

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VINAZAS EN LA COMPOSICIÓN DE *Chorella vulgaris* UTEX 1803 PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO**

**Omar Alfredo Rios Cárdenas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2013**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VINAZAS EN LA COMPOSICIÓN DE *Chorella vulgaris* UTEX 1803 PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO**

**Omar Alfredo Rios Cárdenas**

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

**Directores**

**PhD. Viatcheslav Kafarov**

**M.Sc. Crisóstomo Barajas**

**Codirector**

**Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

2013

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía, por su acogida, apoyo y colaboración.*

*Al Doctor Viatcheslav Dafarov y Crisóstomo Barajas, por su dirección.*

*Al Codirector Andrés Barajas, por sus enseñanzas, sus consejos, conocimientos y tiempos compartidos.*

*A nuestros profesores y compañeros, por sus enseñanzas, consejos, conocimientos y tiempos compartidos*

*Finalmente a la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER por darnos la oportunidad de una formación integral como Ingenieros Químicos.*

## **DEDICATORIA**

*A Dios, fuente de vida y sabiduría*

*A mis padres Gustavo Rios y Marina Cárdenas,  
Hermanos Hernan, Lida y Maria Alejandra,  
por todo el amor, confianza e incondicional apoyo en este primer gran sueño*

*A todas personas que me apoyaron, creyeron en mí y hacen parte  
de nuestro día a día con sus alegrías y buenos deseos, en especial  
Laura Flores y mis amigos*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>18</b>
1.1 Cultivo y preparación del inóculo .....	19
1.2 Producción de vinazas .....	19
1.3 Caracterización de la vinaza producida.....	20
1.4 Montaje experimental .....	21
1.5 Cuantificación de Biomasa .....	22
1.6 Determinación de Proteínas totales.....	22
1.7 Cuantificación de Carbohidratos .....	22
1.8 Extracción de lípidos.....	23
<b>2. RESULTADOS Y ANALISIS</b> .....	<b>24</b>
2.1 Producción y productividad de la biomasa.....	24
2.2 Composición de las vinazas .....	26
2.3 Caracterización de los metabolitos.....	28
2.3.1 Proteínas .....	28
2.3.2 Carbohidratos.....	29
2.3.3 Lípidos.....	33
2.4 Producción de metabolitos.....	33
<b>3. CONCLUSIONES</b> .....	<b>35</b>
<b>4. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de la metodología .....	18
<b>Figura 2.</b> Producción de biomasa en función del tiempo los 5 tratamientos.....	25
<b>Figura 3.</b> Producción de biomasa durante el tiempo para la vinaza industrial y de laboratorio.....	26
<b>Figura 4.</b> Variación de la composición de las vinazas con el tiempo.....	27
<b>Figura 5.</b> Porcentaje en la composición de la biomasa durante los 18 días.....	31

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de macronutrientes y micronutrientes del medio Bol Basal.....	19
<b>Tabla 2.</b> Composición química de la Vinaza provenientes de la Melaza de caña.....	20
<b>Tabla 3.</b> Composición de los bioreactores inoculados con biomasa diluida.....	21
<b>Tabla 4.</b> Composición de los bioreactores inoculados con biomasa concentrada.....	21

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VINAZAS EN LA COMPOSICIÓN DE *Chorella vulgaris* UTEX 1803 PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO\*

**AUTOR:** OMAR ALFREDO RIOS CÁRDENAS\*\*

**PALABRAS CLAVE:** heterotrófico, inoculación, vinaza, bioreactor.

### CONTENIDO:

Se evaluó el cambio en la composición de metabolitos en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 cultivada en vinazas a escala laboratorio. Se realizaron 5 tratamientos diferenciándose en la forma de inoculación: microalga diluida: vinazas (D1=1:4 y D2=1:10) y concentrada mediante centrifugación C1= 0,5 g/L, C2= 1 g/L y C3= 1,5 g/L. Todos los tratamientos se realizaron en bioreactores plásticos de 2,5 litros con un volumen de trabajo de 2 litros a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un flujo continuo de aire y en total oscuridad durante 18 días.

En los 10 primeros días se aprecia un rápida producción de biomasa en todos los tratamientos, logrando una productividad promedio de  $0,87\text{g/L}\cdot\text{d}$ , después de este día la productividad de biomasa comienza a disminuir, alcanzando una producción promedio de  $11,8\text{g/L}$  al 16º día. Durante los primeros 8 días se observa una disminución en la concentración de la mayoría de los metabolitos para todos los tratamientos, esto debido a un periodo de adaptación de las microalgas al nuevo medio de cultivo. A partir del 10º día la concentración de los metabolitos en la biomasa empieza a aumentar hasta estabilizarse alrededor del 16º día, alcanzando valores máximos promedios de: proteínas 48,95%, xilosa 2,88%, glucosa 7,82%, arabinosa 4,54%, fructosa 8,28% y lípidos 1,83%, siendo poco significativa la diferencia de los valores para los distintos tratamientos.

Este estudio comprobó que las vinazas son un excelente medio de cultivo para la *Chlorella vulgaris* y presenta poca variación en la composición y productividad de la biomasa con respecto a la forma de ser inoculadas, las cuales podrían ser aplicadas en procesos industriales debido a su cultivo heterotrófico similar al cultivo de levadura en procesos fermentativos.

---

\* Proyecto de Grado. Modalidad investigación.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Biol. Andrés Barajas

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF THE EFFECT OF VINASSES ON *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 COMPOSITION FOR BIOFUELS PRODUCTION AND VALUE-ADDED PRODUCTS \*

**AUTHOR:** OMAR ALFREDO RIOS CÁRDENAS\*\*

**KEYWORDS:** heterotrophic, inoculation, vinasses, bioreactor.

### CONTENTS:

Changes in the composition of metabolites in *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 cultivated vinasses laboratory scale were assessed. Five treatment with different inoculation were performed: dilute microalgae: vinasses (D1 = D2 = 1:4 and 1:10) and concentrated microalgae by centrifugation C1 = 0.5 g / L, C2 = 1 g / L and C3 = 1.5 g / L. All treatments were performed in 2.5 liter plastic bioreactors with a working volume of 2 liters at  $25 \pm 1$  ° C, continuous air flow and total darkness for 18 days.

In the first 10 days a speedy production of biomass in all treatments can be appreciated achieving an average productivity of 0.87 g / L \* d, after the 10th day biomass productivity begins to decrease reaching an average production of 11.8 g / L at 16th day. During the first 8 days a decrease in the concentration of most of the metabolites for all treatments can be perceived, this due to an adaptive period to a new culture medium for the microalgae. From day 10 the concentration of metabolites in the biomass starts to increase until it stabilizes around the 16th day reaching maximum average values of: 48.95% protein, 2.88% xylose, 7.82% glucose, 4.54% arabinose, 8.28% fructose and 1.83% lipids, with slight difference in the values for the different treatments.

This study verified that vinasses are an excellent culture medium for *Chlorella vulgaris* and shows slight variation in the biomass composition and productivity regarding how to be inoculated, which could be applied in industrial processes due to its heterotrophic culture similar to the yeast culture in fermentation processes.

---

\* Working Grade. Research mode.

\*\* Physicochemical Engineering Faculty. School Of Chemical Engineering. Director: Ph.D. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Biol. Andrés Barajas

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo social sostenible requiere de vías tanto económicas como ecológicamente aceptables para la producción de energía y combustibles (Douskova et al., 2010). Actualmente, el incremento poblacional, la industrialización y la expansión de la agricultura han traído consigo el aumento dramático en la demanda de agua de calidad, escasa debido a la limitación de recursos hídricos (Farril et al., 2003); 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 et al., 2006), además las altas concentraciones de carbono y otros nutrientes presentes en las aguas residuales, han saturado la capacidad de los ecosistemas para lidiar con estos efluentes (Boursier et al., 2005; Olguin, 2003). La composición de las aguas residuales varía profundamente, 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 (de Bashan et al., 2004a), consecuentemente la emisión de estas aguas residuales genera una amenaza constante al suministro global de agua fresca (Montaigne & Essick, 2002), y genera la eutrofización (crecimiento excesivo de algas y/o otros organismos como respuesta a una concentración excesiva de nutrientes en ríos, lagos y mares a nivel mundial) (Lau et al., 1997; Trepanier et al., 2002), provocando una pérdida masiva de organismos acuáticos tales como peces, aves y eventualmente, la pérdida total del ecosistema (An et al., 2003). Para evitar este tipo de problemas han surgido una serie de normas ambientales que regulan los niveles de carga orgánica, nitrógeno y fósforo que pueden contener las aguas ya tratadas (García & Mujeriego, 2000).

Antes de poder descargar las aguas residuales en los cuerpos acuíferos, es necesario remover tanto el nitrógeno (N) como el fósforo (P) presente, esto no

siempre se lleva a cabo, originando un nivel de contaminación cada vez mayor. Actualmente, la industria del tratamiento de aguas residuales posee varios métodos para remover tanto fósforo como nitrógeno (Duenas et al., 2003), pero aquellos nutrientes que no pueden ser solubilizados en las aguas residuales terminan en rellenos sanitarios después de quemar la carga orgánica que los acompaña o usado como fertilizante, siempre y cuando el tratamiento elimine patógenos y compuestos nocivos para la humanidad (Martínez et al., 2000).

El tratamiento que ocurre en los pozos de estabilización resulta de la compleja simbiosis entre bacterias y algas, el cual posee patrones diferentes a los que pueden ser observados en cultivos puros. Cambios periódicos en el pH, temperatura e intensidad solar controlan la abundancia y actividad de grupos específicos de microorganismos pertenecientes a las comunidades microbiales las cuales son características de los pozos facultativos (Wilderer et al., 1991; Murakani et al., 1992; Humenik & Hanna, 1971; Varma & Nepal, 1972). El tiempo de retención y las características del efluente también influyen sobre las actividades simbióticas tanto para bacterias como para algas. El uso de luz natural como fuente de energía, implica un sistema que está sujeto a cambios ambientales y al régimen de luz oscuridad (Guterman et al., 1990).

Muchas de las aguas residuales provienen de efluentes de procesos industriales, por ejemplo la producción de bioetanol, este proceso genera una gran cantidad de residuos líquidos (vinazas) que contiene una alta carga de sales de potasio, fósforo, nitrógeno, metales pesados, materia orgánica, bajos pH, color oscuro, alta demanda bioquímica y química de oxígeno y derivados fenólicos y sulfónicos que producen mal olor (Singh & Patel, 2012); un metro cubico de vinazas equivale a la contaminación generada por 1000 habitantes (Travieso et al., 2008), esto conlleva a pérdidas de ecosistemas.

Con la ley 693 del año 2001 y su Resolución reglamentaria 189687, de julio 17 de 2003; se establece que a partir de septiembre de 2005, la gasolina en Colombia debería tener oxigenantes con el fin de disminuir las emisiones de contaminantes

al medio ambiente, por lo cual se optó utilizar 10% de bioetanol en la gasolina, esto permitiría disminuir en 6 millones de toneladas/año de CO<sub>2</sub> atmosférico. El Bioetanol obtenido a partir de la caña de azúcar, es en el cual se ha centrado la producción en Colombia; actualmente para atender la demanda de ciudades como Bogotá, Medellín, Cali y Barranquilla donde es obligatorio el uso de esta mezcla se requiere de un millón cien mil litros Bioetanol, lo que genera como subproducto una cantidad mayor de vinazas. La proporción de vinazas producidas por cada litro de Bioetanol esta entre los 13 y 15 litros (Ferreira & Montenegro, 1987), aunque actualmente con el uso de nuevas tecnologías como la Praj Delta que utiliza una recirculación del 70%, se han alcanzado producciones de vinazas del orden de 2,5 litros por litro de Bioetanol. Gran parte de estas vinazas son utilizadas como fertilizantes de los suelos de cultivo (Maiorella et al. 1983), pero este uso se ve limitado por el tipo de suelo y la cantidad de nutrientes que los cultivos necesitan (Maynard et al. 1999), por esto es necesario transportar cierta cantidad a piscinas de almacenamiento para su posterior tratamiento, ya que estas generan un gran daño ambiental al ser vertidas directamente. Debido a la creciente demanda de Bioetanol en el mercado Colombiano, el tratamiento de las vinazas como principal subproducto, se ha convertido en uno de los problemas de esta industria, por tal razón se hace necesario nuevos y más eficientes métodos para poder disponer de estas.

La ficorremediación puede definirse como el uso de macro y microalgas para la remoción y transformación de la polución, incluyendo nutrientes y xenobióticos presentes en las aguas residuales, además del CO<sub>2</sub> presente en el aire (Olguín, 2003), esta metodología comprende varias aplicaciones: (a) remoción de nutrientes en aguas residuales y efluentes ricos en materia orgánica; (b) tratamiento de aguas residuales industriales con trazas de metales y ácidos; (c) secuestro de CO<sub>2</sub>; (d) transformación y degradación de xenobióticos y (e) detección de compuestos tóxicos utilizando sensores a base de algas (Ayala & Bravo, 1984; Costa et al., 2000; Olguin et al., 2001; Olguin, 2003; Jimenez & Perez et al., 2004).

El sistema fotosintético de tratamiento de aguas residuales no es nuevo, ya que este programa apareció por primera vez en 1963 (Mallick, 2002). El cultivo de microalgas en agua residuales ofrece un tratamiento de estas, además la producción de biomasa microalgal, la cual puede luego ser explotada para la obtención de proteínas y aditivos alimenticios (para acuicultura, consumo animal y humano) (Jimenez & Perez et al., 2004), energía como la obtención de biogás y combustibles (Ambati et al., 2006; Baba et al., 2011; Berberoglu et al., 2009; Choi et al., 2010; Dayananda et al., 2005, 2006; Eroglu et al., 2010; Eroglu & Melis, 2010; Gardner et al., 2010; Kita et al., 2010; Rivas et al., 2010; Tanoi et al., 2010; Weiss et al., 2010; Zhang et al., 2011; Zhila et al., 2011), en la agricultura (fertilizantes y acondicionadores de suelos), productos farmacéuticos, cosméticos y otros productos de alto valor agregado.

En comparación con el sistema heterotrófico de lodos activados, el principal atractivo del tratamiento con microalgas es el bajo nivel tecnológico y coste energético necesarios, ya que la producción de oxígeno vía fotosíntesis puede reemplazar el aireamiento mecánico (Hoffman, 1998; Bich et al., 1999; Hosetti & Frost 1998; Kilani 1992; Kayombo et al. 2002; Tarlan et al. 2002; Kirkwood et al. 2003); Sin embargo una de las principales limitaciones para este tipo de tratamientos son los sistemas de separación y cosecha de las microalgas de los medios de cultivo (Hoffman, 1998; Bich et al., 1999). Un sistema eficiente para la remoción de la biomasa es esencial para poder completar el reciclado de los nutrientes de las aguas residuales (Martínez et al., 2000). Diferentes tecnologías se han utilizado para su cosecha, varían desde una simple filtración hasta una centrifugación intensiva de la biomasa (Richmond & Becker 1986; Mohn 1988; Oswald 1988).

El rol de las algas puede ser directo o indirecto (Nurdogan & Oswald, 1995), ya que el secuestro de nutrientes y su deposición en las células representa la remoción directa, mientras que durante la fotosíntesis microalgal el pH se eleva, generando la precipitación del amonio y orto fosfatos presentes, causando una remoción indirecta de estos agentes. Por esto la remoción eficiente en sistemas

HARP está controlada por los parámetros que determinan el crecimiento microalgal, como lo son el tiempo de retención celular, radiación solar y temperatura. Muchos estudios acerca del efecto de las algas en estos sistemas apuntan a que la remoción es mejor de forma indirecta que forma directa (Picot et al., 1991; El Halouani et al., 1993). Desde entonces no existe un estudio tan relevante como el de los sistemas HARP. Además de los sistemas realizados por Oswald en St. Helena y Hollister en California, USA (Oswald, 1978, 1988, 1991) y a escala piloto en la universidad de California, (Oswald, 1991; Oswald et al., 1994), existen otros sistemas, como los pozos de alto secuestro en Israel (Shelef and Azov, 1987), España (García et al., 2000), Francia (Pagand et al., 2000), Escocia (Fallowfield et al., 1999), y nueva Zelanda (Craggs, 2001; Craggs et al., 2000).

En el 2002 Valderrama et al 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 aeróbico o anaeróbico, dando como resultado un excelente medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas (Travieso et al., 1999), las microalgas también realizaron una buena remoción del nitrógeno y fósforo superiores al 85% y de solidos totales superiores al 90% (Travieso et al., 2008). En investigaciones desarrolladas por el CIDES, las vinazas han sido utilizadas directamente como medio de cultivo para la *C. vulgaris* dando productividades de Biomasa altas y estabilizando su pH ácido, sin alcanzar la remoción total de carga orgánica (Castro & Parra, 2011), la *C. vulgaris*, es utilizada debido a su fácil adaptabilidad y su rápido crecimiento (Brennan & Owende, 2010), teniendo una capacidad de crecimiento tanto autotróficamente como heterotróficamente, este último necesaria para el crecimiento en vinazas, debido a su color oscuro que impiden el paso de luz para realizar procesos fotosintéticos.

La biomasa que se obtiene de este tipo de cultivo, es necesario realizarle estudios para analizar que tipo de metabolitos presentan, para obtener una valoración

integral de la biomasa y de este modo poder aprovecharlos correctamente bajo un proceso denominado biorefinería (González & Kafarov, 2011). Las biorefinerías son instalaciones donde se integran procesos de conversión de biomasa y infraestructuras para producir combustibles, energía, materiales y otras sustancias químicas tomando como materia prima la biomasa. Una biorefinería toma ventaja de las diferencias de los metabolitos existentes en la biomasa para maximizar el valor derivado de esta (Fatih Demirbas, 2009).

Siguiendo con los estudios realizados por el grupo de investigación CIDES en el tratamiento de las vinazas y obtención de Biomasa de *C. vulgaris*, se determinara la producción de biomasa y metabolitos presentes en esta, durante y al finalizar un lapso de tiempo, variando la forma de inoculación de las microalgas; los metabolitos a medir serán los carbohidratos, proteínas y lípidos, mediante protocolos y métodos establecidos por el CIDES como los más óptimos. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las vinazas en la composición de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para la producción de biocombustibles y productos de valor agregado.

## 1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

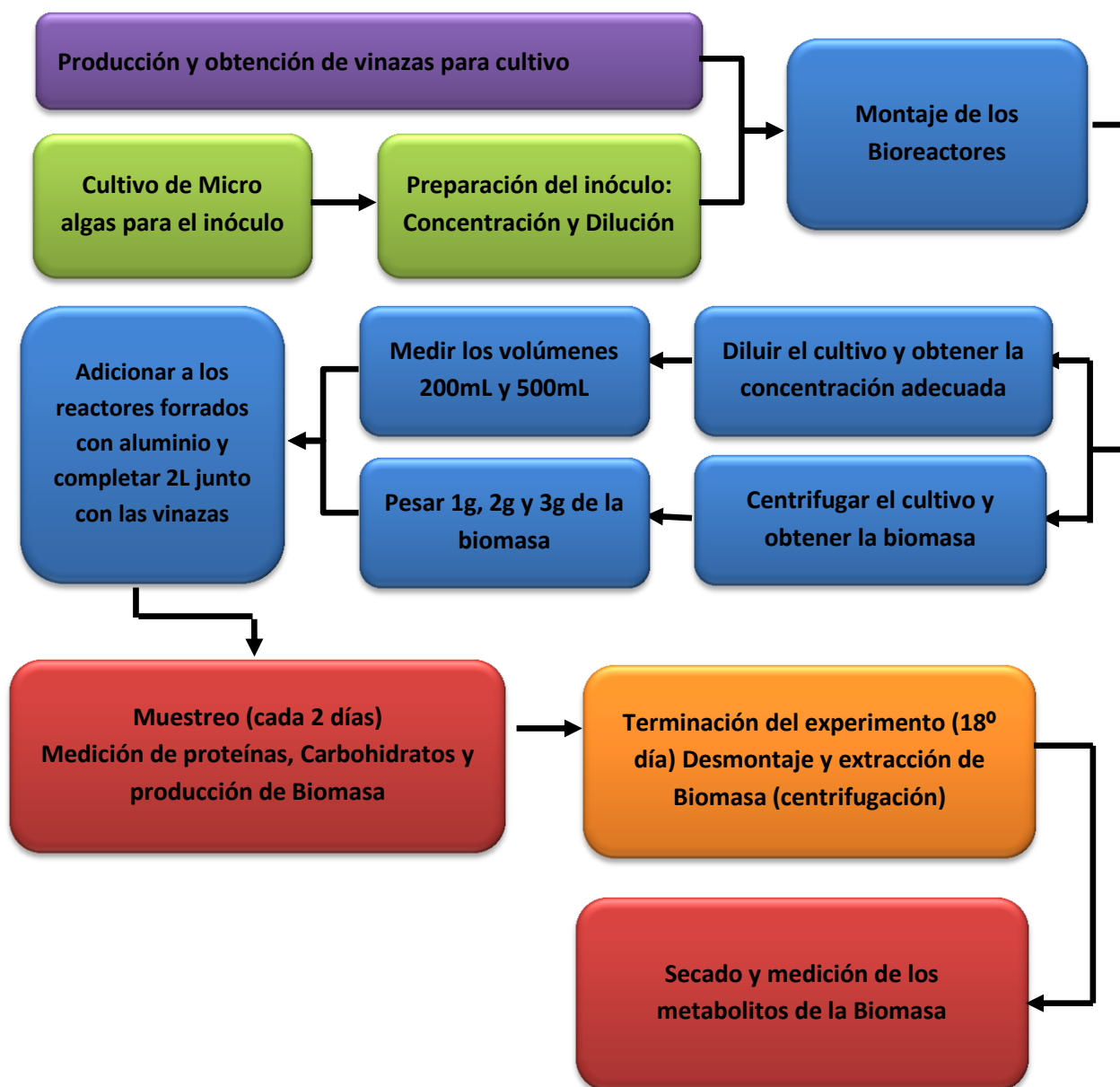


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología

### 1.1 Cultivo y preparación del inoculo

La *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 de los macronutrientes y micronutrientes aparecen en la Tabla 1.

MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
Componente	Concentración [g/L]	Componente	Concentración [g/L]
NaNO <sub>3</sub>	2,94 X 10 <sup>-3</sup>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,07 X 10 <sup>-5</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,04 X 10 <sup>-4</sup>	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,28 X 10 <sup>-6</sup>
NaCl	4,28 X 10 <sup>-4</sup>	MoO <sub>3</sub>	4,93 X 10 <sup>-6</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,31 X 10 <sup>-4</sup>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	6,29 X 10 <sup>-6</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,29 X 10 <sup>-3</sup>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,68 X 10 <sup>-6</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,70 X 10 <sup>-4</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,85 X 10 <sup>-4</sup>
		EDTA	1,71 X 10 <sup>-4</sup>
		KOH	5,53 X 10 <sup>-4</sup>
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,79 X 10 <sup>-5</sup>

**Tabla 1.** Composición de macronutrientes y micronutrientes del medio Bol Basal

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 ± 2°C, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO<sub>2</sub> considerándose este cultivo como tratamiento control.

### 1.2 Producción de vinazas

La vinaza utilizada fue obtenida 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°C durante 1 hora, posteriormente se enfrió hasta los 40°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 (144g), sulfato de magnesio (24g), urea (24g) y Roca fosfórica (10g), utilizados para la activación de 500g 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 °C, realizándose en dos etapas cada una con un tiempo promedio de 210 minutos.

### 1.3 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 2 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.

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

Tabla 2. Composición química de la Vinaza provenientes de la Melaza de caña

#### 1.4 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  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 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, se recubrieron los reactores con papel aluminio para impedir en su totalidad el paso de la luz, permitiendo así un ciclo luz:oscuridad de 0:24 h.y también evitar posibles ruidos en la medición por procesos fotosintéticos.

Con el fin de comprobar el efecto de las vinazas en la composición de la biomasa microalgal se probaron diferentes diluciones de inóculo en vinaza (Tabla 3 y 4). Cada uno de los experimentos se realizaron por triplicado durante 18 días.

Vinazas (mL)	Inóculo <i>C. vulgaris</i> (mL)	Tratamiento
1500	500	D1
1800	200	D2

Tabla 3. Composición de los bioreactores inoculados con biomasa diluida

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

Tabla 4. Composición de los bioreactores inoculados con biomasa concentrada

### **1.5 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  $\mu$ m 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.

### **1.6 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 remueve el sobrenadante con precaución de no retirar el pellet, se adiciona 5 ml de agua destilada agitandose con el fin de hacer una mezcla homogénea, se vuelve a centrifugar para retirar el sobrenadante, esto se realiza con el fin de retirar en su totalidad rastros del medio de cultivo que pueda alterar la medición. Al pellet obtenido se le adiciona 1mL de solución de NaOH 1M y homogeniza, se centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos y se procede a retirar el sobrenadante, al pellet se repite el procedimiento anteriormente descrito pero esta vez se toma el sobrenadante teniendo cuidado que en este proceso no se vaya arrastrar biomasa; a este se le adicionan 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 mide la absorbancia a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck).

### **1.7 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, se

remueve el sobrenadante con precaución de no retirar el pellet, se adiciona 5 mL de agua destilada y se mezcla, luego se vuelve a centrifugar y retira 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 adiciona al pellet 1mL de fenol al 5% se homogeniza la mezcla y adiciona 5 mL de ácido sulfúrico al 95%. Por último se hacen las diluciones necesarias para que la muestra pueda ser medida por el espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a longitudes de onda de 480nm 485nm 488nm y 490nm para identificar Xilosa, Arabinosa Fructosa y Glucosa (Dubois et al., 1956)

### **1.8 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 toman 5 g de muestra, se llevan al horno durante 3 horas y posteriormente al desecador por 1 hora, se pesan 2g 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 es llevado al horno a 105°C por 24 horas para garantizar la evaporación total del hexano y el agua, se pasa a un desecador por 12 horas se pesan en una balanza analítica; por diferencia de peso entre el balón antes y después de la extracción, se determina la cantidad de lípidos extraídos.

## 2. RESULTADOS Y ANALISIS

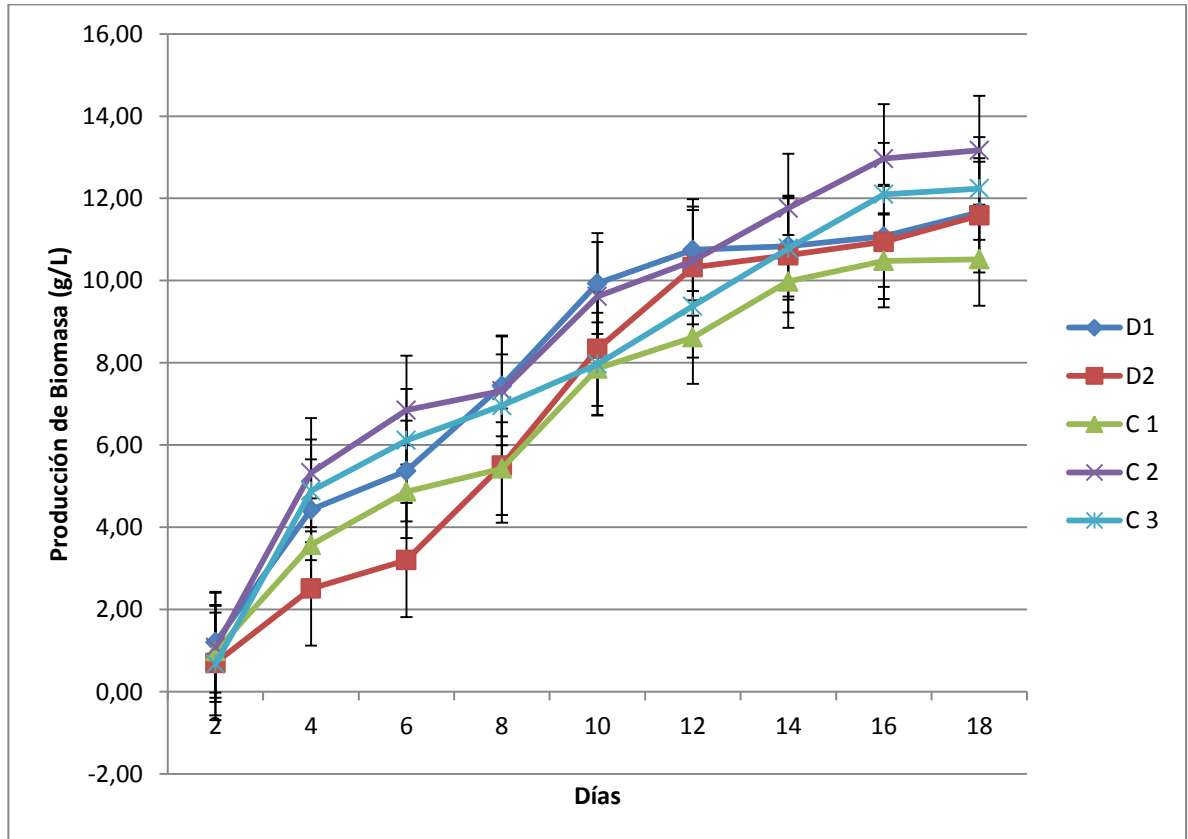
### 2.1 Producción y productividad de la biomasa

Las microalgas tienen la capacidad de absorber rápidamente nutrientes y CO<sub>2</sub>, 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 ellos es muy similar con una desviación estándar 0,97 g/L y 0,054 g/L\*d al 18º día, 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 2). Este aumento significativo en la producción de biomasa, se debe al aprovechamiento de las altas concentración de nutrientes en las vinazas como fosfatos, nitratos, carbono orgánico, entre otros (Pathak et al., 1999) y a la rápida adaptabilidad que tiene *C. vulgaris* a este nuevo medio de cultivo.

Liu et al. (2012) utilizaron molasas diluidas y pretratadas 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

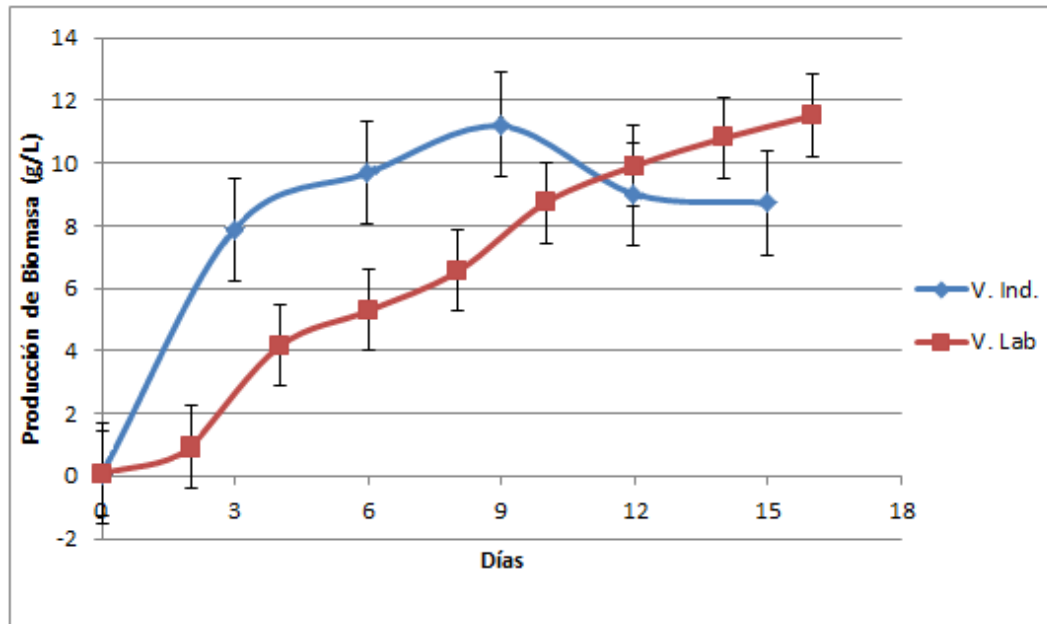
tiempo, la producción es mayor al compararla con la biomasa a partir de vinazas, pero la duplicación ocurre en un tiempo similar.



**Figura 2.** Producción de biomasa en función del tiempo los 5 tratamientos

Se comparó la producción de biomasa obtenida a partir de vinaza producida a nivel industrial proporcionada por una empresa, con la producción promedio del caso de estudio, en esta se pudo observar que el comportamiento es muy similar, sin embargo al inicio de la experimentación la producción de biomasa es un poco mayor para la vinaza industrial, llegando a un valor de 11,78 g/L cercano a la producción máxima obtenida a partir de las vinazas de laboratorio al 9º día, después de este día se presenta una caída en la producción de biomasa de la vinaza industrial hasta 8,73 g/L (Figura 3), la caída en la producción no se alcanza a observar en el tiempo de estudio de las vinazas obtenidas en el laboratorio. Esta

diferencia en el comportamiento de las vinazas se debe al cambio en la composición de las 2 vinazas y a una mayor carga de sustancias que contienen las vinazas a nivel industrial debido a la recirculación de las mismas, lo cual afectaría la producción total de biomasa como lo reporto Liu et al., (2012) en sus estudios.

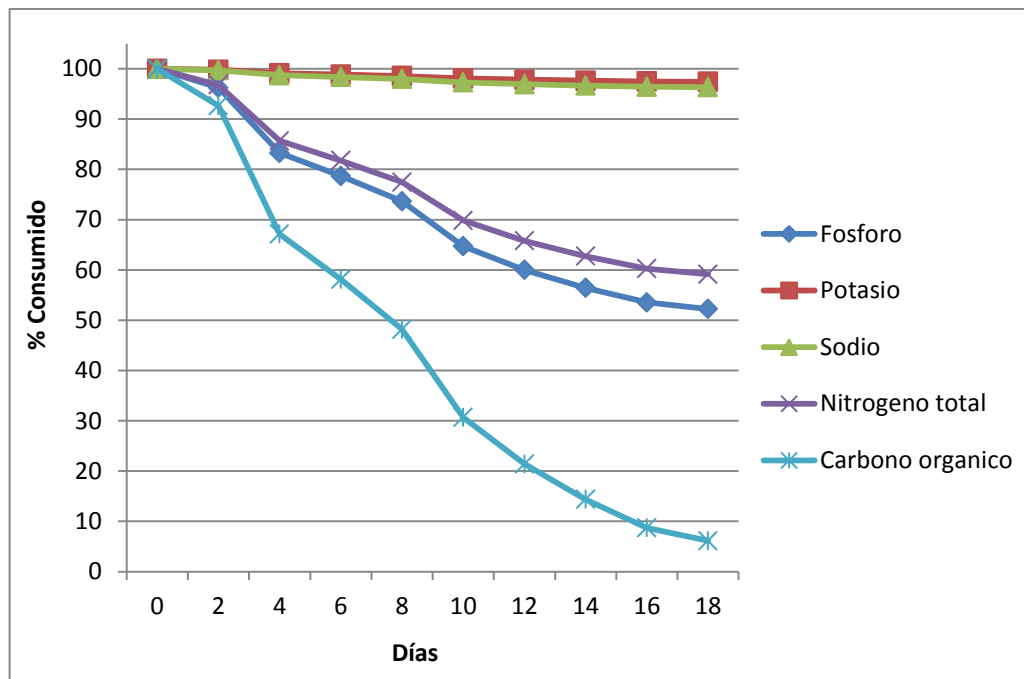


**Figura 3.** Producción de biomasa durante el tiempo para la vinaza industrial y de laboratorio

## 2.2 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 4; 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) logro la eliminación entre 600-

1000 mg/L de nitrógeno en un fotobioreactor continuo con vinazas pretratadas anaerómicamente y con ciclo de luz/oscuridad de 12/12, comparado con estos resultados la eliminación en los dos tratamientos es muy cercana, aunque las vinazas utilizadas en este estudio no se le realizó ningún tipo de pretratamiento. Valderrama et al. (2002) realizó cultivos de *C. vulgaris* en efluentes de destilería pretratadas anaerómicamente, 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 4.** 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) Realizo cultivos conjuntos de microalgas *C. vulgaris* y *Lemma minuscule* en efluentes de destilería pretratadas anaerómicamente, 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. minuscula* 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 fotobio-reductores, 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.

## **2.3 Caracterización de los metabolitos**

### **2.3.1 Proteínas**

En la Figura 5 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% con una desviación estándar de 5.21%, 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 5 a partir del 12º día la concentración (p/p) de proteína empieza a tender a un valor estable para todos los tratamientos y la diferencia entre sus valores se hace menor, por lo cual su desviación estándar

comienza a disminuir de un valor de 3,71% a 1,12% al 18º día, 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%. Fábregas et al. (1989) demostró 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

### **2.3.2 Carbohidratos**

El grupo de carbohidratos 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 los 5 tratamientos no presentan diferencias significativas en la presencia de los carbohidratos al final del experimento como se puede ver en la Figura 5.

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.

#### **2.3.2.1 Xilosa**

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), con un desviación estándar máxima de 0,89% al 8º día. 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), disminuyendo la desviación estándar entre los tratamientos a 0,20%. 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.

#### 2.3.2.2 *Glucosa*

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), con una desviación máxima alcanzada al 8º día de 2,44%, 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), durante este intervalo de tiempo se logró pasar de una desviación de 2,13% a 0,034% (p/p) al 18º día. 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).

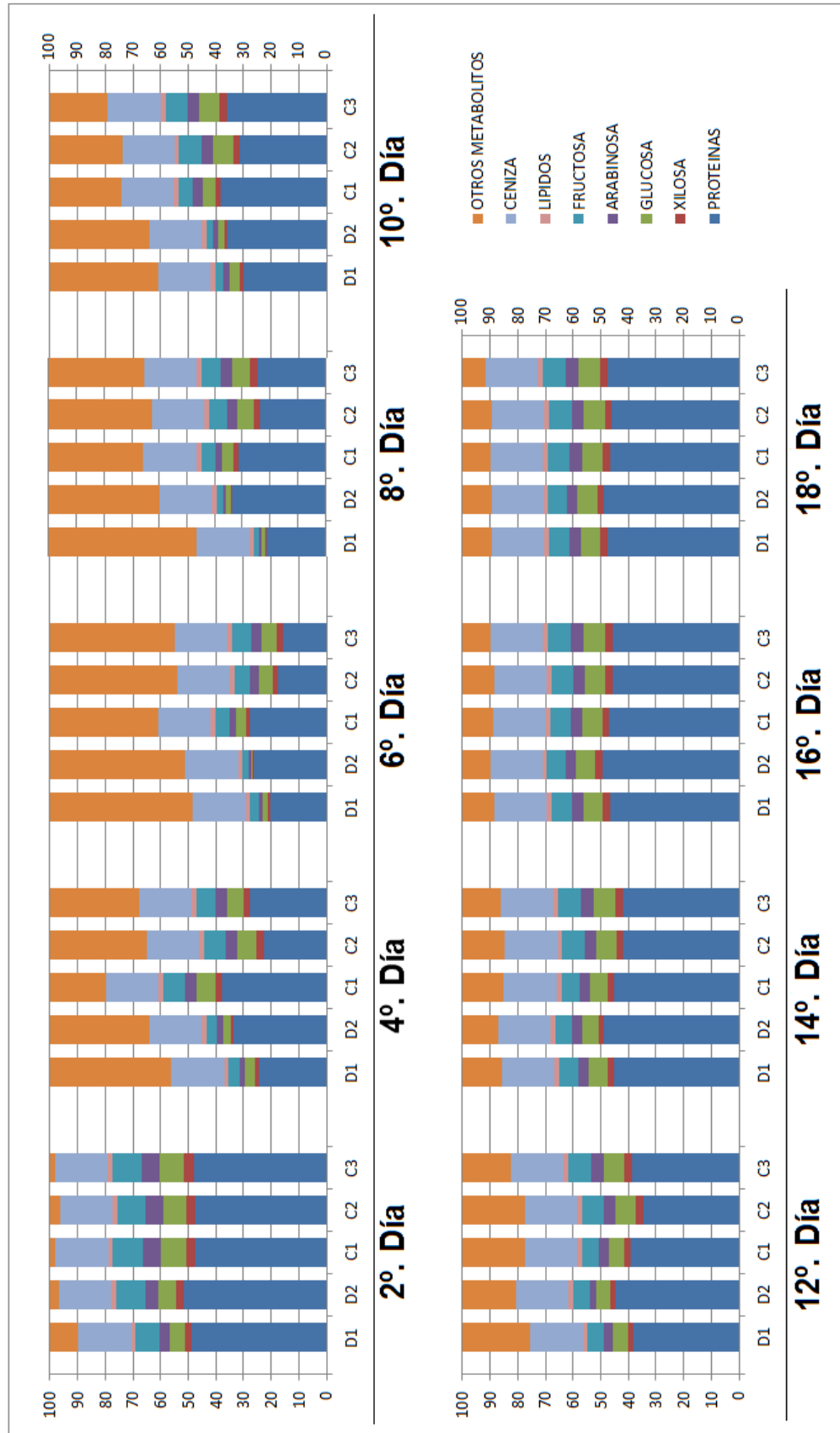


Figura 5. Porcentaje en la composición de la biomasa durante los 18 días

### 2.3.2.3 Arabinosa

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), con una desviación estándar de 1,37% al 8º día. A partir del 10º día cuando la concentración de este metabolito comienza a aumentar, la diferencia entre ellos también, pasando de una desviación de 1,13% a 0,32% al 18º día, alcanzando valores máximos de concentración (p/p) de D1=4,07%, D2=3,78%, C1=4,50%, C2=4,17% y C3=4,54%.

### 2.3.2.4 Fructosa

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) con una desviación estándar máxima de 2,46 al 8º día, los valores máximos son D1=7,52%, D2=6,85%, C1=7,87%, C2=8,41% y C3=8,28% (p/p) decayendo la desviación estándar al 18º día a 0,63%.

Los carbohidratos 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). Algunos cepas de *C. vulgaris* han logrado concentraciones en la biomasa de 55% (Illan 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 (Illan et al., 2000, D'Souza & Kelly, 2000).

### **2.3.3 Lípidos**

A diferencia de los otros metabolitos, los lípidos presentes en la biomasa 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 5, con una desviación de 0,08 g/L; 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.

## **2.4 Producción de metabolitos**

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. El cultivo heterotrófico es similar a los cultivos de bacterias o levaduras donde utilizan tanques agitados y cerrados esterilizados con calor (Chen 1996; Perez & Garcia et al 2011), lo cual hace el cultivo heterotrófico de microalgas más aplicable a la industria por que no requiere el uso de fotobioreactores, además la biorefinería permitiría el aprovechamiento no solo de los carbohidratos como materia prima sino también de otros metabolitos

valiosos como las proteínas (Fatih Demirbas, 2009). En promedio una destilería produce 100 m<sup>3</sup> de alcohol al 96% por día, generando alrededor de 1300 m<sup>3</sup> de vinazas (Perea 2009), si este volumen de vinaza fuese utilizada para el cultivo de microalgas con una producción diaria cercana a 1 g/L\*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, estos metabolitos podrían ser utilizados en la producción de biocombustibles y otras industrias.

### 3. CONCLUSIONES

- Las tasas de producción de biomasa, altas comparadas con otros medios de cultivo y el cultivo heterotrófico de estas, hace a las vinazas un medio viable para la obtención de biomasa rica en nutrientes, la cual podría ser utilizada después de su bio-refinación como materia prima para procesos fermentativos, alimentarios y otros.
- 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 teniendo en cuenta las desviaciones estándar obtenidas.
- La disminución de la presencia de los metabolitos analizados en la biomasa durante los primeros 8 días se debe al cambio de fotoautótrofas a heterótrofas que presentan las microalgas en el nuevo medio de cultivo.

#### **4. RECOMENDACIONES**

Para trabajos futuros, analizar la factibilidad que tiene la biomasa para ser utilizada como materia prima para procesos fermentativos y los procesos que deben ser utilizados para una correcta extracción de los distintos metabolitos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Cobelas, M., Zarco Lechado, J. (1989). Lipids in Microalgae. A review I. Biochemistry. Grasas y Aceites. Vol.40, fasc. 2: 118-145.
- Ambati, r. Sarada, R. Baskaran, V. Ravishankar, G. (2006). Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated in Vitro Models J. Agric. Food Chem, 54: 4593-4599
- An, J. Sim, S. Lee, j. Kim, B. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. Journal of Applied Phycology, 15: 185–191,
- Aslan, S. Kapdan, I.(2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae ecological engineering, 28: 64–70
- Ayala, Bravo (1984) Animal wastes media for *Spirulina* production. Arch. Hydrobiol, 67: 349–355.
- Baba, M. Kikuta, F. Suzuki, I. Watanabe, M. Shiraiwa, Y. (2011). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. Bioresource Technology.
- Berberoglu, H. Gomez, P. Pilon, L.(2009). Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. Used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer.
- Bich, N.N., Yaziz, M.I., Bakti, N.A.K., (1999). Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. Water Res, 33: 2357–2362.
- Boursier H, Béline F, Paul E (2005). Piggery wastewater characterization for biological nitrogen removal process design. Bioresour Technol, 96: 351–358

- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Rev* 14(2):557–577.
- Brennan, L. Owende, P. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew.Sustain. Energ. Rev.* 14 (2010) 557-577
- Castro. L., Parra. J., 2011. Aprovechamiento de vinazas como medio de cultivo para la producción de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala laboratorio. Universidad Industrial de Santander-Libro de tesis.
- Chen F (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14(11):421–426
- Chen, C. Zhao, X. Yen, H. Ho, S. Cheng, C. Lee, D. Bai, F. Chang, J. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* S1369-703X(13)00075-2
- Choi, G. Kim, B. Ahn, C.Oh, H. (2010). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol*,
- Costa R, MedriW, Perdomo CC (2000) High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Sci. Technol.* 42: 357–362.
- Craggs, R.J., 2001. Ecological engineering to improve wastewater stabilization pond performance. Conference Proceedings on the Ecological Engineering for landscape Services and Products. International Ecological Engineering Conference. Lincoln University, New Zealand, 26–29 November.
- Craggs, R.J., Tanner, C.C., Sukias, J.P.S., Davies-Colley, R.J., 2000. Advanced pond systems: performance under New Zealand conditions. *Water 2000: Guarding the Global Resource Conference*. Auckland, New Zealand, March 2000.

- Dayananda, C. Sarada, R. Bhattacharya, S. Ravishankar, G. (2005). Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry* 40: 3125–3131
- Dayananda, C. Sarada, R. Srinivas, B. Shamala, T. Ravishankar, G. (2006). Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii*
- de-Bashan L. Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003) *Water Research* 38 4222–4246
- Dorey, F., Draves, G. (1998). *Quantitative Analysis Laboratory: A New Approach Funded by the National Science Foundation. University of Central Arkansas: 1-3.*
- Doucha J, Lívanský K (2006) Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sup>-2</sup> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella sp.*) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *J Appl Phycol* 18(6):811–826. doi:10.1007/s10811-006-9100-4
- Doušková, I. Kaštánek, F. Maléterová, Y. Kaštánek, P. Doucha, J. Zachleder, V. (2010). Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. *En Conv and Man.* 606-611.
- Dragone, G. Fernandes, B. Abreu, A. Vicente, A. Teixeira, J. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, *Appl. Energ.* 88 (2011) 3331-3335.
- D'Souza, F. Kelly, G. 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 (2000) 311-329.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–356.

- Duenas, J.F., Alonso, J.R., Rey, A.F., Ferrer, A.S., 2003. Characterisation of phosphorous forms in wastewater treatment plants. *J. Hazard Mater.* 97, 1–3.
- El Halouani H, Picot B, Casellas C, Pena G, Bontoux J (1993) Elimination de l'azote et du phosphore dans un lagunage à haut rendement. *Revue des Sciences de l'Eau* 6: 47–61.
- Eroglu, E. Melis, A. (2010). Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Bioresource Technology*, 101: 2359–2366
- Eroglu, E. Okada, S. Melis, A. (2010). Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *J Appl Phycol* 18
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentration as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*. 83: 289-304.
- Fallowfield, H.J., Martin, N.J., Cromar, N.J., 1999. Performance of a batch-fed high rate algal pond for animal waste treatment. *Eur. J. Phycol.* 34, 231–237.
- Fatih Demirbas, M. (2009). Biorefineries for biofuel Upgrading: A critical review. *Applied Energy* 86: S151-S161.
- Ferreira, S. E.; Montenegro, O. A. 1987. Efeitos da aplicacao da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. *Boletín Técnico COPERSUCAR (Brasil)* v.36, p.1-7.
- Garcia, J. Mujeriego, R. Hernandez-Martinez. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen. *Journal of Applied Phycology* 12: 331–339,

- Gardner, R. Peters, P. Peyton, B. Cooksey, K. (2010). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *J Appl Phycol*
- Gloria, N.A. DA; Orlando Filho, J. 1983. Aplicacao da vinhaça como fertilizante. *Boletín Técnico PLANALSUCAR (Brasil) v.5 no.1, p.5-38.*
- 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, Bucaramanga, Colombia: 11pp.
- González, A., Kafarov, V. (2011). Microalgae based biorefinery: Issues to consider. *Ciencia, Tecnología y Futuro. 4:4: 5-22.*
- Guterman, H., Vanshak, A., Ben-Yaakov, S., 1990. A macromodel for outdoor algal mass production. *Biotechnol. Bioeng. 35, 809–819.*
- Hosetti, B., & Frost, S. (1998). A review of the control of biological waste treatment in stabilization ponds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 28(2), 193–218.*
- Humenik, L.E., Hanna, G.P., 1971. Algal-bacterial symbiosis for removal and conservation of wastewater nutrients. *J. Water Pollut. Control Federation 43 (4), 580–593*
- 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: 631–635.*
- J.P. Hoffmann, Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae, *J. Phycol. 34 (1998) 757–763.*
- Jerez. S., Rueda. L., Alfonso. L., Barajas. A., Barajas. C., Viatcheslav. K., 2012. Improvement of lab–scale production of microalgal carbohydrates for biofuel production. *Ciencia, Tecnología y Futuro - Vol. 5 Num. 1 Dec. 2012 Pag. 103-116*

- Jimenez-Perez MV, 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
- Kalavathi DF, Uma L, Subramanian G (2001) Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme Microb Technol* 29:246–250.
- Kayombo, S., Mbwette, T. S. A., Mayo, A. W., Katima, J. H. Y., & Jørgensen, S. E. (2002). Diurnal cycles of variation of physical–chemical parameters in waste stabilization ponds. *Ecological Engineering*, 18, 287–291.
- Kilani, J. H. (1992). Studies on the treatment of dairy wastes in an algal pond. *Water South Africa*, 18(1), 57–62.
- Kirkwood, A. E., Nalewajko, C., & Fulthorpe, R. R. (2003). Physiological characteristics of cyanobacteria in pulp and paper waste-treatment systems. *Journal of Applied Phycology*, 15, 325–335. 22
- Kita, k. Okada, S. Sekino, A. Imou, K. Yokoyama, S. Amano, T. (2010). Thermal pre-treatment of wet microalgae harvest forefficient hydrocarbon recovery. *Applied Energy*, 87: 2420–2423
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y. and Wong, Y. S. (1997) 'Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella Vulgaris*', *Environmental Technology*, 18: 9, 945 — 951
- Liu, J. Junchao, H. Jiang Y. Chen F. 2012. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology* 107 (2012) 393–398
- Maiorella, B L; Blanch, H W; Wilkie, G R (1983). Distillery effluent treatment and by-product recovery. *Process Biochemistry* 18:5–8
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377–390

- Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., El Yousfi, F., Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol.* 73, 263–272.
- Maynard, H.E., Ouki, S.K. and Williams, S.C., Tertiary lagoons: A review of removal mechanisms and performance. *Wat. Res.*, 33,1–13 (1999).
- Mohn FH. 1988 Harvesting of microalgal biomass. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, eds. *Micro-Algal Biotechnology*. NY: Cambridge University Press; 395–414.
- Montaigne, F., Essick, P., 2002. Water Pressure. *Natl. Geog.* 202, 2–33.
- Murakani, K., Inomari, Y., Sudo, R., Kurihara, Y., 1992. Effect of temperature on prosperity and decay of genetically engineered microorganisms in a microcosm system. *Water Sci. Technol.* 26 (9–11), 2165–2165.
- Nurdogan Y, Oswald WJ (1995) Enhanced nutrient removal in high rate ponds. *Wat. Sci. Tech.* 31: 33–44.
- O'Farrill, N. E., Travieso, L., Benítez, F., Bécares, E., Romo, S., Borja, R., Weiland, P. and Sánchez, E. (2003) 'Population Dynamic of Algae and Bacteria in an Oxidation Channel', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38: 4, 697 — 709
- Olguin EJ (2003) Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22: 81–91
- Olguin EJ, 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. *Biores. Technol.* 77: 19–24.
- Olguín, E. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes *Biotechnology Advances* 22 81–91
- Oswald WJ (1978) High rate pond in waste disposal. *Develop. Ind. Biotechnol.* 4: 112–119.

- Oswald WJ (1988) The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. In Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge U.P., Cambridge: 255–282.
- Oswald WJ (1991) Introduction to advanced integrated wastewater ponding systems. *Wat. Sci. Tech.* 24: 1–7.
- Oswald, W.J., Green, F.B., Lundquist, T.J., 1994. Performance of methane fermentation pits in advanced integrated wastewater pond systems. *Water Sci. Tech.* 30, 287–295.
- Pagand, P., Blancheton, J.-P., Lemoalle, J., Casellas, C., 2000. The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system. *Aquacult. Res.* 31, 729–736.
- Patel A, Pawar R, Mishra S, Tewari A (2001) Exploitation of marine cyanobacteria for removal of color from distillery effluent. *Indian J Environ Prot* 21(12):1118–1121
- Pathak H, Joshi HC, Chaudhary A, Kalra N, Dwivedi MK (1999) Soil amendment with distillery effluent for wheat and rice cultivation. *Water Air Soil Pollut* 113:133–140
- Perea, J. 2009. Concentración y combustión de vinazas. Ministerio de Gobierno y Justicia de la Provincia de Tucumán, Argentina.
- Perez-Garcia O, Escalante FM, de-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res* 45(1):11–36.
- Picot B, El Halouani H, Casellas C, Moersidik S, Bontoux J (1991) Nutrient removal by high rate pond system in a Mediterranean climate. *Wat. Sci. Tech.* 23: 1535–1541.
- Porras. T., Prada. C., 2012. Efecto del tiempo de cultivo en la productividad de metabolitos de valor agregado en *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Universidad Industrial de Santander-Libro de tesis.

- Richmond A, Becker EW. 1986 Technological aspects of mass cultivation – A general outline. In: Richmond A, ed. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boca Raton: CRC Press Inc.; 245–263.
- Rivas, M. Vargas, P. Riquelme, C. (2010). Interactions of *Botryococcus braunii* Cultures with Bacterial Biofilms. *Microb Ecol*, 60:628–635.
- Shelef, G., Azov, Y., 1987. High-rate oxidation ponds: the Israeli experience. *Water Sci. Technol.* 19 (12), 249–256.
- Singh, N. Patel, D., 2012. Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. *Farming for Food and Water Security, Sustainable Agriculture Reviews* 10, DOI 10.1007/978-94-007-4500-1\_4
- Tanoi, T. Kawachi, M. Watanabe, M. (2010). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, *J Appl Phycol*
- Tarlan, E., Dilek, F. B., & Yetis, U. (2002). Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, 8, 1–5.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo F., Rincón B., 2008. Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary Treatment of Distillery Wastewaters. *Chem. Biochem. Eng.* 22(4) 467–473
- Travieso, L., Benitez, F., Dupeyrón, R., 1999. Algae Growth Potential Measurement in Distillery Wastes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 62:483-489
- Trepanier, C., Parent, S., Comeau, Y., Bouvrette, J., 2002. Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water Res.* 36, 1007–1017.
- Valderrama, L. Del Campo, C. Rodriguez, C. Bashan, Y. de-Bashan, L. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* 36 (2002) 4185–4192

- Varma, M.M., Nepal, J.K., 1972. Kinetics of soluble substrate assimilation. J. Water Pollut. Control Federation 44 (12), 2316–2324.
- Weiss, T. Johnston, W. Fujisawa, K. Okada, S. Devarenne, T. (2010). Genome size and phylogenetic analysis of the A and L races of *Botryococcus braunii*. J Appl Phycol
- Wilderer, P.A., Rubio, M.A., Davids, L., 1991. Impact of the addition of pure cultures on the performance of mixed culture reactors. Water Res. 25 (11), 1307–1313.
- Zhang, F. Cheng, L. Gao, W. Xu, X. Zhang, L. Chen, H. (2011). Mechanism of lipid extraction from *Botryococcus braunii* FACHB 357 in a biphasic bioreactor. Journal of Biotechnology
- Zhila, N. Kalacheva, G. Volova, T.(2011). Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. J Appl Phycol, 23:47–52