

ESTUDIO DE FACTIBILIDAD TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A
PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

DAVID PALACIOS GARCÍA
HÉCTOR FABIO PÉREZ BUSTOS

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CALI
2014

ESTUDIO DE FACTIBILIDAD TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A
PARTIR DE BIOMASA RESIDUAL DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

DAVID PALACIOS GARCÍA
HÉCTOR FABIO PÉREZ BUSTOS

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director
Jorge Enrique López Galán, Dr. Sci.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CALI
2014

RESUMEN

Las microalgas son fuente de diversos bioproductos como lo son los aceites, los carbohidratos y las proteínas. La producción de biocombustibles de microalga bajo el concepto de biorrefinería implica un aprovechamiento integral de la materia prima, de los insumos y procesos con el propósito de incrementar la rentabilidad. Durante la extracción de lípidos de microalga se obtiene una biomasa residual remanente que necesita ser aprovechada para contribuir al concepto de biorrefinería. La proteína es un producto de alto valor agregado y nutricional que puede extraerse de ésta biomasa remanente.

En la presente investigación se extrajo proteína a partir de biomasa residual libre de solventes, remanente de la extracción de lípidos. Se utilizó la solubilización de proteína en medio acuoso alcalino como método de extracción y se evaluaron los efectos del pH (8.4-12.6), la temperatura (24-66°C), la relación biomasa:agua (1:20-1:40), la agitación (200-380 rpm) y el tiempo (2-20 h) en el rendimiento.

El mayor rendimiento de obtención de proteína fue de 11,7% y se obtuvo a un pH de 10.5, 66°C, relación biomasa:agua igual a 1:40, 200 rpm y 8 horas. A estas mismas condiciones el rendimiento encontrado para biomasa fresca fue de 17%; 5.3% superior al reportado para biomasa residual. La pérdida de proteína por el proceso de extracción de lípidos equivale al 5.9%. Se empleó la liofilización como método para concentrar la proteína solubilizada, obteniendo un producto final incoloro de 18.5% de proteína en base seca.

*A Dios por ser mi fuerza, por acompañarme en cada
paso de mi vida.*

*A mis padres, Rubby y Humberto por su apoyo
incondicional, su amor y dedicación de toda una vida.*

*A mis hermanos, María y Andrés por el respaldo, el
cariño y la dedicación que siempre han puesto en mí.*

*A Jeniffer Celis por su cariño y apoyo en cada
momento.*

*A mi amigo y compañero David Palacios por su
dedicación y empeño para sacar adelante éste
proyecto.*

*Al Dr. Sc. Jorge Enrique López y la Dr. Sc. Luz
Marina Flórez por todo el soporte que brindaron en
cada etapa de éste proceso.*

*A Jorge Luis Sánchez, Catalina Bernal y todos los
integrantes de GRUBIOC por cada valioso aporte y
ayuda que enriquecieron ésta investigación.*

A todos.... GRACIAS TOTALES!!!

HÉCTOR F. PÉREZ BUSTOS

A Dios por ser siempre un respaldo en todo momento de la vida.

A mis padres Teresa y Jairo por estar siempre ahí apoyándome y aconsejándome en todas los pasos que he dado.

A mi familia por siempre estar ahí que los he necesitado y cuando no.

A mi amigo y compañero Héctor, porque sin él este proyecto no hubiera sido posible.

A todos mis compañeros y amigos porque este proceso sin ellos no hubiera sido lo mismo.

Al Dr. Sc. Jorge Enrique López y la Dr. Sc. Luz Marina Flórez por ser los guías y apoyos de este proyecto

A Jorge, Camilo, Catalina, Alejandra y todos los demás integrantes de GRUBIOC por los significativos aportes al desarrollo de este proyecto.

DAVID PALACIOS GARCÍA

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i>	4
1.2 BIOREFINERÍAS DE MICROALGAS	6
1.3 PROTEÍNAS	6
1.4 PROTEÍNAS DE MICROALGA	7
1.5 PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	8
1.5.1 Choque osmótico	8
1.5.2 Solubilización con detergentes	8
1.5.3 Solubilización en medio alcalino	9
1.6 USOS ACTUALES DE LA PROTEÍNA DE MICROALGA	9
2. METODOLOGÍA	11
2.1 PREPARACIÓN DE BIOMASA	11
2.1.1 Cultivo de microalgas	11
2.1.2 Recolección de biomasa	12
2.2 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	13
2.2.1 Biomasa de microalgas	14
2.2.2 Materiales y equipos	14
2.2.3 Ajuste de pH	14
2.2.4 Destrucción celular	15
2.2.5 Extracción de lípidos	15
2.2.6 Separación de fases	15
2.3 RECUPERACIÓN DE SOLVENTES	16
2.3.1 Biomasa residual de microalgas	16
2.3.2 Materiales y equipos	16
2.3.3 Rotaevaporación de solventes	17
2.4 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA	17
2.4.1 Biomasa de microalgas	17

	Pág
2.4.2 Materiales y equipos.....	17
2.4.3 Desarrollo experimental	18
2.4.4 Evaluación de las variables controlables.....	19
2.4.5 Diseño experimental estadístico	20
2.4.6 Evaluación del rendimiento de extracción a través del tiempo	22
2.4.7 Extracción de proteína a biomasa fresca	22
2.4.8 Cuantificación de proteína en solución acuosa	22
2.4.9 Cuantificación de proteína en biomasa fresca, residual y producto liofilizado.....	23
2.4.10 Determinación del rendimiento de extracción	23
2.4.11 Concentración de proteína	24
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
3.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA	25
3.1.1 Evaluación de las variables controlables.....	25
3.1.2 Efecto de la temperatura y el pH en el rendimiento extracción	26
3.1.3 Efecto del tiempo en el rendimiento de extracción	29
3.1.4 Extracción de proteína a biomasa fresca	35
3.1.5 Concentración de proteína y cierre de balance.....	36
3.1.6 Análisis de pérdida de proteína por extracción de lípidos.....	39
4. ANÁLISIS DE COSTOS OPERATIVOS A ESCALA PILOTO.....	41
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	48
APÉNDICES	
A. Diagrama de pareto para el rendimiento de obtención de proteína en el estudio de evaluación de variables controlables.....	50
B. Diagrama de pareto para el rendimiento de obtención de proteína en el estudio de evaluación del pH y la temperatura.....	51
C. Barridos de longitud de onda.....	52
D. Cuantificación de proteína en solución acuosa	53
E. Resultados muestras liofilizadas.....	54
F. Predimensionamiento de equipos para la extracción de proteínas.....	55
ANEXO A. Métodos para la cuantificación de proteínas	57

TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición general de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> , % de biomasa seca.	4
Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales de diferentes fuentes de proteína.....	5
Tabla 3. Perfil de aminoácidos no esenciales de diferentes fuentes de proteína.....	5
Tabla 4. Macro nutrientes dosificados a los sistemas de cultivo.	12
Tabla 5. Evaluación de variables	20
Tabla 6. Valores de las variables de las pruebas experimentales.....	21
Tabla 7. Resultados de pruebas experimentales para influencia de variables.....	25
Tabla 8. Resultado del diseño experimental	27
Tabla 9. Resultados del análisis del tiempo	30
Tabla 10. Extracción de proteína a biomasa fresca.....	35
Tabla 11. Resultados de la extracción de proteína a biomasa residual para liofilización	36
Tabla 12. Balance de proteína en el proceso.....	36
Tabla 13. Resultados promedio de las muestras liofilizadas.....	38
Tabla 14. Determinación de proteína para análisis de pérdidas por extracción de lípidos ..	39
Tabla 15. Cantidad y costos de insumos para extracción de proteína, por 1 kg de proteína liofilizada.....	41
Tabla 16. Equipos principales para la extracción de proteínas	42
Tabla 17. Consumo de energía eléctrica de los equipos en la extracción de proteínas.....	42
Tabla 18. Muestras liofilizadas	54
Tabla 19. Proteína en el liofilizado	54

FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación tridimensional de proteínas	7
Figura 2. Esquema metodológico experimental.....	11
Figura 3. Tanque de cultivo de microalgas	12
Figura 4. Cosecha de biomasa de microalga.....	13
Figura 5. Esquema de la extracción de lípidos.....	14
Figura 6. Rotaevaporador EYELA.....	16
Figura 7. Esquema de extracción de proteína	18
Figura 8. Representación gráfica de los puntos del diseño experimental	21
Figura 9. Gráfica de efectos principales, influencia de variables	26
Figura 10. Gráfica de efectos principales, diseño experimental	28
Figura 11. Superficie de respuesta, diseño experimental.....	29
Figura 12. Rendimiento contra tiempo de extracción	30
Figura 13. Concentración de solución vs tiempo de extracción.....	32
Figura 14. Gráfico de correlación cinético.....	33
Figura 15. Ajuste modelo cinético reportado por Bucić-Kojić et al.	34
Figura 16. Proteína liofilizada de biomasa residual de microalga	37
Figura 17. Balance de masa del proceso	39
Figura 18. Distribución de costos consumibles por unidad de procesamiento	43
Figura 19. Diagrama de pareto, influencia de variables.....	50
Figura 20. Diagrama de pareto, diseño experimental	51
Figura 21. Barrido de longitud de onda para solución de seroalbúmina bovina.....	52
Figura 22. Barrido de longitud de onda para solución de proteína de biomasa residual.	52
Figura 23. Curva de calibración con Seroalbúmina bovina.	53

INTRODUCCIÓN

La investigación en microalgas presenta un crecimiento acelerado en todo el mundo debido en parte a su alta eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer en medios de aguas dulces, saladas y residuales y por ser las responsables de la fijación de aproximadamente el 50% del CO₂ del planeta (Chisti, 2007). Existen múltiples bioproductos valiosos que pueden extraerse de la biomasa de microalgas, sin embargo para que éstos sean una alternativa viable económicamente es necesario enmarcar los procesos bajo un concepto de biorrefinería, es decir un aprovechamiento integral de la materia prima. Algunos bioproductos que pueden extraerse de las microalgas son pigmentos, carbohidratos, proteína y biocombustibles; que tienen la particularidad de ser de tercera generación, por lo cual no solo son una alternativa a los combustibles fósiles, si no que no compite con los alimentos de consumo humano y no necesita suelos para su producción.

Para producir biodiesel se requiere extraer la fracción lipídica de la biomasa; proceso que arroja como subproducto biomasa residual que necesita ser aprovechada para contribuir a la investigación en la biorrefinería de la especie. En estudios preliminares del grupo de investigación en biocombustibles (GRUBIOC) se encontró que la extracción de lípidos con una mezcla de solventes Héxano – Isopropanol, es una alternativa atractiva para el proceso, obteniendo rendimientos de hasta 80%. (Palomino 2010).

En estudios preliminares del grupo de investigación en biocombustibles (GRUBIOC) se encontró que la extracción de lípidos con una mezcla de solventes héxano – isopropanol, es una alternativa atractiva para el proceso, obteniendo rendimientos de hasta 80%. No se conoce con certeza el contenido proteico de la biomasa residual ni cuanta proteína se puede perder en el proceso de extracción de lípidos (Palomino Martínez, 2013). Por lo cual es necesario además establecer el tren de separación más adecuado en el cual se pueda aprovechar de una mejor manera todos los productos de la biomasa de microalgas.

La cepa de microalga *Chlorella vulgaris* tiene aproximadamente un contenido proteico del 51-58% en base seca por lo que la proteína se perfila como un producto valioso a extraerse de la biomasa residual. Además esta proteína cuenta con un perfil de aminoácidos esenciales óptimo para ser una fuente adecuada de proteína en animales y humanos (Becker, 2007; Safi, Zebib, et al., 2014). La proteína es un producto de alto valor agregado y nutricional, por lo cual se hace necesario establecer una secuencia de separación que favorezca su obtención junto con la de los otros bioproductos. La proteína de *Chlorella vulgaris* cuenta con un perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales óptimo para ser una fuente adecuada de proteína en animales y humanos (Becker, 2007; Safi, Zebib, et al., 2014). La proteína aislada de fuentes vegetales convencionales tiene un valor en el mercado de alrededor de \$167,444/kg (Amway, 2014), mucho mayor que el valor comercial promedio del biodiesel (\$1,634/kg) (MinMinas, 2012).

Existen múltiples métodos para aislar proteína de microorganismos y fuentes vegetales, tales como el choque osmótico, solubilización por detergentes, membranas moleculares y solubilización en medio alcalino. Los rendimientos de extracción de proteína por los métodos descritos tienden a ser relativamente bajos, del orden entre 3 – 10% (Rodas 2010). Sin embargo el método de solubilización de proteína en medio alcalino posee mayores ventajas respecto a los otros métodos, en términos de practicidad y resultados. Para el caso de las microalgas, las investigaciones actuales son reducidas y no se conocen muchos estudios del aislamiento de proteína a partir de ésta fuente. Sin embargo, algunos estudios existentes han reportado rendimientos considerablemente altos, respecto a otros métodos de obtención de proteína, usando el método de solubilización en medio alcalino para la cepa de microalga *Nannochloropsis* (Gerde et al., 2013).

La incorporación industrial de la proteína de microalgas en alimentos ha sido infructuosa principalmente por el color y olor característico que éstas transfieren a los alimentos (Becker, 2007; Safi, Zebib, et al., 2014); por lo cual es necesario establecer alternativas para encontrar un aislado proteico de atractiva presentación comercial. La concentración de

la solución acuosa de proteína solubilizada empleando liofilización es una alternativa viable que evita la degradación de proteína asociada a altas temperaturas.

El grupo de investigación en biocombustibles (GRUBIOC) firmó en el 2012 un convenio de cooperación investigativa con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), con el fin de compartir conocimientos, experiencias y resultados en todo lo concerniente a la investigación de microalgas y sus derivados. Fruto de éste convenio en GRUBIOC se ha buscado dirigir las investigaciones en el concepto de biorrefinería a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Los objetivos principales de este trabajo de investigación fueron analizar la factibilidad técnica para extraer proteínas a partir de biomasa residual, obtenida como subproducto en el proceso de extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris*, Definir un proceso y condiciones adecuadas para la extracción de proteína y evaluar los costos operativos preliminares a escala piloto de la extracción de proteínas de acuerdo con los resultados encontrados.

Los resultados obtenidos proporcionan un aporte importante en la investigación para la obtención y el aislamiento de proteína de microalgas y el aprovechamiento integral de la especie, tanto para GRUBIOC como en el contexto mundial, pues a la fecha no existen muchos estudios reportados de la temática en cuestión.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas (diatomeas y algas verdes). Se desarrollan tanto en medio marinos como en agua dulce y son la base de la cadena alimenticia en estos ecosistemas. El mecanismo de fotosíntesis es muy parecido al de las plantas superiores, pero debido a su estructura celular simple es mucho más eficiente la transformación de la luz solar respecto a las plantas. Las microalgas fundamentalmente necesitan estar sumergidas en medios acuosos con algunos nutrientes y CO₂ para llevar satisfactoriamente su proceso de crecimiento y fotosíntesis. Se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (Kirrolia et al., 2013) (Mata et al., 2010)

La *Chlorella vulgaris* es un tipo de microalga de agua dulce, de color verde, con forma esférica, un diámetro entre 2-10 µm (Safi, Zebib, et al., 2014) y con muchas estructuras similares a las plantas. La membrana celular de la microalga se caracteriza por su extrema dureza, capaz de aislar sus componentes, mateniéndolos alejados y protegidos del medio. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente requiriendo solo dióxido de carbono, agua, luz y pequeñas cantidades de nutrientes, para reproducirse. Debido a su existencia elemental y a su rápido crecimiento, la *Chlorella vulgaris* tiene una composición de sustancias aprovechables y valiosas para el adecuado metabolismo de los seres vivos (ver Tabla 1). (Kay & Barton, 1991)

Tabla 1. Composición general de microalgas *Chlorella vulgaris*, % de biomasa seca. (Becker, 2007)

Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
51 – 58	12 – 17	14 – 22

Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales de diferentes fuentes de proteína. (Becker, 2007; Safi, Zebib, et al., 2014)

Fuente	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	His	Thr
Huevo	6.6	8.8	7.2	5.3	5.8	4.2	3.2	2.4	5.0
Soya	5.3	7.7	5.3	6.4	5.0	3.7	1.3	2.6	4.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.8	8.8	5.5	8.4	5.0	3.4	2.2	2.0	4.8
Recomendados FAO	4.0	7.0	5.0	5.5	N/R	6.0	N/R	N/R	4.0

Tabla 3. Perfil de aminoácidos no esenciales de diferentes fuentes de proteína. (Becker, 2007; Safi, Zebib, et al., 2014)

Fuente	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Pro	Ser	Try	Cys
Huevo	N/R	6.2	11.0	12.6	4.2	4.2	6.9	1.7	2.3
Soya	5.0	7.4	1.3	19.0	4.5	5.3	5.8	1.4	1.9
<i>Chlorella vulgaris</i>	7.9	6.4	9.0	11.6	5.8	4.8	4.1	2.1	1.4
Recomendados FAO	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	1.0	3.5

N/R = No Reportado; FAO = Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas

La *Chlorella vulgaris* tiene un perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales (ver Tabla 2 y Tabla 3) que puede ser comparable con las fuentes convencionales de proteína como la soya y el huevo. También se ajusta a los valores recomendados que son reportados por la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) en los diferentes aminoácidos. Por eso resulta tan atractiva la investigación sobre cómo aprovechar esta nueva fuente proteica.

1.2 BIOREFINERÍAS DE MICROALGAS

La valorización de la biomasa de microalga depende del aprovechamiento de los productos que la componen. Básicamente la biomasa está compuesta por lípidos, carbohidratos y proteínas, siendo estas últimas las que se encuentran en mayor proporción (Tabla 1). El concepto de biorefinería puede ser explicado de manera simple como un conjunto de procesos integrados para procesar biomasa de forma sostenible para obtener biocombustibles, productos comercializables y energía. (González-Delgado & Kafarov, 2011).

El aprovechamiento individual de los componentes de la biomasa con las tecnologías actuales es económicamente inviable. Las investigaciones deben enfocarse en el aprovechamiento conjunto de los componentes de la biomasa, como la obtención de biodiesel a partir de los lípidos, la obtención de bioetanol por fermentación a partir de carbohidratos, obtención de péptidos y aminoácidos a partir de la hidrólisis de proteínas y cualquier otro procesos que sirva para incrementar la productividad de una industria basada en biomasa de microalgas (García-Cuadra et al., 2012).

1.3 PROTEÍNAS

Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos lineales unidos por enlaces peptídicos, plegadas de forma que muestra una estructura tridimensional, dependiendo de cómo sea la estructura de los aminoácidos y cuáles de éstos la componen, las proteínas pueden realizar funciones biológicas específicas (Jimeno et al., 1997).

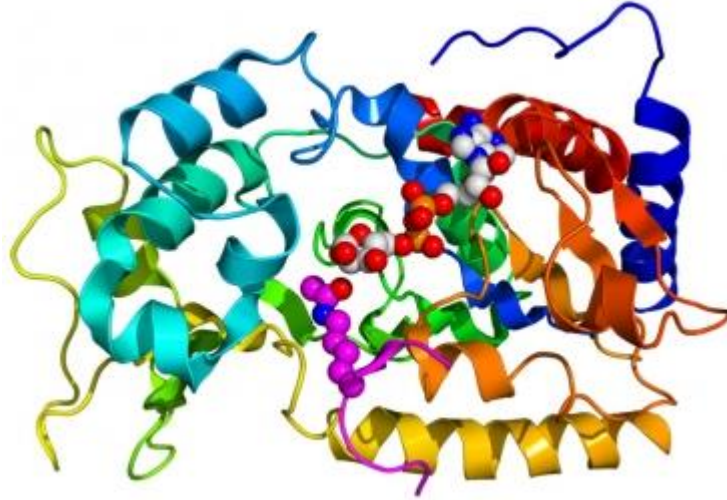


Figura 1. Representación tridimensional de proteínas

Las proteínas en función de su forma y su solubilidad pueden clasificarse en (Campbell-platt, 2010):

- ✓ **Proteínas fibrosas:** Tienen una estructura alargada, formada por largos filamentos de proteínas y tienen forma cilíndrica, representadas en la figura 1. No son solubles en agua, un ejemplo de este tipo de proteína es el colágeno.
- ✓ **Proteínas globulares:** Tienen estructura esférica (ver figura 1), su distribución de aminoácidos, hidrófoba en su interior e hidrófila en su exterior, hace que sean muy solubles en soluciones acuosas, su estructura no es estática. Generalmente son más sensible a los cambios de temperatura y pH que la contraparte fibrosa.

1.4 PROTEÍNAS DE MICROALGA

La proteína que se obtiene a partir de microorganismos como las bacterias, hongos, microalgas, etc., se conoce como proteína unicelular. En el caso de las microalgas se debe hacer hincapié en que el término de proteína unicelular no es del todo correcto, debido a

que no es fácil aislar solo proteína, considerando que los demás componentes pueden interferir en el proceso de extracción de las proteínas y hacer que este no sea muy selectivo (Becker, 2007). La *Chlorella* posee proporcionalmente más proteína que la soja, el atún o la carne de res. La carne de res posee un contenido proteico del 20%, mientras que la *Chlorella* tiene aproximadamente 60%. Las proteínas se componen de aminoácidos, y de éstos la *Chlorella* tiene 18 diferentes, incluyendo todos los denominados aminoácidos esenciales, siendo ésta una fuente de proteína completa y de alta calidad. (Gerde et al., 2013; Safi, Zebib, et al., 2014; Safi, Ursu, et al., 2014)

1.5 PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

1.5.1 Choque osmótico El choque osmótico ha sido utilizado para la extracción de proteína de cierto número de bacterias Gram-negativas, incluyendo *Salmonella typhimurium* y *E. coli*. El método implica sumergir el cultivo en una solución de sacarosa al 20%, después de estabilizarse, las células se recogen y se suspenden rápidamente en agua a una temperatura de 4°C aproximadamente. Entre el 4-8% de la proteína globular se libera por choque osmótico (Rodas Herrera, 2010). Las variables que se reportan como significativas son la concentración de solución de sacarosa y la temperatura a la que se realice el choque osmótico.

1.5.2 Solubilización con detergentes Solventes iónicos y no iónicos son usados para romper la membrana de la célula y separar la proteína. Lauril sulfato sódico y colato sódico son algunos ejemplos de solventes iónicos que han sido utilizados; Tritón X-100, X-450 y tween son casos de solventes no iónicos que también tienen ese efecto. Los detergentes iónicos son más reactivos que los detergentes no iónicos, sin embargo se ha demostrado que desnaturaliza en mayor proporción la proteína. La separación por detergentes tiene la desventaja de afectar las etapas posteriores de separación de otros componentes de la biomasa e incluso en los procesos de purificación de proteína. Muchos de estos solventes, como es el caso del tween, son altamente tóxicos, lo que limita su uso (Rodas Herrera, 2010).

1.5.3 Solubilización en medio alcalino La obtención de proteína por éste método se basa en el principio de solubilización de las proteínas en diferentes condiciones, según la naturaleza de la proteína. Las proteínas generalmente tienen múltiples grupos ionizables, con diferentes valores de pK_a , que es una medida de la fuerza de disociación de las moléculas. Cada proteína tiene un pH característico al cual las cargas negativas se encuentran en igual cantidad que las cargas positivas, éste punto se conoce como punto isoelectrico (PI). En el PI las proteínas presentan la mínima solubilidad, por lo tanto a valores de pH lejanos del PI tiende a presentarse mayor solubilización. Sin embargo el pH no es la única variable que influye, pues se presenta la solubilización como un efecto mancomunado de múltiples parámetros (temperatura, tiempo, relaciones másicas, etc.). En el caso de las microalgas la solubilización de las proteínas se ve favorecida en condiciones alcalinas, en un intervalo de pH de 9 a 13. Este es el método más utilizado por su bajo requerimiento de reactivos y alta selectividad para la extracción de proteínas. (Safi, Ursu, et al., 2014; Gerde et al., 2013; Ursu et al., 2014).

1.6 USOS ACTUALES DE LA PROTEÍNA DE MICROALGA

Las investigaciones realizadas hasta el momento confirman que la biomasa de microalga tiene características prometedoras como una fuente alternativa de proteína, siendo la calidad media de varias cepas analizadas igual e incluso en algunas ocasiones superior, que las proteínas de fuentes vegetales convencionales. A pesar de su alto contenido de proteína nutritiva la biomasa de microalga no ha adquirido aún un papel determinante en la alimentación convencional de los humanos, esto se debe principalmente a la consistencia de la biomasa, su color verde oscuro y su ligero olor a pescado. Han sido probados una serie de procedimientos para incorporar la biomasa de microalga en alimentos, sin embargo, con pocas cantidades los alimentos tornan un color desagradable. Por lo tanto actualmente se sigue investigando para tratar de incorporar la biomasa de microalga en los alimentos convencionales de forma que no pierdan valor y sean atractivos en el mercado (Becker, 2007).

El uso de microalgas como alimento para animales es más reciente. Múltiples evaluaciones nutricionales y toxicológicas han demostrado la idoneidad de la biomasa de microalgas como un valioso complemento alimenticio o sustituto de las fuentes de proteína convencionales (harina de soja, harina de pescado, salvado de arroz, etc.). Las aves de corral han sido los animales a los cuales más se les ha alimentado con biomasa de microalga, obteniendo buenos resultados. Recientemente también se ha incorporado exitosamente la biomasa de microalga como fuente de proteína y minerales en piscicultura. (Becker 2007).

2. METODOLOGÍA

La metodología empleada en la investigación consistió en 4 pasos, la preparación de la extracción de lípidos, la recuperación de solventes y fundamentalmente en la extracción de (ver

Figura 2).

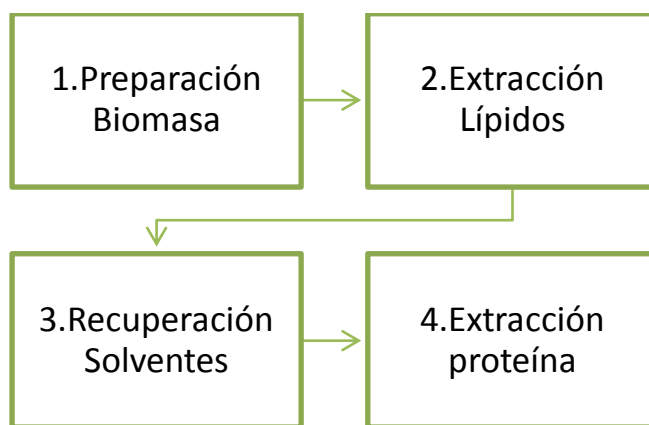


Figura 2. Esquema metodológico experimental

2.1 PREPARACIÓN DE BIOMASA

2.1.1 Cultivo de microalgas La biomasa empleada durante ésta investigación se obtuvo de los sistemas de cultivo de GRUBIOC. Se trata de sistemas de cultivo cerrados, con inóculo de la cepa *Chlorella vulgaris* CVL1 suministrada por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). Los sistemas de cultivo contaron con alimentación semanal de múltiples nutrientes con concentración reportada en la Tabla 4. Además posee un sistema de aireación que opera continuamente y están expuestos al aire libre, por lo cual reciben directamente la luz solar. Los cultivos tuvieron una concentración de biomasa promedio de 1.5 g/L (ver Figura 3).

Tabla 4. Macro nutrientes dosificados a los sistemas de cultivo.

Compuesto	Concentración (mg/L)
Nitrato de potasio, (KNO_3)	250
Cloruro de calcio, (CaCl_2)	25
Sulfato de magnesio, (MgSO_4)	75
Di potasio de hidrógeno de fosfato, (K_2HPO_4)	75
Potasio de di hidrógeno de fosfato, (KH_2PO_4)	17.5
Cloruro de sodio, (NaCl)	25

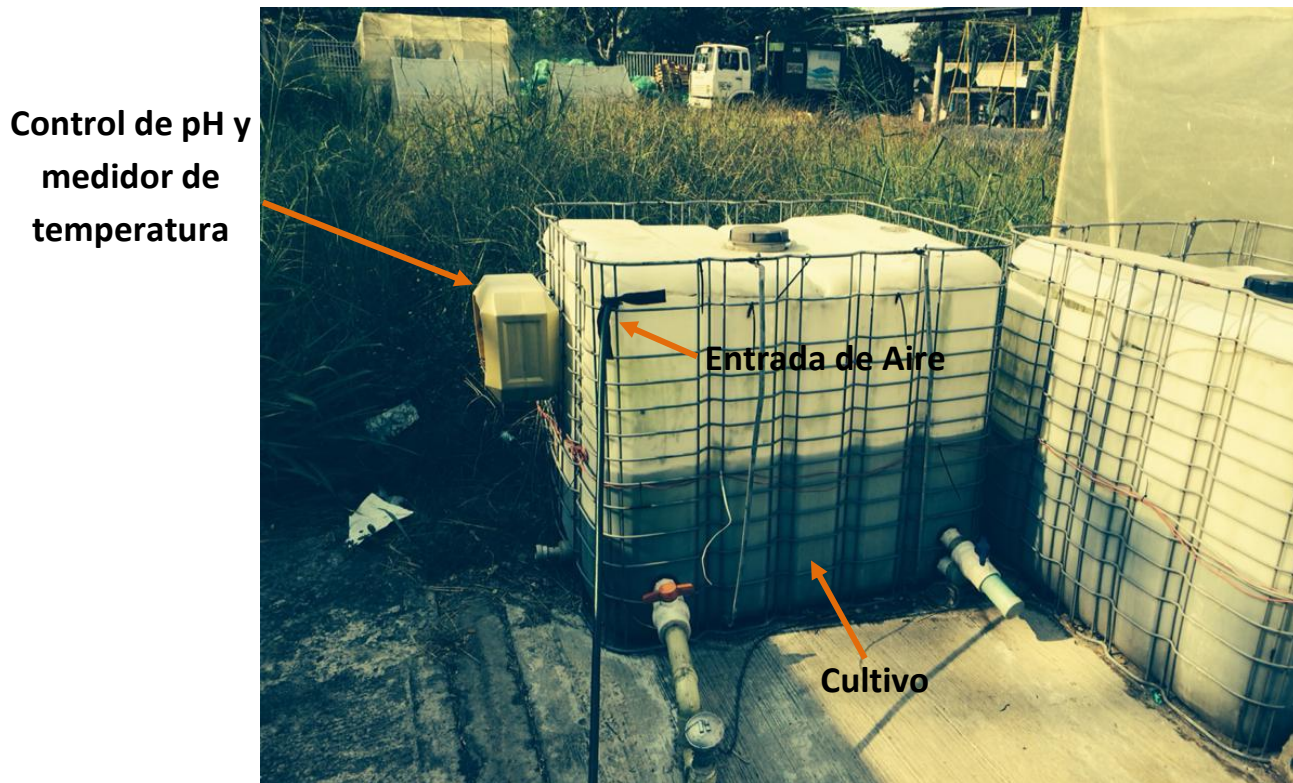


Figura 3. Tanque de cultivo de microalgas

2.1.2 Recolección de biomasa La recolección de biomasa se realizó con una intensidad promedio de una vez por semana durante dos meses. La recolección de la biomasa se

realizó empleando un sistema de recirculación del cultivo, haciéndolo pasar a través de un filtro que posibilitó la concentración de ésta (ver Figura 4). El cultivo se recirculó con la ayuda de 2 bombas sumergibles Tiolu HJ - 942 y el filtro es de tela Muselina. La humedad de la biomasa concentrada en cada cosecha osciló entre 85 y 90%.



Figura 4. Cosecha de biomasa de microalga

2.2 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

La metodología empleada para la extracción de lípidos se basó en investigaciones preliminares de GRUBIOC, usando las condiciones más adecuadas que fueron determinadas en esos estudios. El proceso consistió básicamente de una primera etapa de destrucción celular por autoclave, en el que se hizo un ajuste de la biomasa a un pH ácido. Posteriormente, se realizó la adición de solventes en una proporción conocida, con la utilización de un sistema shaker a 45 °C, finalmente se realizó la separación de fases por decantación. La secuencia general del proceso se ilustra en la Figura 5 (Palomino Martínez, 2013).

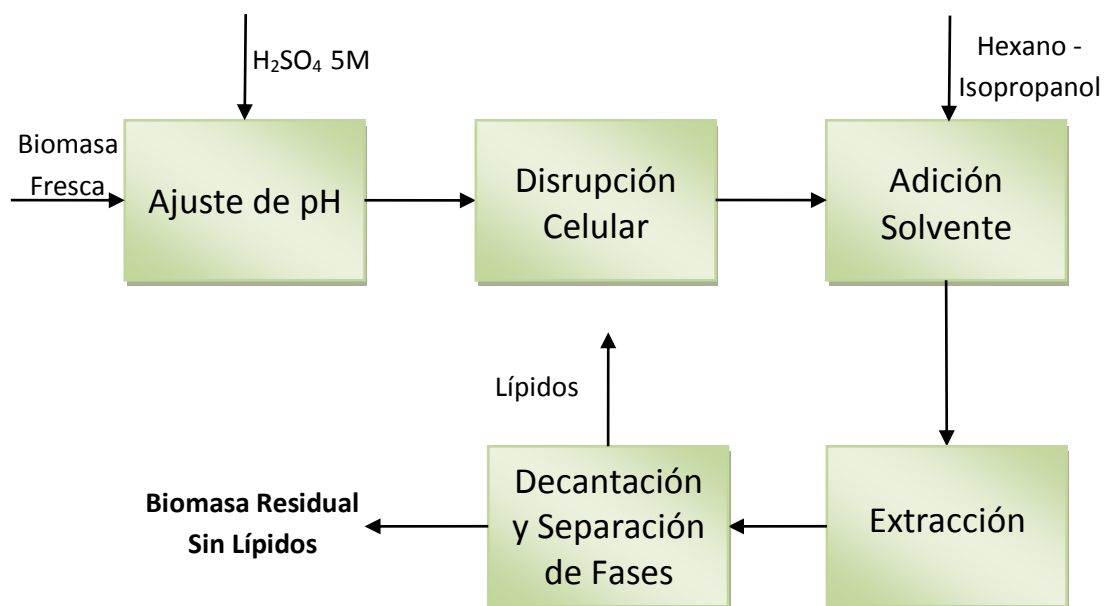


Figura 5. Esquema de la extracción de lípidos

2.2.1 Biomasa de microalgas Se utilizaron 1700 g homogenizados de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada y recolectada bajo las condiciones descritas en las secciones 2.1.1 y 2.1.2.

2.2.2 Materiales y equipos La medición de pH se realizó con un pHmetro Fisher scientific AB15. Para el ajuste de pH de la biomasa de microalgas se utilizó una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5M. Para el proceso de destrucción celular se utilizó un autoclave Trade Raypa (modelo AES-75). En la extracción de lípidos se emplearon como solventes: isopropanol (99.0%) y hexano (98.5%) marca J.T. Baker. Se utilizó un sistema de agitación Shaker 1000 con agitación Unimax 1010, marca Heidolph.

2.2.3 Ajuste de pH La destrucción celular y el rendimiento de extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* se ve considerablemente beneficiado por el pH ácido de la pasta, pues debilita la pared celular y favorece la extracción (Halim, Harun, et al., 2012).

En su investigación (Palomino Martinez, 2013) determinó que el pH adecuado esta alrededor de tres.

2.2.4 Destrucción celular Con el fin de acceder a los lípidos de su posición intracelular, se realizó el rompimiento celular de las microalgas. Las alternativas más viables por su implementación industrial y por los rendimientos que han sido reportados (Lee et al., 2010), son la destrucción celular por micondas y por autoclave, siendo éste último el empleado en la presente investigación debido a la disponibilidad de equipos en el laboratorio y los resultados obtenidos por (Palomino Martínez, 2013).

2.2.5 Extracción de lípidos La extracción de lípidos se realizó inmediatamente después del proceso de autoclavado, en erlenmeyers de 250 mL con 20 g de biomasa cada uno. Se agregó una relación de solventes hexano/isopropanol (3/2 v/v) de acuerdo al porcentaje de humedad de la biomasa, es decir que la cantidad de solvente que se utilizó es equivalente al porcentaje de agua en la biomasa y esa cantidad se distribuye en la relación mencionada anteriormente (Palomino Martínez, 2013). La extracción se llevó a cabo en un sistema Shaker, a una velocidad de 200 rpm para mejorar la interacción entre el solvente y la microalga como también favorecer la migración del aceite desde el interior de la célula (Halim, Danquah, et al., 2012). Se realizó la extracción durante 45 minutos y a 45 °C (Palomino Martínez, 2013).

2.2.6 Separación de fases Posterior a la extracción de lípidos se realizó la separación de fases por decantación en embudos de 500 mL. La fase orgánica o biomasa residual correspondió aproximadamente al 40% del volumen total de la mezcla, siendo la fase pesada. Ésta fue retirada y almacenada a 4°C para la posterior obtención de proteína. La fase liviana compuesta por los lípidos que se han extraído y parte de los solventes fue igualmente recolectada y guardada para posteriores estudios de GRUBIOC.

2.3 RECUPERACIÓN DE SOLVENTES

2.3.1 Biomasa residual de microalgas Se utilizó biomasa residual de microalga *Chlorella vulgaris* libre de lípidos y separada por decantación de la fase liviana o aceitosa, según el procedimiento descrito en la sección 2.2.6.

2.3.2 Materiales y equipos Para la eliminación y posterior recuperación de los solventes presentes en la biomasa residual (hexano e isopropanol) fue utilizado un rotaevaporador EYELA N – 1100, soportado con una bomba de vacío DTC – 22 y como baño termostático de calentamiento se empleó un EYELA SB – 1100 (ver Figura 6).

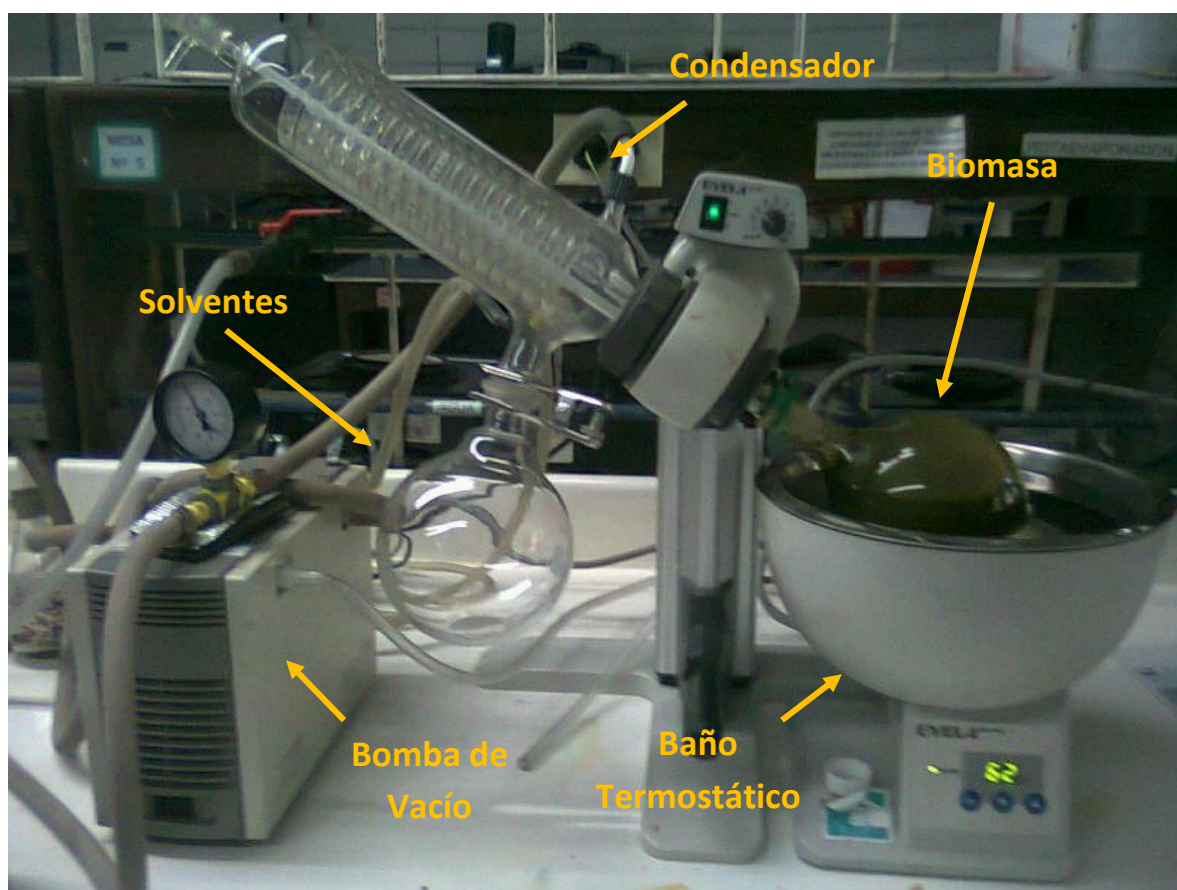


Figura 6. Rotaevaporador EYELA

2.3.3 Rotaevaporación de solventes La eliminación y posterior recuperación de los solventes empleados para la extracción de lípidos de microalgas, presentes en la biomasa residual, fue realizada por un proceso de evaporación - condensación de los solventes en un rotaevaporador. La evaporación de éstos se realizó en un baño termostático a 62 °C y en la condensación se utilizó agua a 2 °C. Durante el proceso de rotaevaporación se usó una bomba de vacío operada a 0.3 bar para reducir la temperatura de ebullición de los solventes y por consiguiente la temperatura a la cual debía estar expuesta la biomasa.

2.4 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA

Aunque a la fecha no hay muchos estudios reportados de obtención de proteína a partir de microalgas, se seleccionó el método de solubilización de proteína en medio alcalino debido a que es un proceso que ha sido probado para algunas fuentes vegetales e inclusive algunas cepas de microalga arrojando buenos rendimientos respecto a otros métodos (Safi, Ursu, et al., 2014; Safi et al., 2012). También es un método sencillo, que requiere una relativa poca infraestructura, lo cual beneficia el proceso a una escala semindustrial o industrial y además no requiere gran utilización de agentes químicos agresivos que puedan tener restricciones ambientales o de consumo humano. Por otro lado no existen antecedentes en GRUBIOC de procesos de obtención de proteína, especialmente de proteína microalgal, por lo que es necesario establecer un protocolo adecuado y un punto de partida para separar éste bioproducto del resto de la matriz algal.

2.4.1 Biomasa de microalgas Se utilizó biomasa residual de la microalga *Chlorella vulgaris* libre de lípidos y solventes, según el procedimiento descrito en la sección 2.3.3.

2.4.2 Materiales y equipos La determinación de humedad de la biomasa se realizó en una balanza de humedad Ohaus MB 45. Para la obtención de proteína se utilizó una incubadora (Shaker) 1000 con agitación Unimax 1010, marca Heidolph. La medición de pH se realizó con un pHmetro Fisher Scientific AB15. El ajuste de pH fue realizado con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2M la cual es una concentración que permite el

ajuste gradual del pH de las soluciones con biomasa. La separación de fases se realizó por centrifugación en una centrífuga Digtor 20C.

La cuantificación de proteína en la fase acuosa se realizó por el método de Lowry utilizando el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin- Ciocalteau marca Panreac. La curva de calibración se realizó con seroalbúmina bovina y las mediciones fueron hechas en un espectrofotómetro Genesys 20-Thermospectronic. El ajuste de pH para la precipitación de proteína se realizó con una solución de HCl 2M y la concentración de proteína se realizó en un liofilizador EYELA FDU – 2100.

2.4.3 Desarrollo experimental Una vez la biomasa residual de la extracción de lípidos ha sido liberada de los solventes y éstos han sido recuperados se sigue el proceso de obtención de proteína, el cual se encuentra resumido en la Figura 7.

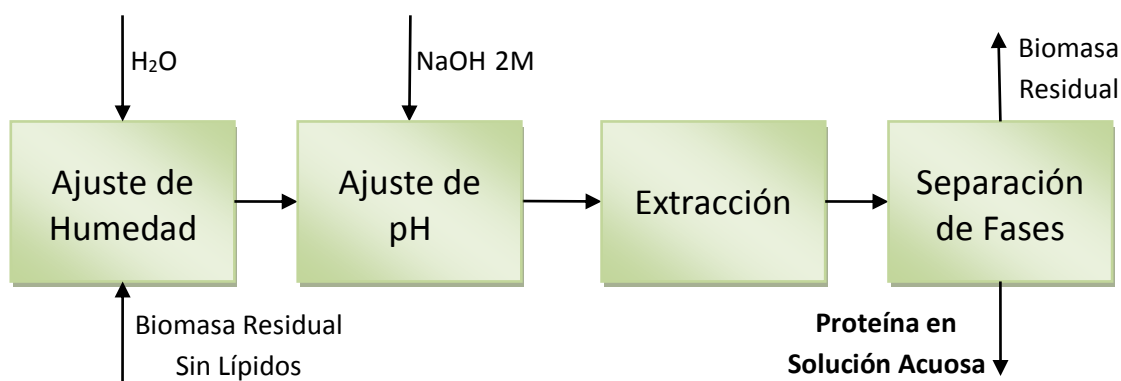


Figura 7. Esquema de extracción de proteína

Para cada ensayo se consideró una base de 30 g de biomasa residual sin lípidos libre de solventes, con un porcentaje de humedad de 92.2%. Cada ensayo se realizó en erlenmeyers de 250 mL donde se ajustó la relación biomasa:agua requerida, 1:20 (95% de humedad) o 1:40 (97.5% de humedad). Luego se hizo el ajuste de pH con una solución de NaOH 2M. Posteriormente se procedió con la extracción en agitador por un tiempo fijado, para finalmente separar las fases por centrifugación a 1800 rpm por 4 minutos.

2.4.4 Evaluación de las variables controlables Se buscó establecer las variables manipulables del proceso de solubilización de proteína, que más influyeran en la obtención de ésta, para ser consideradas en el diseño experimental y así conocer valores o regiones específicas donde los resultados son apropiados. Para esto se realizaron una serie de pruebas considerando esencialmente 3 variables: velocidad de agitación, relación biomasa/agua y temperatura.

Condiciones fijas para el estudio:

- ✓ pH se ajustó a 11. Esta variable es determinante en el método de obtención de proteína, debido a que éste tiene su fundamento teórico en el cambio del punto isoeléctrico de la proteína para que se solubilice en la solución acuosa; el cambio es generado por la alteración en el pH (Gerde et al., 2013).. Por ésta razón el pH no fue una variable considerada en el estudio de influencia si no en el diseño de optimización posterior
- ✓ Tiempo de extracción de 6 horas, donde se puede obtener una cantidad importante de proteína (Gerde et al., 2013).

El diseño experimental propuesto para este estudio de influencia, fue un plan experimental factorial 2^3 , tomando un nivel alto y un nivel bajo para cada una de las 3 variables consideradas (ver Tabla 5).

El rango de temperatura se estableció en base a que en la literatura se reporta una extracción significativa a temperatura de de 35°C y 55°C para explorar un rango amplio permitido por el equipo, la velocidad de agitación se estableció entre 200 y 400 rpm, siendo el rango inferior una velocidad relativamente lenta que permite el buen contacto entre las fases y 400 una alta velocidad que el equipo permitía. La relación biomasa:agua fue establecida en base a las investigaciones consultadas, donde la relación usada era de 1:20 (Gerde et al., 2013) y la relación más alta para explorar valores más altos que no estuvieran reportados en la literatura.

Tabla 5. Evaluación de variables

Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Relación biomasa:agua
55	200	1:20
55	200	1:40
55	380	1:20
55	380	1:40
35	200	1:20
35	200	1:40
35	380	1:20
35	380	1:40

Con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.05 se estableció la influencia de las variables respecto al rendimiento de extracción de proteína, con un nivel de confianza del 95%.

2.4.5 Diseño experimental estadístico Una vez establecida la variable que más influyó en las pruebas de evaluación de variables se procedió a realizar un diseño experimental central rotacional compuesto 2^2 con ésta variable y el pH con el fin de establecer una región en la que se favorezca en mayor medida el rendimiento de la obtención de proteína. Las muestras fueron asignadas al azar con 4 repeticiones en el punto central y 4 puntos estrella. Normalizando las variables se le asignó el nivel alto el valor de 1 y al nivel bajo -1.

Las pruebas de evaluación de variables arrojaron que la temperatura fue la variable más influyente de las estudiadas, ésta se seleccionó para ser tenida en cuenta en el diseño experimental. La relación biomasa:agua también fue una variable influyente, pero no tanto como la temperatura (ver sección 3.1.1), por lo tanto fue descartada del diseño experimental. La variación de la velocidad de agitación no representó ninguna influencia en las pruebas de evaluación, por lo que también fue descartada.

Condiciones fijas para el diseño experimental estadístico:

- ✓ Relación biomasa:agua igual a 1:40, pues fue el nivel en el que se obtuvieron mejores rendimientos durante las pruebas de la influencia de variables.
- ✓ Velocidad de agitación de 200 rpm, pues la variación de ésta variable no tuvo ninguna influencia en el rendimiento de extracción. Menores revoluciones implica menor consumo energético.
- ✓ Tiempo de extracción de 6 horas, donde se puede obtener una cantidad importante de proteína (Gerde 2013).

Los ensayos correspondientes al diseño experimental se muestran en la Tabla 6 y la Figura 8.

Tabla 6. Valores de las variables de las pruebas experimentales

Variable	Niveles				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
pH	8.4	9	10.5	12	12.6
Temperatura (°C)	24	30	45	60	66

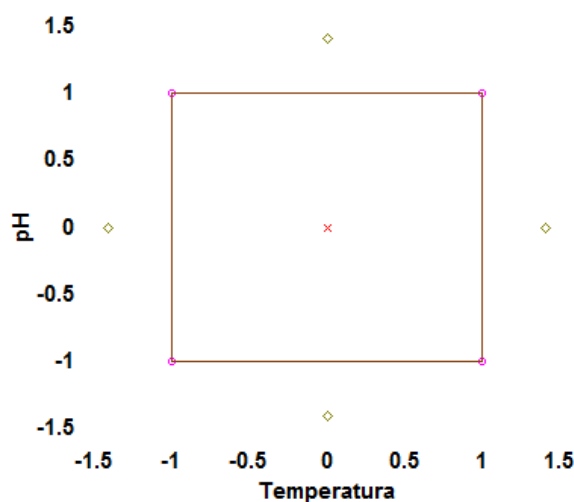


Figura 8. Representación gráfica de los puntos del diseño experimental

Con ayuda del software STATGRAPHIS Centurion XV versión 15.2.05 se estableció la influencia de las variables respecto al rendimiento de extracción de proteína y se establecieron superficies de respuesta, con un nivel de confianza del 95%.

2.4.6 Evaluación del rendimiento de extracción a través del tiempo Con el fin de determinar la influencia del tiempo en el proceso de obtención de proteína se procedió a realizar una curva de rendimiento de extracción vs tiempo, utilizando de igual manera que en las pruebas del diseño experimental, 30 g de biomasa residual libre de lípidos y solventes al 92.2% de humedad. Las condiciones fijas para los ensayos fueron: relación biomasa:agua igual a 1:40 y velocidad de agitación igual 200 rpm. Para el pH y la temperatura se escogieron los mejores valores determinados en el diseño experimental, 10.5 y 66 °C respectivamente. Se determinaron rendimientos para ensayos realizados a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 y 20 horas de extracción de proteína. Para cada ensayo se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.4.3.

2.4.7 Extracción de proteína a biomasa fresca Con el propósito de establecer un comparativo que permita guiar las investigaciones de GRUBIOC en cierto orden respecto al tren de separación de los productos aprovechables de las microalgas y su biorrefinería, se realizó una prueba de obtención de proteína a la biomasa cultivada y recolectada según el procedimiento de las secciones 2.1.1 y 2.1.2 aún con lípidos. La extracción de proteína se realizó a las condiciones que se encontraron los rendimientos más altos en las pruebas de evaluación de las variables, en el diseño experimental y en la evaluación del tiempo: relación biomasa: agua igual a 1:40, velocidad de agitación de 200 rpm, pH igual a 10.5, temperatura igual a 66°C y 8 horas de extracción; según el procedimiento descrito en la sección 2.4.3. La prueba se realizó por duplicado y no se le realizó ningún tipo de pretratamiento a la biomasa.

2.4.8 Cuantificación de proteína en solución acuosa Con el fin de determinar la cantidad de proteína obtenida en solución acuosa alcalina para cada uno de los ensayos y posteriormente establecer rendimientos de extracción, se empleó el método de Lowry

(ANEXO A). Para establecer la longitud de onda a la cual debían ser medidas las muestras y la curva de calibración en el espectrofotómetro, se realizó barridos de longitud de onda, los cuales establecieron los intervalos en los que se presentaban los mayores picos de absorbancia tanto para la muestra problema como para proteína albúmina de suero bovino. Se estableció 700 nm como longitud de onda. Se elaboró una curva de calibración a 700 nm de proteína utilizando seroalbúmina bovina a bajas concentraciones (APÉNDICE E). Estas mediciones se realizaron en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma de Occidente. Se midió el peso de la fase acuosa para cada uno de los ensayos por lo cual fue posible determinar la cantidad de proteína (mg) presente en cada muestra.

2.4.9 Cuantificación de proteína en biomasa fresca, residual y producto liofilizado

Las cuantificaciones de proteína de la biomasa fresca, residual libre de lípidos y solventes y el producto liofilizado se realizaron por el método de Kjeldahl con un factor de 6.35, recomendado para la cepa de microalga *Chlorella vulgaris* (Safi et al., 2012). Estos análisis se realizaron en un laboratorio de servicios técnicos particular (Laboratorio de análisis industriales, Universidad del Valle).

2.4.10 Determinación del rendimiento de extracción El rendimiento de extracción de proteína para cada ensayo se determinó conociendo la cantidad de proteína solubilizada en la fase acuosa respecto a la proteína presente en la biomasa que ingresa al proceso de extracción. Para el caso de la biomasa residual libre de lípidos el rendimiento se determinó en la Ecuación 1.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Proteína en fase acuosa}}{\text{Proteína en biomasa residual sin lípidos}} * 100\% \quad (1)$$

Para el caso de la biomasa fresca el rendimiento se determinó según la Ecuación 2.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Proteína en fase acuosa}}{\text{Proteína en biomasa fresca}} * 100\% \quad (2)$$

2.4.11 Concentración de proteína La proteína solubilizada se encuentra en un medio con gran cantidad de agua, por lo cual con el fin de estudiar la posibilidad de conseguir una presentación comercial más adecuada para un aislado de proteína, se realizó un ensayo de concentración de ésta y eliminación de humedad. El ensayo se hizo para la solución acuosa de proteína obtenida durante el tratamiento a la biomasa residual sin lípidos con las mejores condiciones encontradas en las pruebas de evaluación de variables, en el diseño experimental y en la evaluación del tiempo: relación biomasa:agua igual a 1:40, velocidad de agitación de 200 rpm, pH igual a 10.5, temperatura igual a 66°C y 8 horas de extracción. Para concentrar la proteína es necesario inicialmente inducir la precipitación de éstas en la solución acuosa, es decir generar de nuevo un cambio en el punto isoeléctrico, cambiando el pH de la solución de alcalino a ácido, para que ya no sean solubles en la solución y se favorezca la eliminación de humedad. El pH seleccionado para la precipitación de proteína fue 3.2 según algunos estudios reportados en la literatura (Gerde et al., 2013). El método seleccionado para concentrar la proteína fue la liofilización, principalmente por ser un proceso que al eliminar la humedad evita el paso de la muestra por temperaturas elevadas, lo cual beneficia en la baja degradación asociada a temperatura que sufre la proteína.

Para la concentración de la proteína se colocaron 3 muestras de solución acuosa en cajas petri y se llevó a cabo la liofilización por 20 horas a una presión de 5 mmHg, congelando previamente las muestras hasta -80°C.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNA

3.1.1 Evaluación de las variables controlables En éste capítulo se describe la evaluación de las principales variables controlables del proceso con el propósito de determinar la influencia sobre el rendimiento de obtención de proteína, para posteriormente ser relacionado con el diseño experimental estadístico. En la tabla 7 se muestran los resultados de las pruebas experimentales, lo que se busca es establecer una zona o rango de variables donde el rendimiento del proceso es el más adecuado, según los resultados obtenidos.

Tabla 7. Resultados de pruebas experimentales para influencia de variables

Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Relación p/p biomasa:agua	Concentración (mg/mL)	Rendimiento (%)
55	200	1:20	1.55	3.70
55	200	1:40	1.44	11.31
55	380	1:20	1.90	3.30
55	380	1:40	1.46	10.65
35	200	1:20	0.39	0.91
35	200	1:40	0.33	2.44
35	380	1:20	0.42	0.91
35	380	1:40	0.35	2.65

Dado que los mayores rendimientos de extracción fueron obtenidos a los valores más altos de temperatura y relación biomasa:agua, el incremento de la temperatura y la cantidad del medio acuoso favorecen la extracción de proteína desde el interior de la célula microalgal. Por otro lado, la velocidad de agitación no parece tener un efecto importante o determinante sobre el rendimiento de extracción, viéndose incluso minimizado al incrementar la velocidad de agitación durante la extracción (ver Figura 9).

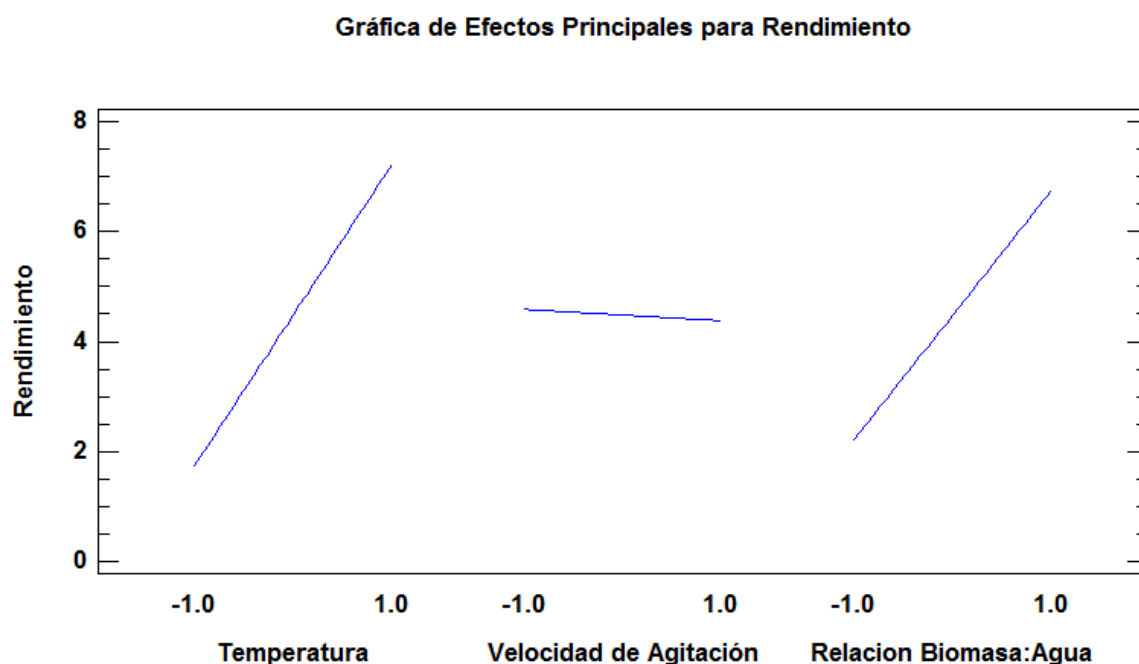


Figura 9. Gráfica de efectos principales, influencia de variables

En la figura 8 se observa que la temperatura presenta una influencia ligeramente mayor a la relación biomasa:agua, dado que la pendiente es más pronunciada y el diagrama de Pareto muestra que es superior un 13% (apéndice A, Figura 17). La velocidad de agitación presenta una pendiente prácticamente nula, por lo que su influencia es muy poco apreciable en comparación a las influencias de la temperatura y la relación biomasa:agua. Si se piensa en el proceso a nivel industrial o semi industrial, es adecuado un beneficio económico que la temperatura sea una variable con mayor influencia en el rendimiento del proceso que la relación biomasa:agua, pues aunque implica un mayor gasto energético, puede llegar a representar un beneficio la utilización de mucha menos agua para la extracción, principalmente por los gastos al concentrar la proteína.

3.1.2 Efecto de la temperatura y el pH en el rendimiento extracción En este capítulo se encontró una región adecuada de extracción de proteína dentro del rango de las 2 variables estudiadas en el diseño experimental estadístico: El pH, variable fundamental en

el proceso de solubilización de proteína y la temperatura, variable de mayor influencia durante el estudio de evaluación de influencia (ver Tabla 8).

Tabla 8. Resultado del diseño experimental

pH	Temperatura (°C)	Concentración (mg/mL)	Rendimiento (%)
12.0	60	1.55	11.16
9.0	60	1.28	10.35
12.0	30	0.97	6.83
9.0	30	0.87	6.26
10.5	66	1.52	11.36
10.5	24	1.00	7.39
12.6	45	1.46	10.82
8.4	45	0.96	7.10
10.5	45	1.51	11.33
10.5	45	1.38	9.75
10.5	45	1.45	10.66
10.5	45	1.46	10.45

El rendimiento de extracción se ve directamente beneficiado por el incremento del pH, hasta un valor de 10.5 en el cual se encontró el máximo rendimiento, ocasionando que mayores incrementos desfavorezcan el rendimiento en la extracción de proteína (ver Figura 10). Dicho comportamiento puede deberse a una saturación de proteína en el medio respecto al cambio en el punto isoeléctrico de éstas, es decir que a valores más alcalinos de pH el punto isoeléctrico de la proteína microalgal no se ve afectado (Gerde et al., 2013). Desde el punto de vista económico es un resultado interesante, si se piensa en un proceso a escala semi-industrial o industrial, pues se reduciría el consumo de agente alcalino que se requiere para ajustar a pH más altos, obteniendo rendimientos prácticamente constantes.

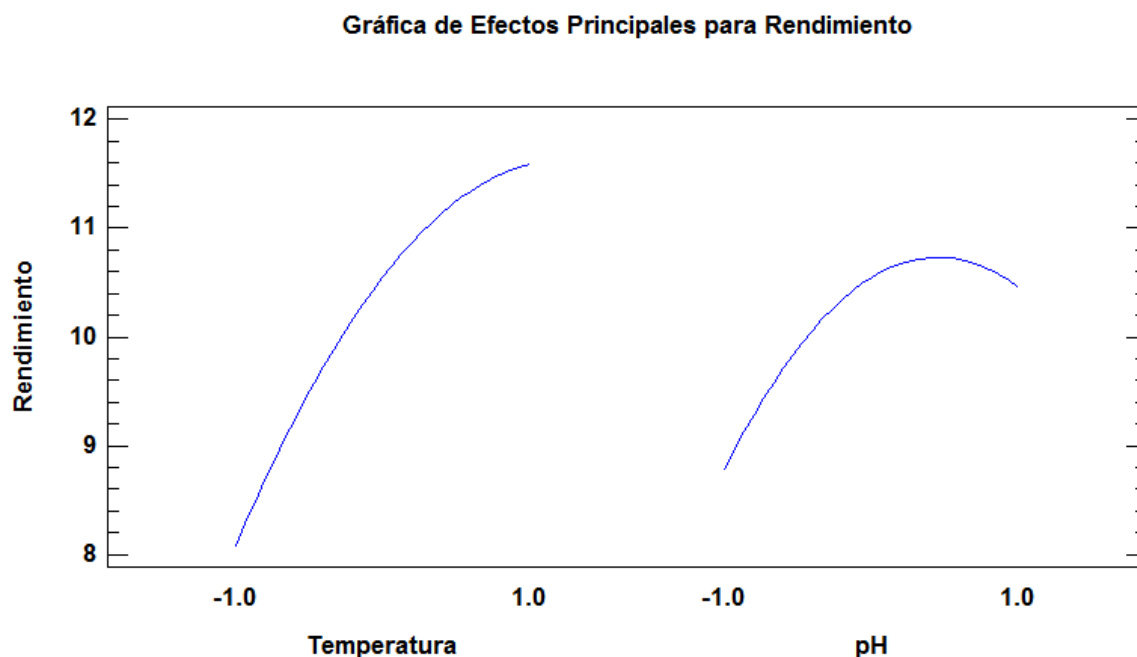


Figura 10. Gráfica de efectos principales, diseño experimental

En el caso de la temperatura se observa que para la mayor parte del rango estudiado, el incremento en la variable favorece considerablemente al rendimiento del proceso. Los mayores rendimientos de obtención de proteína se alcanzaron a una temperatura de 66°C, valor más alto estudiado en el rango. La limitación en el rango de estudio para la temperatura se debió fundamentalmente a que el medio de calentamiento empleado en la investigación no permitía mayores valores de ésta. De igual manera que a valores cercanos a 66°C la influencia que tiene la temperatura sobre el rendimiento se empieza a volver menos pronunciada, permitiendo inferir que la temperatura óptima para el proceso de obtención de proteína se encuentra cerca de 66°C (ver Figura 10 y Figura 11). Adicionalmente se conoce que la proteína tiende a degradarse a temperaturas alrededor de 90°C, por lo cual para estudios posteriores del grupo, no conviene acercarse mucho a ese valor; considerando además el punto de equilibrio en donde el incremento en el rendimiento de extracción sea justificable por el consumo energético que conlleva un aumento en la temperatura.

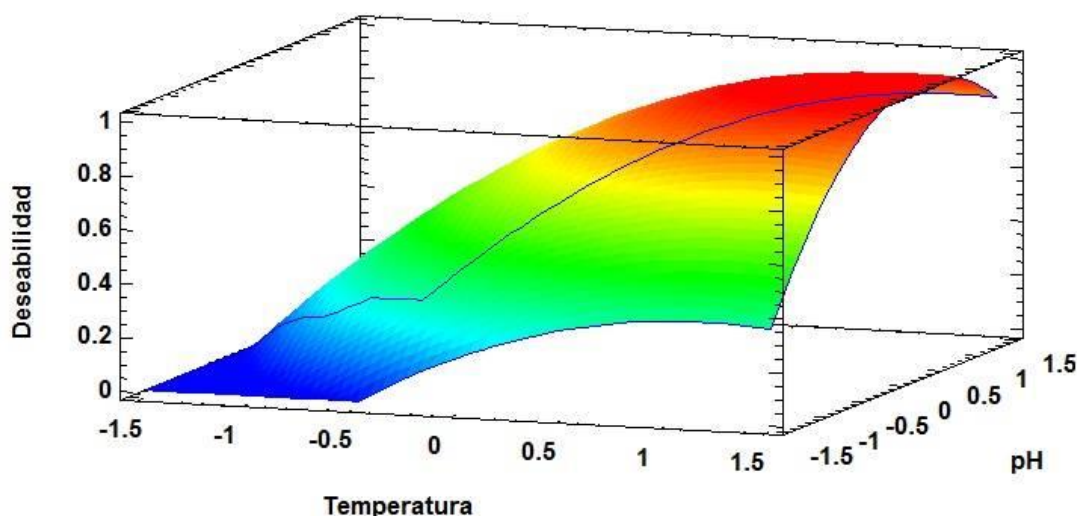


Figura 11. Superficie de respuesta, diseño experimental

La superficie de respuesta (Figura 10) permite visualizar simultáneamente la influencia que tienen la temperatura y pH sobre el rendimiento del proceso. La zona roja que corresponde a la de mayor deseabilidad, concuerda con un valor máximo de 10.5 para el pH y 66 °C para la temperatura. Cabe resaltar que los valores y la tendencia de incremento del rendimiento encontrada en el presente estudio, coincide con las regiones de deseabilidad encontradas en otras investigaciones para obtención de proteína a partir de otra cepa de microalga (Gerde et al., 2013); lo cual permite deducir que las regiones encontradas en el presente estudio corresponden a valores coherentes y cercanos a la naturaleza del proceso, como lo reportado.

3.1.3 Efecto del tiempo en el rendimiento de extracción El estudio de influencia del tiempo en el rendimiento del proceso se realizó a las condiciones que se obtuvo el rendimiento más alto, tanto en el estudio de influencia de las variables como en el estudio del efecto del pH y la temperatura. Las condiciones fueron: velocidad de agitación 200 rpm, relación biomasa:agua igual a 1:40, 66°C y pH igual a 10.5. El máximo rendimiento

obtenido fue de 13.9% a 20 horas de extracción. Comparativamente el rendimiento encontrado a 8 horas de extracción (11.7%) fue un resultado levemente superior a otros estudios realizados donde se han obtenido rendimientos máximos de 11.5% para el mismo tiempo de extracción en biomasa libre de lípidos de la cepa de microalga *Nannochloropsis* (Gerde et al., 2013). A continuación (Tabla 9 y Figura 11) se muestra los rendimientos obtenidos durante el estudio cinético.

Tabla 9. Resultados del análisis del tiempo

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Rendimiento (%)
2	1.27	9.33
4	1.54	10.88
6	1.55	11.36
8	1.64	11.69
10	1.64	11.68
12	1.81	13.06
15	1.87	13.45
20	1.92	13.89

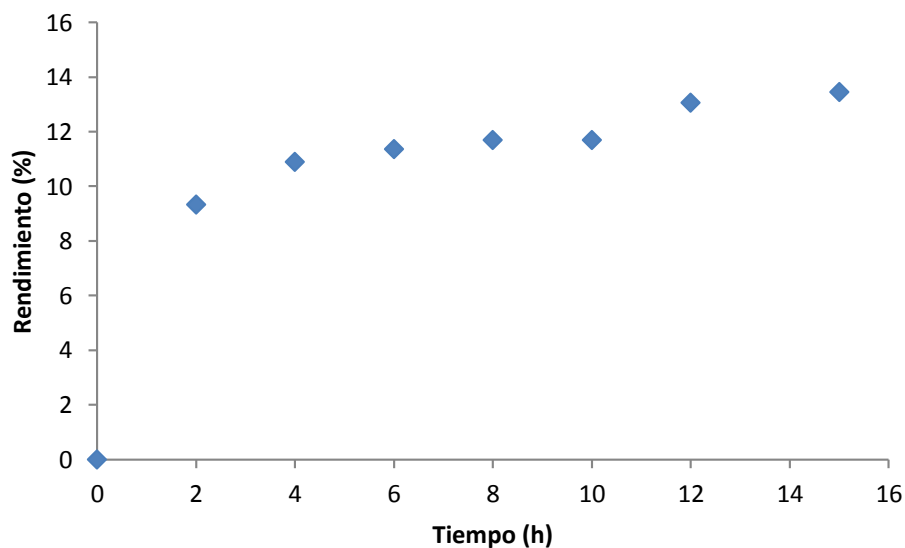


Figura 12. Rendimiento contra tiempo de extracción

La extracción es más rápida al principio, en donde la concentración de proteína en el medio alcalino es baja. A medida que la proteína va emigrando de la célula de microalgas, ésta va llenando el medio y la extracción se hace más lenta. Para éste estudio el tiempo en el cual se presenta un equilibrio y pareciese que un mayor incremento en el tiempo no refleja un incremento apreciable en el rendimiento de obtención de proteína es a las 8 horas. A partir de éste momento el incremento del rendimiento se hace menos pronunciado. Dicho comportamiento puede atribuirse a que al aumentar aún más el tiempo de extracción, la proteína contenida en la célula de las microalgas no se ve mucho más estimulada por el medio acuoso que las rodea para seguir migrando de manera apreciable hacia el exterior. Éste comportamiento también podría deberse a una disminución en el pH de la solución, ocasionando que a mayor tiempo de extracción más disminuya el pH y éste actúe como un inhibidor para que la proteína continúe solubilizando hacia el medio, por lo cual la limitante en la extracción no solo puede ser un efecto ligado al tiempo, si no un efecto cruzado con la disminución del pH.

Se estudió el comportamiento cinético de la extracción, para esto se ajustaron dos modelos cinéticos a esta operación, el modelo de una reacción en un reactor por lotes y la cinética de extracción de polifenoles de la uva.

Modelo reactor por lotes: El sistema empleado en la investigación se asemejó al de un reactor por lotes, cuya cinética viene descrita por la ecuación 3.

$$\frac{dC_p}{dt} = kC_p^\alpha \quad (3)$$

Donde C_p es la concentración de proteína en mg/mL que se ha ido extrayendo en un tiempo t (h), k es una constante de transferencia de masa proteica desde la microalga hasta el medio acuoso alcalino y α es el orden del proceso de solubilización de proteína en el medio.

De ésta manera la concentración de proteína C_p puede asemejarse a un producto que ésta siendo obtenido durante una reacción química convencional, en términos de conocer la

cinética del proceso. Para determinar la cinética es necesario establecer la evolución de la concentración de proteína en el medio en función del tiempo (ver Figura 13).

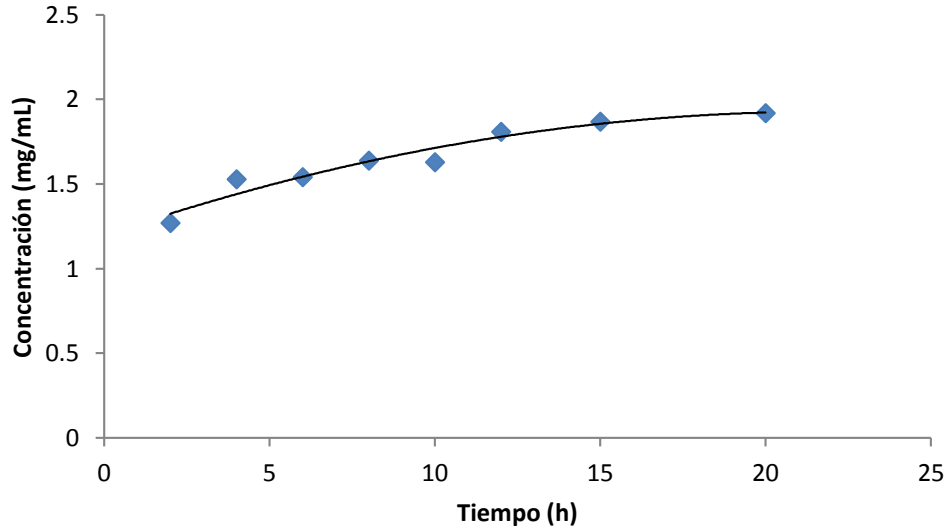


Figura 13. Concentración de solución vs tiempo de extracción

Escogiendo un orden igual a 1.5 para la cinética del proceso, después de descartar los órdenes 1, 1.45, 1.8, 2 y 2.5, se tiene que:

$$\frac{dc_p}{dt} = kC_p^{1.5} \quad (4)$$

Organizando e integrando la Ecuación 4 tenemos:

$$-\frac{2}{C_p^{0.5}} = kt + A \quad (5)$$

De modo que graficando $-\left(\frac{2}{C_p^{0.5}}\right)$ vs t se pudo determinar una recta de correlación, cuya ecuación permitió hallar los valores de las constantes cinéticas del proceso. La pendiente de la recta se asoció con la constante de transferencia de masa proteica (ver Figura 14). La constante A esta asociada a la concentración de proteína en el tiempo cero.

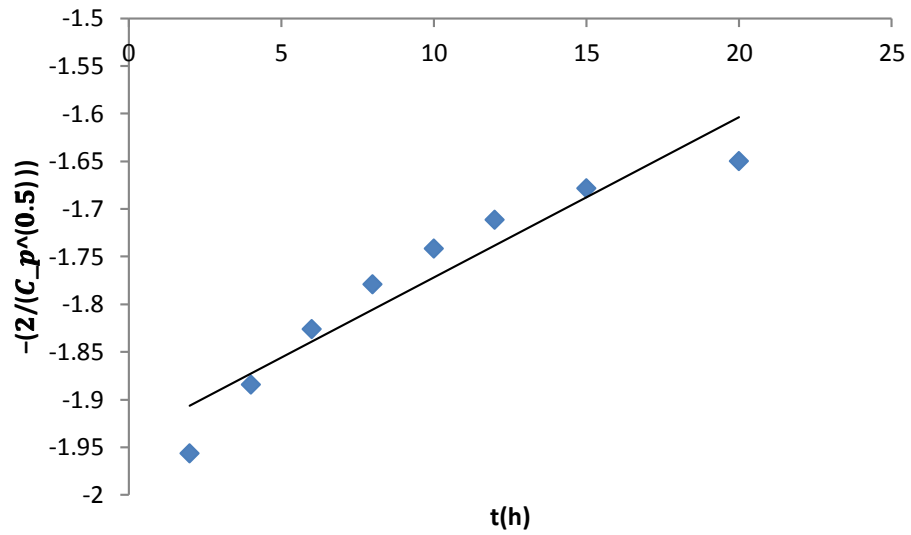


Figura 14. Gráfico de correlación cinético, $-\left(\frac{2}{C_p^{0.5}}\right)$ vs t

La constante de transferencia de masa corresponde al valor de la pendiente de la recta de correlación cinética y su valor fue $0.0168 \text{ mL}^{0.5}/\text{mg}^{0.5}\cdot\text{h}$. Este modelo solo es válido en intervalo de 2 a 20 horas.

Modelo de extracción de polifenoles de la semilla de uva: se realizó el ajuste de los parámetros de este modelo cinético reportado (Bucić-Kojić et al., 2007):

$$C_p = \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (6)$$

Donde K_1 representa la constante de velocidad al inicio de la extracción y K_2 la constante de capacidad cuando se alcanza el equilibrio en el proceso de extracción. Para el ajuste de los parámetros se usó la herramienta de regresión no lineal en POLYMATH 6.0 (ver

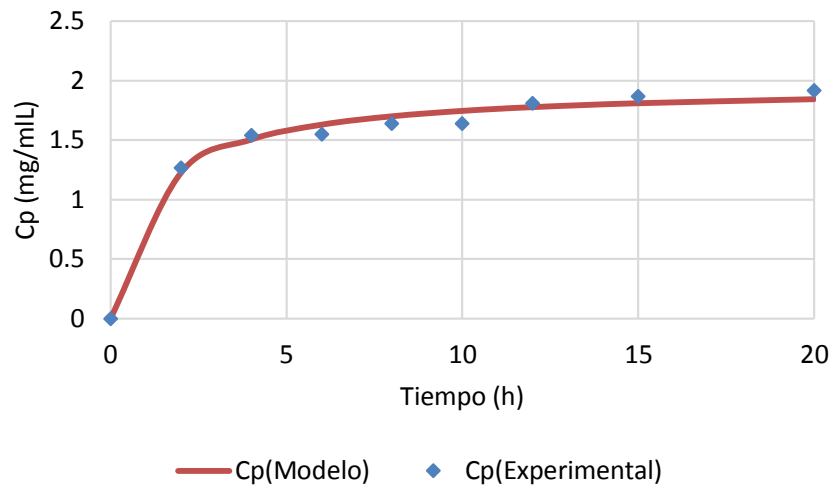


Figura 15. Ajuste modelo cinético reportado por Bucić-Kojić et al.

Lo parámetros cinéticos ajustados son, $K_1 = 0.61 \left(\frac{h \cdot mL}{mg} \right)$ y $K_2 = 0.51 \left(\frac{mL}{mg} \right)$, con un R^2 de 0.985 y una variación de 0.005. Por lo que se puede afirmar que de los modelos evaluados éste es el que mejor se ajusta al proceso de extracción de proteína estudiado en esta investigación.

La cantidad de proteína solubilizada de la biomasa residual de la microalga *Chlorella vulgaris* por volumen de solución acuosa, parece estar restringida por el equilibrio de transferencia de masa que se alcanza aproximadamente a las 8 horas.

Cabe resaltar que las evaluaciones cinéticas con el propósito de determinar constantes que permitan correlacionar la proteína aislada por intervalos de tiempo con los diferentes sistemas utilizados, son bastante escasas y no se han reportado muchos estudios a la fecha, especialmente para el caso de las microalgas. Como se podrá apreciar a continuación (Sección 3.1.5) evidentemente la proteína no es el único producto que ésta siendo extraído y solubilizado en el medio acuoso, por lo cual hay otras sustancias que interfieren en la cinética del proceso. Sin embargo para ésta evaluación cinética se consideró la proteína que se solubiliza como el producto principal.

3.1.4 Extracción de proteína a biomasa fresca Las condiciones a las cuales se realizó el ensayo fueron a las mejores encontradas en la presente investigación para biomasa residual sin lípidos (ver Tabla 10).

Tabla 10. Extracción de proteína a biomasa fresca

Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Rendimiento (%)
0.283	1.77	16.95

Se observó que comparativamente el rendimiento directo de obtención de proteína es mayor para la biomasa fresca que para la biomasa residual a las mismas condiciones de extracción (11.36% para biomasa residual sin lípidos). Éste comportamiento puede atribuirse a que la proteína que se ha perdido durante la extracción de lípidos es una proteína sensible y fácilmente separable de la matriz algal (Gerde et al., 2013). Para el caso de la biomasa residual libre de lípidos, una parte considerable de proteína globular ha sido arrastrada por los solventes empleados durante la extracción de lípidos, por lo cual la proteína que no ha sido arrastrada en éste proceso es más resistente y se encuentra más arraigada a la célula microalgal, haciendo más difícil su solubilización en el medio al momento de aplicar el proceso de obtención de proteína. Este comportamiento también puede deberse a que una parte importante de proteína globular de la microalga se ha visto afectada o incluso desnaturalizada por el proceso de extracción de lípidos, ya que cuenta con una etapa de disrupción celular térmica. Éste daño o desnaturalización de la proteína hace que ésta deje de ser soluble, minimizando así los rendimientos para biomasa residual (Gerde et al., 2013; Safi, Ursu, et al., 2014).

Por ésta razón, existe un beneficio claro en cuanto al rendimiento de extracción de proteína de la biomasa fresca de microalgas respecto a la biomasa sin lípidos, lo que puede llegar a orientar las investigaciones de GRUBIOC en cuanto a la mejor forma de separación de bioproductos aprovechables de la microalga, evitando que la calidad de los lípidos no se vea afectada por el proceso de obtención de proteína.

3.1.5 Concentración de proteína y cierre de balance En este trabajo se prefirió técnicamente la liofilización como método para concentrar la proteína presente en solución, porque no se somete el material a altas temperaturas, evitando la degradación de las proteínas. Se realizó la extracción de proteína de la biomasa residual para su posterior liofilización (ver Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la extracción de proteína a biomasa residual para liofilización

Absorbancia	Concentración (Lowry) (mg/mL)	Rendimiento (%)
0.308	1.54	11.48

Se escogió ésta prueba para establecer también un cierre de balance del proceso de obtención de proteína y poder conocer que tan sensible son los métodos de cuantificación y los rendimientos obtenidos en la presente investigación. La determinación de proteína en la biomasa sin lípidos que ingresa al proceso y la biomasa residual sin proteína que sale (ver Tabla 12), se realizó por el método de Kjeldahl con un factor de 6.35 recomendado para *Chlorella vulgaris* (Safi et al., 2012).

Tabla 12. Balance de proteína en el proceso

Flujo	% Humedad	% Proteína (m/m) base seca	% Proteína (m/m) base húmeda
Biomasa residual sin lípidos	92.19	40.32	3.15
Fase acuosa	-	-	0.15
Biomasa residual sin lípidos y sin proteína	86.85	23.48	3.09

La cantidad de proteína que sale del proceso en la fase acuosa y en la biomasa residual sin proteína corresponde al 85.6% de la proteína que ingresa al proceso en la biomasa residual sin lípidos, presentándose diferencias del 14.4%. Esta diferencia puede deberse a la

incertidumbre de los métodos analíticos. De igual manera los rendimientos obtenidos en la presente investigación corresponden a valores coherentes y muy cercanos a los reportados en la literatura consultada.

Las pérdidas que se presentan en el cierre de balance pueden deberse al error intrínseco que implica utilizar métodos analíticos diferentes para la determinación de proteína (Lowry para proteína en solución acuosa y Kjeldahl para matrices sólidas de biomasa), también pueden deberse que a la longitud de onda que se midió Lowry (700 nm) no estén siendo visibles cierto tipo de proteínas que están siendo extraídas pero no cuantificadas, lo que incrementaría los rendimientos y disminuiría las pérdidas por el cierre de balance. También parte de estas pérdidas pueden estar asociadas a la cantidad de materia que queda pegada en todo el material de laboratorio usado para este proceso.

El liofilizado obtenido se ve con un aspecto inflado, debido al vapor de agua (Figura 15).



Figura 16. Proteína liofilizada de biomasa residual de microalga

Tabla 13. Resultados promedio de las muestras liofilizadas

Peso muestra (g)	Peso liofilizado (g)	Concentración de liofilizado en solución acuosa (mg/ml)	Humedad (%)	Proteína* (m/m) (%)	Concentración de proteína en solución acuosa (mg/ml)
19.85	0.214	10.79	13.99	18.44	1.97

Los resultados de cada muestra liofilizada se pueden ver en el Apéndice F.

*% de proteína en base seca.

La concentración de liofilizado, calculada a partir de los pesos de la muestra inicial y el liofilizado, es relativamente alta con respecto a la concentración de proteína estimada por el método de Lowry, por ésta razón se procedió a cuantificar la proteína presente en el liofilizado por el método de Kjeldahl. Como se puede observar, no todo el liofilizado es proteína, habiéndose secado otro tipo de sustancias como pueden ser carbohidratos y ceniza. Puede apreciarse que efectivamente la cuantificación de proteína realizada por el método de Lowry (1.54 mg/mL), es un valor muy cercano a la proteína realmente liofilizada (1.95 – 2 mg/mL) (ver Tabla 13). Lo cual permite inferir que la determinación de proteína en solución acuosa es confiable y por consiguiente los rendimientos determinados son un buen valor de referencia. La diferencia existente puede deberse a que los métodos por el cual se está cuantificando la proteína (Lowry para proteína en solución y Kjeldahl para proteína en un sólido) son diferentes, lo cual implica un error intrínseco del método analítico.

La concentración de proteína por liofilización permitió obtener un concentrado de proteína blanca con 13.9 % de humedad y 18.4% de proteína en base seca (Ver Tabla 13). En general la obtención de éste tipo de proteínas blancas o incoloras es difícil, aún con métodos costosos para retirar color como la adsorción por membranas. Es posible que la obtención de esta proteína pueda deberse al efecto de extraer los lípidos de la biomasa, pues aporte del color propio que puedan aportar éstos pueden estar siendo extraídos paralelamente ciertos pigmentos.

3.1.6 Análisis de pérdida de proteína por extracción de lípidos Para establecer la cantidad y la proporción de proteína que se pierde por la extracción de lípidos se establece un balance de materia tomando como base 20g de biomasa fresca (ver Figura 15). Como se ha mencionado, la metodología empleada para la extracción de lípidos es un protocolo establecido en investigaciones previas de GRUBIOC, como se menciona en la sección 2.2.

Para el balance son tenidos en cuenta los resultados obtenidos de los análisis realizados a la biomasa fresca y la biomasa residual sin lípidos (ver Tabla 14).

Tabla 14. Determinación de proteína para análisis de pérdidas por extracción de lípidos

Flujo	Humedad (%)	Proteína (m/m) base seca (%)
Biomasa fresca	87,23	25,14
Biomasa residual sin lípidos	92,19	40,32

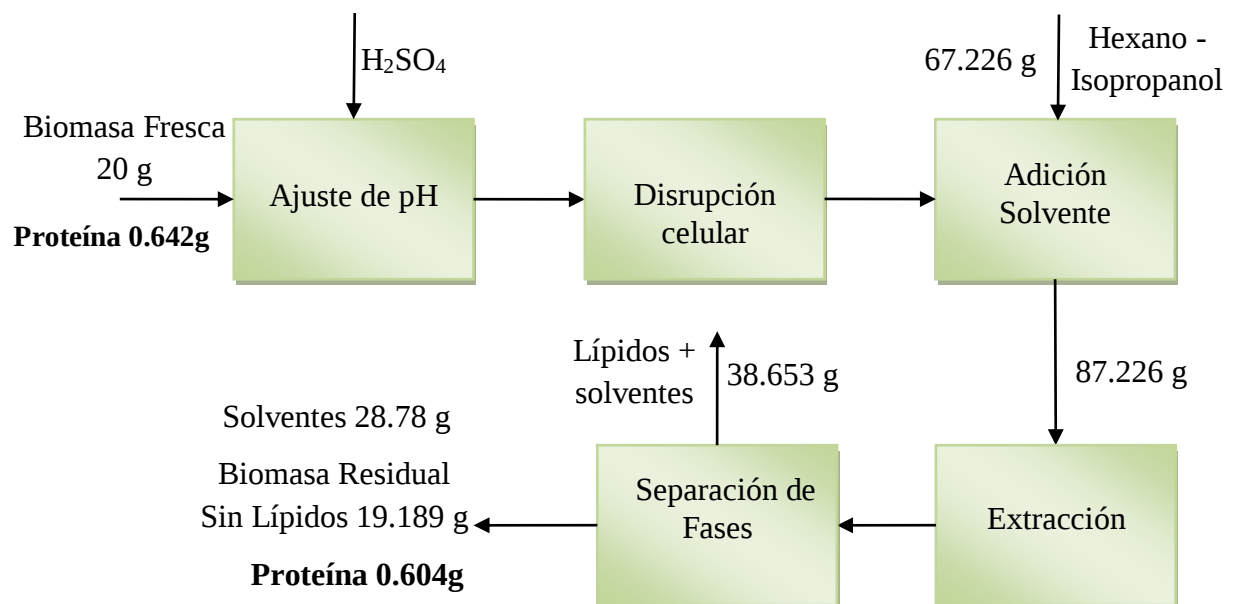


Figura 17. Balance de masa del proceso

El balance de materia permite apreciar que se pierde en la extracción de lípidos el 5.92% de la proteína que entro en la biomasa fresca. Cabe resaltar que éste porcentaje es muy cercano a la diferencia de rendimientos que se presenta al aplicar el proceso de obtención de proteína a biomasa fresca y a biomasa libre de lípidos; lo que permitiría inferir que la proteína que arrastran los solventes es una proteína sensible a la salida de la célula microalgal y que al no estar presente en la biomasa residual, disminuye los rendimientos de obtención, pues queda en la matriz microalgal aquella proteína que es más difícil de arrastrar.

4. ANÁLISIS DE COSTOS OPERATIVOS A ESCALA PILOTO

Después de concluir con la determinación de las mejores condiciones en el rango establecido para la obtención de proteína a partir de biomasa residual sin lípidos, se procedió a hacer un análisis de los costos consumibles que están implicados en el proceso, visualizando una futura planta piloto para realizar esta extracción. Se consideró la producción de 1 kg de proteína liofilizada. Se escaló linealmente las cantidades de material requerido con respecto a las usadas en el laboratorio.

En esta sección se consideró únicamente la parte de extracción de proteínas, el procedimiento para la extracción se detalla en la sección 2.4. Se consideran como reactivos la biomasa residual, el agua, el hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico (ver Tabla 15).

Tabla 15. Cantidad y costos de insumos para extracción de proteína, por 1 kg de proteína liofilizada.

Reactivo	Concentración/ Pureza	Precio x kg (\$COP)	Cantidad necesaria (kg)	Total (\$COP)
Biomasa	92.19%			
Residual	Humedad	--	40	--
Agua	De acueducto	1.7 ¹	85.4	146
Hidróxido de Sodio	98%, En escamas	3800 ²	1.6	30400
Ácido Clorhídrico	35% Solución	872 ²	0.224	1954
TOTAL				32500

¹Fuente: EMCALI, tarifas vigentes a Marzo 2014

² Resolución No. 0249 de 2013, Dirección Nacional de Estupefacientes

El predimensionamiento de la capacidad de los equipos se calculó escalando el proceso en el laboratorio (ver Tabla 16). El procedimiento de cálculo se detalla en el APÉNDICE G.

Tabla 16. Equipos principales para la extracción de proteínas

Equipo	Capacidad
Tanque de agitación con calentamiento (extracción) ¹	200 L
Centrifuga	18.75 L/h
Tanque de agitación (precipitación)	94 L
Liofilizador ²	280 L
Tanque dosificador de ácido	44 L
Tanque dosificador de base	280 L

¹ Tanque de agitación con resistencia eléctrica de calentamiento

² Liofilizador *Telstar, Lyonomic 8*, con área de uso de 14.04 m² (Telstar, 2014)

Los consumos energéticos de todas las unidades de operación se calcularon en base a los requerimientos energéticos del proceso y los equipos que intervienen en él (ver Tabla 17).

Tabla 17. Consumo de energía eléctrica de los equipos en la extracción de proteínas

Equipo	Potencia (kW)	Consumo Energético (kWh)	Costo por kWh (\$COP)	Total (\$COP)
Tanque de Extracción (Agitación)	0.295 ¹	2.36	203	479
Tanque de Extracción (Calefacción)	0.871 ²	6.97	203	1415
Centrifuga	5.5 ³	44	203	8932
Tanque de Precipitación (Agitación)	0.00925 ²	0.074	203	15
Liofilizador	26.82	214.52	203	43548
TOTAL				54389

¹ Heurísticas del libro de Diseño de Procesos de Walas (Couper et al., 2009)

² Se calculó el calor necesario para calentar de 25°C a 65°C la solución acuosa de biomasa residual en el proceso de extracción de proteína, asumiendo la capacidad calorífica de esta solución aproximadamente la del agua pura, es una correcta aproximación debido a que el contenido de agua es del 97.5%

³ Se calculó el consumo tomando como referencia una centrífuga industrial de discos marca *Flottweg* (FLOTTWEG, 2014).

El personal requerido es un operario para la operación de esta planta piloto por turno, el cual devengaría 1 SMMLV, lo cual equivale a \$20.534 por las 8 horas de trabajo. Con el salario del operario, la Tabla 15 de costos de materia prima y la de costos energéticos se obtiene en la Tabla 17.

En la distribución de costos se puede observar que la unidad de procesamiento más costosa es la liofilización abarcando el 41% de los costos totales de la producción (ver Figura 17), esto hace pensar que se debe investigar un método más económico para concentrar la proteína que al igual que la liofilización no la degrade térmicamente como lo es el secado por aspersión.

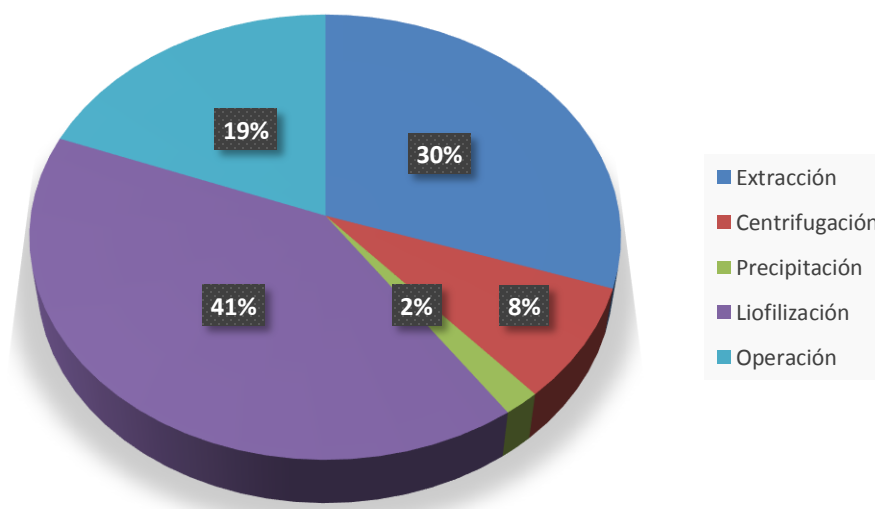


Figura 18. Distribución de costos consumibles por unidad de procesamiento

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos es técnicamente viable obtener un producto de alto valor agregado como la proteína a partir de biomasa residual generada en el proceso de extracción de lípidos de microalga *Chlorella vulgaris*. La obtención de proteína por solubilización en medio alcalino y su posterior concentración por liofilización, es una alternativa para obtener, sin ningún método de retirar el color, un concentrado proteico incoloro de 18,4% en base seca.
- ✓ El rendimiento en la extracción de proteína a biomasa fresca fue 4.1% superior que aquel encontrado a las mismas condiciones para biomasa residual sin lípidos. Considerando que se encontró que la pérdida de proteína por la extracción de lípidos corresponde a 5.92%, sería conveniente extraer primero la proteína de la biomasa de microalga y posteriormente los lípidos, además no se afectaría la cantidad de lípidos remanente, pues éstos no se solubilizan en agua como la proteína.
- ✓ El incremento del pH tiene una influencia favorable y directamente proporcional en el rendimiento del proceso hasta un valor de 10.5, en el cual un mayor incremento no conlleva a aumentos representativos en el rendimiento. Para la temperatura se encontró que se tiende a presentar un aumento directamente proporcional del rendimiento con el incremento de la variable para casi todo el rango estudiado, minimizándose la influencia para valores cercanos a 66°C.
- ✓ La relación biomasa:agua igual a 1:40 favoreció el rendimiento del proceso incrementando la proteína neta obtenida respecto a la inicial, implicando menores concentraciones de proteína pero mayor volumen de solución acuosa con mayor contenido proteico a concentrar; mientras que la agitación no es una variable con una influencia significativa en el proceso.

- ✓ El tiempo es una variable que afecta considerablemente el rendimiento de extracción de proteína, viéndose beneficiado por el incremento de la variable. Sin embargo para tiempos muy altos de extracción el rendimiento se empieza a ver limitado y no presenta un incremento apreciable. Se determinó que a partir de 8 horas empieza a evidenciarse una tendencia casi asintótica en el rendimiento, presentándose un valor de 11,7%, superior al reportado para éste mismo valor de tiempo en otros estudios de obtención de proteína similares para la cepa de microalga *Nannochloropsis* (Gerde 2013).
- ✓ Se recomienda evaluar en detalle la incidencia del tiempo en las primeras 4 horas, debido a que la mayor extracción de proteína sucede en los primeros momentos del proceso. Posiblemente a medida que el tiempo transcurre el pH tiende a disminuir lo cual podría ser una limitante para continuar con la extracción; por lo cual se recomienda medir el pH al finalizar cada extracción y evaluar el efecto que podría tener en el rendimiento un control de pH en el proceso.
- ✓ Se recomienda con el fin de complementar la investigación, estudiar el proceso de obtención de proteína en un sistema diferente al sistema Shaker empleado en este estudio, con el propósito de evaluar un rango más amplio para la temperatura en el cual se pueda visualizar de mejor manera el valor máximo u óptimo de la variable. Cabe resaltar que como la agitación de ese sistema puede llegar a ser muy diferente a la agitación Shaker, se recomienda también estudiar la influencia que pueda tener ese tipo de agitación en el proceso.
- ✓ La liofilización es un método para concentrar la proteína que representa el 50% del costo energético del proceso. Por ésta razón se recomienda estudiar la posibilidad de implementar otro método como el secado por aspersion, con el fin no solo de buscar minimizar el consumo energético, si no mejorar el rendimiento de la concentración y la apariencia final del producto.

- ✓ Si lo que se requiere es obtener un concentrado con alto contenido proteico y prácticamente nulo en grasas, la metodología planteada en la presente investigación es una alternativa atractiva para cumplir con éste propósito, así la separación previa de lípidos disminuya levemente el rendimiento de proteína obtenida.
- ✓ Si se extrae primero la proteína y posteriormente los lípidos, se recomienda estudiar la calidad de los lípidos obtenidos, con el propósito de determinar si la proporción de fosfolípidos y triglicéridos se ve afectada por éste cambio de orden en la extracción, buscando un beneficio hacia la cantidad de triglicéridos, que son los lípidos esterificables.
- ✓ Para alimentación animal especialmente, la cantidad de grasas que puedan estar presentes en un concentrado proteico es más flexible; por lo cual el aislamiento de proteína por solubilización puede ser inoficioso en términos económicos. Se recomienda que en estos casos la proteína sea el último producto a extraerse de la biomasa microalgal, extrayendo primero productos como los lípidos y carbohidratos, para luego solo concentrar la biomasa final remanente. Aplicar solo la eliminación de humedad a ésta biomasa dejará presente aquellos lípidos y carbohidratos que no fueron extraídos, sin embargo éstos integrarán un concentrado con un contenido de proteína relativamente alto que puede ser una buena fuente de nutrición en animales.
- ✓ Como complemento a la presente investigación, se recomienda caracterizar la proteína de biomasa residual obtenida, pues el perfil de aminoácidos que tenga la proteína es muy importante a la hora de compararla con fuentes de proteína convencionales como de la soya o la leche. Cabe resaltar que algunos estudios reportados destacan que el perfil de aminoácidos para la proteína de la cepa *Chlorella vulgaris* es muy similar al de la proteína de soya y del huevo, e incluso superior para algunos aminoácidos esenciales como la Leucina (Becker 2007).

- ✓ Se recomienda realizar un análisis económico más a fondo cuando se tenga la investigación en una etapa de planta piloto para verificar si es económicamente viable la una industria de este tipo de biorrefinerías.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amway, 2014. Proteína Vegetal en Polvo. <http://www.amway.com.co/Store/Catalogue.aspx?show=PrdDetail&NavM=N&line=C&BC=110415> Consultado 15 de Mayo 2014
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), pp.207–10.
- Bucić-Kojić, A. et al., 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), pp.236–242.
- Campbell-platt, G., 2010. *Food Science and Technology*, Oxford: WILEY-BLACKWELL.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), pp.294–306.
- Couper, J. et al., 2009. *Chemical Process Equipment revised 2E: Selection and Design* Segunda Ed., Burlington, MA: Gulf Professional Publishing.
- FLOTTWEG, S.T., 2014. CENTRÍFUGAS DE DISCOS FLOTTWEG. http://www.flottweg.com/cms/upload/downloads/Spanish/disc_stack_centrifuges_Spanish.pdf. Consultado Mayo 23 de 2014
- García-Cuadra, F. et al., 2012. Valorización de biomasa de microalgas : Aprovechamiento de proteínas , carbohidratos y lípidos Valorization of microalgal biomass : Exploitation of proteins , carbohydrates and lipids Abstract. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(2), pp.147–161.
- Gerde, J. a. et al., 2013. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. *Algal Research*, 2(2), pp.145–153.
- González-Delgado, Á.-D. & Kafarov, V., 2011. MICROALGAE BASED BIOREFINERY : ISSUES TO CONSIDER. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4, pp.5–22.
- Halim, R., Harun, R., et al., 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*, 91(1), pp.116–121.
- Halim, R., Danquah, M.K. & Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), pp.709–732.
- Harisha, S., 2008. *Biotechnology procedures and experiments handbook*, Hingham, MA, USA: Infinity Science Press LLC.

- Jimeno, A., Ballesteros, M. & Ugedo, L., 1997. *Biología*, Fuenlabrada: Santillana.
- Kay, R.A. & Barton, L.L., 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6), pp.555–573.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N.R. & Singh, R., 2013. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20, pp.642–656.
- Lee, J.-Y. et al., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1), pp.S75–S77.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other application: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp.217–232.
- MinMinas, 2012. *Precio de Biodiesel*, <http://www.minminas.gov.co/minminas/downloads/archivosSoporteRevistas/7766.pdf>. Consultado Mayo 10 de 2013
- Palomino Martínez, A., 2013. *Extracción de aceites de microalga*. Universidad del Valle.
- Rodas Herrera, M., 2010. *Extracción y Purificación de Proteínas*. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Safi, C., Ursu, A.V., et al., 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, pp.61–65.
- Safi, C. et al., 2012. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), pp.523–529.
- Safi, C., Zebib, B., et al., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp.265–278.
- Telstar, 2014. Telstar Lyonomic, Data Sheet. <http://www.telstar-lifesciences.com/download/files/BR-DS-LYONOMIC-EN-1012.pdf>. Consultado Mayo 23 de 2014
- Ursu, A.-V. et al., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 157, pp.134–139.

APÉNDICE A. Diagrama de pareto para el rendimiento de obtención de proteína en el estudio de evaluación de variables controlables.

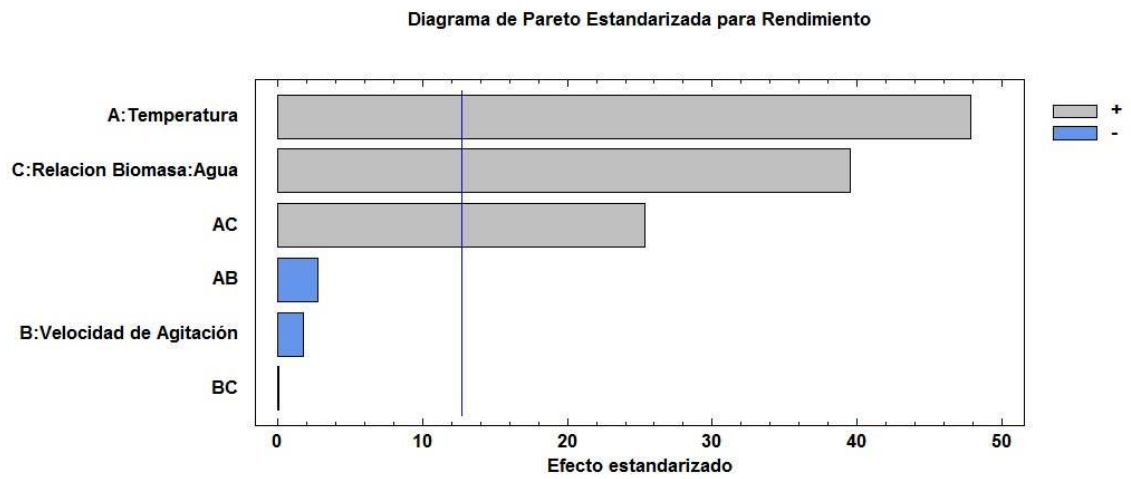


Figura 19. Diagrama de pareto, influencia de variables

APÉNDICE B. Diagrama de pareto para el rendimiento de obtención de proteína en el estudio de evaluación del pH y la temperatura.

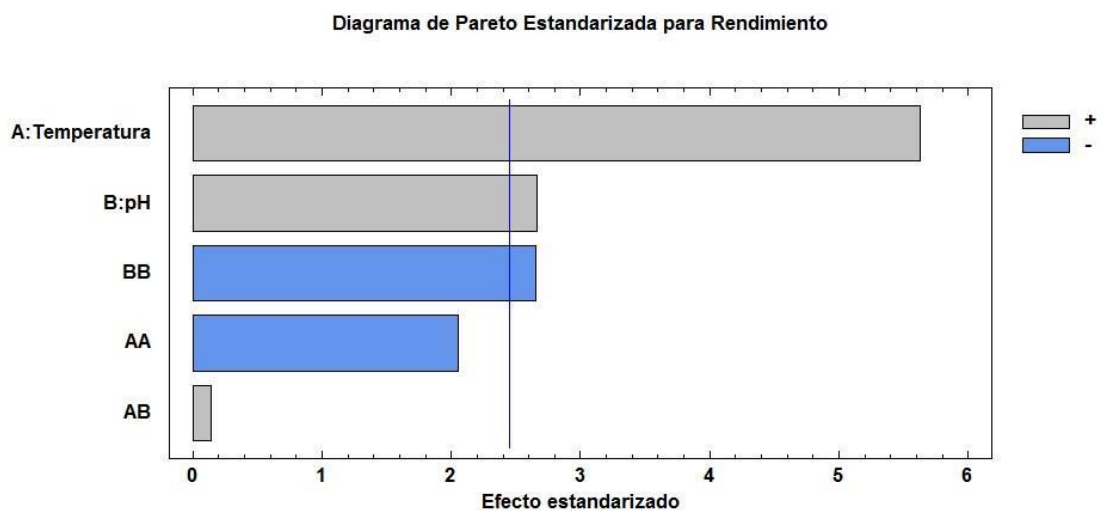


Figura 20. Diagrama de pareto, diseño experimental

APÉNDICE C. Barridos de longitud de onda

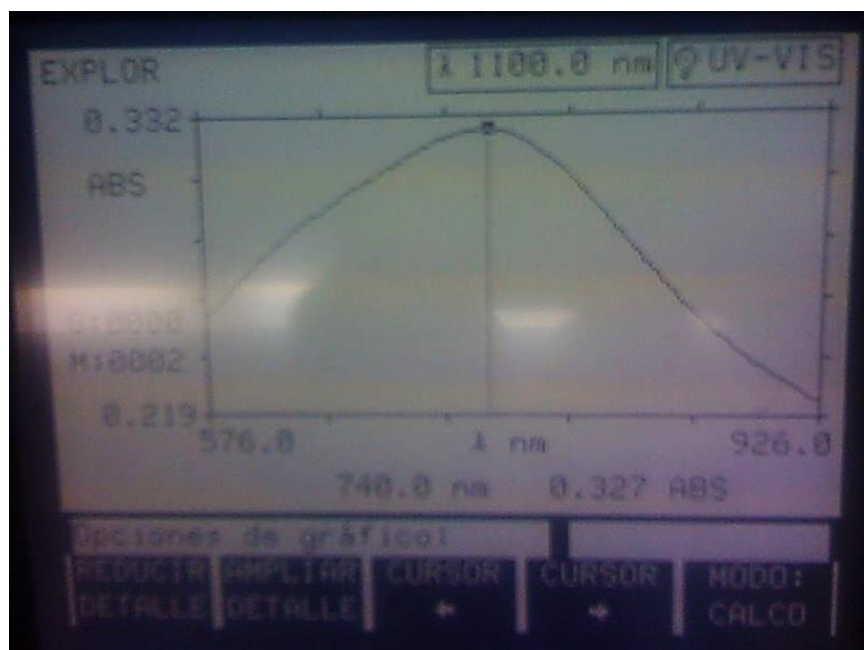


Figura 21. Barrido de longitud de onda para solución de seroalbúmina bovina.

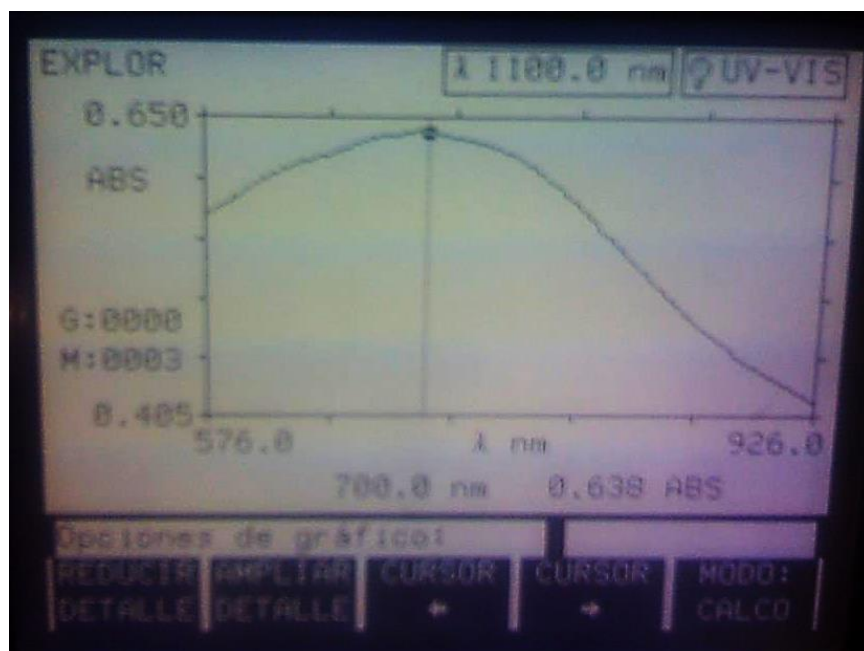


Figura 22. Barrido de longitud de onda para solución de proteína de biomasa residual.

APÉNDICE D. Cuantificación de proteína en solución acuosa

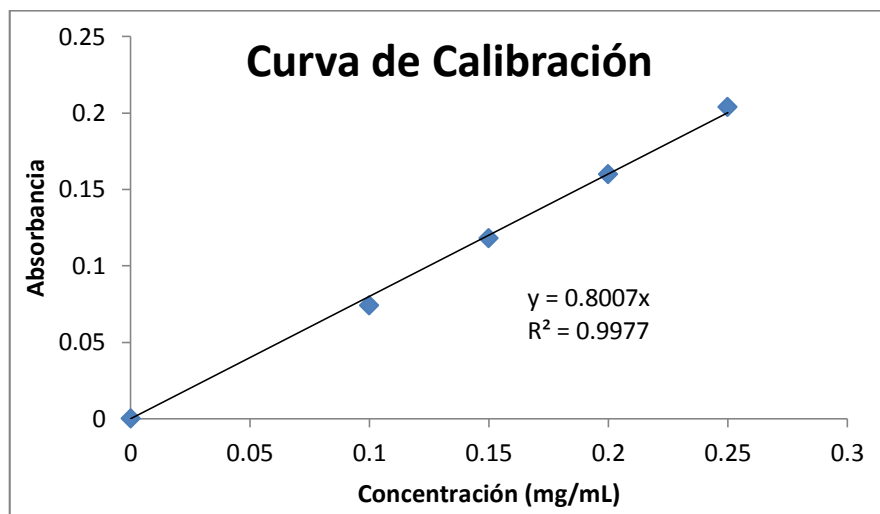


Figura 23. Curva de calibración con Seroalbúmina bovina.

A concentraciones superiores a las utilizadas para realizar la curva, se perdía la tendencia recta de la misma, por lo cual constantemente hubo que preparar diluciones a las muestras medidas con la finalidad de que la absorbancia leída estuviese en el rango recto de la curva. De ésta manera se pudo conocer la concentración de proteína en solución presente en cada prueba.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Absorbancia}}{0.8007} * \text{Factor de dilución} \quad (8)$$

APÉNDICE E. Resultados muestras liofilizadas

Tabla 18. Muestras liofilizadas

Rotulo	Muestra (g)	Liofilizado (g)	Concentración de liofilizado (mg/mL)
A	23.21	0.248	10.68
B	17.68	0.192	10.88
C	18.67	0.202	10.81

Tabla 19. Proteína en el liofilizado

Rotulo	Humedad (%)	Proteína* (m/m) (%)	Concentración solución acuosa (mg/mL)
A	13.99	18.44	1.97
B	13.99	18.44	2.00
C	13.99	18.44	1.95

APÉNDICE F. Predimensionamiento de equipos para la extracción de proteínas

El proceso de escalamiento de todos materiales se realizó como se puede ilustrar en este ejemplo:

- ✓ Para 30g de biomasa residual se adicionan 63.72mL de agua en el laboratorio, en una proporción de 2.124mL de H_2O / g de *BiomasaResidual* por lo tanto para 40Kg*BiomasaResidual* se requieren 84.96L de H_2O

En base a las cantidades calculadas se predimensionaron los equipos requeridos para la planta piloto.

Tanque de agitación con calentamiento (Extracción): Aproximadamente el volumen ocupado por la solución de biomasa residual al 97.5% es de 125L, debido a la agitación y evitar desbordes y un posible aumento de capacidad se estableció un tanque de un volumen de 200L, usándolo a un 63% de su capacidad máxima.

La potencia del motor de agitación se calculó en base a las reglas heurísticas del libro de Wallas, para una solución como ésta se necesita un motor de 10hp/1000galones, dando como resultado 0.4hp que es igual a 0.3kW.

El sistema de calentamiento se diseñó usando una resistencia eléctrica, realizando un balance de energía, asumiendo que el tanque es aislado y la capacidad calorífica de la solución muy cercana al agua tenemos que la energía que se le debe administrar es de 6.967kWh, lo cual implica que se necesita un sistema de calentamiento de 0.871kW.

Centrifuga: La capacidad de la centrífuga se estableció teniendo en cuenta el flujo que sale del tanque de extracción de proteína, dando como resultado 18.75 L/h.

Tanque con agitación (Precipitación): La capacidad del tanque se estableció igual que el anterior tanque estableciendo un volumen de operación del 63% del total (150L).

El cálculo la potencia del motor de agitación con las heurísticas del Wallas dio como resultado 0.00935 kW.

Liofilizador:

El proceso de liofilización requiere de 20 a 24 horas, lo cual implica que para cumplir con la meta de 1Kg de proteína liofilizada diaria se requiere una capacidad de 280L. Un liofilizador industrial marca Telstar, Lyonomic de 14.04 m² cumple esta capacidad y tiene una potencia de 26.82kW.

Tanques dosificadores de ácido y base: Su capacidad se calculó basados en 1 semana de almacenamiento de las soluciones.

ANEXO A. Métodos para la cuantificación de proteínas

Existen diversos métodos para la cuantificación de proteínas, en esta sección se enumeran algunos de los más reconocidos, entre ellos los usados en este trabajo de investigación.

Método de Lowry: Este método cuantifica las proteínas en solución acusa por medio colorimetría. La solución de proteína se hace a reaccionar con el reactivo de Lowry, que está compuesto por soluciones de carbonato de calcio, sulfato cúprico y tartrato sódico-potásico, haciendo que Cu^{+2} presente en el reactivo de Lowry reacciona con el enlace peptídico de las proteínas. Después de 15 minutos de reacción se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu por 30 minutos, donde los grupos $-\text{OH}$ reductores de los aminoácidos tirosina y triptófano que, junto con los complejos Cu^{+2} , reducen el reactivo de Folin generando un color azul oscuro. A las muestras se les realiza medición de la absorbancia, para esto se requiere hacer previamente una curva de calibración con proteína comercial seroalbúmina bovina realizando las mismas reacciones. Este método es el que presenta menores interferencias y una muy buena sensibilidad a valores pequeños de concentración de proteína. (Harisha, 2008)

Método de Biuret: Este método cuantifica las proteínas en solución acusa por medio colorimetría. Se basa en la reacción de Biuret que hace cambiar de color la solución a violeta, debido a la formación del complejo de cobre en un medio alcalino en un medio que posee compuestos con grupos $-\text{CO}-\text{NH}$. El complejo se basa en la desprotonización de los grupos amida para formar el enlace con el Cu (II). A la solución proteica se le adiciona NaOH para alcalinizar y luego el reactivo de Biuret dejando reaccionar por 20 minutos. Al igual que el método de Lowry se requiere medir la absorbancia de las muestras y compararlas con la curva de calibración previamente realizada con seroalbúmina bovina. Este método presenta mayores interferencias que el método de Lowry y tiene una menor sensibilidad, pero tiene como ventaja que es más económico. (Harisha, 2008)

Método de Bradford: Este método cuantifica las proteínas en solución acuosa, pero se emplea una reacción diferente a los métodos anteriores. En este se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos. Como desventaja tiene que es más costoso y un poco menos sensible a bajar concentraciones de proteína. (Harisha, 2008)

Método de Kjeldahl: Este método no cuantifica directamente proteínas como lo hacen los anteriores, cuantifica el nitrógeno total. Se usa Kjeldahl para la cuantificación de nitrógeno total en biomasa y es usado comúnmente para alimentos, este método ampliamente utilizado para la cuantificación indirecta de proteínas. El método consta de 3 etapas:

- ✓ Digestión: conversión del Nitrógeno (proveniente de las proteínas, por ejemplo) en ion amonio mediante calentamiento (a una temperatura de 400° C aproximadamente) en bloque de digestión con adición previa de ácido sulfúrico y catalizador, sulfato de cobre (II), que desencadenan la conversión del nitrógeno de la muestra en amonio.
- ✓ Destilación: separación por arrastre con vapor del amoníaco y posterior solubilización en una solución ácida de concentración conocida. En esta etapa se adiciona NaOH a la disolución de amonio obtenida previamente, generándose NH₃ y vapor de agua, que arrastra al mismo. La solubilización posterior en la solución ácida permite la conversión de NH₃ a catión amonio, el cual se encuentra junto con el exceso de solución ácida añadido. El NH₃ puede recogerse sobre dos medios: ácido fuerte en exceso de concentración conocida, o bien, ácido bórico en exceso medido.
- ✓ Valoración: medición de la cantidad de ácido neutralizado por el amoníaco disuelto, lo que indica la cantidad de Nitrógeno presente en la muestra inicial.

Usando la Ecuación 9 se encuentra el contenido de proteínas basado en el contenido de nitrógeno, el factor depende de la naturaleza de la biomasa pero se tiene un valor de referencia de 6.25 esto debido a que el 16% del contenido de proteínas es asociado al nitrógeno presente en ellas.

$$\textit{Contenido Proteínas} = \textit{Contenido Nitrógeno Orgánico} \times \textit{Factor} \quad \text{Ecuación 1}$$

Según un estudio de la Universidad de Toulouse el factor más adecuado para la cepa de microalga *Chlorella vulgaris* es 6.35 (Safi et al., 2012), y con este valor se trabajó en la investigación.