

**ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A LA APROXIMACIÓN TECNOLÓGICA DE LA
VALORIZACIÓN DE LA VINAZA DE LEVADURA PARA LA PRODUCCIÓN DE
ÁCIDOS GRASOS DE ORIGEN MICROALGAL.**

SEBASTIÁN ANDRÉS VALENCIA VELANDIA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CALI
MAYO 2018**

**ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A LA APROXIMACIÓN TECNOLÓGICA DE LA
VALORIZACIÓN DE LA VINAZA DE LEVADURA PARA LA PRODUCCIÓN DE
ÁCIDOS GRASOS DE ORIGEN MICROALGAL.**

SEBASTIÁN ANDRÉS VALENCIA VELANDIA

Proyecto de Grado para optar el título de Ingeniero Industrial

**Director proyecto
NELSON HERNANDO CAICEDO ORTEGA**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CALI
MAYO 2018**

Contenido

	pág.
RESUMEN	7
1 Introducción	8
1.1 Contexto, Justificación y Formulación del Problema	9
1.1.1 Contexto	9
1.1.2 Justificación	9
1.1.3 Formulación del Problema	9
2 Objetivos	10
2.1 Objetivo del Proyecto	10
2.2 Objetivos Específicos	10
2.2.1 Entregables	10
3 Marco de Referencia	11
3.1 Antecedentes o Estudios Previos.....	11
3.2 Marco Teórico	12
3.3 Contribución Intelectual o Impacto del Proyecto	15
4 Metodología	16
5 Resultados	21
5.1 Discusión de resultados	21
5.1.1 Evaluación experimental.....	21
5.1.2 Esquema del proceso.	27
5.1.3 Análisis económico y de sensibilidad.....	29
5.2 Conclusiones.....	34
5.3 Recomendaciones.....	35
6 Bibliografía	36
ANEXOS	38

Lista de Figuras

Figura 1. Curva de calibración con Sulfo-Fosfo-vainillina.....	22
Figura 2. Curva de crecimiento para ensayos mixotrófico y heterotrófico.	23
Figura 3. μg de ácidos grasos en 50 μL en el ensayo heterotrófico	24
Figura 4. μg de ácidos grasos en 50 μL en el ensayo mixotrófico.....	24
Figura 5. %p/p de ácidos grasos en ensayo heterotrófico.....	25
Figura 6. %p/p de ácidos grasos en ensayo mixotrófico.	25
Figura 7 Diagrama de proceso realizado en SuperPro Designer para el tratamiento de 1246,5 kg/batch.....	28
Figura 8. Análisis de sensibilidad del VPN para 1246,5 kg/batch.....	31
Figura 9. Análisis de sensibilidad del ROI para 1246,5 kg/batch.....	32
Figura 10. Análisis de sensibilidad del VPN para 62500 kg/batch.....	32
Figura 11. Análisis de sensibilidad del ROI para 62500 kg/batch.....	33

Lista de Tablas

Tabla 1. Reportes DQO, COT y N.....	26
Tabla 2. Resumen económico.....	29
Tabla 3. Reporte de Equipos.....	30
Tabla 4. Resumen de Costos.....	30
Tabla 5. Valores del análisis de sensibilidad.....	31

Lista de Anexos

Anexo 1. Protocolo Fosfo-vainillina38

RESUMEN

Este proyecto de grado evaluó técnica y económicamente el uso de la vinaza de caña de azúcar proveniente del proceso de producción de levadura de panadería como fuente de carbono y nitrógeno para la producción de ácidos grasos de origen microalgal para ser usados como materia prima para biodiesel a través de una aproximación tecnológica por medio del software SuperPro Designer. Se determinó experimentalmente el rendimiento de la producción de ácidos grasos por parte de la microalga *Chorella vulgaris* empleando el método colorimétrico de Fosfo-vainillina dando como resultado un máximo de 15 % p/p referido a la biomasa algal base seca.

En cuanto a la evaluación económica, se encontró que no es financieramente viable la implementación del proceso planteado en este proyecto debido a los altos costos de las instalaciones. Por último, se desarrolló un análisis de sensibilidad variando el precio de venta de los ácidos grasos, la producción de biomasa, y el porcentaje de ácidos grasos en la microalga; encontrando que la variable que más afecta a la viabilidad del proyecto es la producción de biomasa.

Palabras claves: Microalga, Ácidos grasos, Fosfo-Vainillina, SuperPro Designer, Vinaza.

1 Introducción

La vinaza es un co-producto líquido con una alta carga orgánica contaminante proveniente de la producción de levadura y etanol a partir de las mieles o jugos de caña de azúcar. Este co-producto es un importante contaminante por su bajo pH (4.0 – 4.60), alta temperatura (92 – 98 °C) y elevado contenido de materia orgánica; si el etanol es producido a partir de jugos la demanda química de oxígeno (DQO) de las vinazas está entre 15 a 35 Kg DQO/m³, y si es producido a partir de mieles la DQO de la vinaza aumenta a valores de 60 a 80 Kg DQO/m³. (Dania Alonso Estrada, Enero-Marzo, 2016)

La vinaza está compuesta de manera general por: sustancias inorgánicas insolubles (como el K, Ca y SO₄), alcoholes (etanol y glicerol) y azúcar residual (C5), sustancias orgánicas insolubles y volátiles, entre otras. Debido a estos componentes la vinaza tiene potencial de ser utilizada como medio nutritivo para el cultivo de microorganismos (hongos y microlagas) de interés industrial (Tsz Him Kwan, 2015).

Entre los usos industriales que se les puede dar a las microalgas se encuentra la remoción de metales pesados y nutrientes de aguas residuales (K. R. Pérez-Silva, oct. 2016), además de la generación de moléculas de interés para la industria farmacéutica, alimentaria, y de biocombustibles, como lo son los ácidos grasos para la formación de biodiesel. Las microalgas tienen la capacidad de acumular cantidades significativas de lípidos, es decir que tienen potencial para ser una fuente de materia prima para la elaboración de biodiesel. (Gemma Vicente, 2017)

Debido al impacto ambiental producido por la vinaza y el alto volumen que se produce en la destilación de etanol y en la producción de levadura, es necesario buscar alternativas para su degradación. Por lo anterior, en este proyecto se implementará un medio nutrido con vinaza para el crecimiento de microalgas con el fin de generar ácidos grasos necesarios para la elaboración de biodiesel.

Este proyecto se enfocó en dos aspectos: el primero fue, evaluar experimentalmente el potencial de la vinaza en la producción de ácidos grasos, los cuales serán cuantificados por medio de técnicas analíticas colorimétricas. Y segundo, realizar un análisis de sensibilidad a un proceso de transformación de vinaza, por medio del software Super-Pro Designer®; con el fin de tener una aproximación tecnológica de la valorización de la vinaza en la producción de ácidos grasos de origen microalgal.

1.1 Contexto, Justificación y Formulación del Problema

1.1.1 Contexto

En Colombia el sector azucarero está representado actualmente por 13 ingenios (Cabaña, Carmelita, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Risaralda, Sancarlos, Tumaco Ríopaia-Castilla, Incauca y Providencia) de los cuales, desde el 2005, los ingenios Incauca, Manuelita, Providencia, Mayagüez y Risaralda, cuentan con destilerías anexas para la producción de alcohol carburante (etanol). (Asocaña, 2017)

Colombia es el tercer país productor de etanol en América Latina, después de Brasil y Argentina, con una producción anual de aproximadamente 456 millones de litros en 2015. (Asocaña, 2017) De acuerdo a la federación nacional de biocombustibles de Colombia, la producción de etanol de caña ha crecido desde el 2010 donde se produjeron 291.28 millones de litros de etanol hasta el 2016 donde se produjeron 434.43 millones de litros; (FedeBiocombustibles, 2017) este incremento en la producción de etanol implica un incremento en la producción de vinaza debido a que un litro de etanol, en promedio ocasiona la producción de 9 a 14 litros de vinaza (Raquel Rezende dos Santos, 2016).

En Colombia se encuentra la empresa Levapan, especializada en la producción de levaduras, actualmente esta compañía exporta a 90 países, entre los cuales se encuentra Estados Unidos, México, Inglaterra, España, Italia, Holanda, España, Corea, Vietnam y Nueva Zelanda, entre otros. Esta empresa proyectó un aumento del 23% en la venta de su portafolio de producto con su planta en Tuluá en el 2017. En ese mismo año la producción de la planta era 50 000 toneladas de levadura de las cuales 25 000 estaban destinadas para exportación. La producción de la empresa y su proyección en aumento en ventas indica una mayor producción de la vinaza asociada a la producción de levadura. (PORTAFOLIO, 2017)

1.1.2 Justificación

Es necesario buscar alternativas para la vinaza debido a que el impacto ambiental producido por esta es alto, debido su bajo pH (4.0 – 4.60), alta temperatura (92–98 °C), elevado contenido de materia orgánica, y su alta demanda química de oxígeno (60 a 80 Kg DQO/m³). Adicionalmente la exploración de alternativas para la vinaza puede generar beneficios económicos para las destilerías productoras de etanol y empresas productoras de levadura.

1.1.3 Formulación del Problema

¿La producción de ácidos grasos a partir de microalgas cultivadas en medios nutridos con vinaza es significativa y económicamente viable para ser usados como materia prima en la producción de biodiesel?

2 Objetivos

2.1 Objetivo del Proyecto

Evaluar los aspectos técnicos económicos de una aproximación tecnológica de la valorización de la vinaza de levadura mediante la producción de ácidos grasos de origen microalgal.

2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar experimentalmente el potencial de la vinaza para la bioaumentación de biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.
2. Esquematizar y resolver los balances del proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.
3. Analizar la pre-factibilidad técnico-económica del proceso obtenido para la valorización de la vinaza.

2.2.1 Entregables

1. Cálculo de la producción de biomasa y ácidos grasos, y protocolo validado para la medición de ácidos grasos en microalgas cultivadas con vinaza.
2. Reporte del balance de materia y energía completo para el esquema del proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.
3. Análisis técnico económico del proceso de valorización de la vinaza.

3 Marco de Referencia

3.1 Antecedentes o Estudios Previos

A continuación se presenta una lista de estudios similares o estudios relacionados con este proyecto. Se buscaron estudios relacionados con el análisis tecno-económico en cultivos de microalgas, cultivo de microalgas con medios nutridos con vinaza, producción de lípidos en microalgas y métodos de cuantificación de lípidos en microalgas.

El primer estudio similar al realizado en este proyecto se titula “Techno-economic analysis of a food waste valorization process via microalgae cultivation and co-production of plasticizer, lactic acid and animal feed from algal biomass and food waste” realizado por Tsz Him Kwan, Daniel Pleissner, Kin Yan Lau, Joachin Venus, Aude Pmmmeret y Carol Sze Ki Lin. De la escuela de energía y ambiente, de la universidad de Hong Kong. (Tsz Him Kwan, 2015)

Seguido de los artículos relacionados con el cultivo de microalgas, “Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media” realizado por Monica Coca, Victor Barrocal, Susana Lucas, Gerardo González-Benito y María Teresa García-Cuero del departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente de la universidad de Valladolid. (Monica Coca, 2015) . Y el artículo “Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as raw material during biodiesel production and cost evaluation” realizado por Panida Rattanoltee y Pakawadee Kaewkannetra del departamento de biotecnología, facultad de tecnología de la universidad de Khon Kaen Tailandia. (Kaewkannetra, 2014)

Los artículos “Cultivation of *Spirulina* maxima in medium supplemented with sugarcane vinasse” realizado por Raquel Rezende dos Santos, Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Jose Luiz de medeiros y Ricardo Moreira Chaloub de la escuela de química de la universidad federal de Rio de Janeiro. (Raquel Rezende dos Santos, 2016) Y “Lipid Production optimization and optimal control of heterotrophic microalgae fed-batch bioreactor” realizado por Javad Abdollahi y Stevan Dubljevic del departamento de química e ingeniería de materiales de la universidad de Alberta, Canadá. (Dubljevic, 2012) Tienen información sobre el cultivo de microalgas con medios nutridos con vinaza y la producción de lípidos en microalgas.

Finalmente el artículo base para la cuantificación de ácidos grasos fue el siguiente. “A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae” realizado por Wei Chen, Chengwu Zhang, Lirong Song, Milton Sommerfeld y Qiang Hu, del departamento de ciencias biológicas aplicadas de la universidad estatal de Arizona, Estados Unidos de América. (Wei Chen, 2009)

3.2 Marco Teórico

Se identificaron los siguientes pilares de conocimiento o temas útiles que contribuyen al buen desarrollo del proyecto. El primero de estos es el análisis técnico económico, debido a que es necesario tener conocimiento de cómo realizar un correcto análisis técnico-económico para implementar adecuadamente el análisis de sensibilidad a la producción de ácidos grasos por medio de microalgas y obtener resultados correctos.

Para este proyecto también fue necesario conocer cómo y de qué manera la vinaza contribuye al aumento de biomasa microalgal y la producción de ácidos grasos, así como también se debe tener en cuenta a que concentración genera el mayor aporte al aumento de la biomasa y las maneras adecuadas de realizar un cultivo y tener mejores resultados. Por esta razón el segundo pilar es el cultivo de microalgas y uso de la vinaza para el aumento de biomasa microalgal y producción de ácidos grasos

El tercer pilar es la medición de la producción de ácidos grasos, puesto que fue necesario tener información sobre las diferentes posibles metodologías para la medición de ácidos grasos en las microalgas debido a que para este proyecto se requirió establecer la producción de ácidos grasos en las microalgas. De igual manera es importante realizar un correcto análisis de sensibilidad, por lo que se esquematizó el proceso de manera detallada junto con sus balances de materia, es decir que el cuarto y último pilar es la esquematización y balance de procesos productivos.

Para realizar una mejor estructuración del aporte de los estudios previos al proyecto, se clasificó la información encontrada en estos 4 pilares de conocimiento previamente nombrados:

Análisis técnico económico: Este pilar se relaciona con el estudio realizado por Tsz Him Kwan, Daniel Pleissner, Kin Yan Lau, Joachin Venus, Aude Pmmeret y Carol Sze Ki Lin (2015). En este estudio se realizó un análisis técnico-económico sobre la valorización de los desperdicios de comida implementados para el cultivo de microalgas en Hong Kong, donde se evidencia una creciente problemática en los desperdicios alimenticios. Este estudio sirve de base para el análisis técnico económico en la valorización de la vinaza, debido a que se realiza un análisis similar para la producción de microalgas nutridas con desperdicios de comida por medio del software Supero-Pro Designer®.

El análisis económico en este estudio se realizó en dos escenarios y se determinó por medio de la estimación del costo de capital, el costo de operación, la utilidad generada y un análisis de sensibilidad. En este documento se manifiesta cómo se realizó la estimación de los aspectos económicos mencionados anteriormente. (Tsz Him Kwan, 2015)

Así mismo el estudio realizado por Monica Coca, Victor Barrocal, Susana Lucas, Gerardo Gonzáles-Benito y María Teresa García-Cuero (2014), se relaciona con este

pilar de conocimiento, debido a que en este artículo se menciona que gran parte de los costos de producción de lípidos a partir de microalgas proviene del costo de cosecha y de extracción de lípidos. Esto depende considerablemente de la densidad de células y el alto contenido lipídico; la alta densidad celular reduce el costo de cosecha y el alto contenido de lípidos reduce la extracción de lípidos. Visto de otra forma el costo de cosecha depende el volumen de las colonias y el costo de extracción depende del peso de la microalga (Monica Coca, 2015).

Cultivo de microalgas y uso de la vinaza para el aumento de biomasa microalgal y producción de ácidos grasos: La relación entre este pilar y el estudio realizado por Monica Coca, Victor Barrocal, Susana Lucas, Gerardo Gonzáles-Benito y María Teresa García-Cuero, radica en que este estudio muestra que se puede usar la vinaza de remolacha como medio nutritivo para la cianobacteria *Spirulina platensis* y se evalúa la bioaugmentación de la *S. platensis* en este medio. Adicionalmente en este estudio se manifiesta que existen pocos reportes enfocados en el cultivo de microalgas a partir de vinaza.

Otro aporte de este estudio es que la productividad de la biomasa fue calculada comparando la concentración de biomasa inicial (x_0) y al final de un tiempo determinado (x_t). Esta diferencia se dividió entre los días de cultivo $P_x = \frac{x_t - x_0}{t}$, la concentración de biomasa fue determinada por medio de la densidad óptica a 750 nm. De este estudio también se establece que a mayor exposición de luz hubo una mayor producción de biomasa. También es prudente tener en cuenta que la concentración de la vinaza fue de 1g/L, y fue agregada después de alcanzar una concentración constante de la biomasa cultivada en 75% del medio de Schösser (SM). 10 días después de la suplementación con vinaza se apreció un incremento de la concentración de la biomasa de aproximadamente 3.4 ± 0.3 g/L. (Monica Coca, 2015)

De igual manera el estudio realizado por Raquel Rezende dos Santos, Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Jose Luiz de medeiros y Ricardo Moreira Chaloub (2016), aporta a este pilar, debido a que en este estudio se evaluó la viabilidad de la vinaza de caña de azúcar como suplemento (fuente orgánica de carbono) en el medio de cultivo de *Spirulina* máxima, se realizaron diversos medios de cultivo y se llegó a la conclusión de realizar un cultivo cíclico de dos etapas (CTSC) con condiciones autotróficas durante la fase de luz del fotoperiodo (12 horas, $70-200 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y condiciones heterotróficas durante la fase oscura (12 horas, 3.0% v/v de vinaza). Esta estrategia dió como resultado un aumento de la concentración de biomasa entre 0.495 g/L y 0.609 g/L, además de alto contenido proteico (entre 74.3% y 77.3% p/p) en el séptimo día de cada ciclo. (Raquel Rezende dos Santos, 2016)

Además, en este artículo se manifiesta que la manipulación de las condiciones de crecimiento de la microalga puede alterar tanto las características de crecimiento como la composición química de las células causando una localización del carbono en lípidos,

carbohidratos y proteínas dependiendo de las condiciones aplicadas. A lo anterior se añade que el crecimiento del microorganismo fue monitoreado por la medición de la densidad óptica a 750 nm. Para evitar la interferencia, la densidad óptica fue corregida en función de la concentración de vinaza añadida. La curva de crecimiento fue construida con los valores de peso seco. (Raquel Rezende dos Santos, 2016)

Por otra parte el estudio realizado por Panida Rattanapoltee y Pakawadee Kaewkannetra (2014), aporta información a este pilar, puesto que en este artículo se cultivó la microalga *Chorella vulgaris* TISTR 8580 en el medio basal Bold bajo tres diferentes condiciones de cultivo, autótroficas (AC), heterótroficas (HC) y mixotróficas (MC) en bioreactores de 20 L. la mayor producción de lípidos (32.9%) se presentó en las condiciones heterótroficas pero la menor producción de proteína (14.5%). El sistema de producción más eficiente en cuanto a producción de lípidos y consumo de energía fue el MC. El crecimiento de la célula fue monitoreado diariamente por medio de la medición de la absorbancia a 540 nm. (Kaewkannetra, 2014)

Así mismo el artículo escrito por Javad Abdollahi y Stevan Dubljevic (2012), provee información sobre la optimización computacional para la regulación en tiempo real de la operación de los bioreactores de microalgas. Este estudio dio como resultado que los cultivos heterótroficos de microalgas requieren menos agua y tierra, además de una tasa de crecimiento alta a comparación de otros cultivos de microalgas. (Dubljevic, 2012)

Medición de la producción de ácidos grasos: El estudio realizado por Raquel Rezende dos Santos, Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Jose Luiz de medeiros y Ricardo Moreira Chaloub (2016), es relevante para este pilar debido a que la extracción de lípidos en este estudio se logró por medio de una mezcla de solvente cloroformo:metanol (2:1) asistido por ultrasonido. Se usaron 0.5g de masa seca por cada 36 mL de la solución, esta mezcla se sometió a un baño de ultrasonido a 40 kHz a temperatura ambiente por 20 minutos. Después se centrifugó (2607 g a 20°C por 10 min), la fase orgánica se recolectó y depositó en otro tubo donde se añadieron 9 mL de KCl 0.88%. Después de remover la parte superior con una pipeta, la parte superior fue lavada por duplicado con la adición de 4.5mL de cloroformo:metanol:agua (3:48:47). La fase orgánica fue colectada y secada en un horno a 40 °C para finalmente determinar el contenido de lípidos por gravimetría. (Raquel Rezende dos Santos, 2016)

Por otro lado en el artículo elaborado por Panida Rattanapoltee y Pakawadee Kaewkannetra (2014), los lípidos intracelulares en la biomasa microalgal fueron extraídos usando la extracción de n-hexano Soxhlet. El porcentaje de lípidos fue determinado por medio de la división entre el peso de los lípidos extraídos y el peso de la microalga seca. (Kaewkannetra, 2014)

También cabe señalar el estudio de Wei Chen, Chengwu Zhang, Lirong Song, Milton Sommerfeld y Qiang Hu (2009), debido a que este artículo trata de como el reactivo

Rojo de Nilo permite realizar la cuantificación de lípidos dentro de las microalgas de una manera rápida y sin necesidad de realizar un proceso de extracción, por medio de un análisis de fluorescencia. (Wei Chen, 2009)

Esquemmatización y balance de procesos productivos: En el artículo de Tsz Him Kwan, Daniel Pleissner, Kin Yan Lau, Joachin Venus, Aude Pmmeret y Carol Sze Ki Lin (2015), se ilustran diagramas del proceso junto con los balances de materias en el proceso de producción de microalgas junto con un análisis de sensibilidad que considera dos diferentes escenarios para la valorización de la vinaza. (Tsz Him Kwan, 2015)

3.3 Contribución Intelectual o Impacto del Proyecto

Se estudió una alternativa para la valorización de la vinaza de Levapan. Esta alternativa es el cultivo de microalgas empleando este coproducto como fuente nutritiva con el fin de producir ácidos grasos. La contribución de este proyecto se da a través de un estudio técnico-económico de este proceso a diferentes escalas productivas, e implementando un método diferente a gravimetría para evaluar el contenido de ácidos grasos en las microalgas.

4 Metodología

1. Evaluar experimentalmente el potencial de la vinaza para la bioaugmentación de biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.

1.1. Definir el protocolo para la medición de ácidos grasos.

Para la parte analítica se partió del protocolo para la cuantificación de ácidos grasos intracelulares en microalgas, propuesto por el departamento de ingeniería bioquímica de la University Collage London (UCL) (London`s Global University).

El protocolo consiste en la preparación de una curva de calibración con estándares de aceite de canola, DMSO 25% v/v, y el colorante Rojo de Nilo. Los estándares que deben ser preparados cada vez que se busque realizar una medición de una muestra de ácidos grasos, y se preparan por medio de diluciones de aceite de canola con DMSO al 25% v/v; posterior a su preparación, y en el menor tiempo posible, se debe servir en un microplate de 96 pozos de fondo plano, 10 μ L de cada estándar de canola con 310 μ L del reactivo Rojo de Nilo, usando como blanco DMSO al 25% v/v.

El microplate se debe incubar a 40°C por 15 minutos a 500 rpm en un termomixer, evitando el contacto con la luz. Pasados los 15 minutos se mide inmediatamente la fluorescencia en un lector de platos con el parámetro de emisión a 530 nm y excitación 580 nm.

De acuerdo al protocolo de la UCL para la cuantificación del lípidos en microalgas se debe tomar 1 o 2 mL del cultivo microalgal y se centrifuga a 10000 rpm por 10 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 1 o 2 mL de DMSO al 25%. De la dilución anterior se toma 10 μ L junto con 310 μ L del reactivo de Rojo de Nilo, y se realiza la medición de la fluorescencia al igual que con los estándares de canola.

La validación del protocolo se realizó con los mismos reactivos que se manejan en el documento de la UCL pero con un lector de platos diferente al usado por la universidad de Londres. Al realizar este protocolo repetidas veces los resultados obtenidos no fueron consistentes ni coherentes con los estándares suministrados para la curva de calibración. Esto puede deberse a que el Rojo de Nilo es fotosensible lo que hace complicado y cuidadoso su manejo, como también a diferencias con el equipo lector de platos empleado.

Por lo anterior se decidió implementar el método colorimétrico con Sulfo-Fosfo-vainillina. Este método se simplifica en cuatro (4) pasos: el primero es la preparación del reactivo de Fosfo-vainillina, segundo, la adición de ácido sulfúrico concentrado a la muestra junto con calentamiento, tercero, la adición del reactivo de Fosfo-vainillina a la muestra y finalmente medir absorbancia a 530 nm (Sanjiv K. Mishra, 2014).

1.2. Realizar la curva de calibración con estándares de aceite de canola.

1.2.1. Preparación de colorante.

La preparación del reactivo de Fosfo-vainillina consistió en pesar 0.3 g de vainillina y disolverlos en 5 mL de etanol absoluto con agitación continua. Una vez esta disuelto se añaden 45 mL de agua desionizada y 200 mL de ácido fosfórico concentrado (70%), todo lo anterior con agitación constante. Este reactivo debe ser preparado poco tiempo antes de su uso y debe ser almacenado en la oscuridad.

1.2.2. Preparación de estándares.

Para la curva de calibración se preparó una solución madre estándar con aceite de canola a una concentración de 1 mg/mL, pesando 10 mg de aceite que fueron diluidos en 10 mL de cloroformo. Con esta solución madre se prepararon los estándares para la curva de calibración tomando 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 50 μ L, 60 μ L, y 70 μ L. para tener puntos con 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 50 μ g, 60 μ g, y 70 μ g de ácidos grasos. Las alícuotas tomadas de la solución madre fueron adicionadas en tubos de ensayo limpios y dejadas por 10 minutos a baño maría para la evaporación del solvente. Posteriormente se añadieron 50 μ L de agua en cada tubo de ensayo.

1.2.3. Medición en lector de platos.

A cada tubo de ensayo se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) y fueron llevados a baño maría por 10 minutos a 100°C para ser posteriormente enfriados en un baño de hielo por 5 minutos. Después se adiciona 2.5 mL del reactivo de Fosfo-vainillina previamente preparado y se homogeniza con agitador vortex por mínimo 30 segundos. Inmediatamente se sirven 100 μ L en un plato de 96 pozos y se incuban por 15 minutos a 37 °C y 300 rpm en un thermomixer para finalmente medir la absorbancia a 530 nm en el lector de platos.

1.3. Cultivo a nivel de laboratorio de *Chlorella vulgaris* sobre vinaza de caña de azúcar.

Se realizaron dos ensayos con la cepa *Chlorella vulgaris*, uno mixotrófico (condición de iluminación) a 30°C con agitación en shaker y uno heterotrófico a 26°C con aireación. El término mixotrófico indica que la microalga está obteniendo energía metabólica por medio de fotosíntesis, es decir de forma autótrofa fijando el CO₂ producido del metabolismo heterotrófico, y de forma heterótrofa por medio del consumo de una fuente de carbono y energía orgánica en el medio (aportado por la vinaza).

Se inició con un pretratamiento a la vinaza original el cual consiste en realizar una dilución de 1:10 con agua tipo 1, para una posterior centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos con el fin de retirar los sólidos más grandes que estén suspendidos en el medio

y que puedan generar interferencia con las mediciones de absorbancia para determinar la concentración de microalgas.

Después de centrifugar se adiciona hidróxido de calcio al 0.15% p/p con el fin de que facilite la precipitación de contenido orgánico y otros sólidos disueltos no deseados. Para realizar bien este proceso se debe dejar en agitación constante por 45 minutos. Seguido de una nueva centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos, recuperando el sobrenadante al cual se le ajusta el pH a 8 y así se obtiene la solución stock que llamaremos vinaza al 100%.

El stock de vinaza al 100% se diluyó con buffer fosfato 0,05 M a pH 8 hasta que quede a una concentración del 58% a la cual se le añaden micronutrientes (2%), macronutrientes (2%), antibiótico (0.1%), Tween 80 (surfactante hidrofílico) (2%) y carbonato de sodio (2%) solo si el crecimiento es en mixotrofia. La dilución con los componentes previamente mencionados son el medio de cultivo base al cual se van a exponer las microalgas, se debe inocular de tal manera que la concentración inicial en el bioreactor sea de aproximadamente 1 g/L con el fin de que ambos tratamientos inicien con la misma concentración de biomasa y se pueda evidenciar cual método de crecimiento es más viable.

Periódicamente a ambos cultivos se les tomaron 1,5 mL de los cuales se usaban 0,5 mL para tomar absorbancia a 630 nm con el fin de estimar la concentración de biomasa en el cultivo, y el volumen restante era usado para hacer la medición de ácidos grasos por el método de la Fosfo-vainillina.

1.4. Evaluar el contenido de ácidos grasos en la muestra.

1.4.1. Preparación de colorante.

La preparación del reactivo de Fosfo-vainillina consistió en pesar 0.3 g de vainillina y disolverlos en 5 mL de etanol absoluto con agitación continua. Una vez esta disuelto se añaden 45 mL de agua desionizada y 200 mL de ácido fosfórico concentrado (70%), todo lo anterior con agitación constante. Este reactivo debe ser preparado poco tiempo antes de su uso y debe ser almacenado en la oscuridad.

1.4.2. Medición en lector de platos.

Se implementó el método de la Sulfo-Fosfo-Vainillina tomando una alícuota de 50µL de muestra en un tubo de ensayo y añadir 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) y someterlo a baño maría por 10 minutos a 100°C, luego enfriarlo en un baño de hielo por 5 minutos. Después se adiciona 2.5 mL del reactivo de Fosfo-vainillina y se homogeniza con agitador vortex por mínimo 40 segundos. Inmediatamente se sirven 100µL en un plato de 96 pozos y se incuban por 15 minutos a 37 °C y 300 rpm en un thermomixer para finalmente medir la absorbancia a 530 nm en el lector de platos.

2. Esquematizar y resolver los balances del proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.

Para este objetivo se realizó de manera experimental y a menor escala el proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal, como se mencionó anteriormente, para calcular la proporción de materia prima, así como las entradas y salidas de cada parte del proceso, para el balance de materia. Se realizaron estudios de porcentaje de sólidos y densidad de la vinaza para determinar la proporción de desperdicios y la cantidad de materia prima que se está utilizando y, adicionalmente, se tomaron en cuenta los resultados de producción de ácidos grasos y las curvas de crecimiento. Definiendo los siguientes pasos.

- 2.1. Realizar el proceso de transformación de las vinazas a biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.
- 2.2. Realizar esquema del proceso de transformación.
- 2.3. Establecer los balances de materia y energía del proceso.

Para el desarrollo de los balances de materia se consideraron dos volúmenes de vinaza asociados a: (i) la generación de vinaza derivada del proceso de producción de levadura y a (ii) la producción de etanol a partir de caña de azúcar. Estos volúmenes a tratar fueron de 1246,5 kg/batch de vinaza en el caso de vinaza de levadura y 62500 kg/batch para la vinaza de destilería.

3. Analizar la pre-factibilidad técnico-económica del proceso obtenido para la valorización de la vinaza.
 - 3.1. Levantamiento de datos de maquinaria requerida según las especificaciones de la planta.
 - 3.2. Realizar los cálculos asociados al sistema productivo.
 - 3.2.1. Horas hombre
 - 3.2.2. Desperdicio
 - 3.2.3. Consumo de materiales directos e indirectos.
 - 3.2.4. Tiempos de producción.

3.3. Alimentar el software Supero-Pro Designer®. Para generar el análisis económico.

En este objetivo se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones económicas para la generación de los reportes de costos, materiales, equipos y finalmente el reporte económico. Los precios de las materias primas están basados de los datos brindados por las páginas web www.sigmaaldrich.com, y www.quiminet.com. Para el costo operacional de horas hombre, se decidió enfocarse en los operarios requeridos para el funcionamiento de la planta, los cuales serán determinados por el programa según las horas necesarias para llevar a cabo la producción en el sistema planteado, a los operarios se les asignó un salario de \$ 1`500.000 pesos.

En cuanto al costo de los equipos se usó la base de datos y regla de cálculo dada por SuperPro Designer, asumiendo un porcentaje de mantenimiento del 5% y de instalación del 10% referente al costo de compra del equipo. Adicionalmente se realizaron estimaciones para los costos directos basados en porcentajes del costo total de compra de equipos, los porcentajes fueron los siguientes, para tuberías 25%, instrumentación 10% aislamiento 3%, instalaciones eléctricas 10%, construcción 30% e instalaciones auxiliares 10%. Del mismo modo se establecieron parámetros para los costos indirectos basados en porcentajes del costo directo, para ingeniería se definió el 10% y para construcción el 20%. Además se implementó la tasa de impuestos locales del 33%.

El costo de la energía eléctrica y agua fue establecido como 0.15 USD*kW/h y 1,75 USD/m³ de acuerdo a las empresas locales. En cuanto al precio de venta del aceite de origen microalgal se tomó como base el precio del aceite de palma debido a que este sería su principal competencia, el precio del aceite de palma a nivel nacional es regulado por el ministerio de agricultura y desarrollo rural, por lo que el precio tomado fue de \$ 2.103 pesos por kg de aceite lo que es equivalente a 0.7474 USD/kg.

Adicionalmente se le dio un valor de venta de 0.25 USD/kg a la biomasa resultante de la extracción asumiendo que podría tener un uso similar al afrecho de raps como fuente de proteína para ganado, el afrecho de raps tiene un precio cercano a 250 USD por tonelada. (Campusano, 2008)

Los parámetros de evaluación económica del proyecto fueron los siguientes, un periodo de construcción de 8 meses con un periodo de inicio de 3 meses, una duración del proyecto de 20 años, una inflación del 3,46 % y una tasa de descuento del 10%. A esto se le agregó una depreciación de 15 años para todos los equipos implementados y se estableció que la planta trabajaría al 100% de su capacidad.

3.4. Realizar análisis de sensibilidad.

Para el análisis de sensibilidad se varió por separado las siguientes variables: el porcentaje de ácidos grasos que contiene la microalga fue planteado como el 15% p/p, este valor se cambió a 37% p/p y 50% p/p; por otro lado se varió el precio de venta del aceite que fue tomado originalmente como 0,7474 USD/Kg a los valores de 1,49 USD/Kg y 3,74 USD/Kg; la última variable evaluada fue la producción de biomasa en el reactor, que paso de ser aproximadamente 6 g/L a 12 g/L, 18 g/L y 24 g/L. para cada cambio se realizó el reporte económico y se observó cómo se veía afectado el VPN y el porcentaje de retorno de la inversión (ROI).

3.5. Realizar análisis técnico-económico del proceso.

5 Resultados

5.1 Discusión de resultados

5.1.1 Evaluación experimental

Inicialmente se buscó evaluar experimentalmente el potencial de la vinaza como agente nutritivo para la bioaumentación de biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos Para desarrollar este objetivo se tomó inicialmente como base los reportes de Juan David Jimenez, en su proyecto de grado “Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar”, que indicaba las condiciones de cultivo de la alga en estudio sobre la vinaza obtenida en Levapan (David, 2017).

En la curva de calibración realizada por el método de la Sulfo-Fosfo-Vainillina se tomaron 6 repeticiones de cada estándar para tener en cuenta la desviación del equipo en la toma de datos. A continuación se presenta la curva de calibración realizada con una correlación lineal de 0.9984.

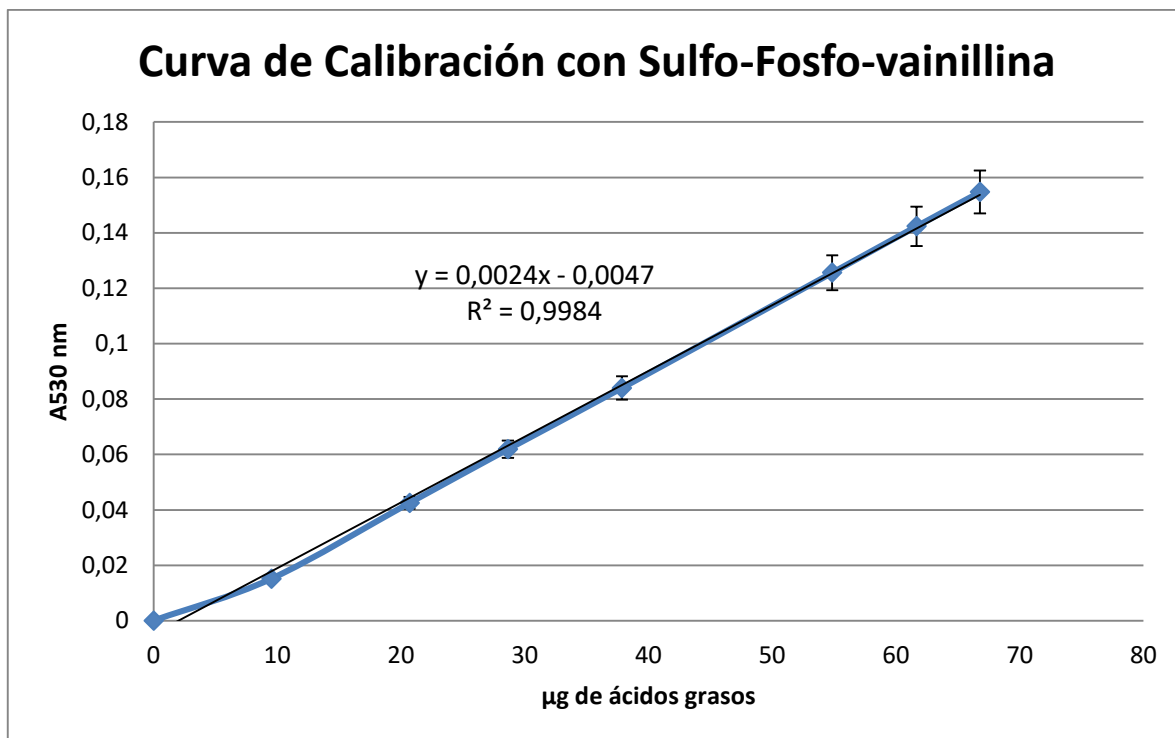


Figura 1. Curva de calibración con Sulfo-Fosfo-vainillina

Con el protocolo de medición de ácidos grasos validado se procedió con la determinación de ácidos grasos en los ensayos implementados para evaluar el potencial de la vinaza para la bio-aumentación de biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.

Como se mencionó anteriormente en este proyecto se cultivaron las microalgas en dos condiciones, heterotrofia a 26°C con aireación y mixotrofia a 30°C en agitación continua por medio de un agitador mecánico. Las diferencias en las temperaturas de cultivo fueron determinadas como las más óptimas para cada tipo de cultivo en estudios realizados previamente. (David, 2017)

Periódicamente a ambos cultivos se les tomaron 1,5 mL de los cuales se usaban 0,5 mL para tomar absorbancia a 630 nm con el fin de estimar la concentración de biomasa en el cultivo, y el volumen restante era usado para hacer la medición de ácidos grasos por el método de la Fosfo-vainillina. A continuación se muestran las curvas de crecimiento obtenidas durante el experimento.

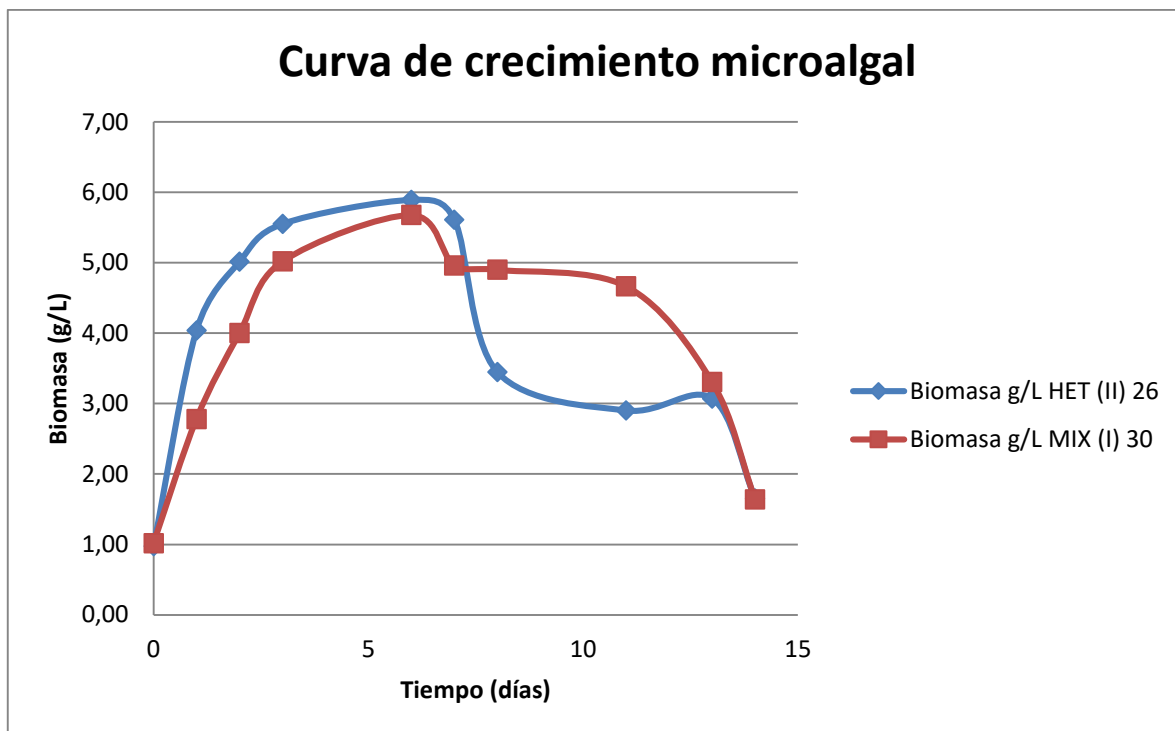


Figura 2. Curva de crecimiento para ensayos mixotrófico y heterotrófico.

En la figura 2 se aprecia que la mayor concentración de biomasa se presenta en el día 6 para ambos ensayos, con una mayor concentración en el ensayo heterotrófico (5.89 g/L) que en el ensayo mixotrófico (5.68 g/L) lo que indica una productividad de biomasa $0.98 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $0.94 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente. En ambos ensayos se evidencia la capacidad de la vinaza para la bio-aumentación de la biomasa microalgal aumentando la concentración de 1 g/L hasta aproximadamente 6 g/L.

Una vez determinada la capacidad de la vinaza para la producción de biomasa se procedió a determinar la cantidad de ácidos grasos producidos durante los experimentos por medio del método de la Sulfo-Fosfo-vainillina. A continuación se presentan las gráficas asociadas a la cantidad de μg de ácidos grasos encontrados en las muestras de cada ensayo y el porcentaje p/p de ácidos grasos respecto a la concentración de biomasa microalgal.

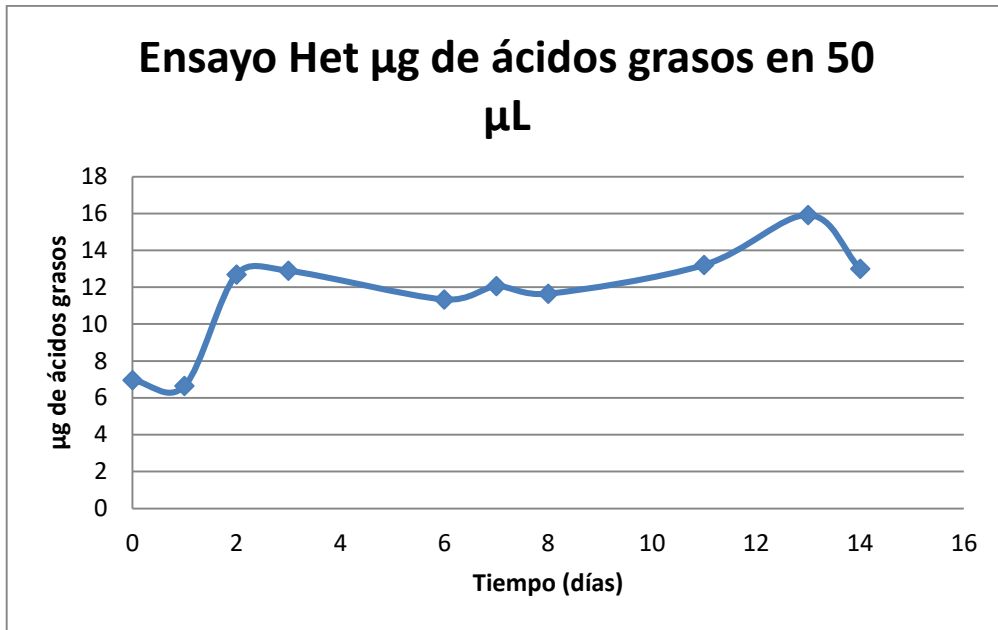


Figura 3. μg de ácidos grasos en 50 μL en el ensayo heterotrófico

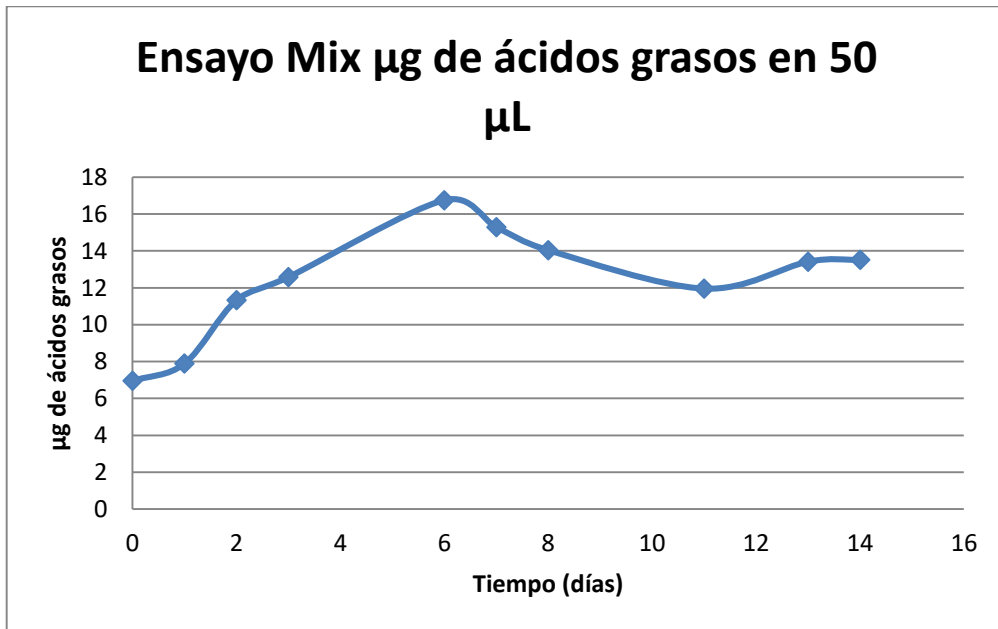


Figura 4. μg de ácidos grasos en 50 μL en el ensayo mixotrófico

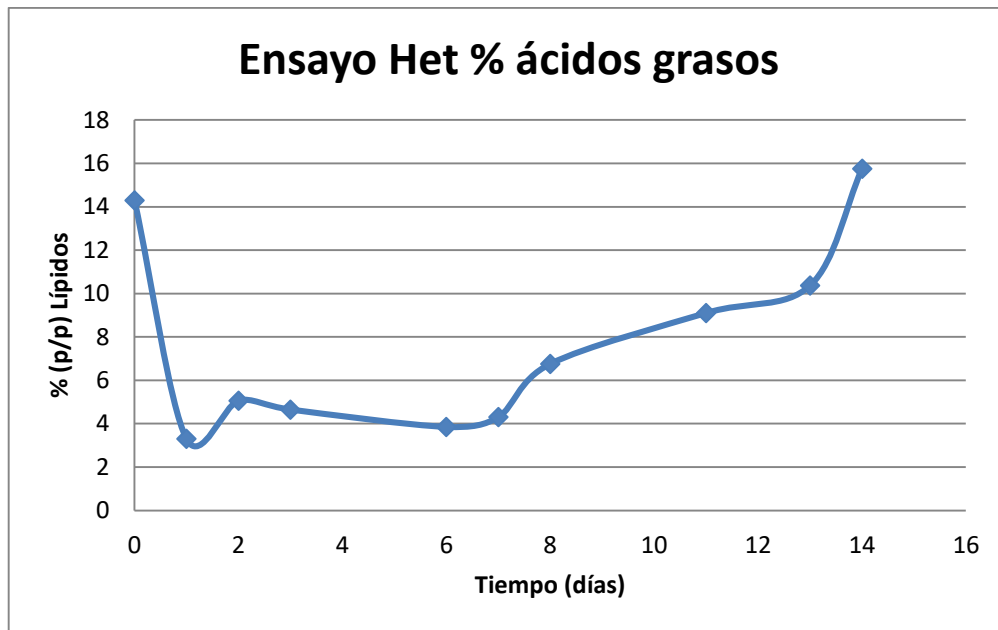


Figura 5. %p/p de ácidos grasos en ensayo heterotrófico.

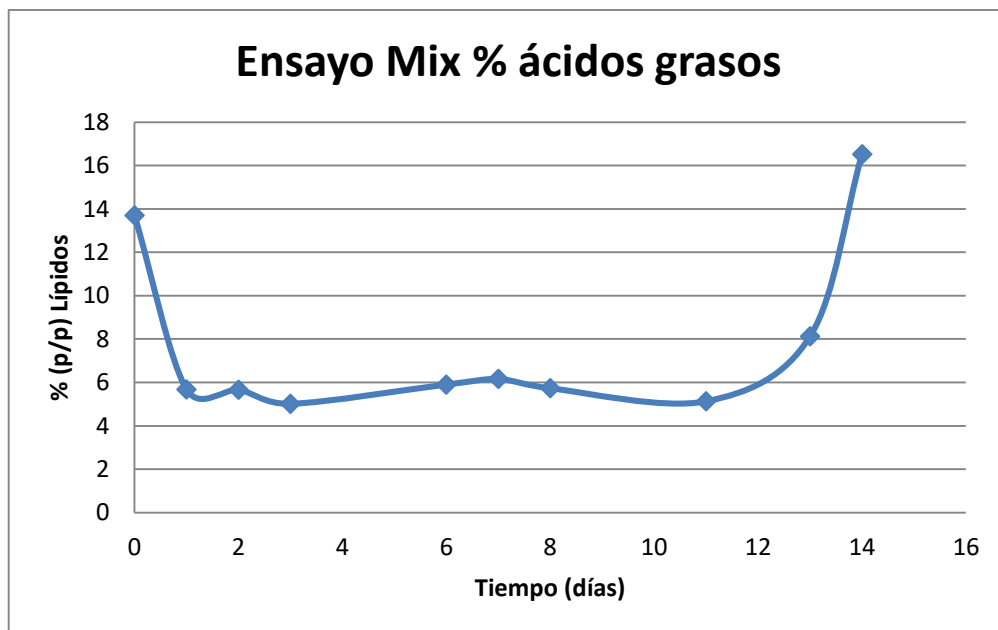


Figura 6. %p/p de ácidos grasos en ensayo mixotrófico.

En las figuras 3 y 4 se aprecia una buena producción de ácidos grasos con máximos de aproximadamente 16µg en 50 µL pero al hacer el porcentaje peso a peso (%p/p) entre los µg de ácidos grasos y µg de biomasa presentes en los 50µL, encontramos que para ambos casos disminuye drásticamente del día cero al día 1 (del 14 % al 5 %

aproximadamente en cada ensayo) y se mantiene estable hasta por unos días para luego aumentar la proporción de ácidos grasos.

Este comportamiento puede deberse a que inicialmente las células vienen de una pre-adaptación de vinaza al 2% y ya han pasado su etapa de crecimiento por lo que comienzan a almacenar energía en forma de ácidos grasos, por esta razón el %p/p de estos está alrededor del 14%. Pero al ser inoculadas en una concentración menor (1g/L) a la que estaban en la pre-adaptación y en un medio con nuevos nutrientes vuelven a entrar en etapa de crecimiento lo que causa la generación de nuevas células y por ende se observa una disminución en el contenido total de ácidos grasos.

El aumento del %p/p de ácidos grasos finalizando los ensayos puede deberse a que se termina la fase de crecimiento celular, posiblemente por escases de nutrientes (posiblemente nitrógeno) o estrés respecto al medio en que se encuentran, esto provoca la acumulación de ácidos grasos en forma de reservas energéticas.

De acuerdo a lo reportado en el estudio de productividad de lípidos y composición de ácidos grasos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba la cepa *Chlorella vulgaris* tiene un porcentaje de lípidos del 27.8% p/p y una productividad de biomasa de $0.150 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Yatali Montero Sanchez, 2012).

Lo que indica que en los ensayos realizados en este proyecto fueron inferiores en el porcentaje de ácidos grasos pero superiores en cuanto a la productividad de biomasa. Esto posiblemente sugiera la necesidad de revisar el nivel de limitación de la fuente de nitrógeno (en este caso urea), la cual normalmente se asocia a la síntesis de lípidos.

Adicionalmente se enviaron muestras de los dos ensayos junto con sus respectivos controles al laboratorio de servicios analíticos del CIAT, para análisis de carbono (COT) y nitrógeno (N), y muestras a Levapan, para análisis de demanda química de oxígeno (DQO). Reportando los siguientes resultados.

Tabla 1. Reportes DQO, COT y N

Muestra	DQO (mg/L)	COT (g/L)	N (g/L)
Ensayo Heterotrófico	13262	7,61	0,809
Control Heterotrófico	20630	11,08	0,850
Ensayo Mixotrófico	16210	9,29	0,871
Control Mixotrófico	20303	10,70	0,914

En la tabla 1 se aprecia que ambos ensayos redujeron la DQO, al igual que el contenido de carbono y de nitrógeno, lo que indica que las microalgas en ambos ensayos consumieron la fuente de carbono (vinaza) y de nitrógeno (urea). Pero el ensayo heterotrófico fue el que logro asimilar una mayor cantidad de carbono, esto se aprecia en el cambio de concentración de 11.8 g/L a 7.61 g/L; al igual que obtuvo el mayor consumo de nitrógeno y la mayor disminución de la DQO.

5.1.2 Esquema del proceso.

El segundo objetivo específico consistió en esquematizar y resolver los balances del proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos. Para el cual se debe generar un reporte del balance de materia y energía completo para el esquema del proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal con alto contenido de ácidos grasos.

Para este objetivo se realizó de manera experimental y a menor escala el proceso de transformación de la vinaza en biomasa microalgal, como se mencionó anteriormente, para calcular la proporción de materia prima, así como las entradas y salidas de cada parte del proceso, para el balance de materia. Se realizaron estudios de porcentaje de sólidos y densidad de la vinaza para determinar la proporción de desperdicios y la cantidad de materia prima que se está utilizando y, adicionalmente, se tomaron en cuenta los resultados de producción de ácidos grasos y las curvas de crecimiento (figura 2, 3 y 4).

Con base en los resultados mencionados anteriormente se decidió hacer el montaje industrial en condiciones heterotróficas, teniendo en cuenta que obtuvo una mayor asimilación de carbono y su curva de crecimiento presentó una mayor producción de biomasa (5,68 g/L en 6 días) y se tomó el porcentaje máximo de ácidos grasos (15% p/p) para el desarrollo del modelo.

El proceso industrial inicia con la introducción de la vinaza en un mezclador junto con hidróxido de calcio a una proporción de 1.5 g/L. Esta solución es mezclada por 90 min y posteriormente es sometida a una decantación para separar los sólidos presentes en la vinaza. La vinaza tratada pasa a ser mezclada con buffer fosfato, micronutrientes, y macronutrientes, dando un medio con vinaza al 58%.

El biorreactor implementado es un Air Lift el cual realiza su agitación por medio de aire y suministra oxígeno al cultivo, en este reactor se adiciona suficiente inóculo para tener una concentración inicial de 1 g/L de biomasa. Dentro del reactor ocurre el crecimiento microalgal por 5 días hasta una concentración aproximada de 6 g/L.

Posterior al reactor se realiza de nuevo un proceso de separación de biomasa y solución por medio de un decantador. De este equipo sale biomasa húmeda que será sometida a un proceso de secado en un secador rotatorio en cual deja la biomasa seca y lista para realizar la extracción con hexano. En el proceso de extracción los ácidos grasos se solubilizan en el hexano lo que permite una separación por fases. Los lípidos van a ser disueltos en el hexano, mientras que los demás componentes de la biomasa salen en una corriente diferente (Juan J. Jaramillo, 2012).

Finalmente se hace un proceso de purificación en el cual se calienta la solución de hexano y ácidos grasos a 68 °C para evaporar el hexano, el cual es recuperado y re

utilizado en el proceso de extracción de ácidos grasos. A continuación se muestra el diagrama de proceso realizado en el software SuperPro Designer.

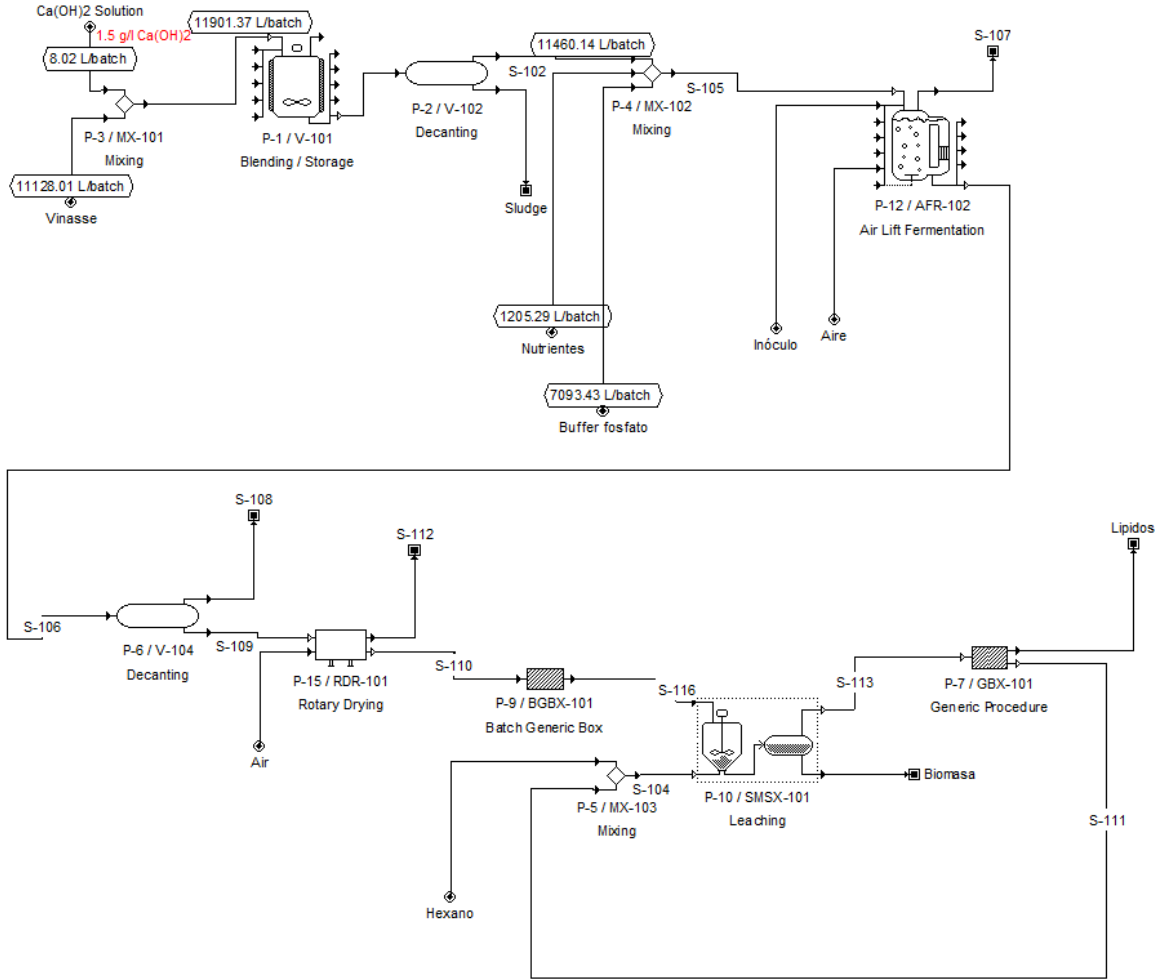


Figura 7. Diagrama de proceso realizado en SuperPro Designer para el tratamiento de 1246,5 kg/batch

5.1.3 Análisis económico y de sensibilidad.

Finalmente el tercer objetivo específico del proyecto es analizar la pre-factibilidad técnico-económica del proceso obtenido para la valorización de la vinaza. De este objetivo se debe obtener el análisis técnico económico del proceso de valorización de la vinaza.

Los parámetros implementados se consideran poco exigentes para el proyecto y se utilizaron de esta manera para determinar si es posible la rentabilidad en estas condiciones favorables. Los resultados de la evaluación económica para los tratamientos de 1246,5 kg/batch y 62500 kg/batch de vinaza de levadura y de destilería, respectivamente, con un porcentaje de ácidos grasos del 15% p/p respecto a la biomasa microalgal fueron los siguientes. Los reportes están presentados en dólares.

Tabla 2. Resumen económico

EXECUTIVE SUMMARY	1246,5 kg/batch	62500 kg/batch
Total Capital Investment	572,000 \$	1,000,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	572,000 \$	1,000,000 \$
Operating Cost	294,000 \$/yr	589,000 \$/yr
Main Revenue	873 \$/yr	4,000 \$/yr
Other Revenues	1,679 \$/yr	8,217 \$/yr
Total Revenues	3,000 \$/yr	12,000 \$/yr
Cost Basis Annual Rate	1,168 kg MP/yr	5,712 kg MP/yr
Unit Production Cost	251.81 \$/kg MP	103.14 \$/kg MP
Net Unit Production Cost	251.81 \$/kg MP	103.14 \$/kg MP
Unit Production Revenue	2.19 \$/kg MP	2.19 \$/kg MP
Gross Margin	- 11,419.51 %	- 4,618.21 %
Return On Investment	- 44.57 %	- 51.74 %
Payback Time	N/A	N/A
IRR (After Taxes)	N/A	N/A
NPV (at 10.0% Interest)	- 2,848,000 \$	- 5,582,000 \$

Como se aprecia en el resumen económico, los valores presentes netos son negativos para ambos escenarios (\$ - 2`848.00 USD, y \$ - 5`582.000 USD), al igual que los porcentajes de regreso de la inversión (ROI) con valores de -44.57% y -51.74% para los escenarios de 1246,5 kg/batch y 62500 kg/batch respectivamente. Esto indica que ninguno de los dos escenarios es económicamente viable a pesar de los parámetros favorables introducidos en el programa. Esto se debe a que para los dos escenarios el costo de producción por unidad es muy elevado (252,81 USD/Kg y 103,12 USD/Kg) a

comparación de los ingresos por Kg de aceite producido (2.19 USD/Kg). Adicionalmente se generó el reporte de equipo y el resumen de costos.

Tabla 3. Reporte de Equipos

Name	Type	12462,5 kg/batch			62500 kg/batch			
		Size (Capacity)	Units	Purchase Cost (\$/Unit)	Size (Capacity)	Units	Purchase Cost (\$/Unit)	
V-101	Blending Tank	13,223.74 L	1	\$ 50.000,00	66,317.66 L	1	\$ 80.000,00	
V-102	Decanter Tank	1,273.13 L	1	\$ 8.000,00	14,297.96 L	1	\$ 30.000,00	
MX-101	Mixer	12,481.19 kg/h	1	\$ -	62,593.75 kg/h	1	\$ -	
MX-102	Mixer	40,479.94 kg/h	1	\$ -	173,566.54 kg/h	1	\$ -	
SMSX-101	Mixer-Settler Extractor	268.30 L/h	1	\$ 5.000,00	1,690.40 L/h	1	\$ 15.000,00	
AFR-102	Air-Lift Fermentor	7,471.56 L	1	\$ 60.000,00	31,874.68 L	1	\$ 70.000,00	
V-104	Decanter Tank	159.49 L	1	\$ 6.000,00	1,137.29 L	1	\$ 7.000,00	
RDR-101	Rotary Dryer	29.46 m2	1	\$ 45.000,00	76.78 m2	1	\$ 100.000,00	
				\$ 174.000,00				
					\$ 302.000,00			

Tabla 4. Resumen de Costos

Cost Item	12462,5 kg/batch				62500 kg/batch			
	\$/kg MP	\$/batch	\$/year	%	\$/kg MP	\$/batch	\$/year	%
Materials	1.66	30	1,941	0.66	1.19	105	6,798	1.15
Facility	219.64	3,945	256,433	87.23	77.17	6,782	440,825	74.82
Labor	2.46	44	2,871	0.98	0.50	44	2,859	0.49
Lab/QC/QA	0.25	4	287	0.10	0.05	4	286	0.05
Utilities	27.80	499	32,457	11.04	24.22	2,129	138,377	23.49
TOTAL	251.81	4,523	293,989	100.00	103.14	9,064	589,145	100.00

Se aprecia un mayor costo de equipos en el escenario de 62500 kg/batch, como es esperado por el aumento de la cantidad de vinaza a ser utilizada. En el resumen de costos se observa que para ambos escenarios el mayor porcentaje de los costos está asociado a las instalaciones, seguido del costo de los servicios públicos. Esto quiere decir que los costos más altos están asociados con la depreciación de los equipos, la infraestructura, los gastos de operación y mantenimiento.

Con los resultados obtenidos se decidió realizar el análisis de sensibilidad variando por separado las siguientes variables: el porcentaje de ácidos grasos que contiene la microalga fue planteado como el 15% p/p, este valor se cambió a 37% p/p y 50% p/p; por otro lado se varió el precio de venta del aceite que fue tomado originalmente como 0,7474 USD/Kg a los valores de 1,49 USD/Kg y 3,74 USD/Kg; la última variable evaluada fue la producción de biomasa en el reactor, que paso de ser aproximadamente 6 g/L a 12 g/L, 18 g/L y 24 g/L. para cada cambio se realizó el reporte

económico y se observó cómo se veía afectado el VPN y el porcentaje de retorno de la inversión (ROI).

Tabla 5. Valores del análisis de sensibilidad

Parámetro	Valor	12462,5 kg/batch		62500 kg/batch	
		VPN	ROI	VPN	ROI
Porcentaje de ácidos grasos	15%	-\$2.848.000,00	-44,57%	-\$5.582.000,00	-51,74%
	37%	-\$2.841.000,00	-44,42%	-\$5.546.000,00	-51,32%
	50%	-\$2.837.000,00	-44,33%	-\$5.525.000,00	-51,07%
Precio de aceite	0,7474 USD/Kg	-\$2.848.000,00	-44,57%	-\$5.582.000,00	-51,74%
	1,49 USD/Kg	-\$2.841.000,00	-44,41%	-\$5.545.740,96	-51,31%
	3,74 USD/Kg	-\$2.818.000,00	-43,95%	-\$5.435.880,05	-50,01%
Producción de biomasa	6 g/L	-\$2.848.000,00	-44,57%	-\$5.582.000,00	-51,74%
	12 g/L	-\$2.841.000,00	-44,08%	-\$5.555.000,00	-50,41%
	18 g/L	-\$2.826.000,00	-43,60%	-\$5.525.000,00	-49,31%
	24 g/L	-\$2.811.000,00	-43,13%	-\$5.475.000,00	-48,22%

Con los valores presentados en la tabla 4 se realizaron las gráficas del porcentaje de variación de cada variable respecto al valor dado del valor presente neto y la tasa interna de retorno para cada escenario, con el fin de evidenciar cuál de estas variables es la que más afecta a la rentabilidad del modelo, las gráficas se muestra a continuación.

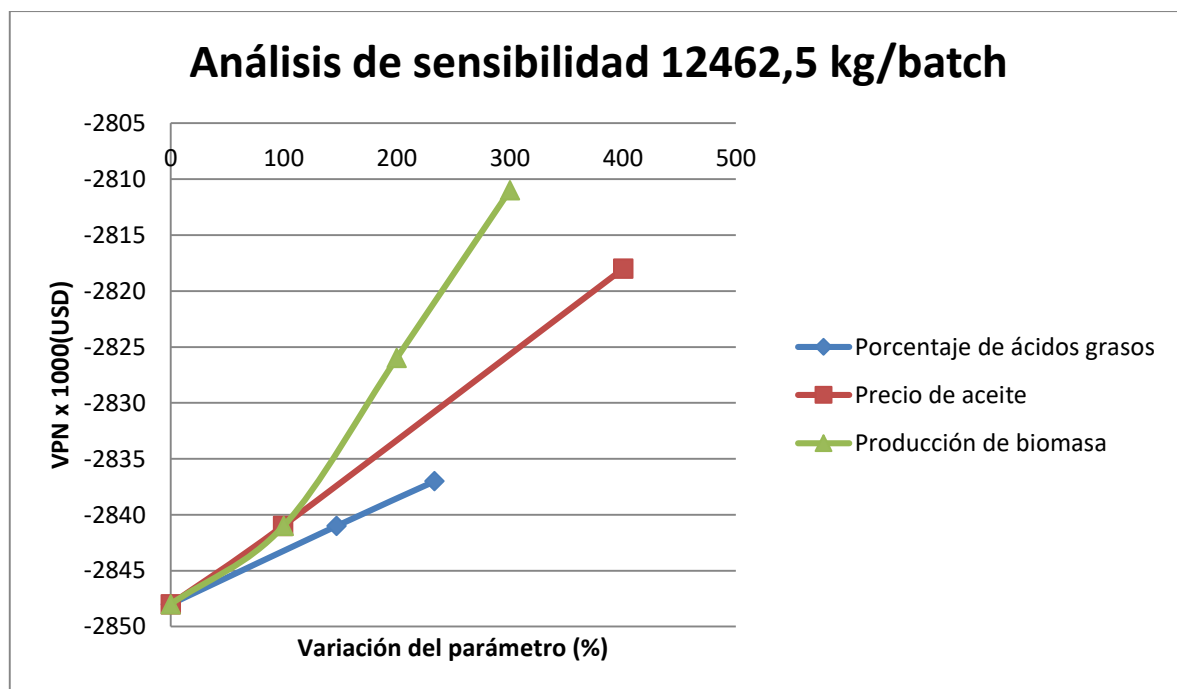


Figura 8. Análisis de sensibilidad del VPN para 1246,5 kg/batch

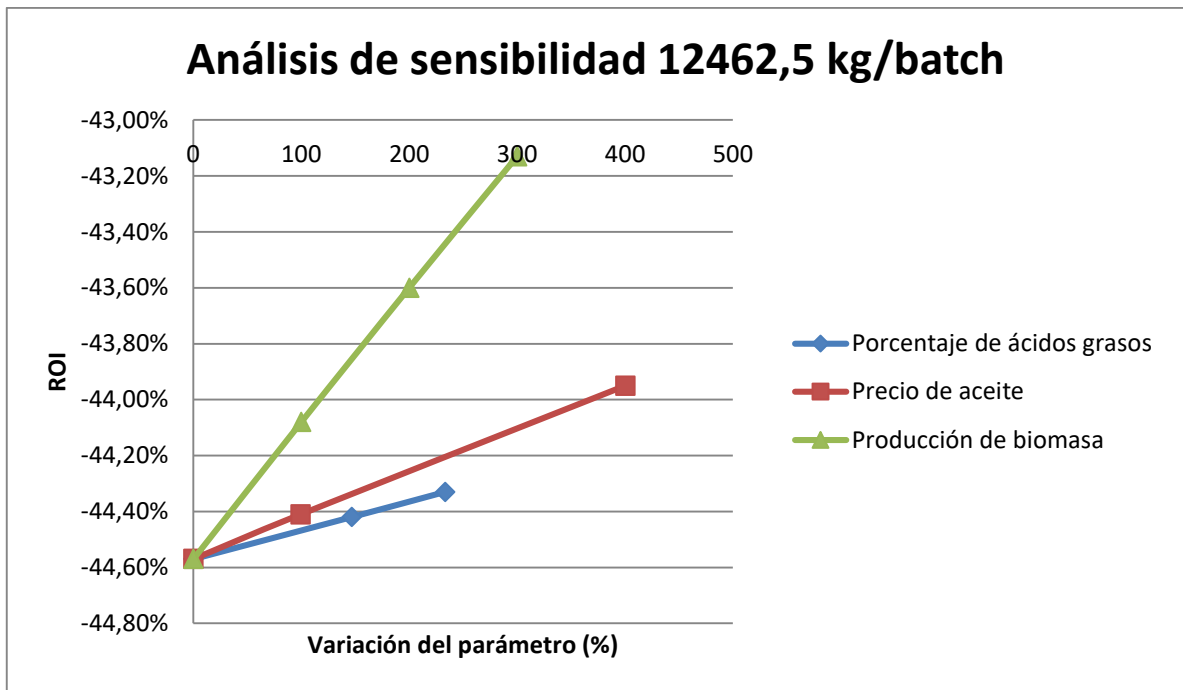


Figura 9. Análisis de sensibilidad del ROI para 1246,5 kg/batch

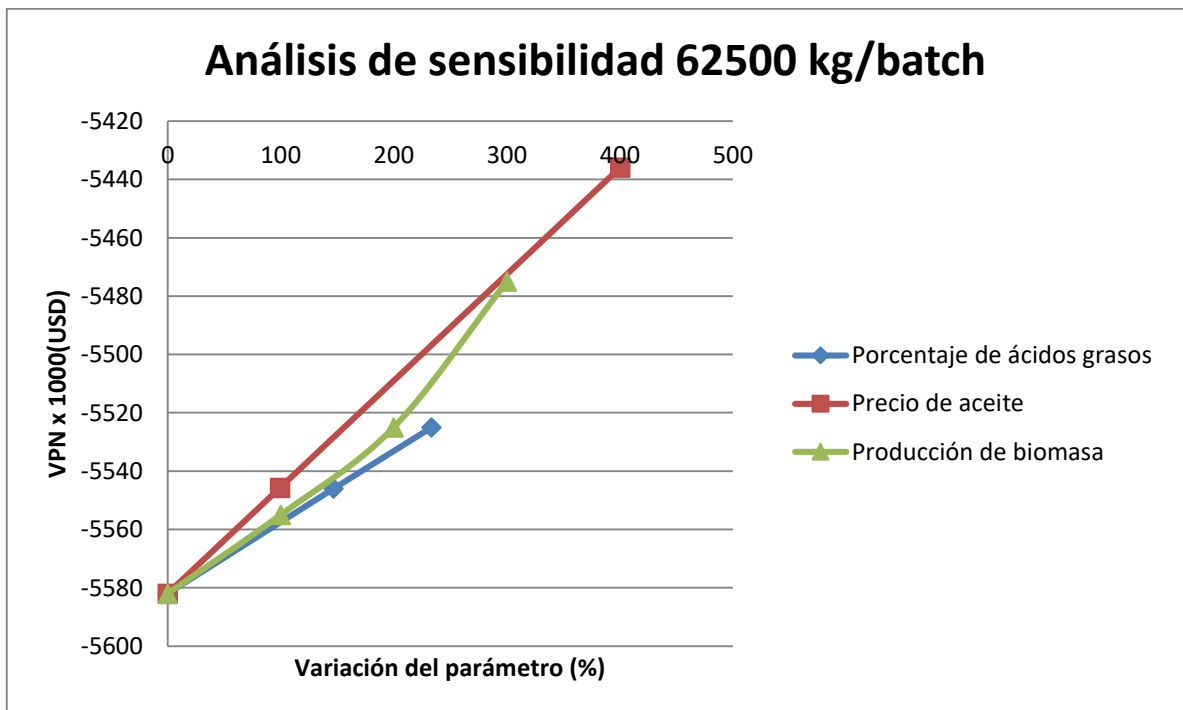


Figura 10. Análisis de sensibilidad del VPN para 62500 kg/batch

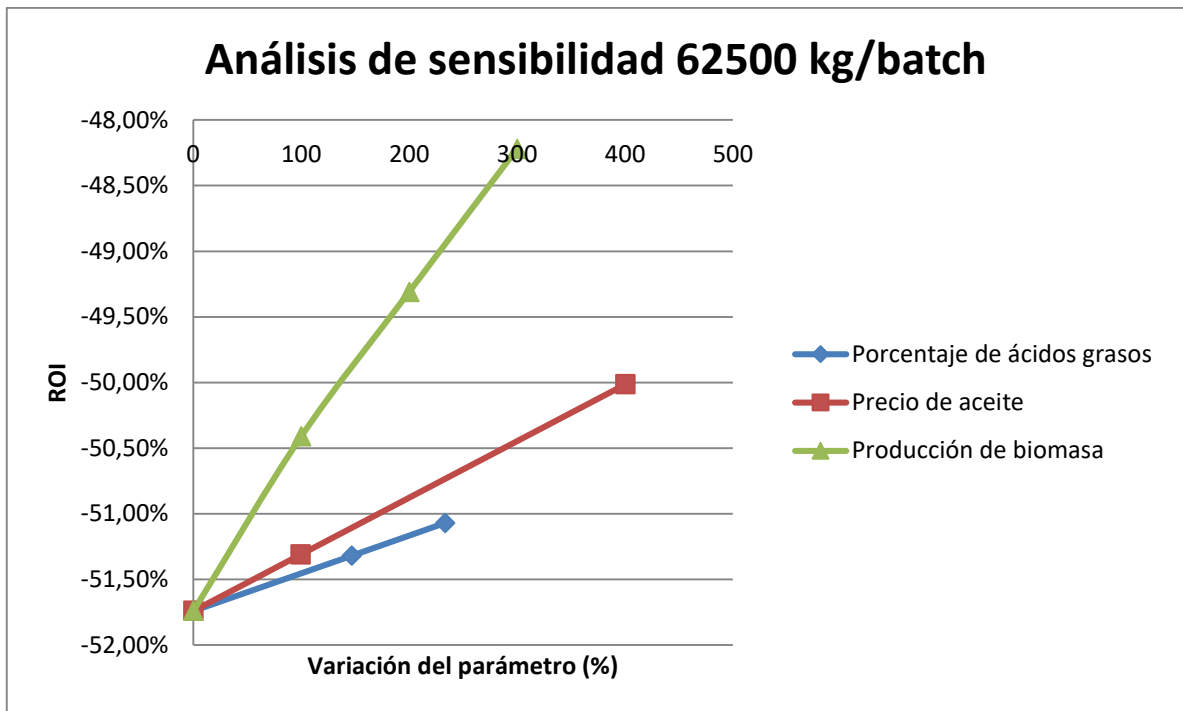


Figura 11. Análisis de sensibilidad del ROI para 62500 kg/batch

En las figuras 8 y 9 se aprecia que la variable que más afecta al VPN y al ROI, en el escenario donde se trata 1246,5 kg/batch de vinaza, es la producción de la biomasa seguida por el precio de venta del aceite. Por otro lado para el escenario donde se trata 62500 kg/batch de vinaza, la variable que más afecta al VPN es el precio de aceite seguido de la producción de biomasa; pero al analizar la figura 11, se encontró que la variable que más afecta al ROI en el escenario de 62500 kg/batch de vinaza, es la producción de biomasa.

El precio del aceite podría aumentarse para favorecer la viabilidad el modelo pero al competir con el aceite de palma para la producción de biodiesel su atractivo sería menor y probablemente no sea utilizado por las empresas fabricantes de biodiesel. Por otro lado la producción de la biomasa es una variable que podría aumentarse cambiando el sistema de producción o por otras alternativas de intensificación del bioproceso.

El modelo está planteado con un sistema en Batch, el cual limita el crecimiento de la microalga al consumo de los nutrientes presentes en el medio que se introduce al inicio del cultivo. Este sistema de producción es viable para fermentaciones pero no para crecimiento excesivo de microorganismos; considerando este aspecto se podría cambiar la producción a un sistema Fed-batch en el cual se adiciona sustrato periódicamente para mantener a los microorganismos en la etapa de crecimiento lo que aumentaría la producción de biomasa.

En el estudio realizado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología sobre la composición de ácidos grasos en cinco especies de microalgas, encontraron que estos microorganismos tienen un porcentaje de lípidos que puede variar desde 51% p/p hasta 13% p/p dependiendo de la cepa implementada. Concretamente se identificó que la cepa *Nannochloris sp.* Tiene un porcentaje de lípidos del 51% p/p, lo que indica que existe la posibilidad de aumentar el porcentaje de lípidos en el proceso productivo si se cambia la cepa de trabajo. (Yatali Montero Sanchez, 2012) Otra forma de optimizar el proceso es evaluando condiciones de operación como pH, flujo de aire, agitación, entre otras.

También es válido resaltar que la cepa *Nannochloris sp* tiene una productividad de biomasa de $0.003 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ lo que es bajo comparado con lo obtenido en este proyecto por *Chorella vulgaris* ($0.98 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$); pero la productividad puede variar según las condiciones de cultivo, por lo que se debe evaluar el uso de otras cepas en medios nutridos con vinaza para observar su reacción.

5.2 Conclusiones

Como se pudo observar en los resultados de este proyecto de grado, la vinaza puede ser asimilada por las microalgas como fuente de carbono y es técnicamente posible utilizarla para el crecimiento de la biomasa y para la producción de ácidos grasos en una proporción considerable (15% p/p) utilizando la cepa *Chorella vulgaris*. Sin embargo la implementación (costo de inversión) de una planta de producción de aceite microalgal como materia prima para el biodiesel no es viable económicamente bajo el proceso establecido en este proyecto de grado, aun con parámetros económicos favorables. No obstante, el escenario de usar las instalaciones de una planta ya depreciada podría arrojar mejores indicadores financieros debido a que reduciría el costo de mayor proporción (costo de las instalaciones).

De acuerdo al análisis de sensibilidad, las futuras aproximaciones que se busquen desarrollar para la producción de ácidos grasos de origen microalgal con un medio nutrido de vinaza deben enfocarse en producir la mayor cantidad de biomasa posible debido a que fue la variable que más afectó al VPN y al ROI en el presente proyecto, esto se puede lograr implementando cepas que posean una mayor productividad de biomasa, cambiando el sistema de producción de un sistema Batch a un sistema Fed-Batch o evaluando diferentes condiciones de operación.

El método de Sulfo-Fosfo-Vainillina permitió la cuantificación rápida y sencilla de los ácidos grasos presentes en los ensayos con microalgas sin necesidad de realizar un proceso de extracción previo, lo que permite ahorrar tiempo y dinero, debido al bajo uso de solventes, en los estudios relacionados con la cuantificación de lípidos. Además de permitir hacer el control de un proceso en curso sin la necesidad de extraer altas cantidades de muestra para realizar la medición de ácidos grasos.

Usualmente en los procesos de producción que involucran microorganismos, el costo mayoritario está asociado a las materias primas, como se reporta en el estudio de la Universidad Nacional de Colombia, "Growth and Oil Extraction from *Chlorella vulgaris*". (Juan J. Jaramillo, 2012) Concretamente en la preparación del sustrato, la fuente de carbono, como sacarosa y dextrosa, se requiere en grandes cantidades debido a que es uno de los componentes principales que va a transformar el microorganismo. Con la implementación de fuentes de carbono alternativas y asimilables, como la vinaza, se logra reducir el costo de la fuente de carbono lo que contribuye a la reducción del costo de las materias primas.

5.3 Recomendaciones

Se deben explorar otros sistemas de producción del aceite de origen microalgal con el fin de reducir los costos de las instalaciones, aumentar la producción de biomasa y analizar si el proyecto podría ser económicamente viable, se recomienda evaluar la producción en un sistema Fed-Batch y en tinas al aire libre. Debido a que la introducción constante de nutrientes en el sistema Fed-Batch lograría aumentar la producción de la biomasa; por otro lado la implementación de tinas al aire libre implica una menor inversión en el bioreactor donde se llevaría a cabo la transformación de la vinaza.

Adicionalmente se debe investigar que otros productos podrían ser generados por las microalgas con el fin de encontrar un producto de mayor valor que pueda favorecer la implementación de la vinaza como medio para las microalgas. También se recomienda explorar la capacidad de otros microorganismos, como hongos y bacterias, para usar como fuente de carbono la vinaza y determinar si su implementación es conveniente. Así como también se recomienda realizar una evaluación ambiental del presente proyecto, a pesar de no ser económicamente viable, la reducción del impacto ambiental puede ser significativa y es un factor a considerar en proyectos que buscan alternativas para la vinaza.

Es prudente que los futuros estudios de factibilidad se realicen con parámetros económicos similares a los evaluados en este proyecto, debido a que son laxos y son un buen punto de inicio para evaluar la viabilidad económica. Además de esta manera se podrían establecer comparaciones con el presente proyecto de grado. De igual manera se recomienda seguir implementando la herramienta SuperPro Designer por su especificidad para la simulación de procesos productivos, manejo de variables económicas, operacionales, y de capital, y su facilidad para la generación de reportes económicos, productivos y ambientales.

6 Bibliografía

- Asocaña. (Junio de 2017). *El Sector Azucarero Colombiano En La Actualidad*. Recuperado el 01 de 10 de 2017, de <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>
- Asocaña. (Junio de 2017). *PAPER SOBRE BIOETANOL*. Recuperado el 02 de 10 de 2017, de Las cifras del sector agroindustrial de la caña de azúcar colombiano y la producción de BioEtanol a base de caña de azúcar: <http://www.asocana.org/modules/documentos/10396.aspx>
- Campusano, P. J. (Agosto de 2008). Estudio Técnico Económico para la Producción de Biodiesel a Partir de Algas. Santiago de Chile , Chile .
- Dania Alonso Estrada, N. G. (Enero-Marzo, 2016). ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA REDUCIR EL VOLUMEN DE LAS VINAZAS DE LA INDUSTRIA ALCOHOLERA Y SU TRATAMIENTO. *Revista Centro Azucar Vol 43.*, 70-79.
- Dubljevic, J. A. (2012). Lipid Production optimization and optimal control of heterotrophic microalgae fed-batch bioreactor. *Chemical Engineering Science 84*, 619-627.
- FedeBiocombustibles. (Julio de 2017). *Información Estadística Sector Biocombustibles*. Recuperado el 02 de 10 de 2017, de [http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Alcohol_Carburante_\(Etanol\).htm](http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Alcohol_Carburante_(Etanol).htm)
- Gemma Vicente, A. C. (2017). Heterogeneous-catalysed direct transformation of microalga biomass into Biodiesel-Grade FAMES. *Fuel 200*, 590-598.
- K. R. Pérez-Silva, A. M.-B.-R.-O.-S. (oct. 2016). Uso de Scenedesmus para la remoción de metales pesados y nutrientes de aguas residuales de la industria textil. *Ingeniería Solidaria, Vol 12, no.20, xx-xx*.
- Kaewkannetra, P. R. (2014). Cultivation of microalga, Chlorella vulgaris under different auto-hetero-mixo trophic growths as raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy 78*, 4-8.
- London`s Global University. (s.f.). Nile Red protocol for the quantification of intracellular lipids in microalgae. Londres, Inglaterra.

- Monica Coca, V. B.-B.-C. (2015). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioprocess Processing* 94, 306-312.
- PORTAFOLIO. (25 de Marzo de 2017). *Portafolio*. Recuperado el 25 de 04 de 2018, de El negocio de la levadura de Levapan se sigue expandiendo: <http://www.portafolio.co/negocios/empresas/el-negocio-de-la-levadura-de-levapan-se-sigue-expandiendo-504425>
- Raquel Rezende dos Santos, O. d. (2016). Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology* 204, 38-48.
- Tsz Him Kwan, D. P. (2015). Techno-economic analysis of a food waste valorization process via microalgae cultivation and co-production of plasticizer, lactic acid and animal feed from algal biomass and food waste. *Bioresource Technology* 198, 292-299.
- Wei Chen, C. Z. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* 77, 41-47.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo Fosfo-vainillina

	FACULTAD DE INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUIMICA	
	Cuantificación de ácidos grasos en microalgas por medio de Sulfo-Fosfo-Vainillina	
Responsable: Sebastián Andrés Valencia Velandia	Director: Dr. Nelson Caicedo Jefe de Departamento de Ingeniería Bioquímica	Elaborado: 07/05/2018
		Página: 1 de 4

1. PROPÓSITO

Se propone calcular la cantidad de ácidos grasos presentes en una muestra de 50 μ L de un cultivo microalgal.

2. ALCANCE Y LIMITACIONES

El método implementado en este protocolo permite realizar una medición rápida y sencilla de los ácidos grasos presentes en la muestra pero esta debe estar de preferencia suspendida en un medio traslucido como agua para evitar las interferencias que pueda presentar el medio.

3. GENERALIDADES

La identificación de nuevas cepas de microalgas con alta productividad de lípidos es uno de los temas de investigación más importantes en la investigación de biocombustibles renovables. Sin embargo, el principal cuello de botella en el proceso de selección de cepas es que los métodos actualmente conocidos para la estimación de lípidos de microalgas son laboriosos y requieren mucho tiempo. (Sanjiv K. Mishra, 2014)

Empleando el método colorimétrico sulfo-fosfo-vainillina (SPV), se logra la cuantificación directa de lípidos dentro del cultivo de microalgas líquidas. El reactivo SPV reacciona con los lípidos para producir un color rosa, lo que permite cuantificar utilizando métodos espectrofotométricos midiendo la absorbancia a 530 nm. (Sanjiv K. Mishra, 2014)

4. MUESTRA

50 μ L de un cultivo microalgal.

5. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza
- Pesa sales
- Espátula
- Micropipeta 1000 μ L
- Micropipera 100 μ L
- Micropipeta multicanal
- Cubetas para Micropipeta multicanal
- 2 Probetas de 100 mL
- Tubos de ensayo de 10 mL (la cantidad está definida por el número de muestras a tratar)
- Beaker para baño de maría
- Nevera para baño de hielo
- Thermomixer
- Lector de platos
- Plato de 96 pozos de fondo plano
- Falcón de 15 mL
- Gradilla para tubos de ensayo

6. REACTIVOS Y PREPARACIÓN

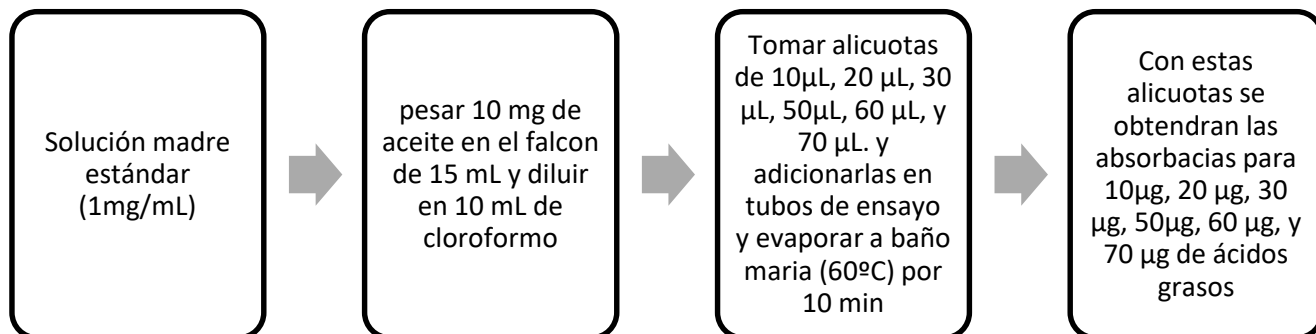
- Vainillina
- Etanol absoluto
- Agua tipo I
- Ácido fosfórico concentrado (70%)
- Cloroformo
- Ácido sulfúrico concentrado (98%)
- Aceite de canola

Preparación de Fosfo-Vainillina (250 mL).

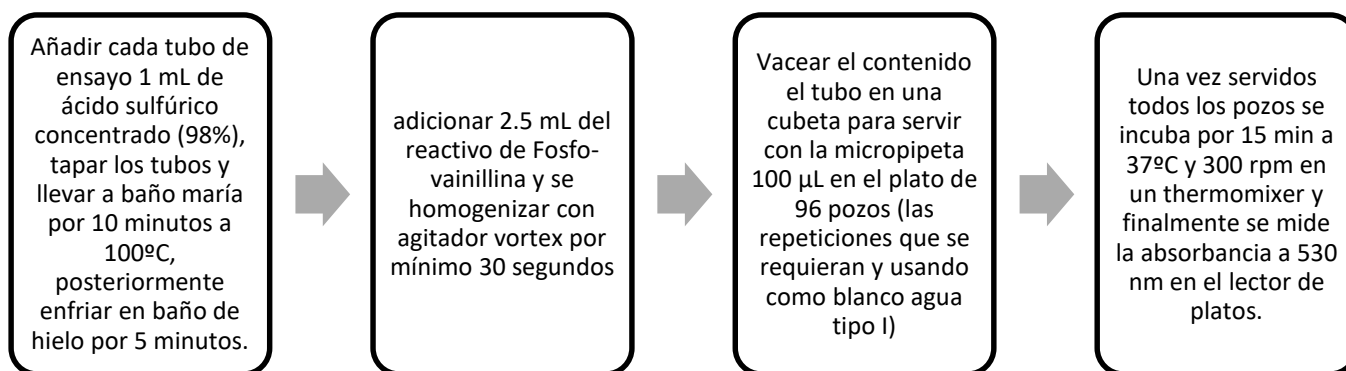
- 0.3 g de vainillina y disolverlos en 5 mL de etanol absoluto con agitación continua. Una vez esta disuelto se añaden 45 mL de agua tipo I y 200 mL de ácido fosfórico concentrado (70%). Este reactivo debe ser preparado poco tiempo antes de su uso y debe ser almacenado en la oscuridad.

7. PROCEDIMIENTO

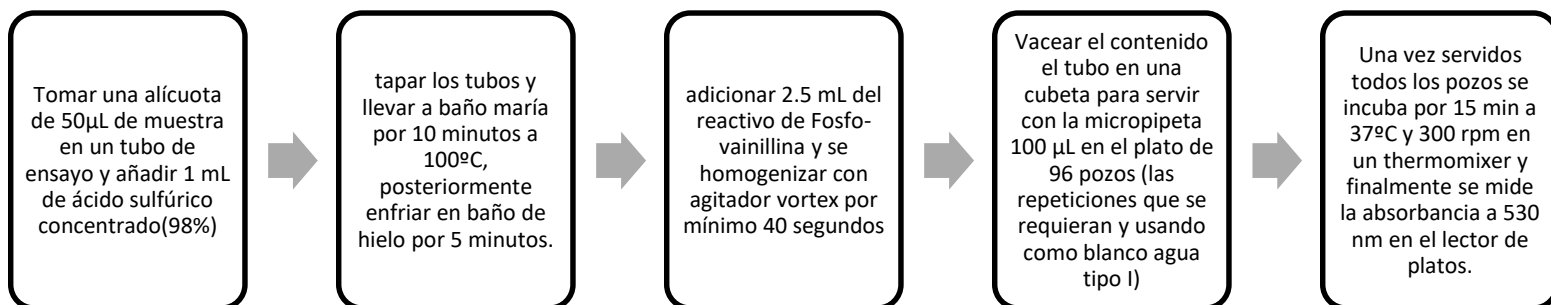
Curva de calibración



Método de Fosfo-Vainillina para curva de calibración.



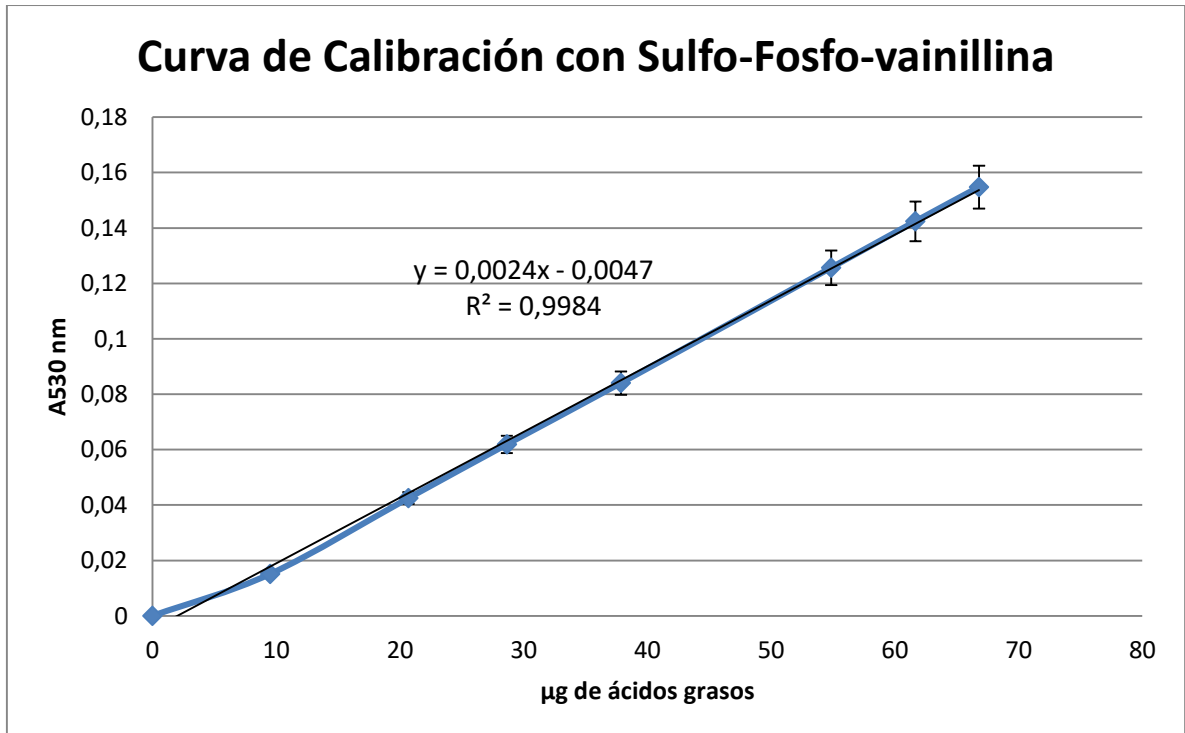
Método de Fosfo-Vainillina para muestra.



8. RESULTADOS

Curva de calibración.

En la curva de calibración se realizaron 6 repeticiones de cada estándar para tener en cuenta la desviación del equipo en la toma de datos. A continuación se presenta la curva de calibración realizada con una correlación lineal de 0.9984.



9. RECOMENDACIONES

- Es importante homogenizar bien durante la preparación de la Fosfo-Vainillina y también se debe agitar bien antes de su uso.
- Tener en cuenta que si se usa un medio oscuro o colorido que puede interferir con la medición de absorbancia se recomienda centrifugar una muestra de 1 mL, retirar el medio y resuspender en agua tipo I.

10. BIBLIOGRAFÍA

Sanjiv K. Mishra, W. I.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology* 155, 330-333.