concentración de ciertos metabolitos como proteínas y carbohidratos, hace del cultivo con vinazas una fuente atractiva de

materia prima para procesos fermentativos. La biorefinería permitiría el aprovechamiento no solo de los carbohidratos como materia prima sino también de otros metabolitos valiosos como las proteínas (Demirbas., 2009). En promedio una destilería produce 100 m^3 de alcohol al 96% por día, generando alrededor de 1300 m^3 de vinazas (Perera., 2009), si este volumen de vinaza fuese utilizada para el cultivo de microalgas con una producción diaria cercana a $1 \text{ g/L}\cdot\text{d}$ se producirían cerca de 1300 kg diarios de biomasa, esta estaría compuesta por 286 Kg de carbohidratos 614 Kg de proteínas y 22Kg de lípidos los cuales podrían ser extraídas por procesos de biorefinería. Esto implicaría una producciones de 104,2, 224,39 y 8,2 toneladas métricas anuales de carbohidratos, proteínas y lípidos respectivamente.

4.4 CONCLUSIONES

- Se concluye que durante el tiempo de experimentación en los cinco tratamientos el comportamiento mostrado por todos estos es muy similar, sin embargo la mayor producción ($13,2 \text{ g/L}$) y productividad ($0,73 \text{ g/L}\cdot\text{d}$) se obtuvo con el tratamiento C2, por otro lado la menor producción ($10,5 \text{ g/L}$) y productividad ($0,58 \text{ g/L}\cdot\text{d}$) se alcanzó en el tratamiento C1
- El consumo de todos los compuestos es proporcional a la producción de biomasa, siendo el carbono orgánico el que sufre la mayor reducción llegando hasta un 94% de eliminación del valor inicial y el nitrógeno consumido es aproximadamente el 40% del total de las vinazas lo que significa 947 mg/L
- Se puede concluir que no existe mayor diferencia en las producciones y concentraciones de los metabolitos obtenidas al final del experimento para los distintos tratamientos.

5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO TÉRMICO EN LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS

5.1 INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos caracterizados por una gran diversidad metabólica y capaz de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, farmacéutica e industrial; bajo adecuadas condiciones de cultivo (Borowitzka 1995, Dunstan *et al.* 1993). Además de dichas aplicaciones, las microalgas cuentan con la capacidad de crecer en agua marina, dulce y aguas residuales disminuyendo así los costos de materias primas (Heredia-Arroyo *et al.* 2011). Éstas tienen además la cualidad de reducir las emisiones de efecto invernadero en la fijación fotosintética del CO₂ liberados en procesos industriales (Alcántara *et al.* 2013), reduciendo los índices de polución generados por las industrias y la quema de combustibles fósiles.

Actualmente la producción de metabolitos (especialmente los considerados como secundarios) está creciendo significativamente (Serive *et al.* 2012), donde la obtención de proteínas es un ejemplo claro de ello, ya que ciertas especies de microalgas pueden acumular hasta un 39% de su peso seco en proteínas (Harun y Danquah 2011), despertando interés respecto a su valorización para producir suplementos alimenticios (Ju *et al.* 2012) y productos benéficos para la salud o biofertilizantes (García-Cuadra *et al.* 2012). 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) (Sari *et al.* 2013). Por otra parte la temperatura es otro factor importante debido a que puede actuar positivamente sobre moléculas resistentes

al calor, sin embargo también puede degradar moléculas termolábiles como las clorofilas (Serive *et al.* 2012).

Además de proteínas la pared celular de las microalgas está compuesta por carbohidratos complejos, que pueden liberarse y convertirse en azúcares más simples de manera que otros microorganismos los consuman para la producción de bioetanol (Harun y Danquah 2011). Ciertas especies de *Chlorella* sp contienen altos contenidos de carbohidratos, especialmente *C. vulgaris* la cual puede tener entre 37% y 55% de carbohidratos de su peso seco dependiendo de diferentes factores de crecimiento (Ho *et al.* 2012). Para aprovechar ese contenido en carbohidratos, es necesario realizar un proceso de disrupción celular de manera que la pared celular del alga sea destruida con el fin de liberarlos (Miranda *et al.* 2012). Un eficiente pretratamiento debe ser simple de aplicar, energéticamente eficiente, tener un bajo costo y no generar la degradación de los azúcares (Harun & Danquah 2011). El pretratamiento de la biomasa utilizada es una de las etapas más relevantes y costosas en el proceso, ya que éste reduce la cristalinidad de la biomasa y aumenta el área de superficie con el fin de mejorar la digestibilidad del sustrato, por ende, el pretratamiento alcalino ha mostrado ser una alternativa favorable, debido a las bajas condiciones de temperatura y presión aplicadas, proporcionando así un menor costo de producción con respecto a otros métodos de pretratamiento (Harun y Danquah 2011).

Todos estos metabolitos de valor agregado producidos a partir del cultivo microalgal en aguas residuales, solo se pueden aprovechar integralmente bajo el concepto de Biorefinería, (González-Delgado, Kafarov 2011), sin embargo el gran desafío es el proceso de extracción simultáneo de los metabolitos presentes en la biomasa, en un sistema eficiente y rentable.

Para el presente estudio inicialmente se mostrarán las metodologías en las que se evaluaron tiempo y temperatura como efectos del pretratamiento térmico de la biomasa.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Métodos de cultivo. *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal.

Se utilizó como fuente de nutrientes las vinazas (residuos generados en la producción de etanol a partir de caña de azúcar), es previamente tratada con *Chlorella vulgaris*, se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y h=35 cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO₂ considerándose este cultivo como tratamiento control.

Después de 15 días de cultivo la biomasa producida fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos en una centrífuga (UNIVERSAL 320 R),

5.2.2 Pretratamiento térmico: efecto del tiempo y temperatura. Con el fin de evaluar las condiciones de temperatura dentro del pretratamiento térmico que maximicen el proceso de extracción, se realizó una evaluación de dichos efectos en las técnicas de organosolv e hidrólisis ácida.

5.2.3 Pretratamiento térmico. La biomasa de *C. vulgaris* UTEX 1803 (cultivada siguiendo el sistema empleando vinazas como medio de cultivo) fue sometida a un

pretratamiento térmico, con el fin de identificar las condiciones de secado que permitirían un mejor proceso de extracción de metabolitos. La biomasa obtenida se dividió en tres partes y cada una fue sometida a un tratamiento térmico en un horno de la siguiente manera:

Tabla 4. Temperatura y tiempo de pretratamiento.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
105	24
75	24
25	0

5.2.4 Método organosolv. Se pesaron 10 g de biomasa tratada térmicamente previamente, para cada muestra y cada réplica respectivamente, luego se procedió a hacer la mezcla con 100 mL de metanol al 32 %v/v y 0,6 M de ácido sulfúrico como catalizador y se llevó a una autoclave a 15 psi y 121 °C durante un período de reacción de 4 horas.

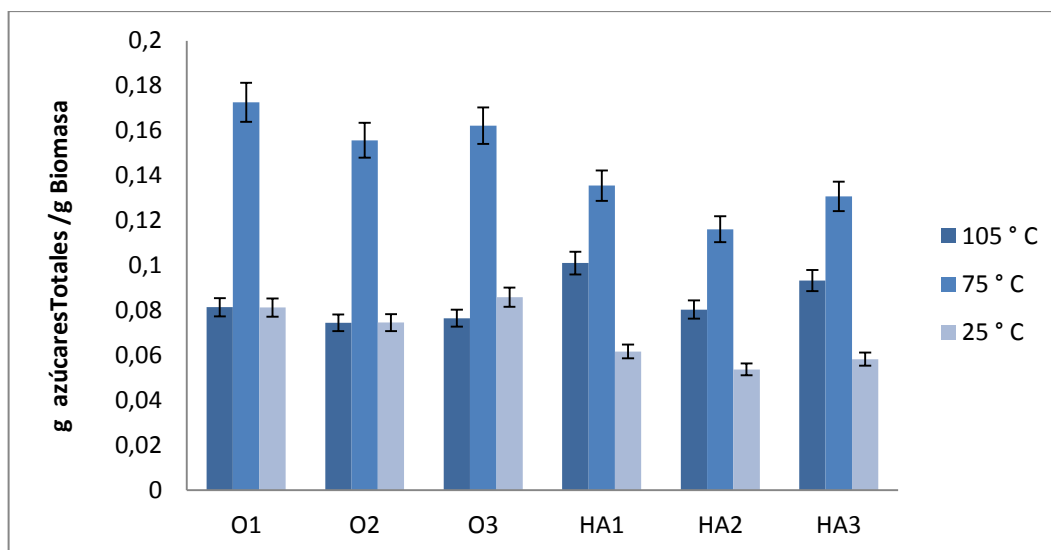
5.2.5 Método de hidrólisis ácida. Se pesaron 10 g de biomasa, posteriormente en un vaso de precipitado se mezclaron con 100 mL de HCl 0,5 M, para la hidrólisis; dicha mezcla se realizó en una placa de agitación magnética (WiseStir MSH-20D) a 500 rpm y 25 °C durante un período de reacción de 2 horas.

Después de cada uno de los procesos de extracción se realizó la respectiva filtración y neutralización seguida de la cuantificación de azúcares por el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Resultados organosolv e hidrólisis ácida. Los resultados para las diferentes hidrólisis se presentan en la Figura 4; donde se aprecia que en la hidrólisis por el método organosolv, la mayor liberación de azúcares fermentables ocurre a una temperatura de pretratamiento de 75 °C, donde se liberan hasta 0,17g de azúcares/g de biomasa, seguida por la biomasa de 25 y 105 °C respectivamente; igualmente para la hidrólisis ácida la mayor cantidad de azúcares liberados se da para el pretratamiento a 75 °C, donde se liberan hasta 0,14 g de azúcares/g de biomasa; seguida por la de 105 y la de 25 °C, cambiando de comportamiento en este caso de un método a otro para estas dos temperaturas.

Figura 4. Total de azúcares liberados para la biomasa pretratada para los dos métodos de hidrólisis: Organosolv (O1, O2, O3) e hidrólisis ácida (HA1, HA2, HA3) para cada uno de los pretratamientos térmicos.



La diferencia entre las cantidades extraídas a 75 °C por los dos métodos de hidrólisis son de aproximadamente 0,03 g de azúcares/g de biomasa; en términos generales se puede observar que la disrupción por el método de hidrólisis ácida es mejor, debido a que se da en menor tiempo, utilizando menor cantidad de reactivos y un consumo energético mucho menor.

En cuanto al análisis de los resultados arrojados por el método organosolv para los pretratamientos a 105 °C y a 75 °C se puede notar que, aunque a la biomasa para cada caso tiene zonas amorfas, la liberación de azúcares obtenida por la biomasa pre tratada a 75 °C es mayor lo cual se debe a que la humedad contenida en la biomasa mejora el área de contacto para la reacción de hidrólisis y además ayuda a la miscibilidad del metanol para la extracción de los azúcares, siendo en este caso mayor; en el caso de la biomasa pre tratada a 25 °C el exceso de agua contenido en ésta provoca un buen esparcimiento del metanol sobre toda la biomasa, pero al ser tan grande la cantidad de agua la concentración del ácido y del metanol disminuyen en la mezcla produciendo un menor contacto entre ácido, agua y biomasa, disminuyendo la reacción de hidrólisis al igual que la extracción de azúcares.

El comportamiento que tiene la liberación de los azúcares está relacionada con la temperatura del pretratamiento y con esto la humedad de la biomasa (Tabla 5).

Tabla 5. Humedad para la biomasa de cada uno de los pretratamientos térmicos.

Temperatura Pretratamiento (C°)	Humedad aprox (%)
105	0%
75	8%
25	70%

Según los resultados obtenidos, la biomasa debe contener una humedad relativamente baja para permitir una mayor liberación de azúcares; de manera que ésta no debe estar totalmente deshidratada (pretratamiento 105°C) ni contener altas cantidades de humedad (pretratamiento 25°C), pues el efecto de los ácidos y el solvente sobre la célula será diferente para cada uno de los métodos de disrupción. Zhou *et al.*,(2011) demostraron que variaciones en las concentraciones de los reactivos pueden provocar cambios en la cantidad de azúcares liberados mejorando o empeorando el resultado de reacción y la extracción de éstos. En los experimentos realizados con diversas concentraciones de reactivos para la hidrólisis llegaron a una cantidad óptima para la liberación de azúcares en presencia de 2% de HCl y 2,5% de MgCl₂ el rendimiento de la liberación de azúcares fue de 83,47%, pero variando esas cantidades el rendimiento cambiaba a valores muy pequeños, esos rendimientos tan altos en la obtención de azúcares hacen muy atractiva la utilización de microalgas para su utilización para la producción de bioetanol; sin embargo el método utilizado en este estudio requiere grandes cantidades de energía; Miranda *et al.* (2012) encontraron que al pre-tratar térmicamente a *Scenedesmus obliquus* el agua removida por los microporos de la celulosa en la pared celular pueden causar cambios irreversibles en su estructura, creando zonas amorfas, en las que la tensión entre las fibras se reduce provocando elasticidad en ellas, lo cual provoca que sea más susceptible al ataque por ácidos; los resultados obtenidos para varios tipos de disrupción celular alcanzaron altas cantidades de azúcares liberados con biomasa deshidratada y rendimientos más bajos con biomasa húmeda.

Para la extracción de un metabolito en especial, la utilización de un solvente específico provoca cambios en el rendimiento tanto de la reacción como de la extracción para biomazas húmedas, pues de la naturaleza del agente extractor va a depender si el agua ayuda o inhibe su acción tanto de reacción como de extracción. Por ejemplo, un agente extractor miscible con agua se beneficiaría de

ésta aumentando el contacto entre él y la biomasa mejorando la extracción, en cambio la utilización de un agente extractor inmiscible en biomasa húmeda, provocaría que el agua inhiba la acción del agente extractor. En el estudio realizado por Magota *et al.*, (2012) se encontró que para la extracción de hidrocarburos de *Botryococcus braunii* con hexano en biomasa húmeda el efecto del contenido de agua en la célula disminuye la acción extractora del hexano por ser una sustancia apolar inhibiendo el efecto del solvente.

Para la hidrólisis ácida de la biomasa pre tratada a 25°C, el contenido de agua es tan alto que al usar el ácido para el proceso de disrupción la concentración de éste disminuye considerablemente, haciendo que el contacto entre el ácido y la biomasa sea mucho menor, provocado que el rendimiento de la reacción y por ende la liberación de azúcares sea baja. Por otra parte la biomasa pre tratada a 75°C al ser tan baja la cantidad de humedad, la concentración del ácido es casi constante y al ocurrir la disrupción la cantidad de agua en la biomasa mejora la reacción. Para el pretratamiento a 105°C al no existir presencia de agua, la concentración del ácido será alta haciendo que el rendimiento del proceso de disrupción sea alto. En sí el efecto de la humedad en la biomasa, el solvente y el ácido utilizados para cada método de hidrólisis juegan un papel importante en la reacción de producción de azúcares fermentables y en la posterior extracción de estos; como se puede apreciar en la hidrólisis organosolv estos tres parámetros juegan un papel importante en la reacción y la extracción; en la hidrólisis ácida es más importante el efecto de la humedad y la concentración de los reactivos.

Dentro de los carbohidratos liberados mediante los dos métodos de hidrólisis la glucosa es el más alto, con valores de hasta 81% tanto para organosolv (Figura 5) como para hidrólisis ácida (Figura 6). El segundo carbohidrato en mayor proporción presente es la fructosa con una cantidad de entre 8 y 12% para los dos métodos, el resto se compone (cerca del 13%) de carbohidratos fermentables tales como galactosa, arabinosa y xilosa.

Figura 5. Porcentaje de azúcares fermentables liberados por el método Organosolv para cada uno de los pretratamientos.

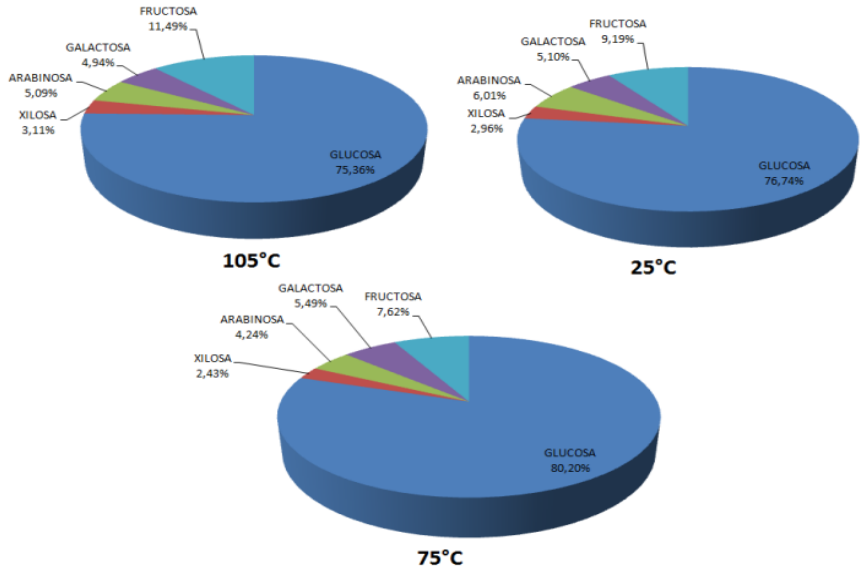
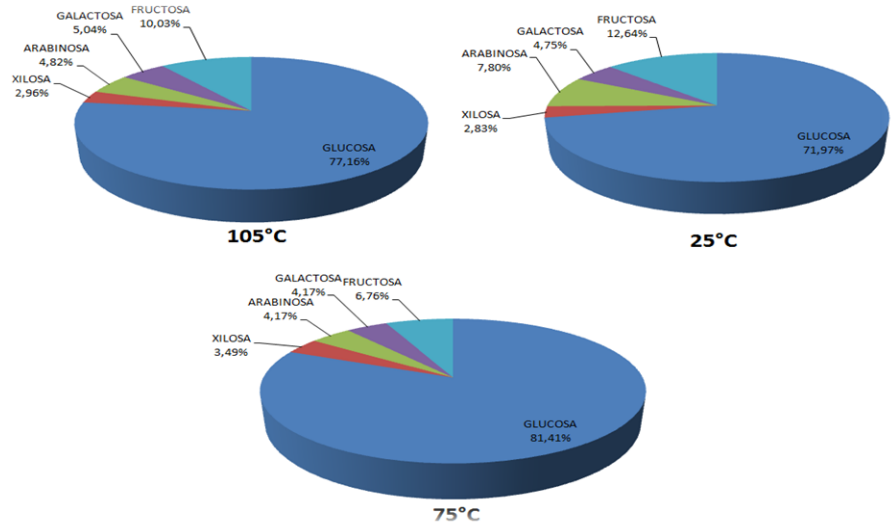
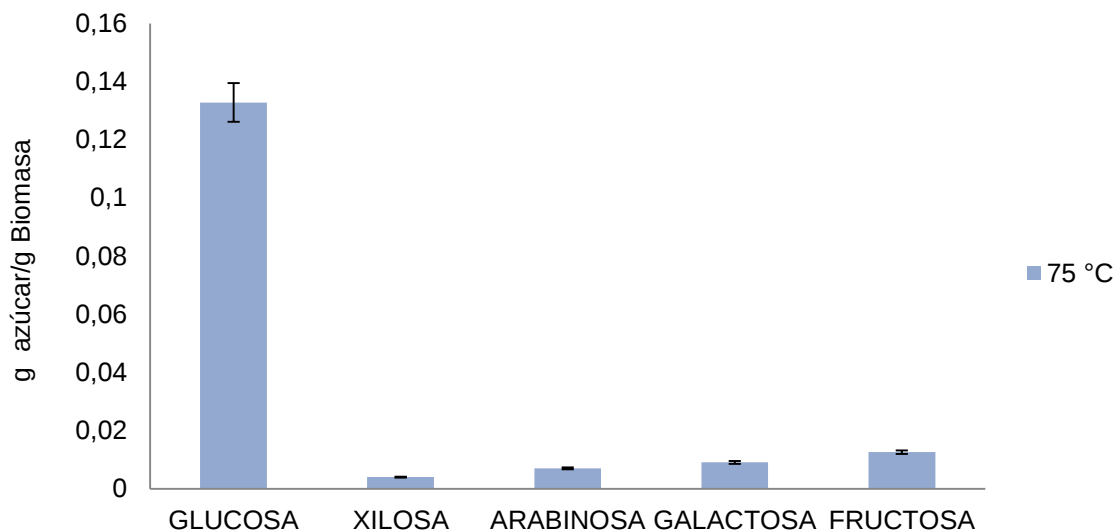


Figura 6. Porcentaje de azúcares liberados por el método de hidrólisis ácida para cada uno de los pretratamientos.



En la Figura 7 se dan los valores obtenidos de glucosa, xilosa, galactosa y fructosa para la hidrólisis organosolv a 75 °C los cuales son: 0,132 g glucosa/g biomasa, 0,004g xilosa/g biomasa, 0,0091 g galactosa/g biomasa y 0,012 g fructosa/g biomasa; comparados con los obtenidos por Lee *et al.*, (2011) realizando métodos de disrupción diferentes y con biomasa seca para *C. vulgaris* dieron: 0,14 g glucosa/g biomasa, 0,04 g xilosa/g biomasa, 0,031 g galactosa/ g biomasa y 0,06 g fructosa/ g biomasa; se puede afirmar que aunque los contenidos de glucosa son similares el resto de azúcares varían de haciendo que el rendimiento de los azúcares liberados a 75 °C por el método organosolv sea aproximadamente 10% menor de los extraídos por el método comparado; sin embargo cabe resaltar que las condiciones por el método organosolv no son las óptimas para este tipo de biomasa, es decir se deben buscar las mejores condiciones para realizar la disrupción y la extracción de los azúcares.

Figura 7. Cantidad promedio del tipo de azúcares liberados por el método Organosolv a 75 °C.



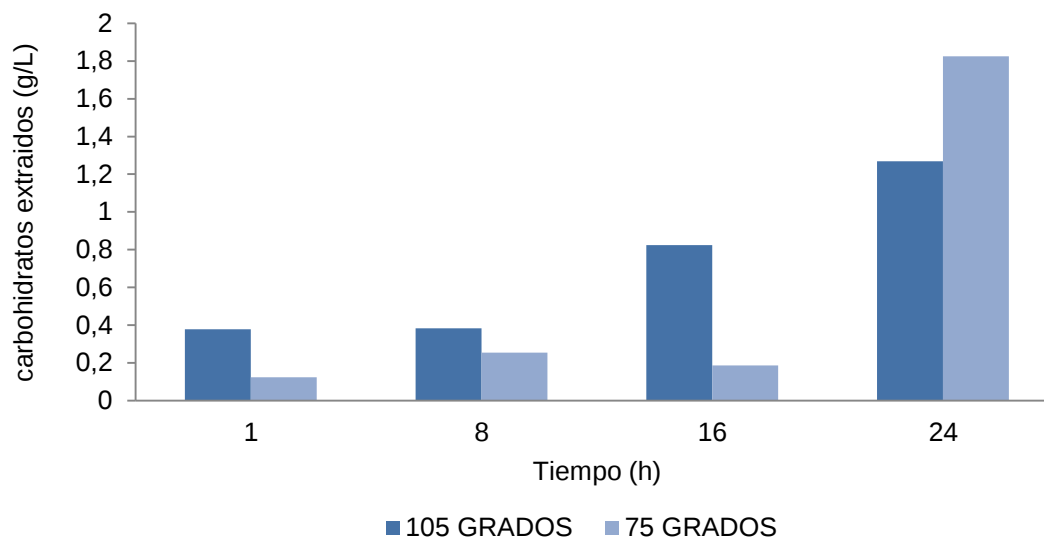
Con el fin de determinar los efectos del tiempo en la eficiencia del pretratamiento térmico sobre la biomasa se probaron diferentes tiempos con las mejores temperaturas de extracción (Tabla 6)

Tabla 6. Temperatura y tiempo de pretratamiento.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)			
105	1	8	16	24
75				

En la Figura 8 se comparan las productividades de biomasa luego de los pretratamientos térmicos realizados en la investigación mediante el método organosolv se encontró que la mayor liberación de azúcares fermentables ocurre a una temperatura de 75 °C con un tiempo de secado de 24 h, en el que se liberan hasta 1,83 g de azúcares/L, seguida por la temperatura de 105 °C con un tiempo de secado de 24 h, en el cual se liberan hasta 1,27 g de azúcares/L; la diferencia entre las cantidades extraídas a 75 °C y 105 °C con un tiempo de secado de 24 horas es significativa (aproximadamente 0,56 g de azúcares/L).

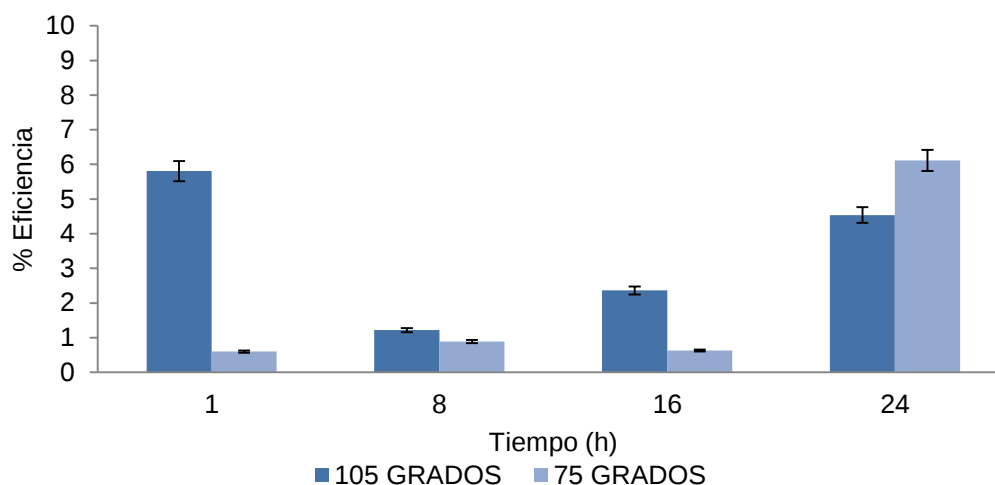
Figura 8. Concentración de carbohidratos extraídos



En los experimentos realizados por Ho *et al.*, (2013) bajo las condiciones óptimas, la productividad de carbohidratos fue de 1,44 g de azúcares/L, comparado con este, la hidrólisis organosolv se hace muy atractiva en la extracción de carbohidratos.

La eficiencia del proceso se muestra en la Figura 9 donde se aprecia que el pretratamiento térmico que presenta mayor eficiencia es el de 75 °C con un tiempo de secado de 24 h, esto se debe a que la humedad contenida en la biomasa mejora el área de contacto para la reacción de hidrólisis, también ayuda a la miscibilidad del metanol para la extracción de los azúcares, siendo en este caso mayor, además el consumo energético es mucho menor, seguido por el de temperatura de 105 °C con un tiempo de secado de 1 h, el cual presenta una eficiencia bastante alta esto se debe a la relación de biomasa seca/solvente.

Figura 9. Eficiencia de extracción de carbohidratos

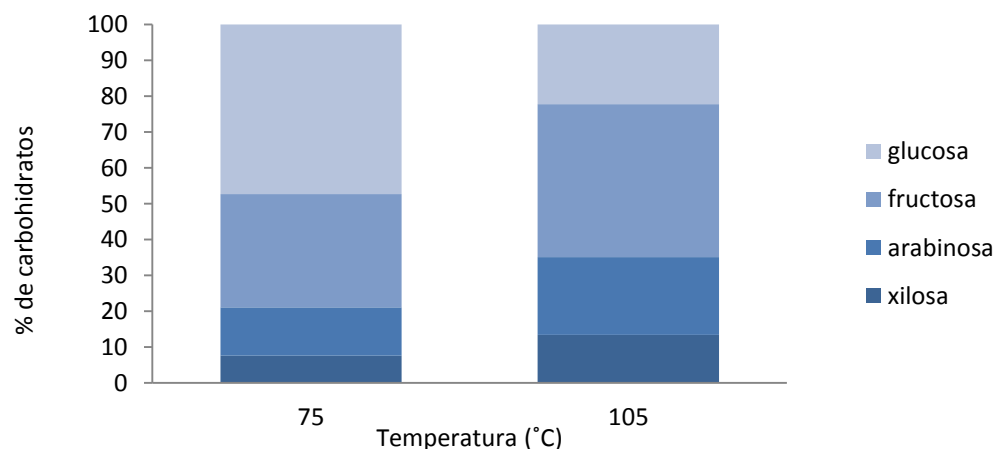


El efecto observado de la concentración de microalgas en la velocidad de hidrólisis y el rendimiento de esta, muestra que la hidrólisis disminuyó con el aumento de la concentración de microalgas demostrado por Fu *et al.*, (2010). Las razones eran posiblemente debido a la creciente resistencia de transferencia de masa con alta concentración de sustrato Chen *et al.* (2008) y la inhibición del producto final (Szczodrak, 1988). En el caso de la biomasa pre-tratada a 105 °C y 24 h la cantidad de agua contenida en ésta es casi nula por tanto el área de contacto es reducida y no permite una miscibilidad factible del metanol para la extracción de los azúcares, por tal motivo no se realizó pretratamiento a temperaturas superiores, tampoco se hizo pretratamiento a temperaturas inferiores a 75 °C debido a que el porcentaje de humedad sería mayor, aunque se provocaría un buen esparcimiento del metanol sobre toda la biomasa, al ser tan grande la cantidad de agua la concentración de ácido y de metanol disminuyen en la mezcla, generando una menor miscibilidad entre el ácido, el agua y la biomasa, limitando la reacción de hidrólisis al igual que la extracción de azúcares. Zhou *et al.*, (2011) demostraron que variaciones en las

concentraciones de los reactivos pueden provocar cambios en la cantidad de azúcares liberados mejorando o empeorando el resultado de reacción y la extracción de éstos.

El porcentaje total de azúcares obtenidos en el pretratamiento (Figura 10) a 75°C con tiempo de secado de 24 h es del 21% y muestran que la glucosa presenta la mayor concentración con un 9,66%, seguida de la fructosa con una cantidad del 6,72% y el 4,62% restante se compone de carbohidratos fermentables tales como, arabinosa y xilosa. Esto se debe a que la pared celular del alga, está conformada en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y almidón, los cuales al degradarse generan glucosa; en el pretratamiento a 105 °C con tiempo de secado de 24 h el porcentaje total de azúcares obtenidos es de 15% en donde la glucosa presenta un 3,3%, fructosa un 6,3% y el 5. % restante se compone de carbohidratos fermentables tales como, arabinosa y xilosa. Trabajos como el de Zhou *et al.*, (2011) presentan un extracción de azúcares totales de 6,77% (glucosa: 4,40%; xilosa y arabinosa: 2,37%) en presencia de HCl.

Figura 10. Concentración de carbohidratos



5.4 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la biomasa debe contener una humedad del 8% para permitir una mayor liberación de azúcares.

Para el caso estudiado, a condiciones de 75 °C se obtuvo una mayor concentración de azúcares fermentables, tanto por el método organosolv como por la hidrólisis ácida, llegando a obtener hasta 0,17 g de azúcares/g de biomasa y 0,14 g de azúcares/g de biomasa para cada uno respectivamente.

La hidrólisis ácida presenta un mejor panorama para la disrupción celular de la *C. vulgaris* pues aunque su rendimiento es un poco inferior respecto al método Organosolv, las condiciones de reacción (25°C y 1 atm) requieren bajos consumos de energía.

6.SISTEMA DE EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN CARBOHIDRATOS

6.1 INTRODUCCIÓN

El problema fundamental que presenta la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal radica en la poca viabilidad económica de estos, debido al gran requerimiento energético en etapas como la cosecha (o concentración de la biomasa) en comparación con el bajo precio de venta de algunos de estos productos como el biodiesel o el bioetanol, por estas razones las líneas de investigación se centran hoy día en reducir dichos costos (García-Cuadra, 2012).

Una alternativa es el estudio de distintos metabolitos que posean alto valor agregado como: 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 (Serive, 2012). Actualmente la producción de metabolitos especialmente secundarios está creciendo significativamente (Serive, 2012), un ejemplo certero de ello son las proteínas, ya que el alga puede acumular entre 28 y 39% de su peso seco (Rebollo, Acien, Sanchez y Guil, 2000); por otro lado cabe resaltar que los carbohidratos son el mayor producto derivado de la fotosíntesis y el metabolismo de fijación de carbono (Ho *et al.*, 2011), los cuales son acumulados en los plástidos como material de reserva (almidón), o en la pared celular (celulosa, pectina y polisacáridos sulfatados) (Chen *et al.*, 2013), sin embargo el metabolismo tanto de la celulosa y el almidón varía significativamente entre géneros y especies (Rangel-Yaguí *et al.*, 2004; Rizmani-Yazdi *et al.*, 2011). Se ha comprobado que géneros como *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, y *Tetraselmis* poseen la capacidad de acumular gran cantidad de carbohidratos (> 40% de su peso seco) (John *et al.*, 2011); para el caso de *Chlorella vulgaris* se ha encontrado que puede contener entre 37% y 55% de

carbohidratos (Brennan y Owende, 2010; Dragone *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012; Illman *et al.*, 2000).

Uno de los principales problemas en el aprovechamiento de los diferentes metabolitos microalgales es la etapa de extracción (Serive *et al.*, 2012), debido a que los carbohidratos en biomasa de microalgas son esencialmente celulosa en la pared celular, almidón en los plástidos sin lignina y hemicelulosas de bajo contenido, que pueden ser fácilmente transformados en azúcares fermentables, sin embargo la disrupción de la pared celular representa el principal obstáculo a superar para la extracción efectiva de los diferentes metabolitos (Barsanti & Gualtieri, 2006; Sing, 2011); en el caso de *Chlorella* sp 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 (Sari *et al.*, 2013; Slocombe *et al.*, 2012).

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 (Harun y Danquah, 2011).

En la actualidad se encuentran numerosos trabajos sobre extracción de metabolitos con pretratamiento alcalino para otros tipos de biomasa (Harun y Danquah, 2011) sin embargo (Harun *et al.*, 2010) fue el primero en realizar este

tipo de extracción en biomasa de microalgas, con el fin de producir bioetanol, mas no para la obtención de proteínas.

Para la hidrólisis enzimática a pesar de los altos rendimientos obtenidos por Ho *et al.*, (2012) este no es un método viable debido a que estos valores no compensan lo caro que puede llegar a ser el tratamiento por el alto costo de las enzimas (Harun y Danquah, 2011; Daroch *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). El proceso de tratamiento ácido es preferible, ya que aporta una mayor eficiencia en la conversión de materiales celulósicos, las condiciones ácidas pueden conducir a la descomposición de los azúcares en compuestos no deseados que inhiben el proceso de fermentación (Girio *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010; Moxley & Zhang, 2007). Debido a esto durante este proceso influyen significativamente diversos parámetros en la cantidad total de azúcares fermentables tales como: el tiempo del proceso, la temperatura, la cantidad de sustrato y la concentración del ácido (Harun *et al.*, 2011a). A diferencia de los anteriores trabajos, Sui *et al.* (2012) realizaron la extracción de polisacáridos de una especie de *Chlorella* utilizando un tratamiento con una solución de clorito de sodio acidificada con ácido acético a una temperatura de 75 °C, relación biomasa/solvente de 1/80 ml/g durante 4 horas , encontrando que cantidades considerables de polisacáridos pueden ser extraídos después del tratamiento de las células (rendimiento de polisacárido recuperado, 19-22%), esto se debe a que el dióxido de cloro generado logra tanto la ruptura de la pared celular como la extracción de carbohidratos (Núñez y Pavlik, 1999). Sin embargo ya que los procesos de pretratamiento contribuyen significativamente en el costo, el pretratamiento seleccionado debe ser económicamente atractivo, simple de aplicar, energéticamente eficiente y tener un bajo potencial de degradación (Harun y Danquah, 2011), por lo cual el presente capítulo se enfoca en evaluar 3 solventes para la extracción de carbohidratos.

6.2 METODOLOGÍA

Para determinar la eficiencia de la relación biomasa/solvente en la extracción de carbohidratos se evaluaron 3 tipos de solventes: NaOH, clorito de sodio e hipoclorito de sodio.

6.2.1 Solución NaOH. Para determinar el efecto del NaOH en la extracción de carbohidratos se desarrolló un diseño de experimentos basado en composición central, no factorial 3^3 (Tabla 7), éste fue realizado para evaluar el efecto de la variables molaridad, relación solvente/biomasa y temperatura.

Para la extracción se tomó 1g de biomasa seca y mediante el diseño experimental se adicionó la solución alcalina y se trató térmicamente 20 minutos. La para recuperar el extracto la mezcla se centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos.

Transcurrido el tiempo la biomasa fue recuperada por centrifugación (3400 rpm, 15 minutos) y obteniendo así el primer extracto (licor 1).

A la biomasa recuperada de la primera extracción se adicionó un volumen igual de solución llevo a un segundo ciclo de extracción para obtener el segundo extracto (Licor 2).

Tabla 7. Diseño de experimentos para la extracción empleando NaOH

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	0,33	3,67	2	2	2	2	2
mL Solv/g Biomasa	15	45	15	45	30	15	45	15	45	30	30	30	4,9	55	30	30	30
Temp (°C)	25	85	85	25	55	85	25	25	85	55	55	55	55	55	4,8	105	55

6.2.2 Solución acidificada de clorito de sodio. Para la extracción se partió del método descrito por Sui *et al.* (2012), el cual consiste en adicionar 5 g de biomasa seca previamente macerada a un Erlenmeyer con 400 mL de solución de clorito de sodio (1 % p/v) levemente acidificada con 1 mL de ácido acético glacial. La mezcla se calentó durante 4 horas a 75 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, la biomasa se recuperó por filtración al vacío, obteniendo finalmente el extracto (licor). El licor obtenido se le realizó cuantificación de carbohidratos. Para determinar el efecto de las variables: relación biomasa/solvente, tiempo y temperatura se empleó un diseño compuesto central factorial 3^3 (Tabla 8)

Tabla 8. Diseño experimental extracción con clorito de sodio

Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
mL Solv/g Biomasa	40	40	120	120	80	40	40	120	120	80	13	146	80	80	80	80	80
Temp (°C)	50	90	50	90	70	50	90	50	90	70	70	70	36	104	40	70	70
Tiempo (h)	2	6	6	2	4	6	2	2	6	4	4	4	4	4	0.7	7	4

6.2.3 Solución acidificada de hipoclorito de sodio. Para la extracción de los carbohidratos se tomó 5 g de biomasa seca, y se mezcló con una solución acidificada de hipoclorito de sodio. Luego se procedió a colocar el recipiente de reacción en el baño de maría a determinadas condiciones de temperatura y tiempo dadas por un diseño compuesto central factorial 3^3 (Tabla 9), Para recuperar el extracto (licor), la muestra se centrifugó (3400 rpm, 15 minutos).

Tabla 9. Diseño Experimental extracción con hipoclorito de sodio

Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
mL Solv/g Biomasa	40	40	120	120	80	40	40	120	120	80	13	146	80	80	80	80	80
Temp (°C)	50	90	50	90	70	50	90	50	90	70	70	70	36	104	40	70	70
Tiempo (h)	2	6	6	2	4	6	2	2	6	4	4	4	4	4	0.7	7	4

6.2.4 Cuantificación de carbohidratos. Se empleó el método calorimétrico fenol-ácido sulfúrico. De cada uno de los extractos (Licor 1 y 2) se tomó 1 mL de muestra (previamente filtrada por carbón activado) y se adicionaron 0,5 mL de fenol al 5% y 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (95%), la mezcla se agitó y se dejó reposar durante 20 minutos; finalmente cada una de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro UV-VIS a diferentes longitudes de onda (480, 485, 487 y 490 nm) para identificar xilosa, glucosa, galactosa y fructuosa respectivamente.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Extracción con NaOH. De acuerdo a la interpretación del diagrama de Pareto de la Figura 11 (ver ANEXO B), es posible determinar que la variable más significativa es la temperatura, y en segunda instancia aunque no representativa es la interacción entre la molaridad y la relación solvente/biomasa; por otra parte de acuerdo con las gráficas de superficie de respuesta (Figura 12) las mayores concentraciones de carbohidratos (1,8 g/L o 8,1 % de la biomasa inicial) se logran empleando altos valores de molaridad, temperatura y relación solvente.

Figura 11. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos con NaOH.

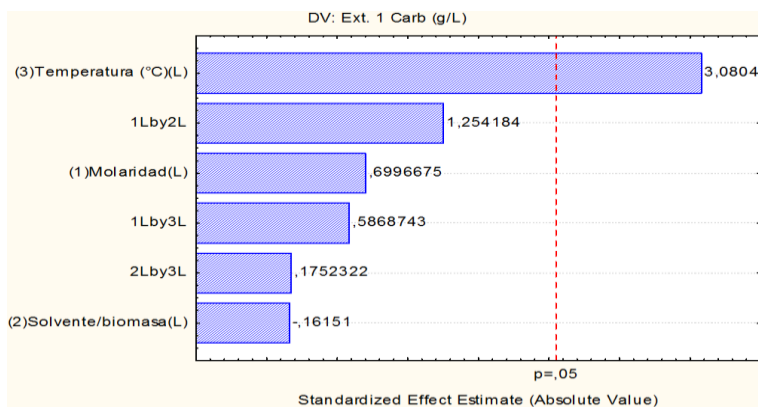
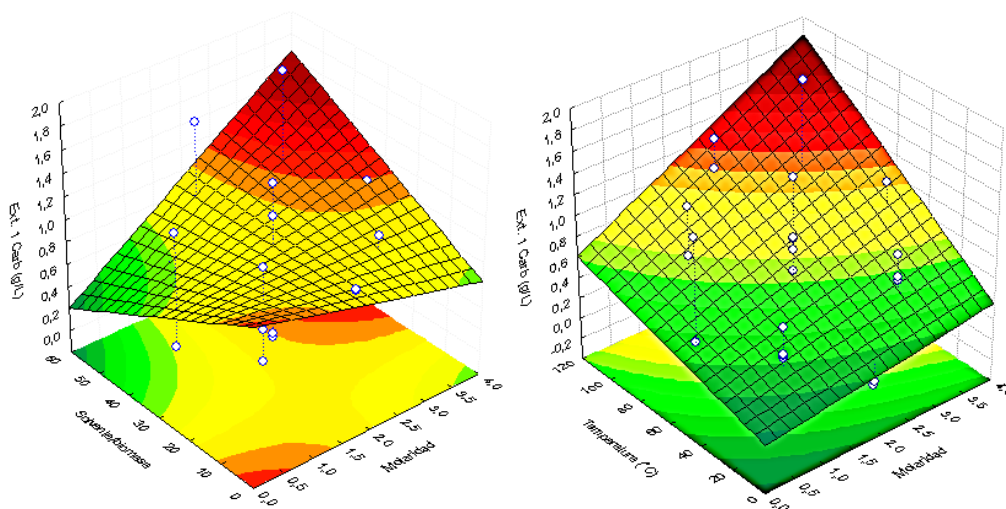


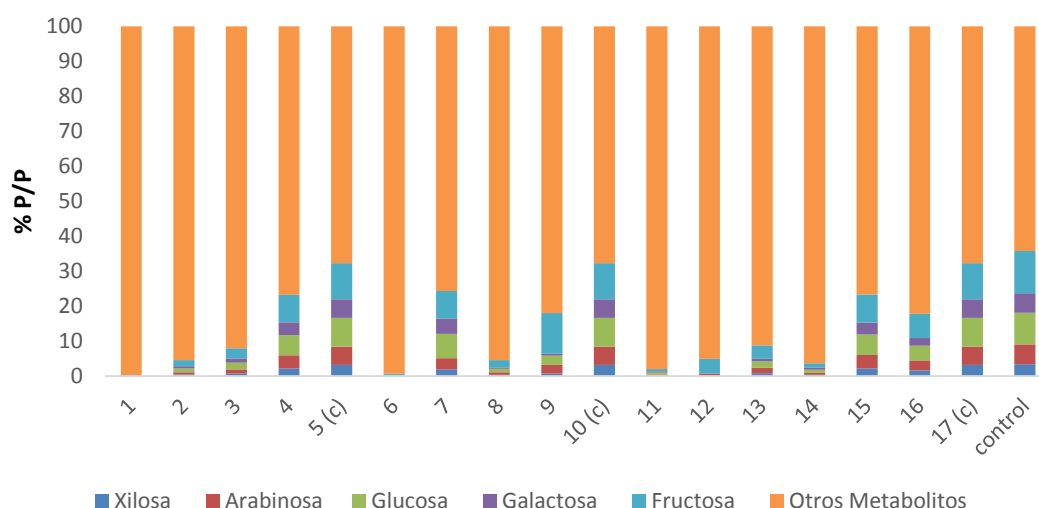
Figura 12. Superficies de respuesta para la extracción de carbohidratos empleando NaOH



6.3.2 Extracción empleando una solución acidificada de clorito de sodio. Al comparar los resultados obtenidos con el proceso propuesto por Sui *et al.* (2012)

(Figura 13) se aprecia que la mejor extracción de carbohidratos ocurre a una temperatura de 70°C, relación biomasa/solvente de 1:80 g/mL y 4 horas, obteniendo hasta 0,32 g carbohidratos/g biomasa y un rendimiento del 81%. La glucosa junto con la fructosa fueron los monosacáridos con mayor extracción en la biomasa, encontrando los mayores porcentajes de extracción entre 7-10% de la biomasa inicial. A diferencia de estos monosacáridos la xilosa presentó los más bajos porcentajes de extracción del grupo.

Figura 13. Porcentaje de monosacáridos extraídos en el tratamiento para cada experimento realizado.

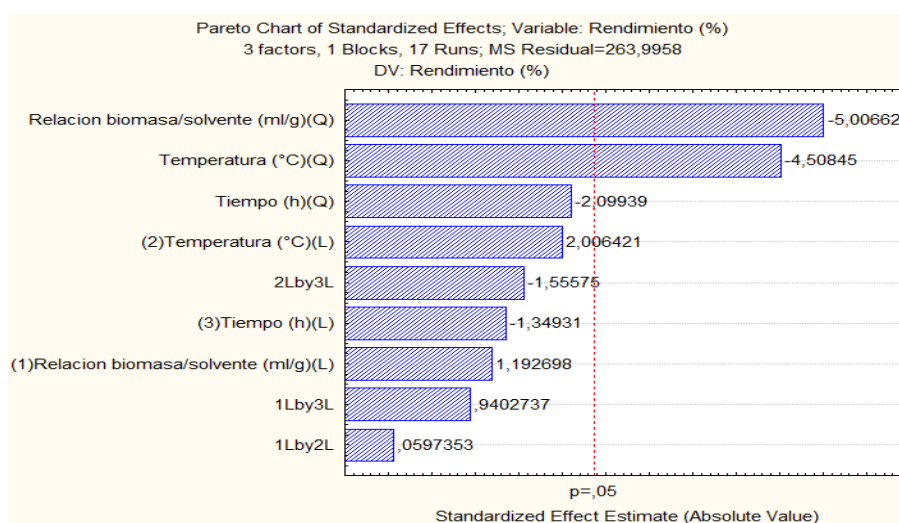


En el diagrama de Pareto presentado en la Figura 14 se observa la significancia de las variables y sus interacciones, sobre el rendimiento de los carbohidratos iniciales, teniendo en cuenta que los carbohidratos corresponden al 40% de la biomasa seca total (Ho *et al*, 2012). Los bloques que no pasan el umbral (línea roja punteada), refieren a los efectos no significativos, que para este diseño es el tiempo y las interacciones de las tres variables. El efecto más importante lo

causan la relación biomasa/solvente y la temperatura separadamente, produciendo una reducción en la extracción de carbohidratos.

En las superficies de respuesta se grafica el rendimiento del tratamiento como función de dos de las variables estudiadas manteniendo la otra constante en su punto medio. Los perfiles para valores predichos muestran el cambio de la variable respuesta “rendimiento” para las variaciones de cada una de las variables estudiadas.

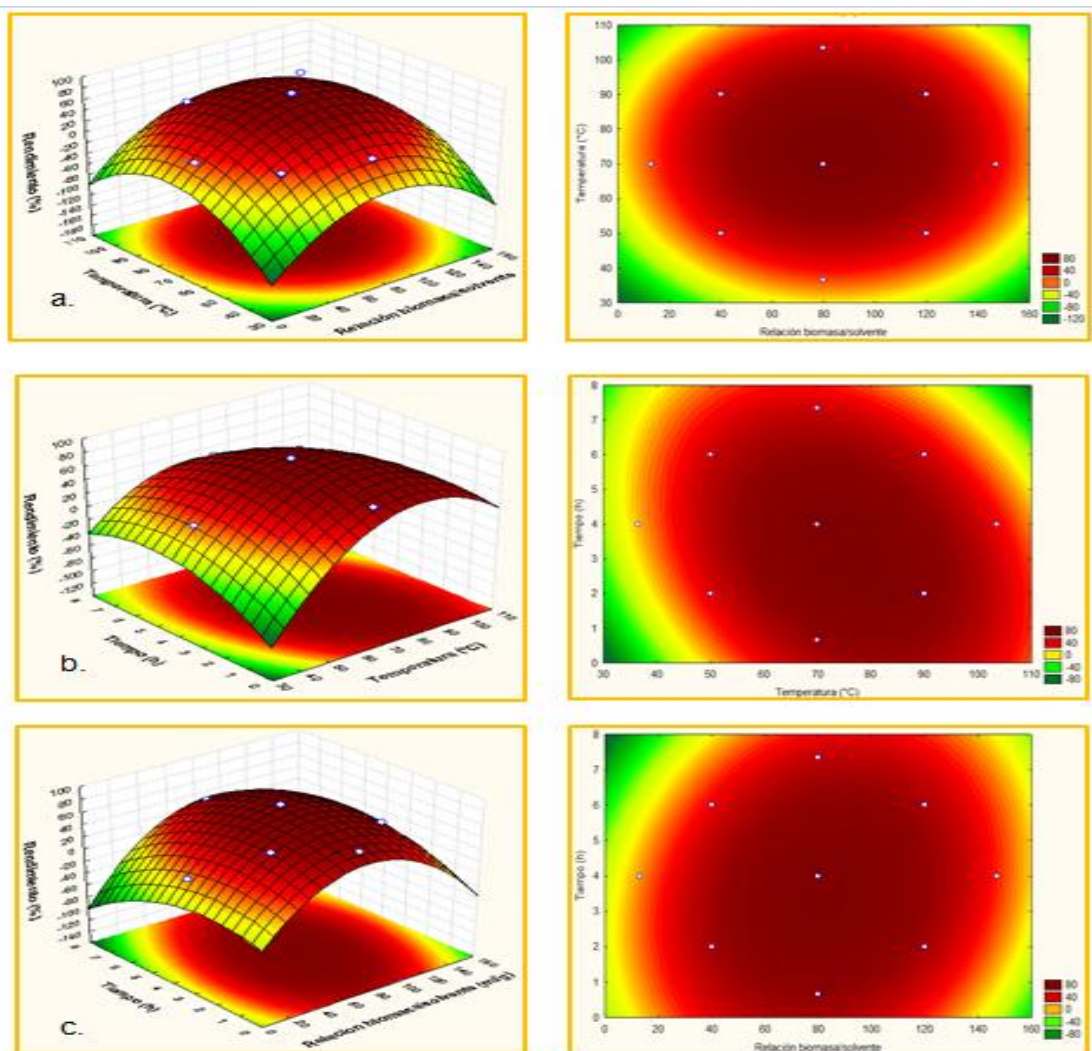
Figura 14. Diagrama de Pareto de los efectos estándares teniendo como variable de repuesta: rendimiento del tratamiento.



La Figura 15 muestra las superficies de respuestas de las variables de estudio. En la superficie de respuesta a tiempo constante se ve que el rendimiento de la extracción aumenta con la relación biomasa/solvente, llegando a un máximo que se encuentra aproximadamente en 1:80 g/mL y luego comienza a disminuir, un efecto similar se observa en la temperatura para un máximo cercano entre los 70-

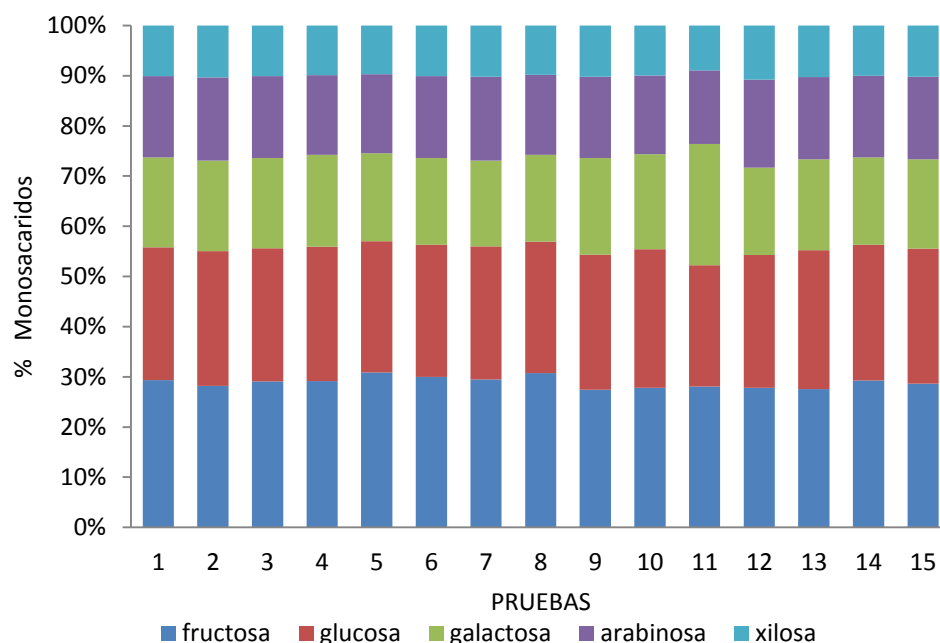
75 °C. Para la superficie de respuesta a relación biomasa/solvente constante se puede observar que tiene una forma cóncava hacia abajo, viendo nuevamente el máximo para la temperatura; con respecto al tiempo se puede ver que aparentemente para un tiempo entre 3-4 h el rendimiento es máximo. En la superficie de respuesta c. se observa que el máximo para la relación biomasa/solvente es el mismo mostrado en las gráficas anteriores.

Figura 15. Superficies de respuesta: Variables independientes a. Temperatura y 1/R; b. Tiempo y 1/R; c. Tiempo y Temperatura.



6.3.3 Solución acidificada de hipoclorito. En la Figura 16 se presentan los porcentajes de extracción de carbohidratos obtenidos, donde se observa que la mayor eficiencia de extracción se obtiene de la prueba número 9 a condiciones de temperatura de 70 °C, relación solvente/biomasa 80 mL/g con tiempo de duración 4 h con un 13,45 %, lo cual corresponde a un 0,2691 g de carbohidratos/g de biomasa. Los monosacáridos con mayor extracción en la biomasa son la fructosa y la glucosa con porcentajes de extracción entre 2,3-3,7% a diferencia de estos monosacáridos la xilosa presenta los más bajos porcentajes de extracción.

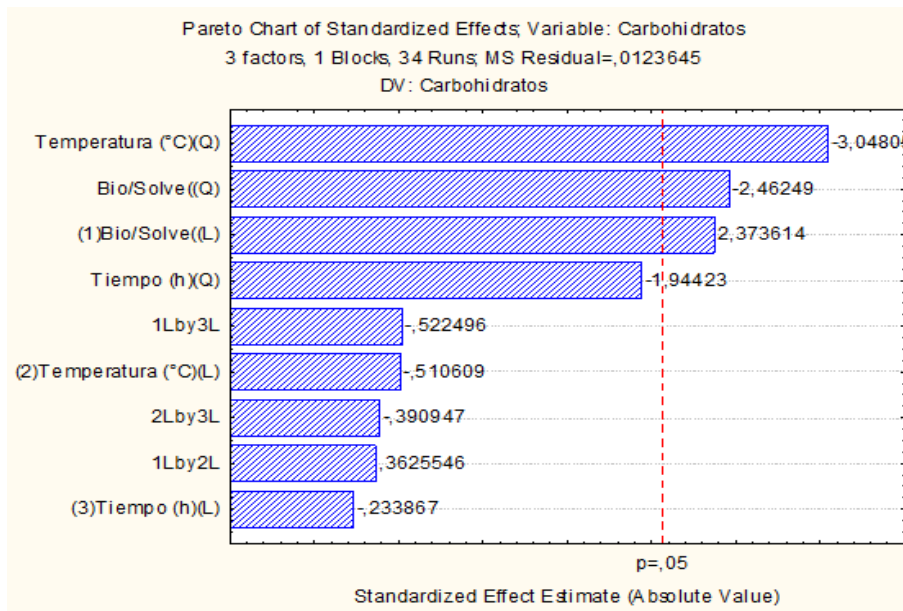
Figura 16. Porcentaje de monosacaridos extraidos en cada experimento



En la Figura 17 se muestra la prueba de Pareto en la cual las variables más significativas son aquellas que pasen el umbral (línea roja punteada), en este caso y de manera positiva es la temperatura y la relación biomasa/solvente, el tiempo pese a no ser significativa, puede representar variaciones importantes en la

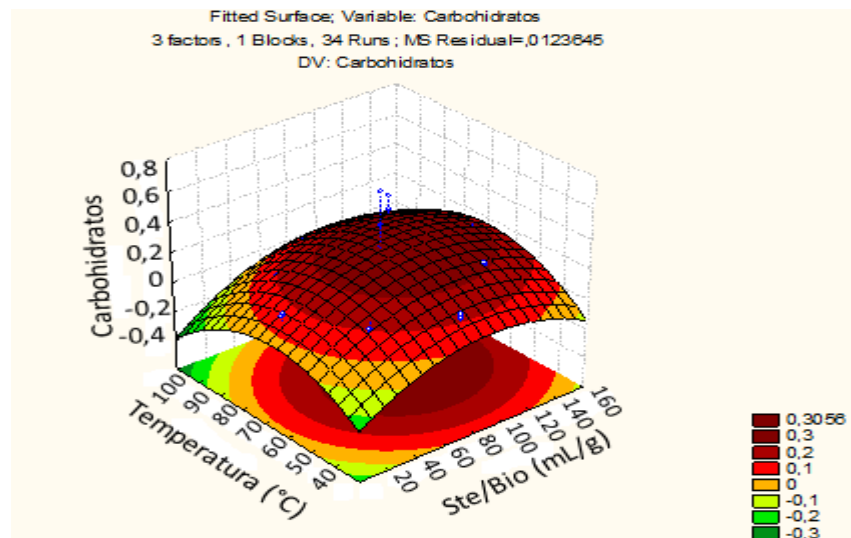
extracción al aumentar su valor. (Figura 17). Para ello, se visualizan las superficies de respuesta más representativas para obtener predicciones de las mejores condiciones de extracción de carbohidratos.

Figura 17. Diagrama de Pareto para la extracción de Carbohidratos Totales



La superficie de respuesta de la extracción (Figura 18) muestra que para un tiempo constante de 4h, la mayor extracción de carbohidratos se ve en un rango de temperatura entre 70-75 °C y relación biomasa/solvente entre 80-85 mL/g.

Figura18. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa (Eje Z) Vs Temperatura (Eje X), Tiempo= 4 h.



La Figura 19 muestra la superficie de respuesta a temperatura constante 70 °C, viendo nuevamente que la temperatura está en un rango de 70-75 °C y un tiempo entre 3,5-4 horas es donde se da la mayor extracción.

Figura19. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Solvente/biomasa (Eje Z) Vs Tiempo (Eje X), Temperatura= 70 °C

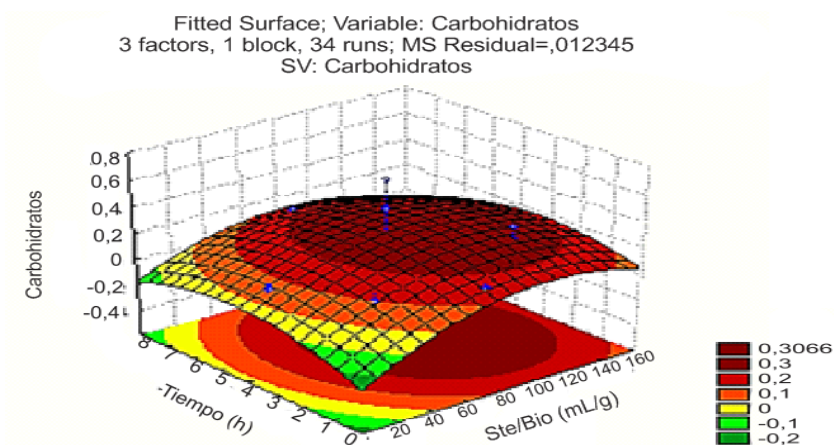
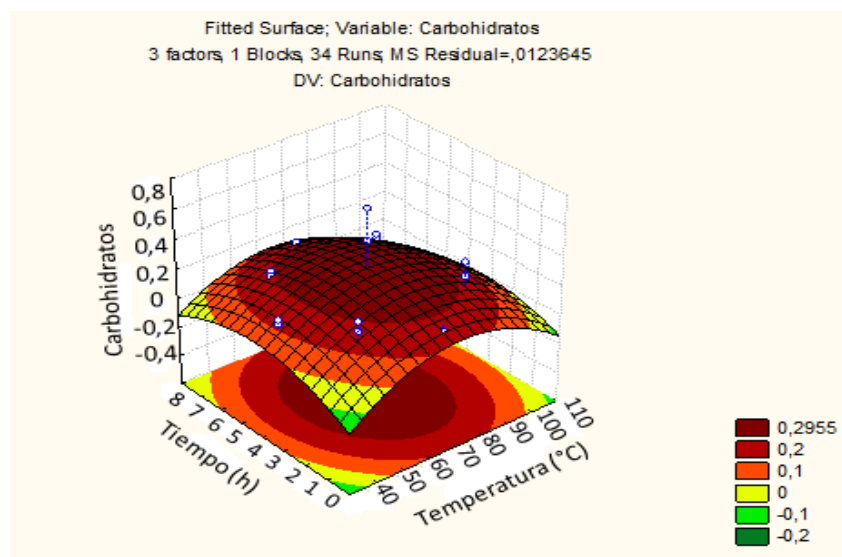


Figura 20. Superficie de respuesta para la extracción de carbohidratos, Temperatura (Eje Z) Vs Tiempo (Eje X), Solvente/biomasa = 80 mL/g.



El presente estudio revela que la extracción de carbohidratos empleando una solución acidificada de clorito de sodio es una técnica prometedora para la industria de bioetanol y biorefinería debido a los altos porcentajes de carbohidratos extraídos. La técnica consiste en tratar el material orgánico con solución de clorito de sodio a la que se le agrega ácido acético hasta pH alrededor de cuatro, para generar dióxido de cloro (Núñez y Pavlik, 1999). La efectividad de la solución acuosa de dióxido de cloro disminuye cuando el pH aumenta (US E.P.A., 1999). Las sustancias de naturaleza orgánica reaccionan con dióxido de cloro causando la interrupción de distintos procesos celulares. El dióxido de cloro es un agente oxidante que reacciona directamente con aminoácidos y el ARN de la célula, atacando la estructura celular o los ácidos en el interior de esta y evitando la formación de proteínas. El dióxido de cloro afecta la membrana celular cambiando las proteínas y grasas de la membrana e interfiriendo en la inhalación. Cuando el dióxido de cloro penetra en la pared celular se da paso a extracción de

carbohidratos, dando lugar a los buenos resultados obtenidos durante la extracción.

Si se analiza los experimentos y sus respectivos resultados de la extracción de carbohidratos se puede observar las variables más influentes en el tratamiento como lo son la temperatura y la relación biomasa solvente, afectando negativamente la obtención de azúcares fermentables. Los mejores resultados de la extracción ocurren a temperaturas entre 70-90 °C, cabe notar que el tiempo de exposición debe ser de 2-4 h, debido a que exponer la muestra por mucho tiempo a altas temperaturas puede llegar a degradar los azúcares fermentables.

El mayor porcentaje de rendimiento de los carbohidratos iniciales alcanzado fue de 81%, usando temperatura de 70 °C, tiempo de 4 h y relación biomasa/solvente de 1:80 g/ml, presentando diferencias significativas con los demás experimentos, mostrando así el efecto negativo de la temperatura y la relación biomasa/solvente. Al comparar el rendimiento máximo obtenido con respecto al método Sui *et al* (2012) donde el rendimiento máximo fue de 89% de los carbohidratos iniciales trabajando a 75 °C y a las mismas condiciones de relación biomasa/solvente y tiempo, se observa que una variación de 5 °C representa una diferencia mínima en el porcentaje de carbohidratos extraídos. Cabe notar que Sui *et al.*, (2012) realizan un fraccionamiento de los carbohidratos para la extracción de ellos.

Harun y Danquah, (2011) realizaron un tratamiento alcalino de la biomasa de microalgas de la especie *Chlorococcum infusionum*, variando las condiciones de temperatura, el tiempo de tratamiento y la concentración de NaOH, estos autores obtuvieron un rendimiento máximo de 35,01% de los carbohidratos iniciales, trabajando a 120 °C, 0,75% w/v de NaOH durante 30 minutos, siendo menos eficiente en la extracción de carbohidratos en comparación con el presente estudio.

Si ahora se compara con el estudio realizado por Harun y Danquah, (2011) donde emplea un tratamiento ácido obteniendo el mayor rendimiento (80%) a 140 °C durante 60 min, se puede observar que el presente trabajo representa menos gasto energético.

Otro trabajo con el cual se pueden generar comparaciones es el de Ho *et al.* (2012), en el cual utilizando la hidrólisis enzimática de *C. vulgaris* SP obtienen rendimientos cercanos a este estudio, alrededor del 80%. Sin embargo estos valores en el rendimiento no compensan lo costoso que puede llegar a ser la hidrólisis enzimática, es decir no permite obtener una buena relación rendimiento/costo de proceso en comparación con otros tratamientos (Harun y Danquah, 2011; Daroch *et al.*, 2013) debido a que algunas enzimas son muy caras y por lo tanto, el tratamiento enzimático no es un método viable (Zhao *et al.*, 2013). Al comparar los resultados obtenidos en el método con hipoclorito de sodio con el método clorito de sodio y solución NaOH, se observa que para el clorito de sodio la mejor extracción de carbohidratos ocurre a una temperatura de 70 °C, relación solvente/biomasa de 80 mL/g durante 4 horas, obteniendo hasta 1,6109 g de carbohidratos/g de biomasa y eficiencia del 80,5%, la glucosa junto con la fructosa fueron los monosacáridos con mayor extracción en la biomasa, encontrando los mayores porcentajes de extracción entre 7-10% de la biomasa inicial. El tratamiento alcalino (solución con NaOH) muestra resultados de un porcentaje de extracción de carbohidratos correspondientes al 95 % realizado en dos extracciones, las condiciones de operación son: temperatura 55 °C, Molaridad 3,673, relación biomasa/solvente 30 ml/ g.

6.4 CONCLUSIONES

- El método de extracción a partir NaOH (85°C, 3M y 45 mL/g de relación solvente/biomasa) permite la obtención del 65% de carbohidratos totales
- Para el método con Clorito de sodio acidificado se pudo determinar que un aumento de la relación biomasa solvente y de la temperatura afecta negativamente la extracción de los carbohidratos.
- Con uso de una solución acidificada de hipoclorito de sodio se observa que la mayor eficiencia de extracción se obtiene de la prueba número 9 a condiciones de temperatura de 70 °C, relacion solvente/biomasa 80 mL/g con tiempo de duracion 4 h con un 13,45 %, lo cual corresponde a un 0,2691 g de carbohidratos/g de biomasa

7. 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

7.1 INTRODUCCIÓN

La amplia gama de subproductos a partir de microalgas hace que sea una materia prima promisoría para el desarrollo de procesos para el aprovechamiento integral de la biomasa o procesos de biorefinación con miras a la obtención de productos químicos industriales (Haveren et al., 2008). Tanto la investigación como el desarrollo, la demostración y la comercialización están obligados a hacer de las biorefinerías a gran escala una realidad.

La composición y el metabolismo de carbohidratos en la biomasa microalgal (principalmente almidón y celulosa) pueden diferir significativamente de especie a especie (Rangel-Yagui et al., 2004; Rismani-Yazdi et al., 2011). Por lo tanto, es de gran importancia seleccionar microalgas con alta productividad de carbohidratos así como la composición de azúcar adecuado para biocombustibles o de productos químicos con alto valor agregado como polímeros. 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 como una fuente de azúcar (Wargacki et al., 2012).

Para mejorar la viabilidad económica de la utilización de los carbohidratos de algas para la producción de biocombustibles, la productividad es el parámetro clave; desafortunadamente la acumulación masiva de este metabolito ocurre cuando las células se exponen a factores de estrés (por lo general la limitación de nutrientes), lo cual conlleva a un crecimiento celular pobre (o menor

productividad). Por lo tanto, la forma de mejorar el contenido de carbohidratos sin comprometer la tasa de crecimiento es crucial, esto se puede mejorar mediante el uso de diversas estrategias de cultivo tales como cambios en la concentración de luz (Suknik, 1991), reducción en la fuente de nitrógeno (D'Souza & Kelly 2000), variación de temperatura (De Oliveira et al., 1999), cambio de pH (Khalil et al., 2010), y modificación en la suplementación de CO₂ (Araujo and Garcia,2005).

Durante los últimos años el grupo de Investigación CIDES se ha enfocado en el desarrollo de procesos de extracción de diferentes metabolitos como carbohidratos, proteínas y lípidos. Dentro de los principales resultados se resalta que: para el proceso empleando soluciones 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 3 M, temperatura de reacción 85 °C y relación solvente/biomasa 45 mL/g. Además se encontró que al aumentar la cantidad de biomasa a ser sometida a extracción se presentan problemas en la homogenización de la solución y la uniformidad de la temperatura en todo el volumen, lo cual conlleva a reducciones considerables en la eficiencia final de extracción. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo consiste en la evaluación del 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).

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 Extracción de carbohidratos y proteínas. Con la intención de determinar el efecto del escalamiento del proceso de extracción se evaluaron diferentes concentraciones de biomasa manteniendo la relación entre la biomasa a extraer y el volumen de solvente (Tabla 10); para esto una concentración de biomasa determinada fue mezclada con un volumen específico de solución 3,67 M de NaOH. La mezcla se trató térmicamente a 55 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo la biomasa fue recuperada por centrifugación (3400 rpm, 15 minutos) y obteniendo así el primer extracto (licor 1).

A la biomasa recuperada de la primera extracción se adicionaron 0,23 mL de solución 3 M de NaOH y fue tratada térmicamente a 85 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo la biomasa fue recuperada por centrifugación (3400 rpm, 15 minutos) y obteniendo así el segundo extracto (licor 2).

Tabla 10. 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

7.2.2 Cuantificación de carbohidratos. Se empleó el método calorimétrico fenol-ácido sulfúrico. De cada uno de los extractos (Licor 1 y 2) se tomó 1 mL de

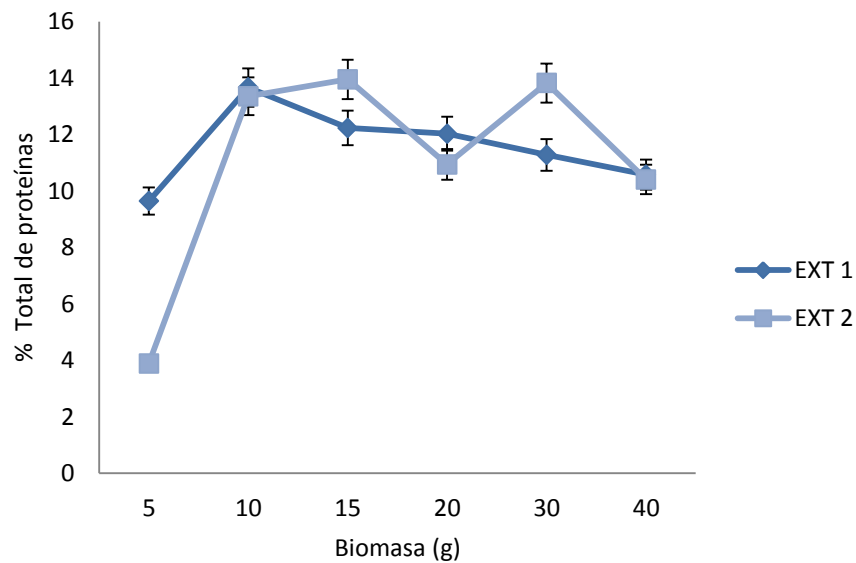
muestra (previamente filtrada por carbón activado) y se adicionaron 0,5 mL de fenol al 5 % y 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 %), la mezcla se agitó y se dejó reposar durante 20 minutos; finalmente cada una de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro UV-VIS a diferentes longitudes de onda (480, 485, 487 y 490 nm) para identificar xilosa, glucosa, galactosa y fructuosa respectivamente.

7.2.3 Cuantificación de proteínas. Se empleó el método de Lowry (Borowitzka & Moheimani 2013). 1mL de licor y se mezclan con 1,4 mL de solución Biuret (A-B-C), después de 20 minutos se adicionan 0,2 mL de reactivo de Folin–Ciocalteu mientras se agita en un vortex a velocidad media. Finalmente cada una de las muestras fue medida en un espectrofotómetro UV-VIS a 750 nm.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

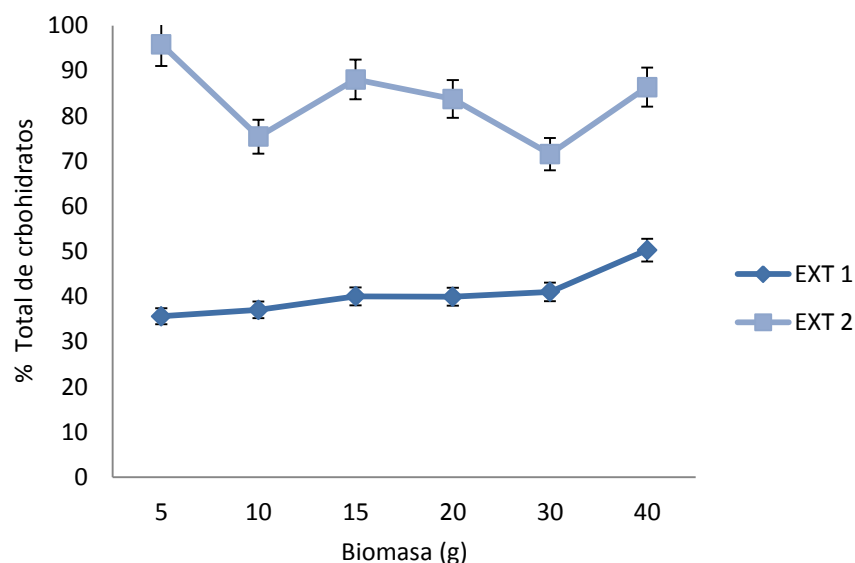
7.3.1 Cantidad de proteínas y carbohidratos. Según Los resultados obtenidos para la extracción de proteínas (Figura 21) el mayor valor de extracción de proteínas (>13% p/p) se obtiene empleando 10 g de biomasa y 300 mL 3,67M de NaOH, sin embargo al aumentar la cantidad de biomasa la concentración de proteínas extraídas decae hasta alcanzar valores cercanos al 12%; por otra parte para la segunda extracción, el mayor porcentaje se encuentra al emplear 15 g de biomasa y 680 mL 3 M de NaOH; sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos para la primera extracción la concentración de proteínas recuperada no se reduce de forma pronunciada (Excepto en los experimentos con 20 y 40 g de biomasa), estos resultados se pueden deber a diferencias en la estructura celular de la biomasa debido al proceso de secado y preparación de la biomasa previa a la extracción.

Figura 21. Porcentaje de proteínas extraídas



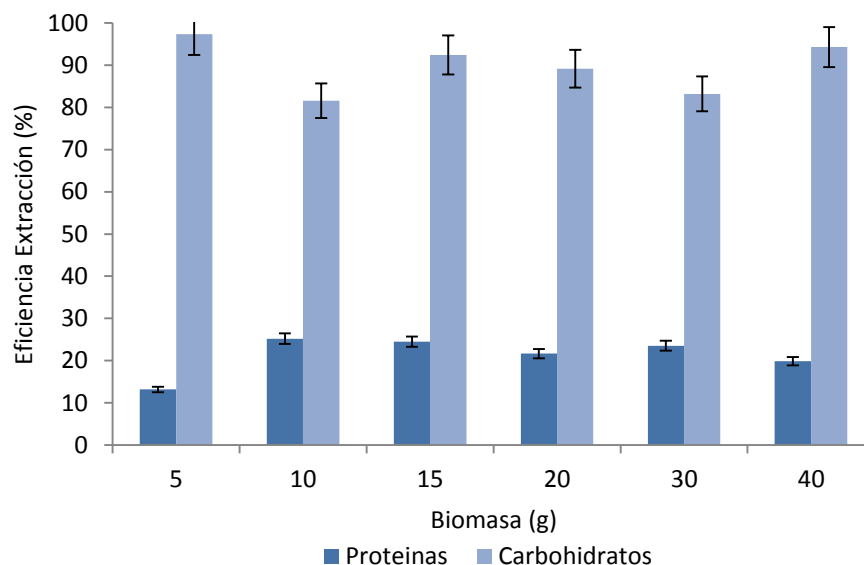
En la Figura 22 se presentan los resultados para la cantidad de carbohidratos donde los mayores valores se obtienen en la primera etapa (entre 70 y 95%); sin embargo, en la segunda etapa encontramos el mayor porcentaje se obtiene al emplear la mayor cantidad de biomasa (40 g), estos resultados permiten inferir que, para obtener la mayor cantidad posible de carbohidratos es necesario desarrollar 1 proceso previo de extracción para debilitar la pared celular y otras ultra estructuras en las cuales se encuentran concentradas las mayores cantidades de carbohidratos como los gránulos pirenoides.

Figura 22. Porcentaje de carbohidratos extraídos.



En la Figura 23 se muestra la eficiencia total de extracción de carbohidratos y proteínas, siendo los carbohidratos el metabolito que se extrae más eficientemente (>80%); por otro lado, la baja eficiencia en la extracción de proteínas puede ser debido a que estas se degradan rápidamente por efectos de temperaturas altas, 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 *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.

Figura 23. Eficiencia extracción carbohidratos y proteínas.



7.4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten demostrar que al emplear un sistema de extracción alcalina (NaOH) de dos etapas es posible obtener hasta el 95% de los carbohidratos totales presentes en la biomasa.

Finalmente se demostró que el aumento en la cantidad de biomasa a ser extraída no representa una limitante, ya que los valores de eficiencia para las diferentes cantidades de biomasa evaluadas (tanto de proteínas como carbohidratos) no presentan diferencias.

8. CONCLUSIONES GENERALES

- Se concluye que las vinazas representan un buen medio de cultivo teniendo en cuenta que la mayor producción (13,2 g/L) y productividad (0,73 g/L*d) se obtuvo con el tratamiento C2 (2000 mL de vinazas y 2 g de inóculo en base húmeda), por otro lado la menor producción (10,5 g/L) y productividad (0,58 g/L*d) se alcanzó en el tratamiento C1
- Para el pretratamiento térmico se identificó que según los resultados obtenidos, la biomasa debe contener una humedad del 8% para permitir una mayor liberación de azúcares. Para el caso estudiado, a condiciones de 75 °C se obtuvo una mayor concentración de azúcares fermentables, tanto por el método organosolv como por la hidrólisis ácida, llegando a obtener hasta 0,17 g de azúcares/g de biomasa y 0,14 g de azúcares/g de biomasa para cada uno respectivamente.
- El método de extracción a partir NaOH (85°C, 3M y 45 mL/g de relación solvente/biomasa) permite la obtención del 65% de carbohidratos totales
- El proceso de extracción llevado hasta 40 g de biomasa inicial mantiene una continuidad en la cantidad de carbohidratos y proteínas extraídas, sin el uso de agentes extra como el aumento de temperatura o agitadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALCÁNTARA, C., GARCÍA-ENCINA, P. A., & MUÑOZ, R. (2013). Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae growth-anaerobic digestion process. *Chemical Engineering Journal*, 221, 238-246.
2. ALVAREZ COBELAS, M., ZARCO LECHADO, J. (1989). Lipids in Microalgae. A review I. Biochemistry. *Grasas y Aceites*. Vol.40, fasc. 2: 118-145.
3. AN, J. Y., Sim, S. J., LEE, J. S., & KIM, B. W. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 185-191.
4. ANSARI, F. A., SHRIWASTAV, A., GUPTA, S. K., RAWAT, I., GULDHE, A., & Bux, F. (2015). Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: A step closer to the biorefinery. *Bioresource technology*, 179, 559-564.
5. ARAUJO, S.D., GARCIA, V.M.T. (2005). 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.
6. ASLAN, S., & KAPDAN, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70.

7. AYALA J, F., & BRAVO B, R. (1984). Animal wastes media for Spirulina production. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 349-355.
8. BARSANTI, L., & GUALTIERI, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
9. BECKER, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
10. BENEMANN, J. R. (1997). CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy conversion and management*, 38,
11. S475-S479
12. BOROWITZKA, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3-15.
13. BRENNAN, L., & OWENDE, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577
14. BUMBAK, F., COOK, S., ZACHLEDER, V., HAUSER, S., & KOVAR, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 31-46.

15. CASTRO, L., & PARRA, J. (2011) Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala laboratorio (Proyecto de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
16. CHEN F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14(11):421–426
17. CHEN, C. Y., ZHAO, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., CHENG, C. L., LEE, D. J., ... & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
18. CHISTI, Y. (2006). Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 5(3).
19. CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
20. COSTA, R., MEDRI, W., & PERDOMO, C. (2000). High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Science & Technology*, 42(10), 357-362.
21. D'SOUZA, F.M.L., Kelly, G.J. (2000). 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.

- 22.DAROCH, M., GENG, S., & WANG, G. (2013). Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 102, 1371-1381.
- 23.DE OLIVEIRA, M.A.C.L., MONTEIRO, M.P.C., ROBBS, P.G., LEITE, S.G.F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures, *Aquaculture. Int.* 7:261–275.
- 24.DEMAIN, A.L. (2009) Biosolutions to the energy problema. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:319–332.
- 25.DEMIRBAS, M. F. (2009). Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review.*Applied Energy*, 86, S151-S161.
- 26.DOREY, C. R., & DRAVES, J. A. (1998). Quantitative analysis laboratory: a new approach. *Laboratory manual. Department of Chemistry, University of Central Arkansas, Conway, AR.*
- 27.DOUCHA, J., & LÍVANSKÝ, K. (2006). Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811-826.
- 28.DRAGONE, G., FERNANDES, B. D., ABREU, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88(10), 3331-3335

- 29.D'SOUZA, F. M., & Kelly, G. J. (2000). 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(3), 311-329.
- 30.DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P., & SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- 31.DUNSTAN, G. A., VOLKMAN, J. K., BARRETT, S. M., & GARLAND, C. D. (1993). Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(1), 71-83.
- 32.FABREGAS, J., ABALDE, J., & HERRERO, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, 83(3), 289-304.
- 33.FILHO, J., Gloria, N.A., Orlando, N.A. (1983).Aplicacao da vinhaça como fertilizante. Boletín Técnico PLANALSUCAR (Brasil) v.5 no.1, p.5-38.
- 34.FU, C. C., Hung, T. C., CHEN, J. Y., Su, C. H., & Wu, W. T. (2010). Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, 101(22), 8750-8754.

35. GARCIA, J., Mujeriego, R., & HERNANDEZ-MARINE, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 331-339.
36. GARCÍA-CUADRA, F., JAWIARCZYK, N., GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V., Fernández-Sevilla, J. M., & Acién, F. G. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(2), 147.
37. GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
38. GONZÁLEZ, A. (2010). Protocolos de extracción de aceite de microalgas de bioprospección nacional. Proyecto “bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710. Centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía.
39. GONZÁLEZ-DELGADO, Á. D., & KAFAROV, V. (2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4(4), 5-22.
40. GUO, H., DAROCH, M., LIU, L., QIU, G., GENG, S., & Wang, G. (2013). Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. *Bioresource technology*, 127, 422-428.

41. Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology advances*, 30(3), 709-732.

42. HARUN, R., DANQUAH, M. K., & FORDE, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(2), 199-203.

43. HARUN, R., Jason, W. S. Y., CHERRINGTON, T., & DANQUAH, M. K. (2011). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, 88(10), 3464-3467.

44. HAVEREN, J.V., Scott, E.L, SANDERS, J. (2008). Bulk chemical from biomass. *Biofuels Bioprod Biorefin*; 2(1), 41-57.

45. HAVEREN, J.V., SCOTT, E.L, SANDERS, J. (2008). Bulk chemical from biomass. *Biofuels Bioprod Biorefin*; 2(1), 41-57.

46. HEREDIA-ARROYO, T., Wei, W., RUAN, R., & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 2245-2253.

47. HO, S. H., CHEN, C. Y., & CHANG, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology*, 113, 244-252.

48. ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., & SHALES, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, 27(8), 631-635.
49. JEREZ-MOGOLLÓN, S. J., RUEDA-QUIÑONEZ, L. V., ALFONSO-VELAZCO, L. Y., BARAJAS-SOLANO, A. F., BARAJAS-FERREIRA, C., & KAFAROV, V. (2012). Improvement of lab-scale production of microalgal carbohydrates for biofuel production. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(1), 103-116.
50. JIMENEZ-PEREZ, M.V., SANCHEZ-CASTILLO, P., ROMERA, O., FERNANDEZ-MORENO, D., PEREZ-MARTINEZ, C. (2004) Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 392–398.
51. JOHN, R. P., ANISHA, G. S., NAMPOOTHIRI, K. M., & PANDEY, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1), 186-193.
52. JU, Z. Y., DENG, D. F., & DOMINY, W. (2012). 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*, 354, 50-55.
53. KALAVATHI, D. F., UMA, L., & SUBRAMANIAN, G. (2001). Degradation and metabolization of the pigment—melanoidin in distillery effluent by the marine

- cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4), 246-251
54. KANG, C. D., An, J. Y., PARK, T. H., & SIM, S. J. (2006). Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical engineering journal*, 31(3), 234-238.
55. KHALIL, Z.I., ASKER, M.M., EL-SAYED, S., KOBBA, I.A. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J Microbiol Biotechnol*. 26(7):1225-31.
56. KIM, J., YOO, G., LEE, H., LIM, J., KIM, K., KIM, C. W., ... & Yang, J. W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 31(6), 862-876.
57. LEE, S., OH, Y., KIM, D., KWON, D., LEE, C., & LEE, J. (2011). Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 878-888.
58. LIU, J., HUANG, J., JIANG, Y., & CHEN, F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource technology*, 107, 393-398.
59. LUNDQUIST, T. J., WOERTZ, I. C., QUINN, N. W. T., & BENEMANN, J. R. (2010). A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. *Energy Biosciences Institute*, 1.

60. MAGOTA, A., SAGA, K., OKADA, S., ATOBE, S., & IMOU, K. (2012). Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource technology*, 123, 195-198.
61. MAYNARD, H.E., OUKI, S.K. and WILLIAMS, S.C., (1999). Tertiary lagoons: A review of removal mechanisms and performance. *Wat. Res*, 33,1–13.
62. MIAO, X., & WU, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology*, 97(6), 841-846.
63. MIRANDA, J. R., PASSARINHO, P. C., & GOUVEIA, L. (2012). Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, 104, 342-348.
64. MONTAIGNE, F., & ESSICK, P. (2002). Water pressure. *National Geographic*, 202(3), 2-33.
65. MOXLEY, G., & ZHANG, Y. H. P. (2007). More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. *Energy & Fuels*, 21(6), 3684-3688.
66. NÚÑEZ, C. E., & PAVLIK, C. A. (1999). Disgregado de tejidos leñosos por el método clorito-ácido acético-carbonato. Evaluación del daño producido a las fibras. *Rev. Cienc. Tecnol*, 2(2), 33-37.

67. OLGUÍN, E. J. (2012). Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology advances*, 30(5), 1031-1046.
68. OLGUÍN, E. J., GALICIA, S., MERCADO, G., & Pérez, T. (2003). Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 249-257.
69. OLGUIN, E.J., GALICIA, S., ANGULO-GUERRERO, O., HERNANDEZ, E. (2001) The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp* (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresour. Technol.* 77: 19–24.
70. PARK, J. B. K., CRAGGS, R. J., & SHILTON, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35-42.
71. PATEL, A., PAWAR, R., MISHRA, S., & TEWARI, A. (2001). Exploitation of marine cyanobacterial for removal of colour from distillery effluent. *Indian Journal of Environmental Protection*, 21(12), 1118-1121.
72. PATHAK, H., JOSHI, H. C., CHAUDHARY, A., CHAUDHARY, R., KALRA, N., & DWIWEDI, M. K. (1999). Soil amendment with distillery effluent for wheat and rice cultivation. *Water, air, and soil pollution*, 113(1-4), 133-140.

73. PAVLOU, A.K., REICHERT, J.M. (2004). Recombinant protein therapeutics-- success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol.* 22(12):1513-9.
74. PERERA, J. (2009). Concentración y combustión de vinazas. *Ministerio de Gobierno y Justicia de la Provincia de Tucumán, Secretaría de Estado de Gobierno y Justicia, Subsecretaria de Asuntos Técnicos*.[\[Links\]](#).
75. PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M., De-BASHAN, L. E., & BASHAN, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
76. PORRAS. T., PRADA. C., (2012). Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 (proyecto de grado). Universidad Industrial de Santander
77. RANGEL-YAGUI, Cde O., DANESI, E.D., de CARVALHO, J.C., SATO, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour Technol.* 92(2):133-41.
78. RASHID, N., REHMAN, M. S. U., & HAN, J. I. (2013). Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels. *Biochemical Engineering Journal*, 75, 101-107.
79. RAWAT, I., RANJITH KUMAR, R., MUTANDA, T., BUX, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl Ener.* 103: 444–467.

80. REBOLLOSO Fuentes, M., Acien FERNANDEZ, G., SANCHEZ PEREZ, J., & Guil Guerrero, J. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*(70), 345-353
81. RISMANI-YAZDI, H., HAZNEDAROGLU, B. Z., BIBBY, K., & PECCIA, J. (2011). Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC genomics*, 12(1), 148.
82. RISMANI-YAZDI, H., HAZNEDAROGLU, B.Z., Bibby, K., PECCIA, J. (2011). Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway.
83. SARI, Y. W., BRUINS, M. E., & SANDERS, J. P. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83
84. SCHWENZFEIER, A., WIERENGA, P., & GRUPPEN, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*(102), 9121–9127.
85. SERIVE, B., KAAS, R., BÉRARD, J. B., PASQUET, V., Picot, L., & CADORET, J. P. (2012). Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 124, 311-320.
86. SING, S. F., ISDEPSKY, A., BOROWITZKA, M. A., & MOHEIMANI, N. R. (2013). Production of biofuels from microalgae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 47-72.

87. SINGH, N. K., & PATEL, D. B. (2012). Microalgae for bioremediation of distillery effluent. In *Farming for food and water security* (pp. 83-109). Springer Netherlands.
88. SINGH, N.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.
89. SLOCOMBE, S. P., ROSS, M., THOMAS, N., MCNEILL, S., & STANLEY, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource technology*, 129, 51-57.
90. SUBHADRA, B. G. (2010). Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*, 38(10), 5892-5901.
91. SUI, Z., GIZAW, Y., & BEMILLER, J. N. (2012). Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*. *Carbohydrate polymers*, 90(1), 1-7.
92. SUKENIK, A. (1991). Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp (Eustigmatophyceae), *Bioresour. Technol.* 35, 263–269.
93. SUN, Y., & CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

94. SZCZODRAK, J. (1988). The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Biotechnology and bioengineering*, 32(6), 771-776.
95. TRAVIESO, L., BENITEZ, F., SANCHEZ, E., BORJA, R., LEON, M., RAPOSO, F., & RINCON, B. (2008). Performance of a laboratory-scale microalgae pond for secondary treatment of distillery wastewaters. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(4), 467-473.
96. TRAVIESO, L., CANIZARES, R. O., BORJA, R., BENITEZ, F., DOMINGUEZ, A. R., DUPEYRÓN y, R., & Valiente, V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 62(2), 144-151.
97. U.S. EPA, 1999. Search in Ecotoxicology Database System (U.S. EPA MED-Duluth) Disponible en: [http://www.epa.gov/medecotx/ecotox home.htm](http://www.epa.gov/medecotx/ecotox%20home.htm).
98. UĞURLU, M., & KULA, İ. (2007). Decolourization and removal of some organic compounds from olive mill wastewater by advanced oxidation processes and lime treatment. *Environmental Science and Pollution Research-International*, 14(5), 319-325.
99. VALDERRAMA, L. T., DEL CAMPO, C. M., RODRIGUEZ, C. M., de-BASHAN, L. E., & BASHAN, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, 36(17), 4185-4192.

100. WARGACKI, A.J., LEONARD, E., Win, M.N., REGITSKY, D.D., SANTOS, C.N.S., Kim, P.B., COOPER, S.R., RAISNER, R.M., HERMAN, A.M., SIVITZ, A.B., LAKSHMANASWAMY, A., KASHIYAMA, Y., BAKER, D., YOSHIKUNI, Y. (2012). An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. *Science*, 335 (6066), 308-313.
101. WU, L. F., CHEN, P. C., HUANG, A. P., & LEE, C. M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource technology*, 113, 14-18.
102. ZHAO, G., CHEN, X., WANG, L., ZHOU, S., FENG, H., CHEN, W. N., & LAU, R. (2013). Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. *Bioresource technology*, 128, 337-344.
103. ZHOU, N., ZHANG, Y., Wu, X., GONG, X., & WANG, Q. (2011). Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. *Bioresource technology*, 102(21), 10158-10161.

ANEXOS

Anexo A. PRINCIPALES PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN

Durante la realización de la tesis se resaltan los siguientes productos:

Un artículo publicado en revistas indexadas ante COLCIENCIAS

Garcia-Martinez B., Ayala-Torres E., Reyes-Gomez O., Zuorro A., Barajas-Solano A., Barajas-Ferreira C. (2016). Evaluation of a two-step extraction system of carbohydrates and proteins from *chlorella vulgaris*. Chemical Engineering Transactions, *Paper to be published*.

Seis (6) Ponencias nacionales e internacionales

Seminario Internacional Del Medio Ambiente Y Desarrollo Sostenible (SIMADS 2013)

Estudio del efecto de las vinazas en la composición de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para la producción de biocombustibles y productos de valor agregado. -Janet Bibiana García-Martínez, Omar Alfredo Ríos Cárdenas, Andrés Fernando Barajas-Solano, Vyatcheslav Kafarov y Crisóstomo Barajas-Ferreira.

Efecto del pretratamiento térmico de biomasa de *Chlorella vulgaris* para la obtención de azúcares fermentables Janet Bibiana García-Martínez, Javier Enrique Sánchez, Víctor Hugo Velasco, Andrés Fernando Barajas-Solano, Vyatcheslav Kafarov, Crisóstomo Barajas- Ferreira.

Diseño de un sistema de dos etapas para la extracción de proteínas y carbohidratos de microalgas Janet Bibiana García-Martínez, Didier Aleisso

Gutierrez, Cristian Camilo Marmolejo, Andres Fernando Barajas-Barajas, Vyatcheslav Kafarov, Crisóstomo Barajas-Ferreira.

II Congreso Internacional de Energía Sostenible-CES 2014.

Bajo el concepto de biorefinería: Extracción de carbohidratos producidos a partir de biomasa microalgal usando como medio de cultivo vinazas, residuos de la producción de etanol, mediante el uso de una solución acidificada de hipoclorito de sodio (NaClO). **Janet Bibiana García-Martínez**, Omar Avila, Lorena Varquel, Andres Barajas, Crisóstomo Barajas.

VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Biocombustibles CIBSCOL 2014

Contribución del alcohol de tercera generación a una biorefinería. Ana Celia de Armas Martinez, Viviana Quintero Dallos, Janet Bibiana García-Martínez Viatcheslav V. Kafarov, Yaillet Albornas Carvajal, Erenio González Suárez.

MEJORAMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS PRESENTES EN *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 UTILIZANDO UNA SOLUCIÓN ACIDIFICADA DE CLORITO DE SODIO Janet Bibiana García-Martínez, Sindy julieth beleño rodríguez1 Johanna ximena villamizar sandoval, Andrés Fernando Barajas-Solano, Crisostomo Barajas-Ferreira, Viatcheslav Kafarov.

Dos (2) proyectos de grado (pre-grado) en Ingeniería Química

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. Universidad Industrial de Santander - UIS
Estado: Tesis concluida Ingeniería Química, 2013. Persona orientada: David Eduardo Chavarro Acuña y Liliana Karolina Rojas Celis

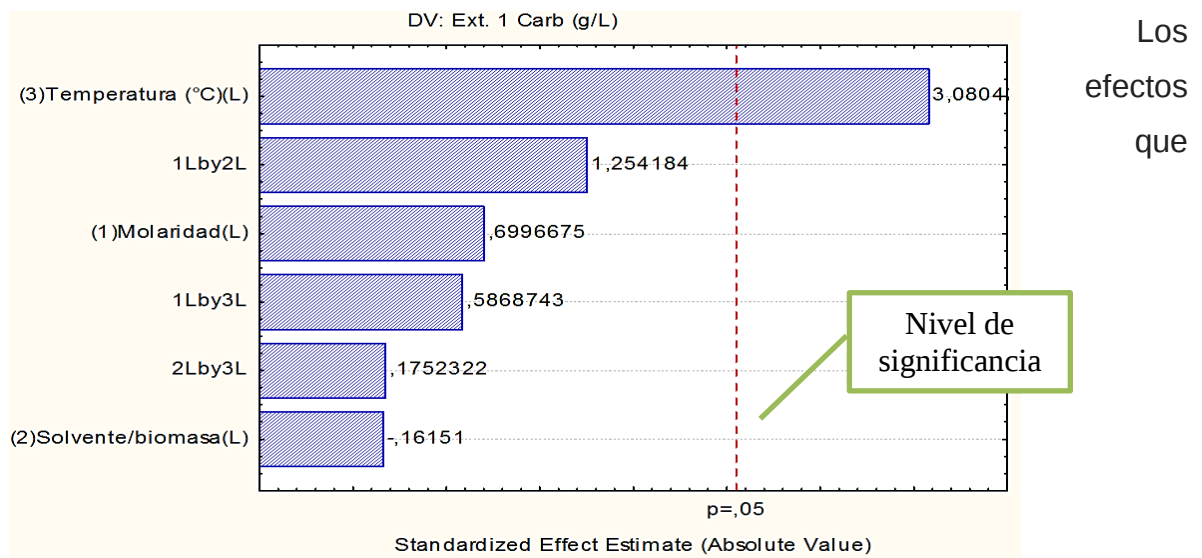
Diseño de una metodología para la extracción de carbohidratos de microalgas a partir de una solución acidificada de hipoclorito de sodio Universidad Industrial de Santander - UIS Estado: Tesis concluida Ingeniería Química, 2013, Persona orientada: Omar Augusto Avila Jaimes y Lorena Varcacel

Anexo B. Manual de interpretación del diagrama de Pareto el software Statistic 7.0

El software STATISTICA ® es un programa integrado para la gestión de análisis estadístico y bases de datos, que ofrecen una amplia selección de proceso analítico, desde básico a avanzado.

El sistema incluye no sólo los procedimientos estadísticos y gráficos generales, pero también módulos especializados (análisis de regresión, supervivencia, time series, análisis factorial, análisis discriminante y varios otros módulos).

Para el caso del presente estudio se hizo uso del diagrama de Pareto de efectos, para determinar la magnitud y la importancia de un efecto. El diagrama muestra el valor absoluto de los efectos y traza una línea de referencia en la gráfica. Cualquier efecto que se extienda más allá de esta línea de referencia es potencialmente importante. Par el caso se especifica un nivel de significancia del 5 % ($P = 0,05$).



sobrepasan la línea de significancia representan un mayor efecto acumulativo en el sistema dado. El software presenta la relación lineal (L) y cuadrática (Q) de los efectos que se generan a partir de las variables de estudio, cabe también resaltar que el programa incluye una función para la evaluación de la

interacción de las variables, esto quiere decir, que el software emplea una ecuación lineal donde intersecta los diferentes factores (en números) para determinar si la interacción entre 2 factores posee un factor significativo en la respuesta.

En el caso específico demostrado en la siguiente gráfica, el factor que más influye es la temperatura (factor N°3), sin embargo su intersección con los otros factores como son Molaridad (1) y Solvente/Biomasa (N) no son significativos