

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN BIFÁSICO DE
CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVOS
HETERÓTROFOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.**

**EDISON GABRIEL AYALA TORRES
OSCAR JULIAN REYES GÓMEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN BIFÁSICO DE
CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVOS
HETERÓTROFOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.**

**EDISON GABRIEL AYALA TORRES
OSCAR JULIAN REYES GOMEZ**

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

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

**Codirector
ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

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

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su orientación, comprensión y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto.

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

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

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

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA..... | 18 |
| 1.1 MÉTODOS DE CULTIVO | 19 |
| 1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 1.3 SEPARACIÓN DE CLOROFILAS..... | 20 |
| 1.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES..... | 21 |
| 1.5 CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS | 21 |
| 1.6 BALANCE DE MASA | 22 |
| | |
| 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS | 23 |
| 2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| 2.1.1 Extracción de carbohidratos..... | 26 |
| 2.1.2 Extracción de Proteínas | 29 |
| 2.2 PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO PARA LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN | 32 |
| 2.3 COMPARACIÓN DE LAS TRES TEMPERATURAS DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO PARA LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN | 35 |
| | |
| 3. CONCLUSIONES | 37 |

| | |
|-------------------------|----|
| 4. RECOMENDACIONES..... | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |
| ANEXOS..... | 42 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Diseño de experimental | 20 |
| Tabla 2. Carbohidratos y proteínas extraídos | 25 |
| Tabla 3. Eficiencia de extracción carbohidratos..... | 34 |
| Tabla 4. Eficiencia proteínas extraídas | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1 . Procedimiento Experimental | 18 |
| Figura 2. Eficiencia de carbohidratos..... | 23 |
| Figura 3. Eficiencia de proteínas..... | 24 |
| Figura 4. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos | 26 |
| Figura 5. Superficie de respuesta para la primera extracción de carbohidratos, Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g..... | 27 |
| Figura 6. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de carbohidratos | 27 |
| Figura 7. Superficie de respuesta para la segunda extracción de carbohidratos Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g..... | 28 |
| Figura 8. Diagrama de Pareto para la primera extracción de proteínas..... | 29 |
| Figura 9. Superficies de respuesta para la primera extracción de proteínas. Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g (a); Molaridad vs Solvente/biomasa, Temperatura: 105°C (b)..... | 30 |
| Figura 10. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de proteínas | 31 |
| Figura 11. Superficies de respuesta para la segunda extracción de proteínas. Molaridad vs solvente/biomasa, Temperatura: 25°C (a); Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g (b) | 32 |
| Figura 12. Eficiencia carbohidratos extraídos | 33 |
| Figura 13 . Eficiencia proteínas extraídas..... | 34 |
| Figura 14. Pre-tratamiento térmico para la mejor extracción de proteína | 36 |

Figura 15. Pre-tratamiento térmico para la mejor extracción de carbohidratos.....36

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| ANEXO A. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS EXTRAÍDOS..... | 42 |
| ANEXO B. CULTIVOS Y MONTAJES DE EXTRACCIÓN..... | 44 |
| ANEXO C. MÉTODO DE CULTIVO <i>Chlorella vulgaris</i> | 45 |
| ANEXO D. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES A-B-C..... | 46 |

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN BIFÁSICO DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVOS HETERÓTROFOS DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.*

AUTORES: EDISON GABRIEL AYALA TORRES, OSCAR JULIAN REYES GÓMEZ**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, proteínas, carbohidratos, extracto, pretratamiento térmico, selectividad.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos autótrofos unicelulares, son una valiosa fuente de productos de alto valor y biocombustibles, sin embargo el alto costo energético requerido para la extracción de sus metabolitos ha mantenido en tela de juicio sobre el posible escalamiento industrial para la obtención de biocombustibles y otros productos derivados de esta biomasa. El objetivo de este trabajo es evaluar un sistema de extracción de carbohidratos y proteínas en 2 ciclos mediante el uso de soluciones básicas (NaOH).

Dentro del trabajo se evaluó el efecto de la temperatura, relación solvente/biomasa y concentración de NaOH en la selectividad en cuanto a la obtención de carbohidratos y proteínas.; para esto se realizó un diseño de experimentos 2^3 utilizando el software STATISTICA 7.0

Se encontró que las mejores condiciones de extracción para carbohidratos se logran a una concentración de solvente de 3,673 M, temperatura de reacción 55°C y una relación solvente/biomasa 30mL/g; mientras que las mejores condiciones para proteínas se obtienen a una concentración de 3M, temperatura de reacción 85°C y relación solvente/biomasa 45 mL/g. las eficiencias que se lograron bajo estas condiciones fueron de 95% para carbohidratos y de 98% para proteínas.

Tomando las mejores condiciones de extracción para cada metabolito, se realizó un pretratamiento térmico a 25°C y 75°C para compararlos con los logrados a 105°C, los resultados obtenidos indican que las mayores eficiencias se lograron con biomasa seca (pre-tratada a 105°C) con valores de 95% para carbohidratos y 98% para proteínas, sin embargo al compararlos con las eficiencias obtenidas al utilizar biomasa húmeda (pre-tratada a 25°C) cuyos valores fueron de 89% para proteínas y 73% para carbohidratos, la posibilidad de trabajar con biomasa húmeda al considerar que la etapa de secado de la biomasa representa la etapa en la cual ay un mayor gasto energético.

* Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF A TWO-PHASE EXTRACTION SYSTEM OF CARBOHYDRATES AND PROTEINS FROM CROP OF heterotrophic *Chlorella vulgaris* UTEX 1803.*

AUTHORS: EDISON GABRIEL AYALA TORRES, OSCAR JULIAN REYES GÓMEZ**

KEYWORDS: Micro-algae, proteins, carbohydrates, extract, thermal pre-treatment, selectivity.

Microalgae are photosynthetic autotrophic unicellular microorganisms; they are a valuable source of high-value products and biofuels. However the high energy cost required for the extraction of their metabolites has kept questioning on possible industrial upgrading for the obtaining of biofuels and other products derived from biomass. The aim of this study was to evaluate a 2-cycle carbohydrate and protein extraction system by using basic solutions (NaOH).

Within the paper, the effect of temperature, solvent / biomass and concentration of NaOH in the selectivity in terms of obtaining carbohydrate-protein ratio was evaluated; in order to do this, it was performed a design of experiments 23 using STATISTICA 7.0 software. We found that the best extraction conditions for carbohydrates are achieved at a concentration of 3.673 M solvent, reaction temperature 55 ° C and a solvent / biomass 30mL / g ratio, while the best conditions for protein are obtained at a 3M concentration, reaction temperature 85 ° C and solvent / biomass 45 mL / g ratio. The efficiencies achieved under these conditions were 95% for carbohydrates and 98% for proteins.

Taking the best extraction conditions for each metabolite, a thermal pre-treatment was performed at 25 ° C and 75 ° C for comparison with those obtained at 105 ° C. The results indicate that the highest efficiencies were achieved with dry biomass (pre-treated at 105 ° C) with values of 95% for carbohydrates and 98% for proteins; however when compared to the efficiencies obtained using wet biomass (pre-treated at 25 ° C) which values were 89% for protein and 73% for carbohydrates, the possibility of working with wet biomass considering that its drying stage represents the stage in which there is a bigger energy expenditure.

* Graduation project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering. Department. Director: Dr. Sc Viatcheslav Kafarov. Codirector: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son consideradas como una de las fuentes renovables más prometedoras para la producción de diversos productos para las industrias farmacéuticas, alimentarias y para la producción de biocombustibles, ya que posee grandes ventajas como: rápido crecimiento, alta eficiencia en la fijación de CO₂, no compiten por tierras cultivables y agua potable (Chen *et al.*, 2013). Sin embargo los altos costos asociados a la cosecha y secado de la biomasa (García-Cuadra, *et al.*, 2012), generan un alto costo energético requerido para la extracción de metabolitos esenciales (carbohidratos, lípidos y proteínas).

Por estas razones las investigaciones se están centrando en reducir dichos costos mediante el mejoramiento de las técnicas de extracción y obtención de nuevos metabolitos como son los isoprenoides, alcaloides, toxinas, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, péptidos no ribosomales, carbohidratos y proteínas, que encuentran aplicaciones en la salud, la farmacología, nutrición y biotecnología (Serive *et al.*, 2012).

Chlorella vulgaris, que es una de las cepas microalgales más utilizadas a nivel comercial, principalmente en las industrias alimentarias y nutricionales (Harun *et al.* 2010) debido a sus niveles de carbohidratos (33-50%), proteínas (20-60%) y lípidos (10-20%) (Ho *et al.*, 2012); además puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales, la fijación de CO₂ industrial y futuras aplicaciones con gran potencial (Hadj-Romdhane *et al.*, 2012). 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).

Por lo tanto en algunas ocasiones se presentan dificultades en la extracción debido al pequeño tamaño celular y/o a paredes celulares resistentes, por lo cual se hace necesario pre-tratar la biomasa para mejorar las eficiencias de extracción. El pre-tratamiento de la biomasa es una de las etapas más importantes y costosas en el proceso, ya que permite reducir la cristalinidad de la biomasa y aumentar el área de contacto con el fin de mejorar la digestibilidad del sustrato.

En la actualidad se encuentran numerosos trabajos sobre la extracción de los metabolitos presentes en la biomasa. Para el caso específico de extracción de proteínas existen ciertas dificultades que conllevan a problemas de sobrestimación proteica pues las microalgas contienen niveles de aminoácidos y otros compuestos orgánicos no proteicos como la clorofila (Slocombe *et al.*, 2013).

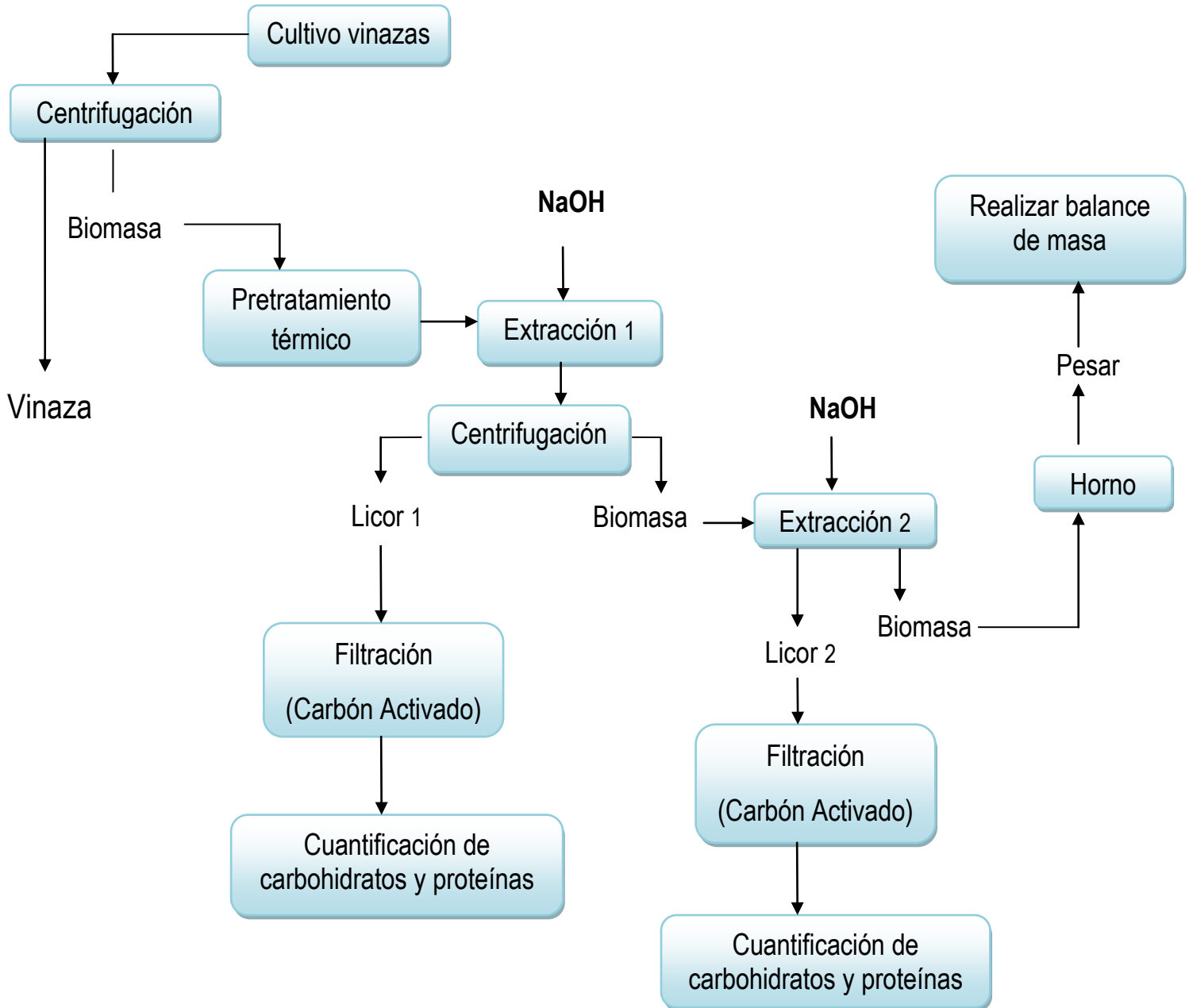
Aunque las condiciones alcalinas pueden beneficiar la extracción proteica es necesario tener en cuenta que la extracción en medio alcalino altamente concentrado, conduce a varios efectos adversos como la reducción de la digestibilidad de la proteína y el daño de algunos aminoácidos (lisina, cisteína) (Sari *et al.*, 2013). Por otra parte, la temperatura es otro factor importante debido a que puede actuar positivamente sobre moléculas resistentes al calor, también puede degradar moléculas termolábiles como las clorofilas (Serive *et al.*, 2012). Harun *et al* (2011) utilizaron un tratamiento alcalino para la extracción de carbohidratos donde el rendimiento máximo fue de 35,01% de los carbohidratos totales, trabajando a 120°C, 0,75% w/v de NaOH durante 30 minutos; el mayor problema de esta técnica son los altos costos energéticos sin obtener rendimientos significativos.

Para la hidrolisis 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 el alto valor agregado que puede llegar a tener el tratamiento por el alto costo de las enzimas (Harun & 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, sin embargo un ambiente acidificado puede conducir a la descomposición de los azúcares en metabolitos 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.*, 2011); 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 *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar un sistema de extracción bifásico que permita obtener tanto carbohidratos como proteínas, utilizando variables como temperatura, concentración del medio alcalino (NaOH) y la relación solvente/biomasa, para mejorar la selectividad en cuanto a la obtención de estos dos metabolitos.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Figura 1 . Procedimiento Experimental



1.1 Métodos de cultivo

Se utilizó como fuente de nutrientes las vinazas (residuos generados en la producción de etanol a partir de caña de azúcar), 500 mL de inóculo de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 fueron mezclados con 1500 mL de vinazas, en 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), posteriormente la biomasa se llevó al horno a 105°C, durante 24 horas.

Para la extracción de carbohidratos y proteínas mediante tratamiento alcalino, se tomó 1 g de biomasa seca a 105°C y mediante las condiciones descritas en el diseño experimental para cada tratamiento, se adicionó la solución de NaOH. La mezcla se pre-trató térmicamente a (55 – 85°C) en baño maría (Memmert) durante 20 minutos.

En la siguiente etapa se procedió a centrifugar las muestras a 3400 rpm en una centrífuga (UNIVERSAL 320 R) durante 15 minutos, obteniendo el primer extracto y biomasa residual, a la cual se le aplica nuevamente una solución de NaOH con el fin de lograr una segunda extracción y cuantificar los metabolitos extraídos.

1.2 Diseño experimental

Para el desarrollo del diseño experimental se realizó en la herramienta informática STATISTIC 7.0. El diseño realizado está basado en composición central, factorial 3^3 de 17 experimentos con replica (Tabla 1), éste fue realizado para evaluar el efecto de la variables molaridad (1, 2 y 3M), relación solvente/biomasa (15, 30 y 45 mL solvente /g biomasa) y temperatura (25, 55 y 85°C).

Tabla 1. Diseño de experimental

| Prueba | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15* |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|
| Molaridad | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0,327 | 3,673 | 2 | 2 |
| mL solvente/ g biomasa | 15 | 45 | 45 | 15 | 30 | 45 | 15 | 15 | 45 | 30 | 30 | 30 | 30 | 4,9 | 55 |
| Temperatura °C | 25 | 25 | 85 | 85 | 55 | 25 | 25 | 85 | 85 | 4,8 | 105 | 55 | 55 | 55 | 55 |

*15: El tratamiento 15 es el promedio aritmético de las pruebas 16 y 17, para las dos fases de extracción de carbohidratos y proteínas.

1.3 Separación de clorofilas

La temperatura es un factor importante ya que además de maleabilizar la pared celular también puede degradar moléculas termolábiles como son las clorofilas (Serive, *et al.*, 2012), generando así sobrestimación en los extractos proteicos (Slocombe *et al.*, 2013), cambios en el color y estructura molecular (Schwenzfeier *et al.*, 2011). Para disminuir dicho problema culminados los 20 minutos de tratamiento térmico, las muestras fueron centrifugadas a 3400 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante obtenido se hace pasar por una columna vertical de diámetro interno 1,4 cm y altura 12,5 cm rellena con carbón activado.

1.4 Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), el cual consiste en tomar 1 mL de cultivo y adicionar 1,4 mL de solución A-B-C; después de 20 minutos se adicionan 0,2 mL de reactivo de Folin y se homogeniza por 30 minutos. La mezcla se mide utilizando un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a 750 nm. Para determinar el porcentaje de eficiencia en la extracción de proteínas presentes en un gramo de biomasa pre-tratada térmicamente a 105°C, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia proteínas} = \frac{\text{Proteínas totales extraídas}}{\text{Proteínas totales antes de extracción}} \times 100 \quad (1)$$

En los diagramas de barras de erros descritos en la Figura 3 se pueden observar las eficiencias para los dos ciclos de extracción de proteínas.

1.5 Cuantificación de carbohidratos

Se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Se toma 1mL de cada extracto y a estos se les adicionan por separado, 0,5 mL de fenol al 5% se homogeniza la mezcla y adiciona 2,5 mL de ácido sulfúrico al 95%.

Por último la muestra es medida en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a longitudes de onda de 480nm, 485 nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa, glucosa y Fructosa presentes en la biomasa.

Para determinar el porcentaje de eficiencia en la extracción de carbohidratos presentes en un gramo de biomasa pre-tratada térmicamente a 105°C, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Eficiencia carbohidratos} = \frac{\text{Carbohidratos totales extraídos}}{\text{Carbohidratos totales antes de extracción}} \times 100 \quad (2)$$

Se pueden observar las eficiencias para los dos ciclos de extracción de carbohidratos en los diagramas de barras de error descritos en la Figura 2.

1.6 Balance de masa

Para obtener la cantidad de biomasa que se solubilizó y quedó como residuo del proceso, se realiza un balance de masa para cada una de las extracciones ilustrado en la Tabla A1 del anexo A.

Para determinar el porcentaje de biomasa solubilizada de carbohidratos y proteínas presentes en un gramo de biomasa seca. Se aplicó la siguiente ecuación:

Donde la biomasa se obtiene a partir del diseño de experimentos descrito en la Tabla1.

$$\text{Biomasa (solubilizada)} = \text{Biomasa (inicial)} - \text{Biomasa (residual)} \quad (1)$$

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la Figura 2 y 3 se pueden observar las eficiencias para los dos ciclos de extracción de carbohidratos y proteínas. Se aprecia que para la mayoría de los tratamientos se obtiene una mayor cantidad de carbohidratos en la segunda etapa de extracción.

Figura 2. Eficiencia de carbohidratos

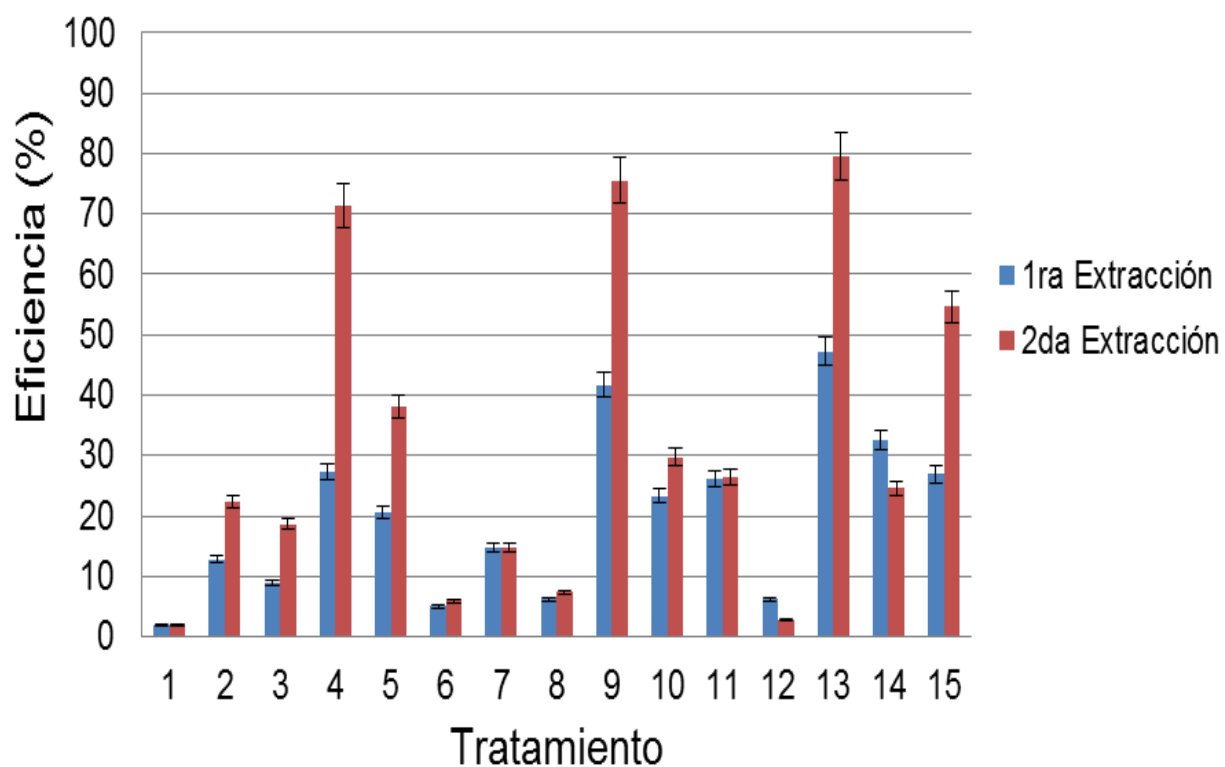
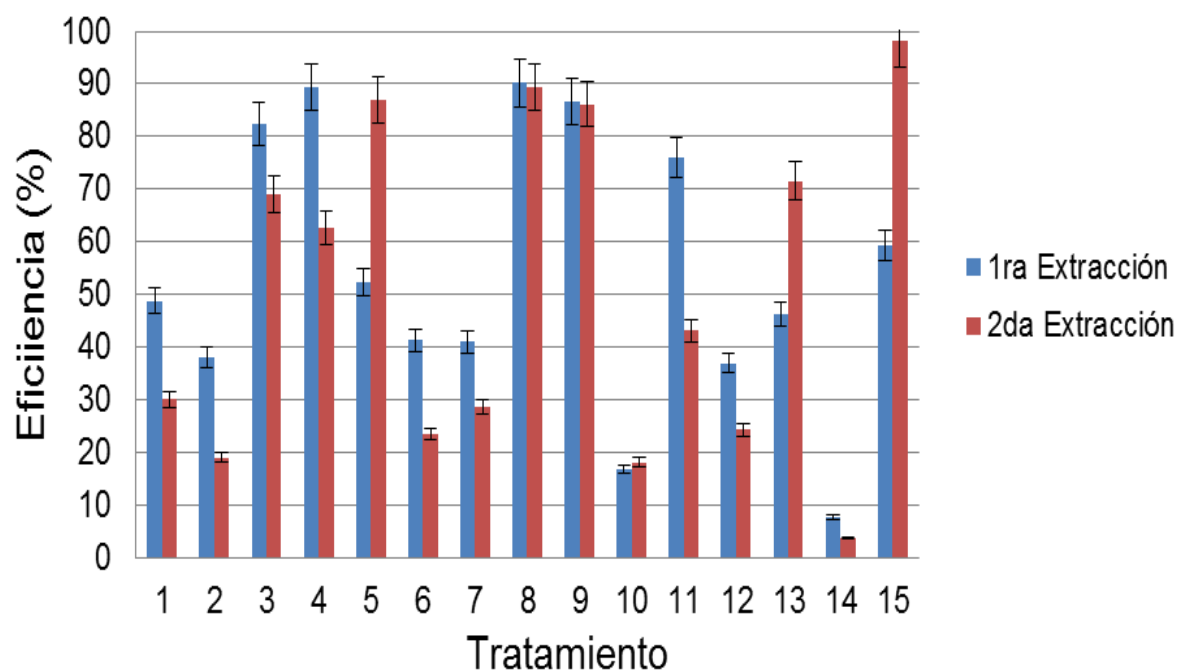


Figura 3. Eficiencia de proteínas



Los resultados de extracción de carbohidratos y proteínas obtenidos para cada tratamiento se presentan en la Tabla 2; en el experimento 9 se solubiliza un 98% de las proteínas iniciales y un 74% de los carbohidratos iniciales, por otro lado en el experimento 13 se solubilizan un 85% de las proteínas iniciales y un 95% de los carbohidratos iniciales.

Tabla 2. Carbohidratos y proteínas extraídos

| Prueba | Proteínas solubilizadas (g/L) | | | Carbohidratos solubilizados (g/L) | | |
|--------|-------------------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|---------------|----------------|
| | 1° Extracción | 2° Extracción | Eficiencia (%) | 1° Extracción | 2° Extracción | Eficiencia (%) |
| 1 | 16,218 | 5,136 | 64 | 0,436 | 0,333 | 3 |
| 2 | 4,222 | 1,302 | 50 | 0,999 | 1,327 | 30 |
| 3 | 9,167 | 1,344 | 95 | 0,688 | 0,806 | 19 |
| 4 | 29,804 | 2,210 | 96 | 6,359 | 7,619 | 60 |
| 5 | 8,714 | 6,908 | 94 | 2,417 | 2,950 | 46 |
| 6 | 4,582 | 1,531 | 55 | 0,392 | 0,355 | 10 |
| 7 | 13,638 | 5,617 | 58 | 3,431 | 2,566 | 26 |
| 8 | 30,047 | 2,937 | 99 | 1,448 | 0,906 | 10 |
| 9 | 9,622 | 1,282 | 98 | 3,246 | 2,472 | 74 |
| 10 | 2,774 | 2,497 | 32 | 2,724 | 2,893 | 48 |
| 11 | 12,670 | 1,723 | 86 | 3,047 | 1,622 | 40 |
| 12 | 6,135 | 2,548 | 52 | 0,729 | 0,246 | 8 |
| 13 | 7,691 | 6,425 | 85 | 5,505 | 5,601 | 95 |
| 14 | 7,700 | 3,500 | 11 | 23,300 | 14,900 | 53 |
| 15* | 5,379 | 3,628 | 99 | 1,707 | 2,114 | 60 |

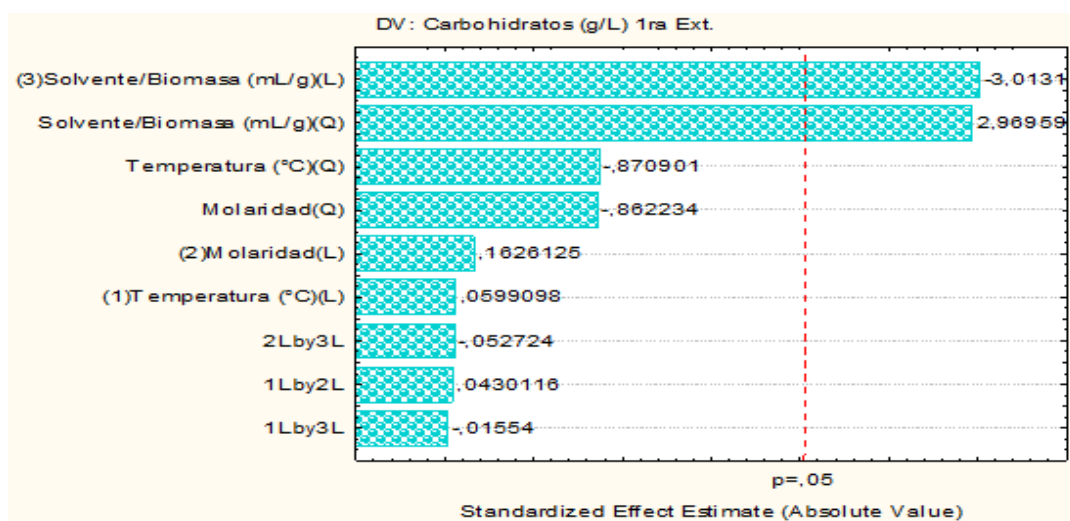
*15: La prueba 15 es el promedio aritmético de las pruebas 16 y 17, debido a que estas son las pruebas generadas por el programa STATISTIC 7.0 como la composición central.

2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.1.1 Extracción de carbohidratos

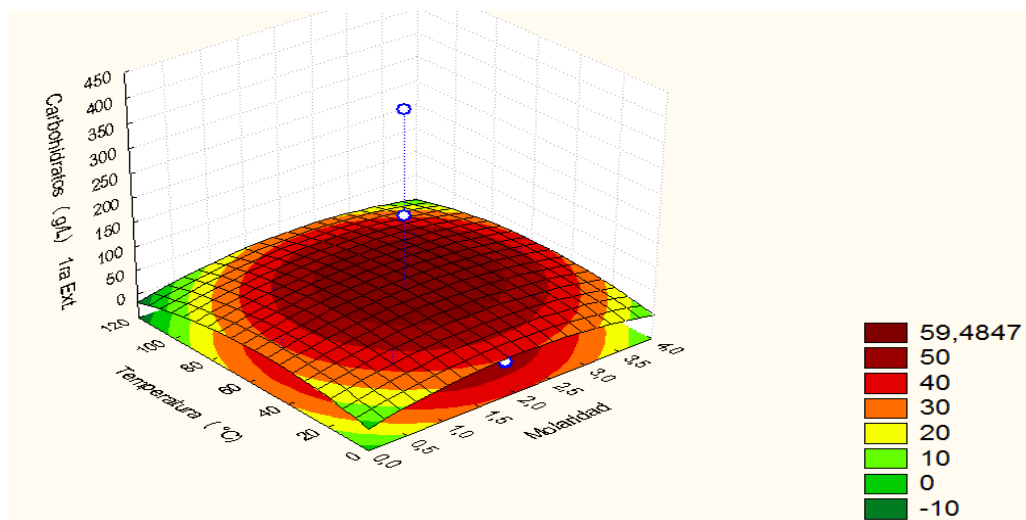
Para determinar la influencia de las variables (Temperatura, Molaridad, relación solvente/biomasa) sobre los datos obtenidos en la Tabla 2, se realizaron los diagramas de Pareto determinando la influencia positiva o negativamente de dichas variables en la extracción de metabolitos (Figura 4).

Figura 4. Diagrama de Pareto para la primera extracción de carbohidratos



Se observa que en la primera extracción la relación es la variable solvente/biomasa la más significativa en la primera extracción de carbohidratos, de manera que la molaridad, la temperatura y cada una de las interacciones entre ellas no representan variaciones importantes en los resultados de extracción. Por otro lado, la superficie de respuesta de esta primera extracción (Figura 5) demuestra que a una concentración de 2M de NaOH, temperatura de 55°C y relación solvente/biomasa de 15 mL/g, la cantidad de carbohidratos extraída fue 59,48 g/L, lo que corresponde al 89,22% de la biomasa inicial.

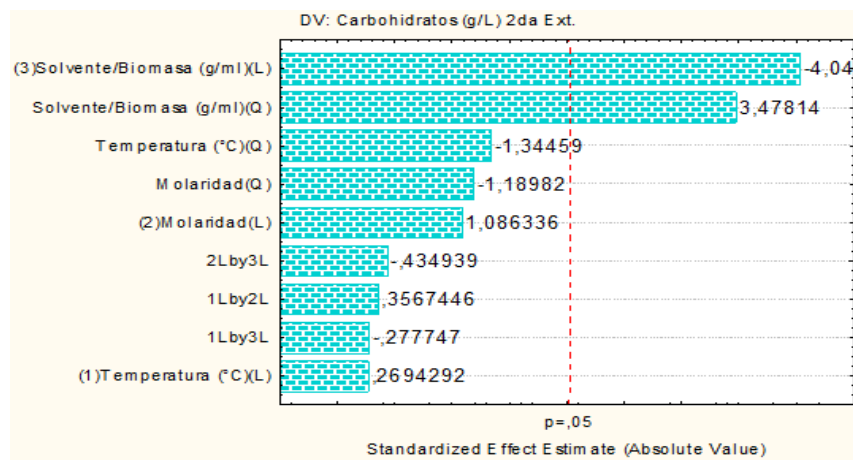
Figura 5. Superficie de respuesta para la primera extracción de carbohidratos, Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g



En la segunda extracción de carbohidratos de nuevo se visualiza que la variable con mayor importancia en la extracción sigue siendo la relación solvente/biomasa (Figura 6).

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

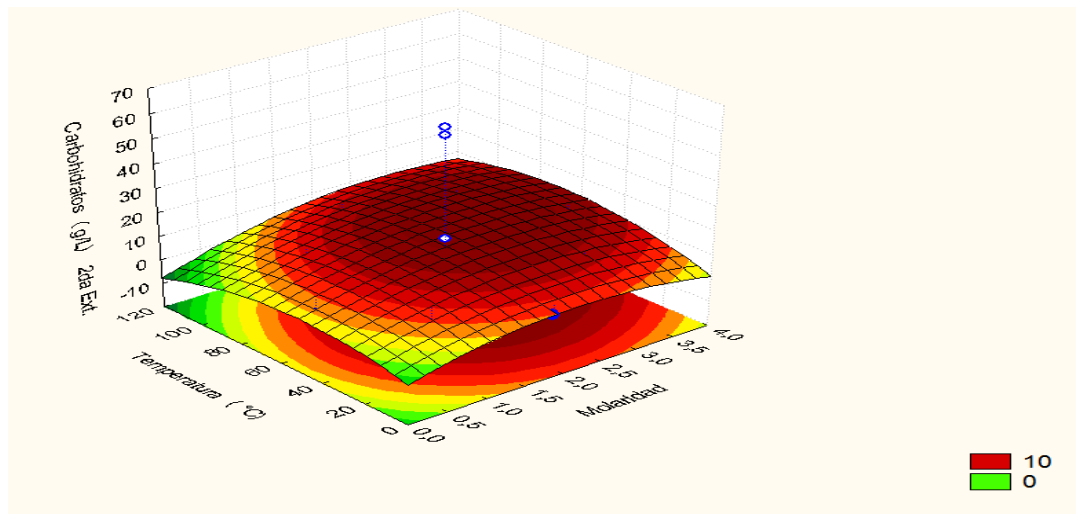
En la Figura 7 se visualiza que a una temperatura de 60°C, molaridad de 2,5 y



relación solvente/biomasa de 15 mL/g se extrae 10 g/L (correspondiente al 19,99% de la biomasa inicial).

También se logra evidenciar que durante la segunda etapa de extracción, la máxima cantidad de carbohidratos que se obtienen corresponde aproximadamente a un 69,23% menos de la máxima a la que se puede llegar en la primera extracción.

Figura 7. Superficie de respuesta para la segunda extracción de carbohidratos Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g

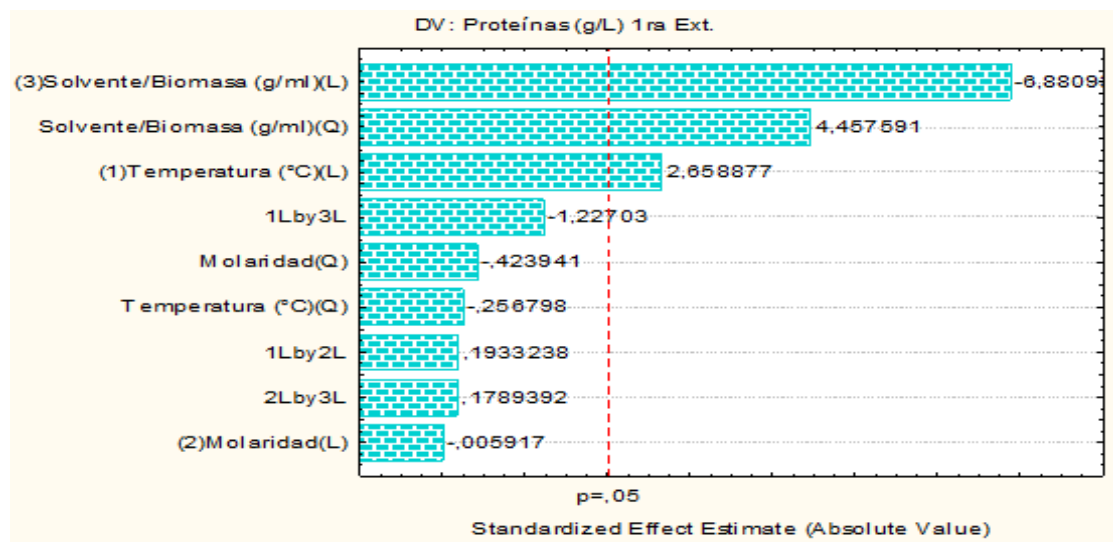


La mayor cantidad de carbohidratos extraídos fue 59,48 g/L para el primer ciclo de extracción a temperatura de 55°C, molaridad de 3M y relación solvente/biomasa de 15 mL/g, lo que corresponde al 89,22% de los carbohidratos iniciales. La extracción de carbohidratos realizada resulta ser más eficiente que la propuesta por (Zhou *et al.*, 2011) donde la mayor extracción de carbohidratos iniciales corresponde al 83%, trabajando a condiciones 180°C, concentración de 0,4mol/L $MgCl_2$ durante 10 minutos.

2.1.2 Extracción de Proteínas

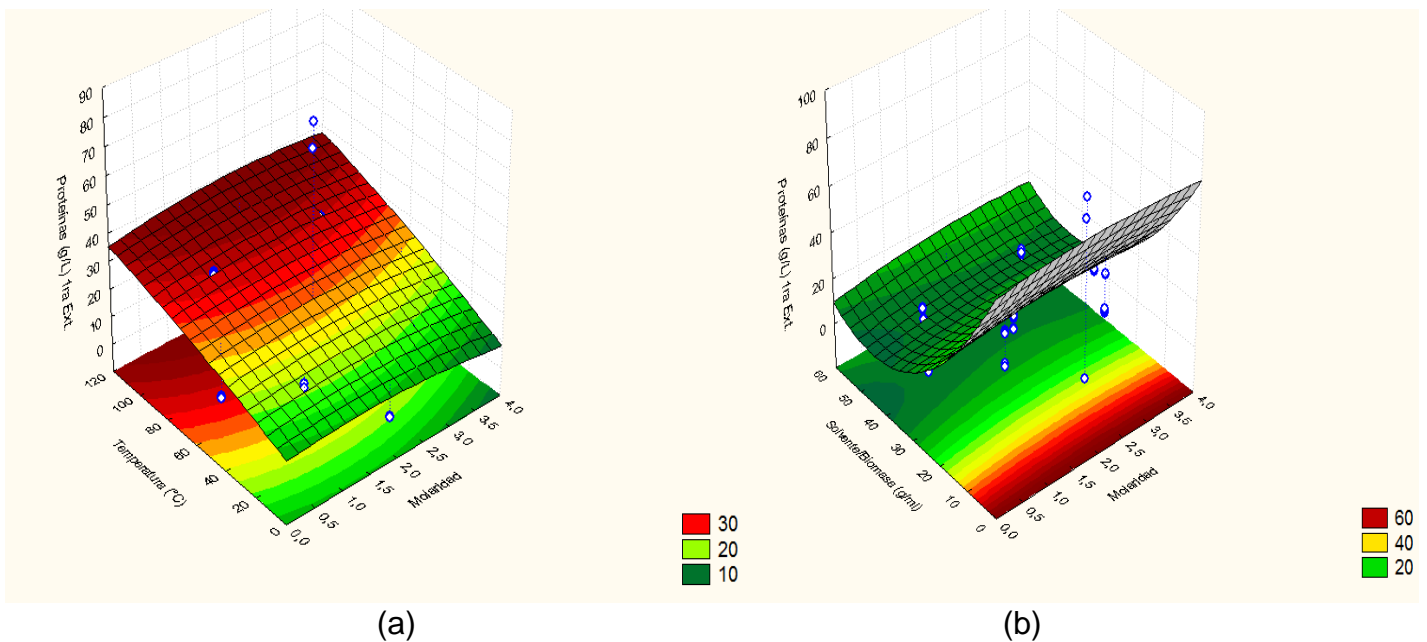
En el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 8 se observa qué para el caso de la primera extracción de proteínas, las variables significativas que afectan la extracción son la temperatura de forma directa. Se observó que a mayores temperaturas (Figura 9a), se extrae la mayor cantidad de proteínas, mientras que a una la relación solvente/biomasa, se espera extraer la mayor cantidad de proteínas.

Figura 8. Diagrama de Pareto para la primera extracción de proteínas



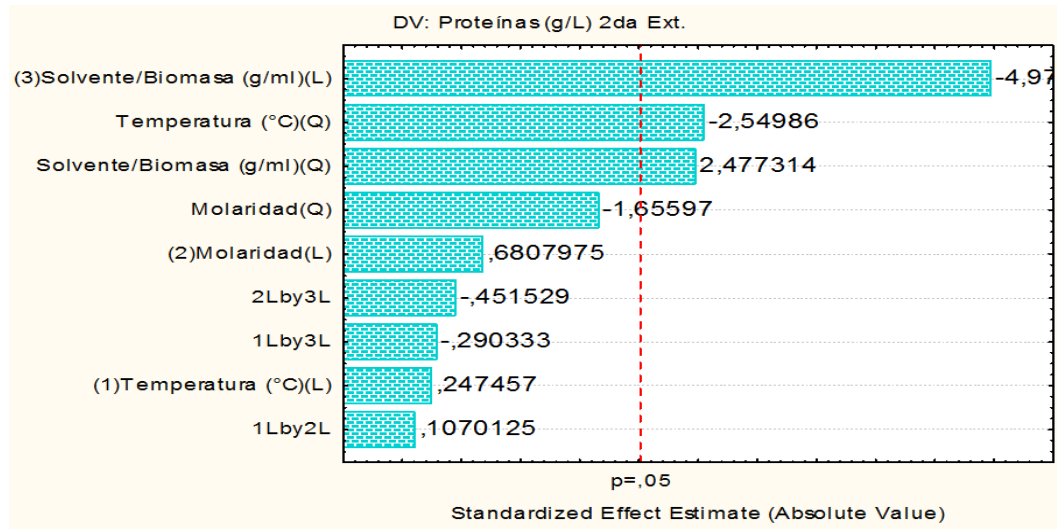
De acuerdo a las figuras 9a y b, la mayor extracción posible es de 30 g/L, (correspondiente al 44,99 % de proteínas iniciales) la cual se logran entre un rango de temperaturas de 100-110 °C y concentración 3M y una relación solvente/biomasa de 15 mL/g.

Figura 9. Superficies de respuesta para la primera extracción de proteínas. Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g (a); Molaridad vs Solvente/biomasa, Temperatura: 105°C (b)



Para el caso de la segunda extracción de proteínas las variables significativas que afectan la extracción son la temperatura de forma indirecta pues se observa que a menores temperaturas se extraerá la mayor cantidad de proteínas. La relación solvente/Biomasa de forma indirecta, se espera extraer la mayor cantidad de proteínas conforme disminuya la cantidad de solvente empleado por gramo de biomasa.

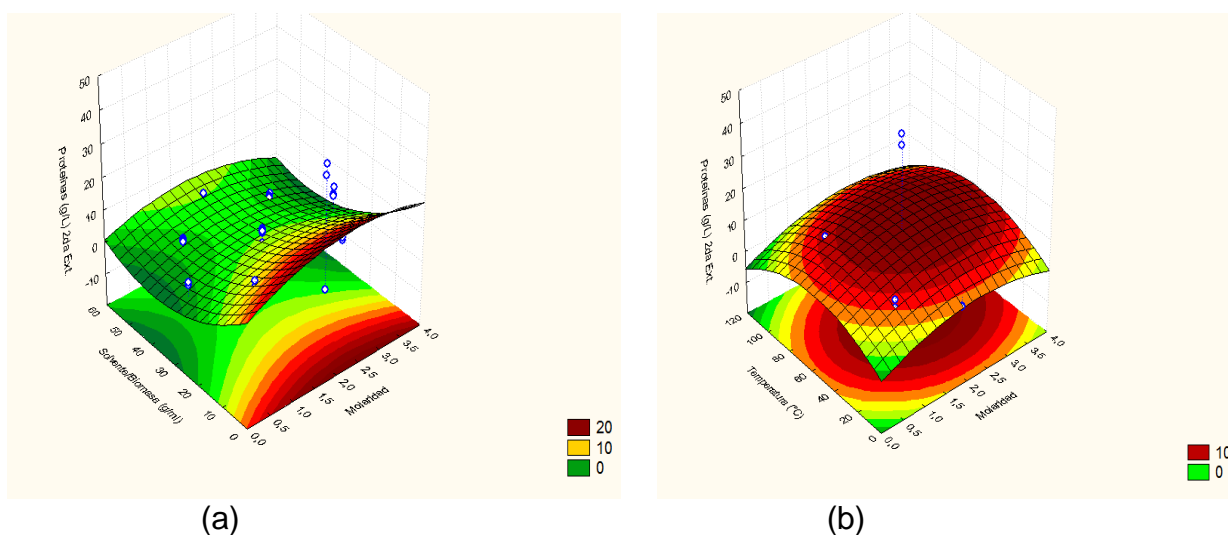
Figura 10. Diagrama de Pareto para la segunda extracción de proteínas



Según la superficie de la figura 11a se puede evidenciar que la mayor extracción se obtiene a relación solvente/biomasa bajas y molaridades alta, cuyo valor es alrededor de 10 g/L que corresponden al 20% de la biomasa inicial. De acuerdo a la figura 11b se observa que las mejores condiciones de extracción es cuando aumenta la temperatura y la molaridad, siempre y cuando se mantenga la relación solvente/biomasa en 15 mL/g.

En base a estas dos superficies de respuesta y de los datos presentes en la Tabla 2, se logra determinar que la mayor cantidad de proteínas ocurren en la primera extracción.

Figura 11. Superficies de respuesta para la segunda extracción de proteínas. Molaridad vs solvente/biomasa, Temperatura: 25°C (a); Molaridad vs Temperatura, Solvente/biomasa: 15 mL/g (b)



La mayor cantidad de proteínas extraídas fue 30 g/L a temperatura de 105°C, molaridad de 3M y relación solvente/biomasa de 15 mL/g, lo que corresponde al 49,99% de las proteínas iniciales. La extracción de proteínas realizada resulta ser más eficiente que la propuesta por (Barbarino & Lourenco, 2005) donde la mayor extracción de proteínas iniciales corresponde al 24%, trabajando a condiciones 95°C, 0,1 N de NaOH durante 10 minutos.

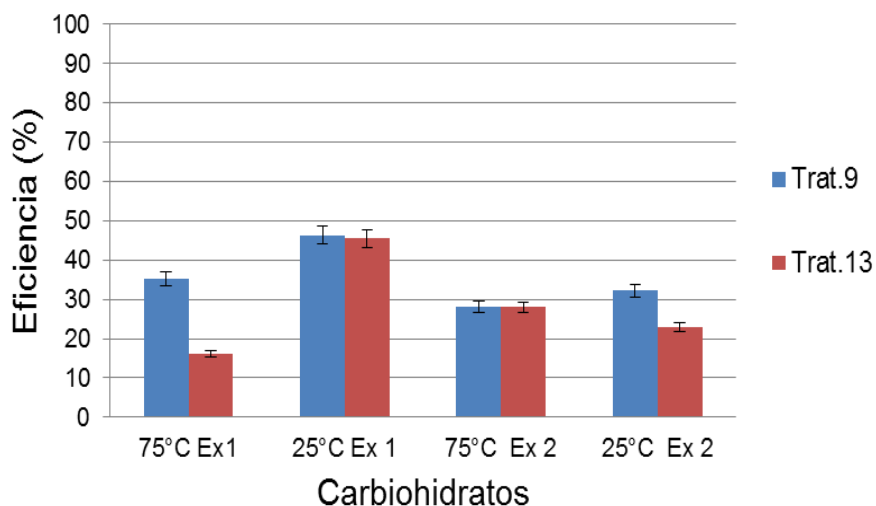
2.2 PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO PARA LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Tomando las mejores condiciones de extracción para carbohidratos y proteínas realizadas con biomasa seca (105°C, 24 h), se realizó un pre-tratamiento térmico a 25 y 75°C durante 24 h, con el propósito de observar la influencia que tiene la humedad presente en la biomasa antes de realizarse la hidrólisis alcalina. Para luego ser comparados con los datos obtenidos con la biomasa seca.

Esto se llevó a cabo mediante la variación de las temperaturas de secado de la biomasa.

Las eficiencias de extracción de carbohidratos y proteínas utilizando biomasa pre-tratada térmicamente a 25 y 75⁰C en dos ciclos de extracción para las condiciones descritas en los experimentos 9 y 13 se ilustran en las Figura 12 y 13, de allí se pueden observar que a condiciones de temperatura de reacción de 85⁰C, relación solvente/biomasa de 45 ml/g y concentración 3M de solvente (experimento 9), para una biomasa húmeda (pre-tratada a 25⁰C), se logran las mayores eficiencias. Adicionalmente se observa que la mayor cantidad de carbohidratos y proteínas se solubilizan en el primer ciclo de extracción.

Figura 12. Eficiencia carbohidratos extraídos



Las eficiencias para cada ciclo de extracción fueron calculadas teniendo en cuenta la cantidad de biomasa que ingresaba a cada ciclo (Tabla 3). Además se puede establecer que la mayor extracción de carbohidratos de la biomasa inicial se le

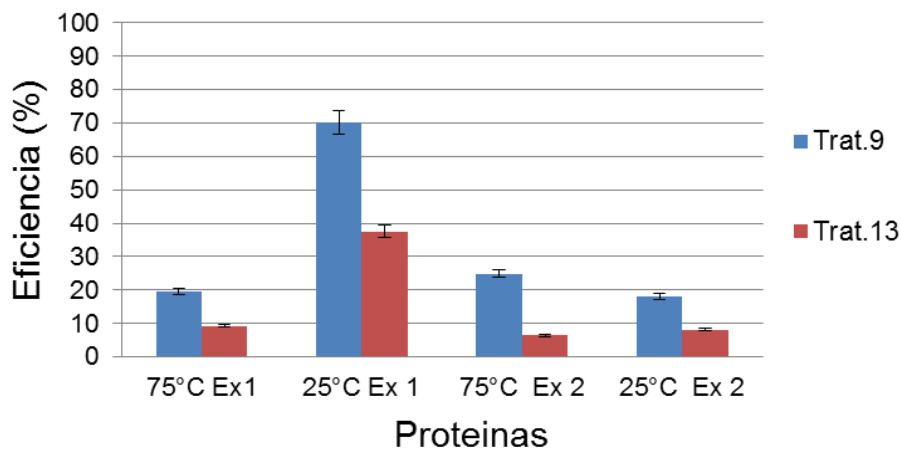
atribuye al tratamiento 9 que corresponde a una relación de 3,31 g/L con una eficiencia del 46% de carbohidratos solubilizados.

Tabla 3. Eficiencia de extracción carbohidratos

| | | Tratamiento 9 | | | | Tratamiento 13 | | | |
|--------------|-----------------------------|---------------|----------------|------|----------------|----------------|----------------|------|----------------|
| | | 25°C | Eficiencia (%) | 75°C | Eficiencia (%) | 25°C | Eficiencia (%) | 75°C | Eficiencia (%) |
| Ext.1 | carbohidratos iniciales g/L | 7,14 | 46 | 7,16 | 35 | 7,14 | 46 | 7,16 | 16 |
| | Carbohidratos extraídos g/L | 3,31 | | 2,51 | | 3,25 | | 1,16 | |
| Ext.2 | carbohidratos iniciales g/L | 3,83 | 32 | 4,64 | 28 | 3,89 | 23 | 6,00 | 28 |
| | Carbohidratos extraídos g/L | 1,23 | | 1,31 | | 0,90 | | 1,68 | |

Se puede observar que el tratamiento con el cual se obtiene la mayor extracción de proteínas es el número 9 con una eficiencia del 70 % (Figura 12), utilizando un pre-tratamiento térmico a 25°C; además se puede decir que debido a las bajas eficiencias obtenidas en el segundo ciclo de extracción, no sería recomendable llevar a cabo otra extracción para solubilizar toda la biomasa empleada durante el proceso de extracción.

Figura 13 . Eficiencia proteínas extraídas



En la Tabla 4 se puede establecer que la mayor extracción de proteínas de la biomasa inicial se le atribuye al tratamiento 9 que corresponde a 7,78 g/L con una eficiencia del 70% de proteína solubilizada.

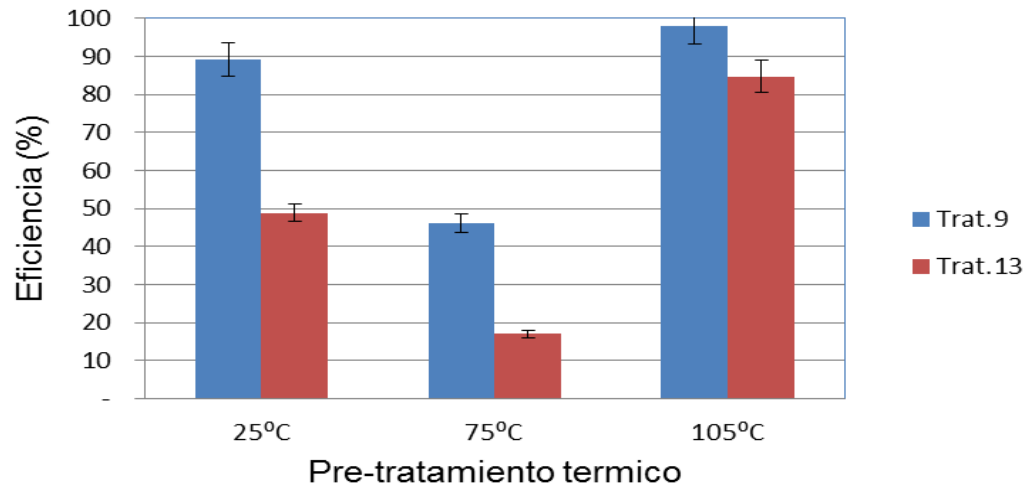
Tabla 4. Eficiencia proteínas extraídas

| | | Tratamiento 9 | | | | Tratamiento 13 | | | |
|--------------|-------------------------|---------------|----------------|-------|----------------|----------------|----------------|-------|----------------|
| | | 25°C | Eficiencia (%) | 75°C | Eficiencia (%) | 25°C | Eficiencia (%) | 75°C | Eficiencia (%) |
| Ext.1 | proteínas iniciales g/L | 11,22 | 70 | 11,22 | 20 | 11,22 | 38 | 11,22 | 9 |
| | proteínas extraídas g/L | 7,88 | | 2,21 | | 4,21 | | 1,05 | |
| Ext.2 | proteínas iniciales g/L | 3,34 | 18 | 9,01 | 25 | 7,01 | 8 | 10,17 | 6 |
| | proteínas extraídas g/L | 0,60 | | 2,21 | | 0,58 | | 0,65 | |

2.3 COMPARACIÓN DE LAS TRES TEMPERATURAS DEL PRE-TRATAMIENTO TÉRMICO PARA LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

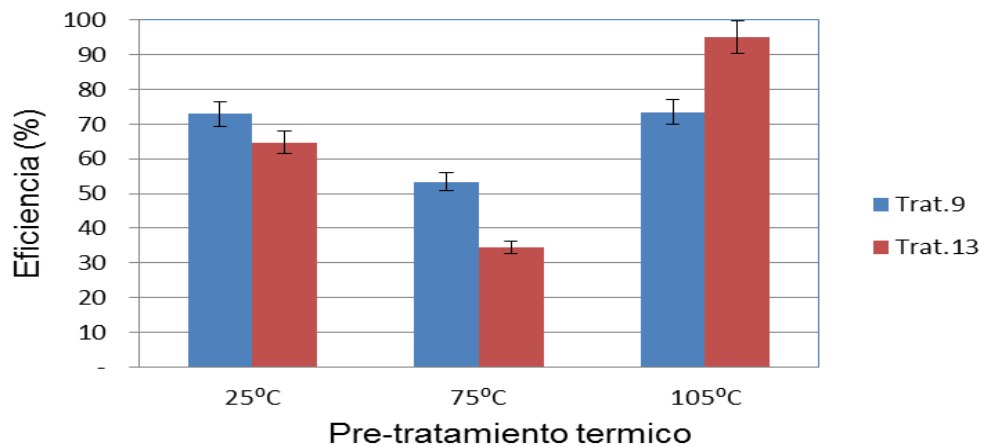
Comparando los resultados obtenidos para cada temperatura de pre-tratamiento. En la Figura 14 Se puede observar que la mayor cantidad de proteínas se consiguen con biomasa seca (pre-tratada a 105°C por 24 h), con una eficiencia del 98%, cabe resaltar que para el pre-tratamiento térmico a 25°C se obtiene una eficiencia de 89 %, este resultado a pesar de no ser el mejor tiene una gran ventaja en cuanto al ahorro energético ya que el secado de la biomasa representa el 90% de la energía total del proceso (Lardon et al., 2009).

Figura 14. Pre-tratamiento térmico para la mejor extracción de proteína



En la Figura 15 se puede apreciar la influencia del pre-tratamiento térmico en la extracción de carbohidratos para las pruebas 9 y 13, podemos notar que la humedad presente en la biomasa, juega un papel muy importante; la mayor eficiencia se obtiene para la prueba 9 pre-tratada a 105°C la cual es del 95%, cabe resaltar que para esta misma prueba a temperatura ambiental (25°C) se obtiene una eficiencia del 73% la cual es buena considerando que el secado de la biomasa es la etapa del proceso con mayor gasto energético (Lardon *et al.*, 2009).

Figura 15. Pre-tratamiento térmico para la mejor extracción de carbohidratos



3. CONCLUSIONES

- El análisis estadístico de los resultados mostró que trabajando con biomasa seca (pre-tratada a 105°C por 24 h), la mayor cantidad de carbohidratos se extraen bajo condiciones de temperatura 55°C, relación solvente/biomasa de 30 mL/g y molaridad de 3,673 M.
- Los mejores resultados se obtuvieron utilizando con solvente NaOH en los dos ciclos de extracción, donde se alcanzó una eficiencia del 95% para la extracción de carbohidratos y 98% para la extracción de proteínas.
- Una menor relación solvente/biomasa, mejora la extracción de carbohidratos, mientras que a mayor temperatura aumenta la extracción de proteínas.
- Es posible realizar la extracción de metabolitos utilizando biomasa con un 80% de humedad, logrando eficiencias de extracción superiores al 70%.

4. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de otras variables como agitación y tiempo de extracción en la obtención de proteínas y carbohidratos a partir de biomasa de microalgas.
- Evaluar la metodología desarrollada con otras especies de microalgas y diferentes medios de cultivos.
- Evaluar diferentes rangos de temperatura en el pre-tratamiento térmico de la biomasa y su efecto en la eficiencia de extracción.

BIBLIOGRAFÍA

Barbarino, E. & Lourenco, S.O. (2005). An Evaluation of Methods for Extraction and Quantification of Protein from Marine Macro – and Microalgae. *Journal of Applied Phycology.*, 17, 447-460.

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

Dubois, M., Gilles, K., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry.*, 3(28), 350-356.

García-Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González-López, C., Fernández-Sevilla, J. & Ación Fernández, F. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas carbohidratos y lípidos. *Revista Latinoamericana en Biotecnología Ambiental y Algal.*, 3(2) ,147-161 .

Girio,F.M., Fonseca, C., F. Carvalheiro., Duarte,L.C., Marqués, S. & Bogel-Lukasik, R.(2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology.*, 101(13), 4775–4800.

Guo H., Daroch M.,Liu L., Qui G., Shu G., Guangyi W. (2013). Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. *Bioresource Technology.*, 127, 422–428.

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

Harun, R., Jason, W., Cherrington, T., & Danquah, M.K.(2011). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy.*, 88, 464–3467.

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.

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J. & Bernard, O. (2009). Life-cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environ Sci Technol.*, 43, 6475-6481.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., N.J., Fair, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.*, 193, 265-275.

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.

Na Zhou, Yimin Zhang, Xiaobin Wua, Xiaowu Gong, Qinhong Wang. (2011) Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. *BioresourceTechnology.*,102, 10158-10161.

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

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.

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

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 (148).

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.

Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A. & Gruppen, H.(2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology.*, (102), 9121–9127.

Serive, B., Kaas, R., Bérard, J-B., Pasquet, V. & Picot, L. (2012). Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology.*, 124, 311–320.

Singh., Nirbhay K. & Patel. D.B. (2012). 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.

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.

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.

ANEXOS

ANEXO A. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS EXTRAÍDOS

Para cuantificar la biomasa residual, una vez realizada la segunda extracción al licor se procedió a filtrar para dicho propósito se utiliza papel filtro (Munktell diámetro de poro 110 mm), libre de humedad. Se envió por 24 horas al horno, luego se introduce en el desecador por 12 horas y finalmente se pesa junto con la biomasa residual.

La biomasa solubilizada, es la diferencia entre la biomasa inicial y la biomasa residual. El porcentaje de solubilización para carbohidratos y proteínas fue calculado utilizando las ecuaciones 2 y 3.

$$\% \text{ Solubilización Carbohidratos} = \frac{\text{g Carbohidratos solubilizado}}{\text{g Biomasa solubilizada}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Solubilización Proteínas} = \frac{\text{g Proteínas solubilizada}}{\text{g Biomasa solubilizada}} \times 100 \quad (3)$$

Tabla A1. Resultados generales del balance de masa

| Prueba | Biomasa inicial (g) | Solvente (mL) | Biomasa residual (g) | % solubilización | Biomasa solubilizada (g/L) | Proteínas totales (g/L) | % Proteínas | Carbohidratos totales (g/L) | % Carbohidratos |
|--------|---------------------|---------------|----------------------|------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | 1,0 | 15,0 | 0,7 | 33,2 | 22,1 | 21,4 | 64,1 | 0,8 | 3,3 |
| 2 | 1,0 | 45,0 | 0,5 | 35,3 | 7,9 | 5,5 | 49,7 | 2,3 | 29,9 |
| 3 | 1,0 | 45,0 | 0,2 | 54,0 | 12,0 | 10,5 | 94,6 | 1,5 | 19,2 |
| 4 | 1,0 | 15,0 | 0,5 | 69,0 | 46,0 | 32,0 | 96,0 | 14,0 | 59,9 |
| 5 | 1,0 | 30,0 | 0,5 | 63,0 | 21,0 | 15,6 | 93,7 | 5,4 | 46,0 |
| 6 | 1,0 | 45,0 | 0,6 | 30,9 | 6,9 | 6,1 | 55,0 | 0,7 | 9,6 |
| 7 | 1,0 | 15,0 | 0,6 | 37,9 | 25,3 | 19,3 | 57,8 | 6,0 | 25,7 |
| 8 | 1,0 | 15,0 | 0,2 | 53,0 | 35,3 | 33,0 | 99,0 | 2,4 | 10,1 |
| 9 | 1,0 | 45,0 | 0,6 | 74,8 | 16,6 | 10,9 | 98,1 | 5,7 | 73,5 |
| 10 | 1,0 | 30,0 | 0,6 | 32,7 | 10,9 | 5,3 | 31,6 | 5,6 | 48,1 |
| 11 | 1,0 | 30,0 | 0,5 | 57,2 | 19,1 | 14,4 | 86,4 | 4,7 | 40,0 |
| 12 | 1,0 | 30,0 | 0,5 | 29,0 | 9,7 | 8,7 | 52,1 | 1,0 | 8,4 |
| 13 | 1,0 | 30,0 | 0,5 | 75,7 | 25,2 | 14,1 | 84,7 | 11,1 | 95,2 |
| 14 | 1,0 | 4,9 | 0,2 | 24,2 | 49,4 | 11,2 | 11,0 | 38,2 | 53,5 |
| 15 | 1,0 | 55,1 | 0,4 | 70,7 | 12,8 | 9,0 | 99,3 | 3,8 | 60,2 |

ANEXO B. CULTIVOS (*Chlorella* y Vinazas) Y MONTAJES DE EXTRACCIÓN A 105 Y 4,8°C



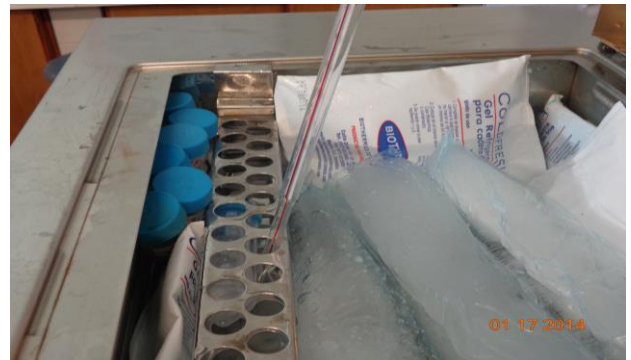
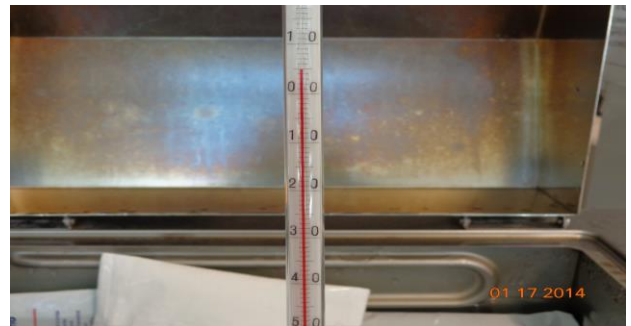
A. Cultivo de microalgas



B. Cultivo de Vinazas



C. Baño de maría 105°C



D. Baño de maría 4,8°C

ANEXO C. MÉTODO DE CULTIVO *Chlorella vulgaris*

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, 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 ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

ANEXO D. PREPARACIÓN SOLUCIONES A-B-C PROTOCOLO DE LOWRY

3. PREPARING the SOLUTIONS

- The Lowry solution is a mixture of the above chemicals, except the Folin Reagent. The Lowry solution should be prepared fresh, at the day of measurement. Though the individual solutions for the Lowry solution can be prepared in advance and then mixed at the day of measurement. **Personal note:** Different than the protocol given by Gerhardt *et al.* (1994), I dissolve $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$ and $\text{Na}_2\text{Tartrate} \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ separately. Please compare this protocol and the one given by Gerhardt *et al.* (1994). You can find my calculations for this comparison at the end of this protocol. Use ddI water.
- Solution A is a dilute alkali solution. 2N Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent contains hydrochloric and phosphoric acids. So, **wear gloves, goggles, lab coat, and work carefully**

SOLUTION A (alkaline solution) (for 500 mL)

2.8598 g NaOH

14.3084 g Na_2CO_3

SOLUTION B (for 100 mL)

1.4232 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$

SOLUTION C (for 100 mL)

2.85299 g $\text{Na}_2\text{Tartrate} \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$