

Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar

Juan David Jimenez Tafur

Universidad Icesi

Facultad de ciencias naturales

Química Farmacéutica

Valle del cauca

Santiago de Cali,

2017

Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar

Jimenez Tafur Juan David

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutor:

Nelson Hernando Caicedo

Co-tutor:

Andrés Felipe Dávalos

Universidad Icesi

Facultad de ciencias naturales, valle del cauca

Santiago de Cali,

2017

Aprobado por:

**Nombre Correspondiente
Evaluador.**

**Nombre Correspondiente
Evaluador**

**Nelson Caicedo
Director del proyecto.**

**Andrés Dávalos
Co-Director del proyecto.**

Agradecimientos

En primer lugar doy gracias a Dios por permitirme lograr culminar mi tesis de grado optando por el título de químico farmacéutico y así lograr cumplir otro logro en mi proyecto de vida

Doy gracias a mi tutor, el director Nelson Caicedo y a mi cotutor, el profesor Andrés Dávalos por su tiempo y colaboración que permitieron la culminación de este proyecto. También agradezco a Eliana Hidalgo por sus enseñanzas y colaboración incondicional.

Por otra parte doy infinitas gracias a mis padres, humanos y amigos que me apoyaron y dieron ánimos a lo largo de mi carrera, permitiendo mejorar cada día más.

Contenido

Agradecimientos	4
Lista de tablas	6
Lista de graficas.....	7
Lista de anexos.....	8
1. Resumen del proyecto	9
2.1.1 Descripción del problema	10
2.2 Marco teórico y estado del arte	10
2.2.1 Las Microalgas y su versatilidad metabólica	10
2.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	11
2.2.3 Las vinazas	13
2.2.3 Antecedentes	14
2.3 Objetivos	16
2.3.1 Objetivo general	16
2.3.2 Objetivos específicos	16
2.4 Metodología propuesta	17
2.4.1 Etapa 1	17
Pre-adaptacion de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	18
2.4.2 Etapa 2. Cultivo heterotrófico de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> en medios formulados con vinaza.	18
Resultados.....	24
2.6 Discusión	33
Conclusiones	37
Recomendaciones	39
2.6 Bibliografía	40

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones controladas de crecimiento, de cada una de las muestras.	19
Tabla 2- planteamiento de los 28 tratamientos según el diseño experimental.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3 - Cantidad de carbono oxidable total para los tratamientos representativos de cada uno de los ensayos propuestos en el diseño experimental.	32

Lista de graficas

Grafica 1 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 30%.	24
Grafica 2 – Efecto del porcentaje de inculo en el crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza.....	25
Grafica 3- Valores promedio de productividad de biomasa para los tratamientos	26
Grafica 4 – Superficie de respuesta de la productividad <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza	27
Grafica 5 – Grafica de contornos de la productividad de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza	28
Grafica 6– Velocidad promedio de consumo de nitrógeno de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza	¡Error! Marcador no definido.
Grafica 7– Grafica de contornos de la velocidad de consumo de nitrógeno para <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza	30
Grafica 8– Superficie de respuesta de la velocidad de consumo de nitrógeno de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza	31

Lista de anexos

Contenido

ANEXO 1- Pretratamiento de para vinazas concentrada	43
Anexo 2 - Protocolo medición de Urea	46
Anexo 3- Composición de la formulación de los diferentes tipos de tratamientos .	51
Anexo 4 Curva de calibración de la absorbancia de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza.	52
Anexo 5- Graficas del crecimiento celular de <i>Chlorella vulgaris</i> en vinazas.	57
Gráfica 1 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 50%.	57
Gráfica 2 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 30%.	57
Gráfica 3 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 10%.	58
Gráfica 4 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 2% ..	58
Gráfica 5 - Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz con vinaza al 58%.	59
Gráfica 6– Efecto del porcentaje de vinaza en el crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de inoculo al 6%.	59
Gráfica 7 – Efecto del porcentaje de vinaza en el crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de inoculo al 9%.	60
Anexo 6- Evaluación del consumo de nitrógeno en los sobrenadantes de los 28 tratamientos.	61
Gráfica 1– Velocidad de consumo de nitrógeno para los biorreactores del 15 al 28 del <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza. El termino B seguido por el numero hacen referencia a los biorreactores correspondientes.....	63
Gráfica 2– Velocidad de consumo de nitrógeno promedio por <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza. Donde la letra “v” hace referencia al porcentaje (v/v) de vinaza y la letra “l” hace referencia al porcentaje (v/v) de inoculo.....	63
Anexo 7 Caracterización vinaza de la industria Levapan.....	64

1. Resumen del proyecto

En este proyecto de investigación se trabajó con la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada heterotróficamente en un medio de cultivo elaborado a base de vinazas provenientes del procesamiento de las mieles de caña de azúcar.

Chlorella vulgaris puede generar altas concentraciones de proteínas, grasas, y carbohidratos, convirtiéndola en una especie de interés industrial; por ejemplo su contenido proteico (de hasta 60 % base seca) la hace una especie relevante en la industria de los suplementos nutricionales para seres humanos y animales.

Esta investigación, se evaluó como una estrategia de valorización de la vinaza de caña de azúcar, como sustrato para la producción de biomasa algal (*Chlorella vulgaris*). Para ello, se determinó la velocidad de consumo de urea como fuente de nitrógeno y su efecto sobre la velocidad de crecimiento del alga en medio heterotrófico formulado con vinaza. Así mismo, se definió la concentración óptima de vinaza (v/v) empleada para el medio de cultivo de *Chlorella vulgaris* que permita obtener el mayor valor de productividad de biomasa.

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de la facultad de ciencias de la Universidad Icesi siguiendo un diseño experimental de superficie de respuesta. Este tipo de diseño permitió analizar el efecto del porcentaje de vinaza y de inóculo como parámetros de cultivo.

Como resultado de la optimización de la productividad de biomasa del cultivo de la cepa *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) bajo condiciones de heterotrofia, 26°C, aireación constante y empleando medios de cultivo formulados a base de vinaza (6% de sólidos totales), proveniente de la empresa Levapan, se maximiza el valor de productividad de biomasa a partir de una condición operativa de un 10,24%(v/v) de inóculo con 58,28%(v/v) de vinaza. De otro lado, se encontró que la velocidad de consumo de nitrógeno presenta una relación compleja con las cinéticas de crecimiento, la cual no logró explicarse completamente con las variables estudiadas.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, vinaza, productividad, superficie de respuesta.

2.1.1 Descripción del problema

En los últimos años, el acelerado impulso y desarrollo de la industria del Bioetanol y de levadura de panadería a partir de jugos de caña de azúcar en la región del Valle del Cauca, ha incrementado proporcionalmente los volúmenes de su principal residuo o co-producto, la vinaza.

El nivel de magnitud de las cantidades de vinaza que se están produciendo actualmente comienza a alertar a las grandes industriales en la medida en que las estrategias convencionales para su manejo resultan poco funcionales y de cobertura insuficiente. Por ende, el desarrollo de nuevas vías de manejo y mejor aún de valorización misma de la vinaza se hacen necesarias en el escenario tanto regional como nacional.

Ahora bien, con el fin de buscar alternativas de valorización de las vinazas provenientes del procesamiento de la caña de azúcar, se propuso, para mediados del año 2017, optimizar bajo condiciones heterotróficas, el crecimiento de la biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* usando como sustrato la vinaza de caña de azúcar generada en la compañía Levapan S.A.. Esto con el fin de biotransformar las vinazas como fuente de energía para obtener productos con valor agregado.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Las Microalgas y su versatilidad metabólica

Las microalgas son organismos eucariotas, que habitan en ambientes acuáticos, presentan un metabolismo fotosintético y son estructuralmente menos complejos que las plantas terrestres. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011) Así mismo Las microalgas poseen clorofila-a, y algunos otros pigmentos auxiliares que les confieren la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica. (Tijani, Abdullah, & Yuzir, 2015)

De acuerdo a sus requerimientos nutricionales las microalgas se pueden clasificar en tres grandes clases: autótrofas, heterótropas y mixotróficas. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011) En primer lugar, para crecer autotróficamente las microalgas necesitan principalmente una fuente de carbono que normalmente sería dióxido de carbono, además de luz como fuente de energía. En este caso, dentro del proceso autotrófico, las células almacenan energía lumínica en sus fotosistemas durante la exposición a la luz. (Gonzalez, 2010)

En segunda instancia, para el crecimiento quimiorgano-heterótrofico de las microalgas, éstas son privadas de la luz y son alimentadas con una fuente externa

de carbono orgánico como: glicerol, acetato o glucosa (Liang, Sarkany, & Cui, 2009) que actúa como fuente de energía primaria para su metabolismo (Diaz & Diaz, 2012).

Por lo anterior, las microalgas pueden crecer mixotróficamente, ya que son capaces de ser autótrofas y heterótrofas y ser muy versátiles en su crecimiento (Cocoa, Barricak, Lucas, González, & Garcia, 2014). Por ende, se puede suministrar simultáneamente una fuente de luz y una fuente externa de carbono orgánico como carbonato, para que las microalgas fijen el dióxido de carbono por medio de fotosíntesis y puedan consumir los nutrientes orgánicos del medio en donde se encuentran (Gonzalez, 2010).

Ahora bien, el crecimiento general de las microalgas (tanto autótrofas como heterótrofas), se puede acortar o alargar dependiendo de los parámetros de cultivo tales como; temperatura, fuente de luz, composición química del medio de cultivo, tamaño del inoculo y las características propias de las microalgas (respuestas al estrés) (Ley, 2003).

Lo más importante, para lograr tener un medio de cultivo en el que la microalga crezca, es suministrar una solución que contenga los nutrientes necesarios para su crecimiento como carbono, nitrógeno, fósforo, macro y micronutrientes (S.L, ATS Ingeniería, 2013). Sin embargo, su suministro así como las concentraciones de los nutrientes, debe ser balanceada y controlada (Fernandez, 2014), dado que si hay un exceso de nutrientes, la microalga inhibirá el crecimiento por el exceso y si hay muy poco, tampoco habrá crecimiento.

Cabe resaltar que los cultivos heterotróficos ofrecen una ventaja con respecto a los cultivos autotróficos, en cuanto pueden lograrse menores costos de producción por ahorro de energía lumínica (Andersen, 2005). Adicionalmente su producción puede resultar más económica debido a que pueden usarse diversos subproductos industriales (aguas residuales, residuos agrícolas y pecuarios, etc) para crecer las microalgas y así generar una buena cantidad de biomasa con valor agregado bajo un esquema de buena rentabilidad (Garcia L. C., 2012).

Un ejemplo de la implementación de cultivos heterotróficos se presenta en la producción de biodiesel; en este caso, se induce en *Chlorella vulgaris* la síntesis de ácidos grasos durante su crecimiento en un medio formulado a base de melazas (Aslan & Kapadan, 2006). De esta forma, es posible generar biomasa con alto contenido lipídico y por ende, se puede impactar en la factibilidad económica de obtener biodiesel a partir de fuentes distintas de plantas de interés para alimentación humana (Ratanaporn, 2011).

2.2.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es una microalga que pertenece al phylum *Chlorophyta*, familia *Chlorellaceae* (Ley, 2003). Se caracteriza por que sus células son circulares, su tamaño oscila entre 2 y 10 micras y sus cloroplastos presentan como pigmentos fotosintéticos principales clorofila *a* y *b*, los cuales tienen un pico de absorción máximo alrededor de 430nm y de 675nm (Ley, 2003) (Gonzalez, 2010)

Un rasgo importante de *Chlorella vulgaris* es que puede ser cultivada fácilmente bajo condiciones *in vitro*, planteándose varias aplicaciones para su cultivo a un nivel industrial (Ley, 2003). Además, puede ser usada como ingrediente en alimentos, debido a que presenta un alto contenido de proteínas (45-60%), grasas (20%), carbohidratos (20%), minerales, sales y vitaminas (15%) (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014). Adicionalmente, esta microalga, es particularmente rica en calcio, magnesio y hierro teniendo un alto contenido de clorofila, carotenoides y diferentes vitaminas (B1, B2, B6, B12, C y E) (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

Chlorella vulgaris ha sido ampliamente cultivada desde mitad del siglo XX hasta la actualidad y su biomasa ha sido utilizada para extraer β -carotenos, axantinas y ácido docosahexaenóico (DHA, ácido graso). Todos estos compuestos son de alto valor agregado en distintos sectores económicos como la industria alimentaria y farmacéutica. (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014)

La biomasa de *Chlorella vulgaris* y de *Spirulina* son los principales productos de origen algal que se encuentra en el mercado como suplemento o aditivo, ofreciendo beneficios a la salud por su riqueza en proteínas, lípidos, polisacáridos y vitaminas. Por lo anterior estos productos son considerados como nutraceuticos. (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014)

Actualmente se estima que cerca del 30% de la producción de microalgas, es utilizada en la elaboración de productos de nutrición animal, la demanda de ingredientes de origen natural ha aumentado, lo cual ha desencadenado un enorme interés por encontrar ingredientes de este tipo que mejoren la calidad de los alimentos para animales. (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

Lo anterior ha permitido el desarrollo de investigaciones que han reportado la capacidad de *Chlorella vulgaris* para brindar protección contra metales pesados (cadmio, etc) y otros compuestos dañinos (naftaleno) en el organismo, a través de la reducción significativa del estrés inducido por estos. (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

Debido a las propiedades encontradas en *Chlorella vulgaris*, este organismo viene siendo utilizada como antioxidante, desintoxicante e hipocolesterolémico ref. A su vez, la microalga presenta propiedades farmacológicas como modificador de la respuesta biológica linfática, ofreciendo beneficios a las personas que han tenido suprimido el sistema inmunológico. (Ley, 2003)

Además, *Chlorella vulgaris* se considera una de las microalgas más estudiadas debido a la versatilidad metabólica, permitiendo ser cultivada en condiciones mixotróficas (para el tratamiento de aguas residuales) y heterotróficas (para la obtención de aceites para biodiesel) (Tijani, Abdullah, & Yuzir, 2015) (Diaz & Diaz, 2012) (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

Lo anteriormente citado junto con las otras diferentes aplicaciones biotecnológicas de las microalgas y en especial de la especie *Chlorella vulgaris* ha impulsado un auge desde finales del siglo XX y por ende sigue aumentando el interés de seguir estudiándola.

2.2.3 Las vinazas

Las vinazas son subproductos resultantes de la transformación de melazas o mieles de caña de azúcar en procesos para la obtención de etanol o levaduras de panadería. Esencialmente corresponden a los mostos residuales de los procesos fermentativos o resultantes de las etapas de destilación ref.

A pesar de que son consideradas un desecho, la composición química de la vinaza es bastante rica en nutrientes. La vinaza está compuesta particularmente por Nitrógeno (N_2), fósforo (P_2O_5), potasio (K_2O) y carbono orgánico (C) (Martín, 2000), sin embargo, su composición exacta depende de la materia prima utilizada en los procesos previos, que pueden ser: melaza de caña concentrada, del jugo de los molinos (mieles) o de mezcla de jugo y melaza (Solera, 1985). Adicionalmente, las vinazas también están compuestas por gran parte de agua y sólidos solubles e insolubles, siendo los sólidos insolubles sulfatos de calcio, sulfatos de potasio y otras sales (dependiendo del vegetal de partida); en cuanto a los sólidos solubles, son de tipo orgánico en un porcentaje elevado (Irisarri D. , 2005).

Tradicionalmente las vinazas han encontrado nichos de aplicación en el sector agrícola luego de ser sometidas a procesos de compostaje (Irisarri D. , 2005), debido a que es una matriz que contiene carbono orgánico oxidable, nitrógeno, fósforo, macronutrientes y micronutrientes, que pueden ser usadas como sustrato para? ref. Sin embargo, estas alternativas de manejo cuentan con desventajas como: requerimiento de grandes extensiones de tierra para el caso del compostaje y costos energéticos asociados a las etapas de secado (Irisarri, 2005) y en especial una baja capacidad de cubrimiento del total de vinaza producida (García & Rojas, 2010)

Cabe resaltar que se han desarrollado muchas aplicaciones de las vinazas, las cuales giraban en torno a o giraban alrededor de la industria de la caña de azúcar, debido a que desde mitad del siglo XX se ha buscado que sean fuentes de nutrientes para la misma caña, por su gran contenido orgánico ref. Sin embargo el rendimiento de la caña sigue siendo el mismo y no ha podido ser útil la vinaza como abono para estas plantas (Susana Mirían Perdigón Martín, 2000) además de su efecto negativo

en la fertilidad de los suelos cuando son aplicadas en grandes cantidades (Irisarri, 2005).

Otro mecanismo de tratamiento de esta vinaza es el uso de digestores anaerobios, los cuales son capaces de degradar su elevado contenido de materia orgánica y generar metano ref. Por ejemplo, la compañía Levapan, cuenta con una planta de tratamiento anaerobico de las vinazas para hacer el vertimiento de los efluentes al acuífero principal (Rio Tuluá), sin embargo, los costos de operación de dicha planta junto con el aumento de los volúmenes de vinaza hacen cada vez mas necesario contar con otras alternativas de manejo o valorización de este sub-producto.

2.2.3 Antecedentes

En los últimos años se ha observado un incremento importante en publicaciones de estudios sobre cultivos heterotróficos de diferentes especies de microorganismos; como *Spirulina platensis* (*Spirulina es una cianobacteria filamentosa, no es una microalga*) (Cocoa, Barricak, Lucas, González, & Garcia, 2014), *Tetraselmis suecica* (Azama, y otros, 2010), *Auxenochlorella protothecoides* (Wenguang, y otros, 2012), *Scenedesmus* sp (Probir, y otros, 2016) y *Chlorella vulgaris* (Qian, Wenguang, Min, & Min, 2015), orientados al aprovechamiento de desechos agroindustriales, para obtener productos con alto valor agregado. No obstante, los cultivos de *Chlorella vulgaris* siguen siendo los más estudiados y partir de estos se han logrado obtener, bajo condiciones de crecimiento heterotrófico, diversos subproductos de interés tales como: proteínas, biodiesel, alimentos para animales, emulsificadores, aditivos en las comidas, bioetanol, medicamentos, cosméticos, nutracéuticos, antioxidantes y alimentos funcionales (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014).

Los desechos agroindustriales constituyen una fuente interesante de nutrientes para el crecimiento de muchos microorganismos. El desempeño de estos es dependiente de la complejidad y tipo de moléculas que es capaz de metabolizar el microorganismo seleccionado (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011). En este sentido hay evidencia de que especies del genero *Chlorella* sp. son capaces de transformar bioquímicamente y crecer sobre diferentes sustratos como melazas (Chinalia, 2013), glicerol (Liang, Sarkany, & Cui, 2009), glucosa (Liang, Sarkany, & Cui, 2009), acetato (Liang, Sarkany, & Cui, 2009) , aguas de desecho de la industria de carne (Qian, Wenguang, Min, & Min, 2015), aguas residuales (Wenguang, y otros, 2012) y vinazas (Castro & Parra, 2011).

Se ha encontrado que los cultivos heterotróficos de microalgas (*Chlorella vulgaris*) a base de vinazas de remolacha muestran un buen crecimiento en medios formulados con bajos porcentajes de este sub-producto (< 80%(volumen/volumen) (Castro & Parra, 2011).

Se han desarrollado investigaciones como las de Mónica Coca, sobre el aumento de la producción de proteína en la biomasa de la cianobacteria *Spirulina platensis* cultivada mixotroficamente en un medio de vinazas de remolacha (Cocoa, Barricak, Lucas, González, & Garcia, 2014). Encontrándose allí un mayor incremento de biomasa y proteínas con un medio a partir de 1g/L de vinaza, obteniendo 6.5 ± 0.7 g/L y 168 ± 18 mg/dL de proteína microalgal, demostrando así que puede haber un crecimiento significativo de biomasa de microalgas, si se controla las concentraciones de vinaza en el medio de cultivo (Cocoa, Barricak, Lucas, González, & Garcia, 2014).

Adicionalmente, algunas investigaciones muestran que es posible el crecimiento de una cepa de *Chlorella vulgaris*, usando como medio de cultivo vinaza de la caña de azúcar sin diluir; sin embargo, la velocidad de crecimiento de la microalga se reduce a medida que aumenta la concentración de la vinaza, por consiguiente la cantidad de vinaza suplementada es un factor de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011). Adicionalmente, se encontró que la concentración de vinaza donde hubo el mayor crecimiento fue de 30% v/v. (Garcia & Higueta, 2013)

Ahora bien, estas investigaciones demuestran que hay diferencias en la composición de la vinaza que se obtiene de la fermentación de la remolacha comparada con la que se obtiene de la fermentación caña de azúcar.

La vinaza de remolacha es rica en carbohidratos, y vitaminas principalmente vitamina A, mientras que la vinaza de la caña de azúcar es una fuente contiene más cantidad de azúcares, vitamina K y vitamina E (Ley, 2003)

Así mismo, se han encontrado diferencias en el proceso de obtención de la vinaza de remolacha con el de la caña de azúcar, debido a la utilización de amonio en el proceso de fermentación de remolacha, lo incide en la composición de la vinaza obtenida causando que sea baja en nitrógeno (Cocoa, Barricak, Lucas, González, & Garcia, 2014). Sin embargo, la vinaza que se obtiene de la fermentación de la caña de azúcar utiliza urea, permitiendo tener una mayor concentración de nitrógeno siendo una mejor matriz para el crecimiento de microorganismos (Ley, 2003).

Por otra parte, cuando *Chlorella vulgaris* es cultivada heterotróficamente, la composición de la fuente de energía de energía debe ser rica en carbono, nitrógeno y fosforo, además necesita macro y micronutrientes, para tener un óptimo crecimiento (Garcia & Higueta, 2013). Así mismo se necesita una relación con el fosforo y nitrógeno de 1:8 ya que permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes en el medio siendo el nitrógeno un factor limitante de la velocidad del crecimiento de la microalga (Aslan & Kapadan, 2006).

Así mismo, se ha encontrado que el control de la temperatura (Tijani, Abdullah, & Yuzir, 2015), el pH (Probir, y otros, 2016), la presión, la aireación (Chinalia, 2013) y la agitación (Andersen, 2005) son cruciales para obtener un mayor crecimiento de la microalga y se deben tener en cuenta en su cultivo.

Diferentes investigaciones han reportado, que para algunas cepas de *Chlorella vulgaris*, cultivadas con medios formulados con vinaza, una temperatura constante de 25 ± 2 °C y agitación de 90 rpm (Castro & Parra, 2011), con una velocidad de aireación de 0.50 vvm (volumen de gas por volumen de caldo por minuto) de aire atmosférico, incrementa la velocidad de crecimiento de la microalga (Gonzalez, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado que si las células de las microalgas son incubadas a un pH de 6.8 ± 0.8 , aumentará el crecimiento celular (tasa de crecimiento) durante el periodo de incubación (Castro & Parra, 2011), por consiguiente el ajuste de estos parámetros es de vital importancia para la mayor obtención de biomasa.

Cabe resaltar que debido a que los parámetros de cultivo han sido verificadas preliminarmente con la cepa de *Chlorella vulgaris* seleccionada, son apropiadas para la formación de biomasa, estos se mantuvieron fijos durante el desarrollo de este trabajo.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar el uso de vinaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de biomasa algal (*Chlorella vulgaris*) como una estrategia de valorización de subproductos de la industria azucarera.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la velocidad de consumo de urea como fuente de nitrógeno y su efecto sobre la velocidad de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio heterotrófico formulado con vinaza.

Indicador:

- Capacidad de cuantificar la urea con método enzimático con alta precisión en las concentraciones presentes en los medios de vinaza.
- La relación de la velocidad de consumo de urea con el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*.

2. Determinar la concentración óptima de vinaza (v/v) empleada para el medio de cultivo de *Chlorella vulgaris* que permita obtener el mayor valor de productividad de biomasa.

Indicador

- Diferentes porcentajes de vinaza como suplemento de fuente de carbono del medio de cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris*.
- los parámetros cinéticos cruciales para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones heterotróficas determinados
- Los valores de productividad (g biomasa b.s/ l. h) determinados
- Condiciones óptimas (porcentaje inoculo y porcentaje de vinaza) de cultivo para *Chlorella vulgaris*, definidas.

2.4 Metodología propuesta

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de la facultad de ciencias naturales de la universidad Icesi, donde se cultivó una cepa de la microalga, *Chlorella vulgaris* obtenida de la colección UTEX (385), bajo condiciones heterotróficas, usando las vinazas como fuente mayor de nutrientes.

En éste experimento, se pretendió identificar las condiciones óptimas de cultivo para el crecimiento heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, empleando medios formulados a partir de vinazas de la caña de azúcar, procedentes del procesamiento de mieles de caña para la obtención de levaduras de panadería en la empresa Levapan.

Para cumplir con los objetivos propuestos, la metodología se dividió en 2 etapas que se describen a continuación

2.4.1 Etapa 1.

Pretratamiento de la vinaza

Con el propósito de remover sólidos insolubles (Anexo 8) presentes en la vinaza, los cuales mostraron evidencia de inhibición de crecimiento durante pruebas preliminares a nivel del semillero EBB, se procedió con la aplicación de un pretratamiento siguiendo el protocolo presente en el (anexo 1), el cual fue adaptado de reportes de literatura (Azama, y otros, 2010).

Este pretratamiento consistió en la dilución de la vinaza concentrada suministrada por Levapan (53 % de sólidos totales) con agua tipo 1 en una proporción 1:10, seguido de centrifugaciones (3) a 4000 rpm por 15 minutos. Posteriormente al sobrenadante de vinaza obtenido se le adicionó **hidróxido de calcio** (3 g/L) manteniéndolo bajo agitación por 45 minutos seguido de una centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos. Al finalizar se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH con hidróxido de sodio a un valor cercano a la neutralidad (± 7.0). Esta solución representó el “stock” de vinaza llamado vinaza 100 % (v/v) a partir de la cual se hicieron las posteriores diluciones (2%, 10%, 30%, 50% y 58%) para los tratamientos experimentales.

Pre-adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Con el propósito de contar con una cantidad de biomasa de *Chlorella vulgaris* lo suficientemente grande para los ensayos siguientes, la microalga se creció en un medio basal CHU-13, con el cual las células se mantuvieron bajo condiciones autotróficas y fueron almacenadas a 25°C y pH 8,0, para mantener un cultivo madre de células frescas y activas metabólicamente.

Seguidamente, a partir de este cultivo madre, se prepararon otros nuevos cultivos formulados con 2 % (v/v) de vinaza stock, macronutrientes suplementados con urea y micronutrientes. Lo anterior con el fin de pre-adaptar las células microalgales a los compuestos presentes en la vinaza. El tiempo de cultivo celular fue de 5 días a 25 °C, con aireación y bajo condiciones de crecimiento heterotrófico (sin incidencia lumínica sobre el medio).

2.4.2 Etapa 2. Cultivo heterotrófico de la microalga *Chlorella vulgaris* en medios formulados con vinaza.

En esta etapa, se implementó un diseño experimental de superficie de respuesta de dos factores (% de vinaza en el medio y % de inóculo) con tres niveles (alto, medio y bajo), donde se definió como unidad experimental el biorreactor (recipiente en vidrio con entrada y salida superior de aire) (figura 1A). La unidad observada fue la concentración celular de la microalga (células/mL) y gramos base seca de células/mL, estimado a través de una curva de OD & peso seco) a lo largo del tiempo y la variable de respuesta dependiente que se empleó fue la productividad de biomasa.



A



B

Figura 1- Biorreactores de *Chlorella Vulgaris* en vinazas de la caña de azúcar

En la tabla 1 pueden observarse los valores para cada uno de los factores planteados en el diseño experimental.

Tabla 1. Condiciones controladas de crecimiento, de cada una de las muestras.

Variable	Nivel		
	bajo	Medio	Alto
Porcentaje de inculo % v/v	3	6	9
% vinaza en el medio (v/v)	10	30	50

A partir de estas variables y estos niveles se hizo la posterior definición del diseño experimental para el establecimiento de los tratamientos o biorreactores. De esta manera se obtuvieron 14 tratamientos (tabla 2), cada uno con una repetición para un total de 28.

Tabla 2- Detalle de los tratamientos experimentales según el diseño de superficie de respuesta.

Tratamiento	%Inoculo (v/v)	%Vinaza (v/v)
1	3	10
2	9	10
3	3	50
4	9	50
5	6	30
6	6	30
7	6	30
8	2	30
9	10	30
10	6	2
11	6	58
12	6	30
13	6	30
14	6	30

La vinaza incorporada en cada tratamiento aportó como fuente de carbono, el carbono total oxidable que corresponde principalmente a azúcares no fermentables (C5) (Scull, 2012) (García & Rojas, 2010).

Sin embargo, debido a algunos resultados en ensayos preliminares del semillero de investigación EBB (Ecología, Bioprospección y Bioprocesos), se observó que el pretratamiento al que se sometió la vinaza con hidróxido de calcio, disminuyó parte de la urea disuelta debido al incremento considerable del valor de pH. Por consiguiente, se optó por suplir ésta pérdida con la suplementación de 8g/L de urea en la solución de macronutrientes, obteniéndose una concentración final teórica en cada tratamiento de aproximadamente 0,36g/L.

Preparación de los biorreactores.

Las unidades experimentales o biorreactores fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del diseño experimental de superficie de respuesta. En total se generaron 14 tratamientos por duplicado para un total de 28. Todas las unidades experimentales se pusieron a crecer durante 15 días a una temperatura de 25°C ± 1°C y bajo la condición de aireación constante.

El detalle de las cantidades de cada uno de los parámetros evaluados para los tratamientos (14) del diseño experimental usado se muestra en la tabla 2. Los tratamientos conformaron tres grupos: cuatro puntos estrella (tratamiento 8, 9,10 y 11), seis puntos centrales (tratamiento 5, 6, 7, 12,13 y 14) y cuatro puntos extremos

(tratamiento 1, 2,3 y 4) de acuerdo a lo establecido por el Software estadístico Minitab versión 17.3.1

Para realizar la ejecución de esta segunda etapa, se realizaron las siguientes actividades en orden secuencial.

Actividad 1- Preparación de los tratamientos.

Correspondió a la preparación de los medios de los tratamientos formulados con la vinaza (6 % de sólidos) centrifugada y pre-tratada (Stock), obtenida en la Etapa1, a diferentes porcentajes de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental. En el Anexo 3 se muestra el detalle de los otros componentes del medio que incluyeron Tween 80 al 0.002%(v/v) para efectos del control en la formación de espuma, antibióticos (bactericida) y agente anti-bacterial (bacteriostático).

Estos medios se inocularon con sus respectivos volúmenes (porcentaje volumétrico referido al volumen total de cada tratamiento) de inóculo, el cual fue tomado a partir de las células pre-adaptadas (inóculo stock) en la etapa 1 luego de separarlas por centrifugación y re suspenderlas en solución salina 1%. La concentración de células del inóculo stock obtenido de *Chlorella vulgaris* fue estimada por el método de medición de cámara de Neubauer encontrándose en un orden de magnitud superior a 10^6 células/mL.

Los cultivos, se realizaron en biorreactores de vidrio con un volumen de trabajo de 250mL. A modo de garantizar la condición heterotrófica del metabolismo de las algas, se colocaron los cultivos en un punto donde no recibieron incidencia lumínica (medida realizada con un luxómetro marca Apogee®) y se les ajustó el pH en el rango de 8.0 a 8,5 y aireación constante del medio (Figura 1 B).

Adicionalmente, se prepararon los controles negativos (sin inoculación) para los porcentajes de vinaza correspondientes a 2%,10%, 30%, 50% y 58%.

Actividad 2 - Seguimiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

En esta actividad se realizó el seguimiento del crecimiento celular, con la implementación de un método espectrofotométrico de densidad óptica de las células medidas a 683nm y conteo de concentración celular en cámara de Neubauer. Así mismo se hizo control al volumen del medio mediante seguimiento en el tiempo del peso del biorreactor (control gravimétrico). Cabe recordar, que a lo largo del cultivo se presentan pérdidas de masa por fenómenos de evaporación y arrastre de agua por parte del aire suministrado al sistema.

El muestreo para seguimiento por espectrofotometría, se realizó tomando 1 mL de muestra de cada biorreactor cada dos días y se centrifugo a 5000rpm por 10

minutos, luego se retiró y almaceno el sobrenadante, para re suspender a 1 mL la biomasa centrifugada.

Por otra parte para el muestreo en cámara de Neubauer se tomó 0,5 mL de muestra cada dos días y se adiciono en un recipiente con 24,5mL de agua destilada, para formar una dilución de 1:100. El conteo en cámara se realizó contando los cuadros extremos de la cuadrícula central en las 2 cuadrículas para un total de 8 cuadros.

Para el seguimiento de crecimiento por mediciones espectrofotométricas, se hizo una curva de calibración de absorbancia contra peso seco de *Chlorella vulgaris*. (Anexo 4)

Adicionalmente se determinaron los valores de productividad (g biomasa b.s/ g medio. día), para cada uno de los 28 tratamientos.

Para la determinación de esta productividad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad} = \frac{(C_m - C_0) * 1000}{(M_T * t)} \quad (\text{E.C } 1)$$

C_m = Cantidad máxima de células totales en el cultivo obtenidas durante el crecimiento (g)

C_0 = cantidad de células totales en el medio al inicio del cultivo en (g).

M_T = masa total del medio de cultivo correspondiente al día en el que se obtuvo C_m (g)

t = tiempo en el cual se obtuvo la mayor cantidad de células totales, C_m (días).

Actividad 3- Medición de la concentración de urea y amonio.

En esta actividad se realizó la medición de la concentración de urea y amonio en los tratamientos experimentales (muestras de la actividad 2) y controles negativos.

La medición de la concentración de estos compuestos nitrogenados se realizó en todas las unidades experimentales a los días 0, 8 y 10, de acuerdo a la fase de crecimiento, con un kit enzimático Megazyme® UREA/AMONIO aplicando el protocolo descrito en el anexo 2.

Actividad 4- Cuantificación del carbono oxidable total.

Correspondió a la medición de la concentración de carbono orgánico oxidable (método Walkley-Black, NTC 5167) a los tratamientos experimentales (muestras de los sobrenadantes de la actividad 2) y controles negativos.

La medición de la concentración carbono orgánico se realizó en los tratamientos más representativos con respecto al crecimiento celular al final del cultivo, por los laboratorios AGRILAB. Por razones de presupuesto, este análisis fue asignado para algunos tratamientos.

Actividad 5- Procesamiento estadístico de datos

En esta etapa se realizó el análisis estadístico del diseño de superficie de respuesta, estimándose así el nivel óptimo de crecimiento (dependiente del porcentaje de inóculo y de vinaza) para el cultivo de la cepa *Chlorella vulgaris* a las condiciones descritas en la actividad 1.

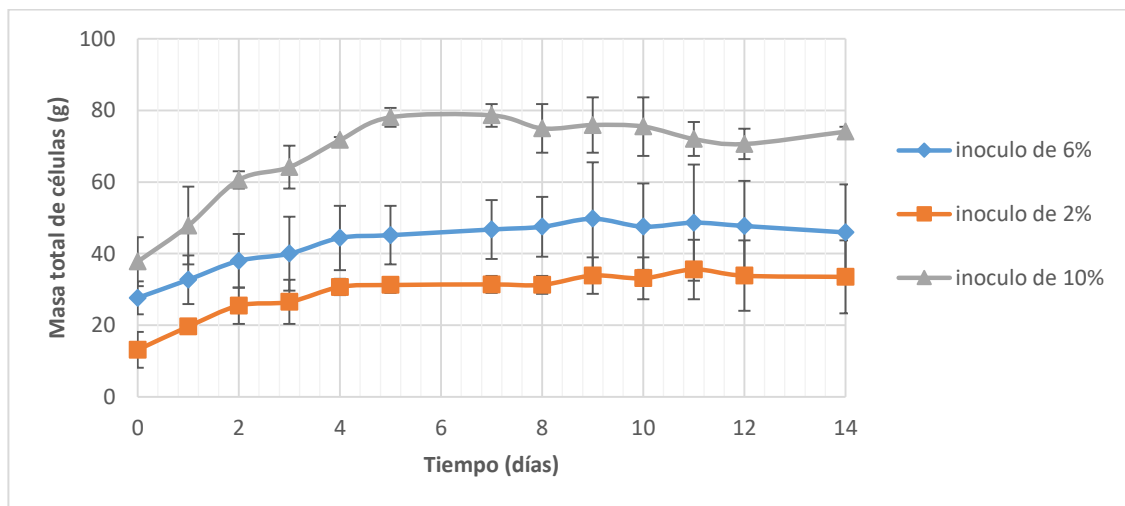
Adicionalmente, se realizó un análisis de cordillera donde se definió el nivel óptimo de crecimiento que tiene la microalga, en el mejor punto posible dentro de la región experimental abordada.

Resultados

Crecimiento celular

Con el objetivo de observar los patrones del crecimiento celular se graficó el valor de la masa total de células (g) presente en cada tratamiento a partir de las concentraciones de biomasa determinados con el método espectrofotométrico. Los datos de conteo celular mostraron dificultad en la estimación especialmente en los últimos días de seguimiento, principalmente por el bajo tamaño de las células de alga observadas al microscopio.

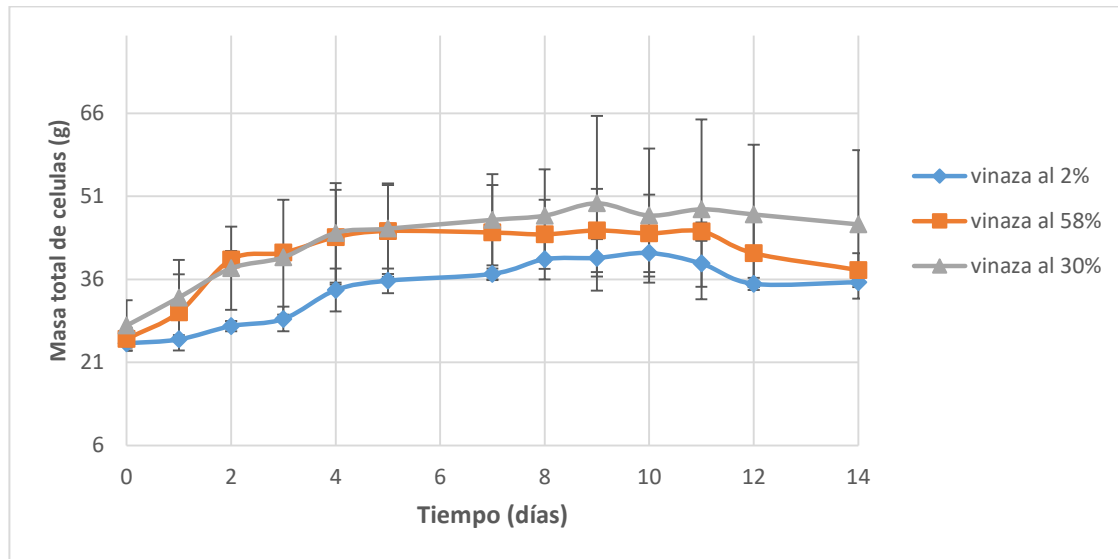
Para efectos prácticos se agruparon los tratamientos con concentración de vinaza semejantes (anexo 5) mostrando el comportamiento cinético del cultivo a diferentes porcentajes de inóculos. En la gráfica 1, puede observarse que para los tratamientos con 10 % de vinaza, el crecimiento de la microalga en los primeros 5 días para el tratamiento correspondiente a un inóculo del 10% (v/v) se logró alcanzar 78,09 g de biomasa, número que comparado con los otros dos ensayos (inóculo del 6% y 2%) es superior. Adicionalmente, puede observarse claramente en todos los tratamientos que la fase de adaptación (lag) celular es indistinguible.



Gráfica 1 - Crecimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* UTEX 385 en una matriz con vinaza al 30% con diferentes porcentajes de inóculos (2, 6 y 10%).

Complementariamente, en la gráfica 2, para un mismo porcentaje de inóculo, se muestra el efecto de la concentración de vinaza en los tratamientos sobre el crecimiento de la microalga, se observa que con la concentración de vinaza de 58% (v/v) se logró alcanzar 44,39 g de biomasa (masa total de células), valor aproximado al que presenta la concentración de vinaza del 30%(v/v), seguida de la vinaza al 2%(v/v) con un menor valor a la gráfica de inóculo de 6%(v/v) de 34,06.

Adicionalmente, se observa que todos los tratamientos alcanzaron su estado estacionario aproximadamente luego del sexto día.

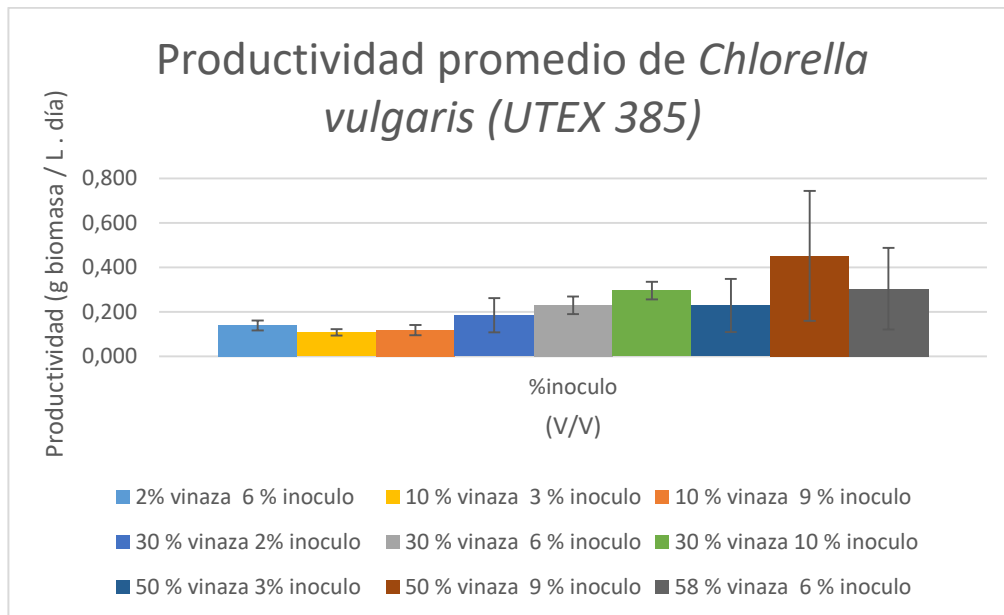


Gráfica 2 – Efecto del porcentaje de vinaza en el crecimiento *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) en una matriz de inóculo al 6%.

Cabe resaltar que durante la experimentación, se presentó un inconveniente con el muestreo de algunos biorreactores en donde se observó la formación de un flóculo de biomasa que dificultó la toma de muestras completamente homogéneas. Por ende se requirió agitar cada muestra antes de sacar la muestra correspondiente y vigilar el estado de la aireación de cada biorreactor.

Calculo de la productividad del crecimiento de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385)

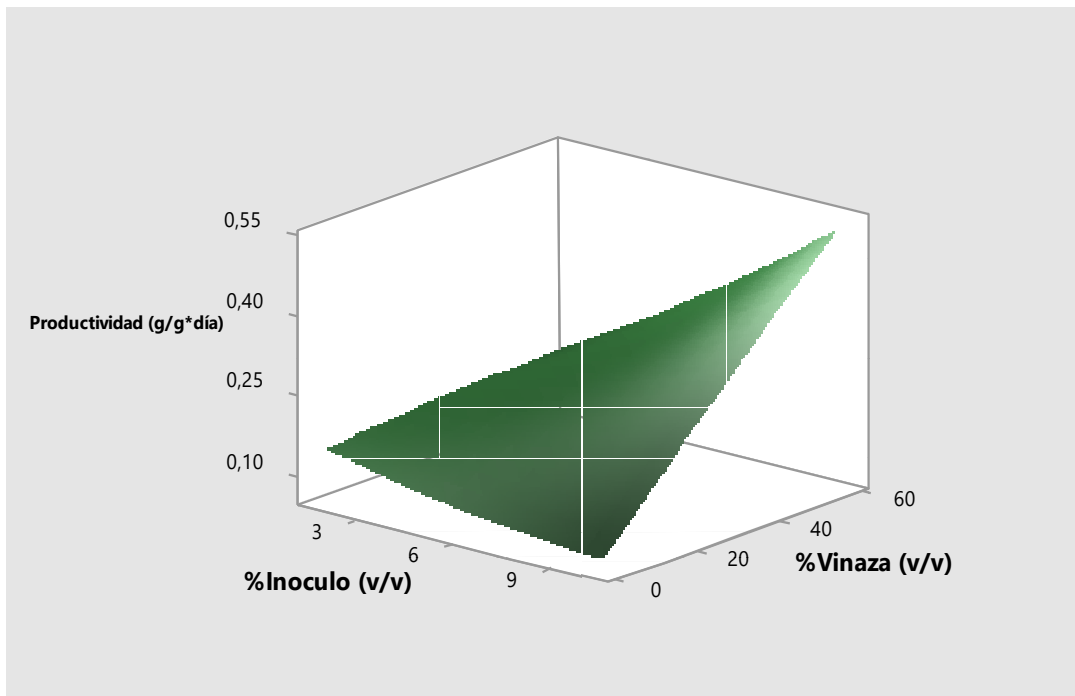
Con el fin de calcular la productividad del crecimiento de *C. vulgaris* se aplicó la ecuación 1 (E.C1) y posteriormente se promediaron los valores entre todos los tratamientos. En la gráfica 3 se presentan estos datos agrupados por el porcentaje de inóculo observándose un aumento de la productividad proporcionalmente al aumento del porcentaje de inóculo, principalmente en los tratamientos de mayor cantidad de vinaza (10, 30 y 50 %). El tratamiento con un inóculo del 9% y una concentración de vinaza del 50% (marrón) obtuvo mayor productividad promedio, seguidos de los tratamientos con 6% inóculo y 58% de vinaza (gris); y 10% inóculo y 30% de vinaza (verde). Los tratamientos que presentaron la menor productividad fueron aquellos cuyo porcentaje de vinaza estaba por debajo de un 10%(v/v).



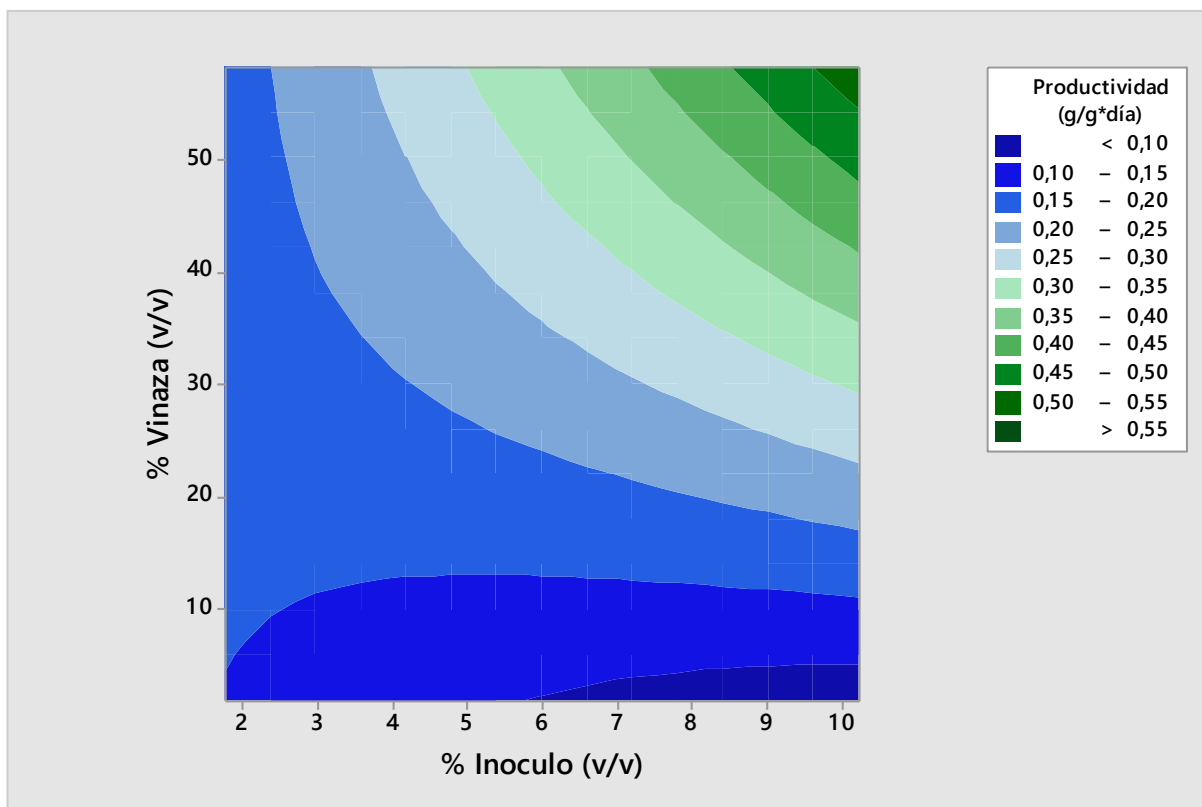
Grafica 3- Valores promedio de productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* obtenidos con los tratamientos experimentales.

Con el objetivo de encontrar el valor óptimo de productividad de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385), se procesaron los datos estimados de productividad de los 28 tratamientos con ayuda del software Minitab a partir del cual se generó el grafico de superficie de respuesta Grafica 4.

Allí se observa que la productividad de biomasa algal aumenta a medida que también aumenta el porcentaje de inoculo y porcentaje de vinaza. Esta información se complementa con más claridad en la gráfica de contornos de la productividad de *Chlorella vulgaris* (gráfica 5), donde se observa que con una vinaza con porcentaje superior al 50%(v/v) y a un porcentaje de inoculo de 10%(v/v), puede obtenerse productividades superiores a 0,55 (mg biomasa /g x día). De igual forma, la gráfica 6 muestra la interacción del porcentaje del porcentaje de inoculo y la vinaza en la productividad. Se observa que a un porcentaje de inoculo alto (10%(v/v)) de la cepa de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385), en un porcentaje de vinaza bajo (1,7%(v/v)), ocasiona que la productividad disminuya. Sin embargo, a medida que aumenta el porcentaje de inoculo en las vinazas del 30% y 58%(v/v), ocurre el efecto opuesto causando un aumento de la productividad.



Gráfica 4 – Superficie de respuesta de la productividad de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) en una matriz con vinaza



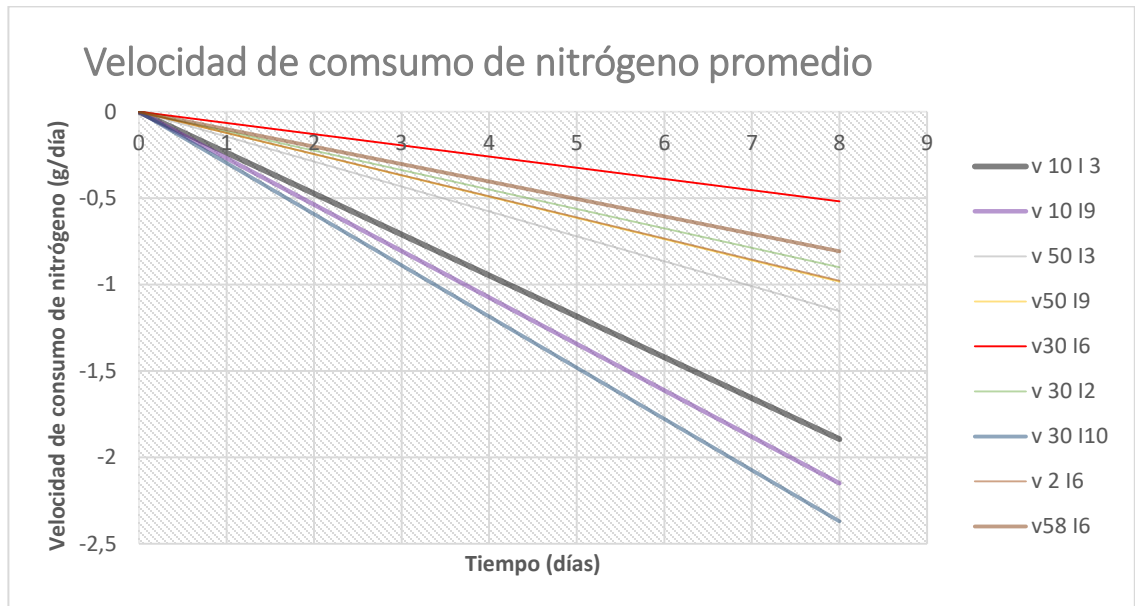
Gráfica 5 – Grafica de contornos de la productividad de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) en una matriz con vinaza

Seguimiento de la velocidad de consumo de Nitrógeno

Con el fin de evaluar la velocidad de consumo de nitrógeno para la cepa *Chlorella vulgaris* (UTEX 385), se calculó la cantidad de Urea y amonio utilizando el kit enzimático UREA/AMONIO, sobre los sobrenadantes de los ensayos a tres tiempos diferentes de cultivo. A partir de estos se estimó la velocidad de consumo de nitrógeno total calculando el logaritmo natural del valor de nitrógeno del día 0 con el valor de nitrógeno del día 8.

En los resultados obtenidos, la concentración de urea (0,277(g/L) a 0,38(g/L)), al tiempo cero fue muy cercana a la teórica esperada (0.39 g/L) luego de la suplementación de la solución de macronutrientes. No obstante, desde el tiempo cero, el kit enzimático detectó la presencia de ión amonio, implicando que hubo dos fuentes de nitrógeno en los medio de cultivo. Sin embargo, cuando se midió la concentración de urea y amonio en los días 8 y 10, se observó que la concentración de ambos sustratos disminuyo considerablemente hasta llegar a cero.

Después se calculó la velocidad de consumo de nitrógeno y los valores se graficaron en función del tiempo de cultivo (anexo 6).

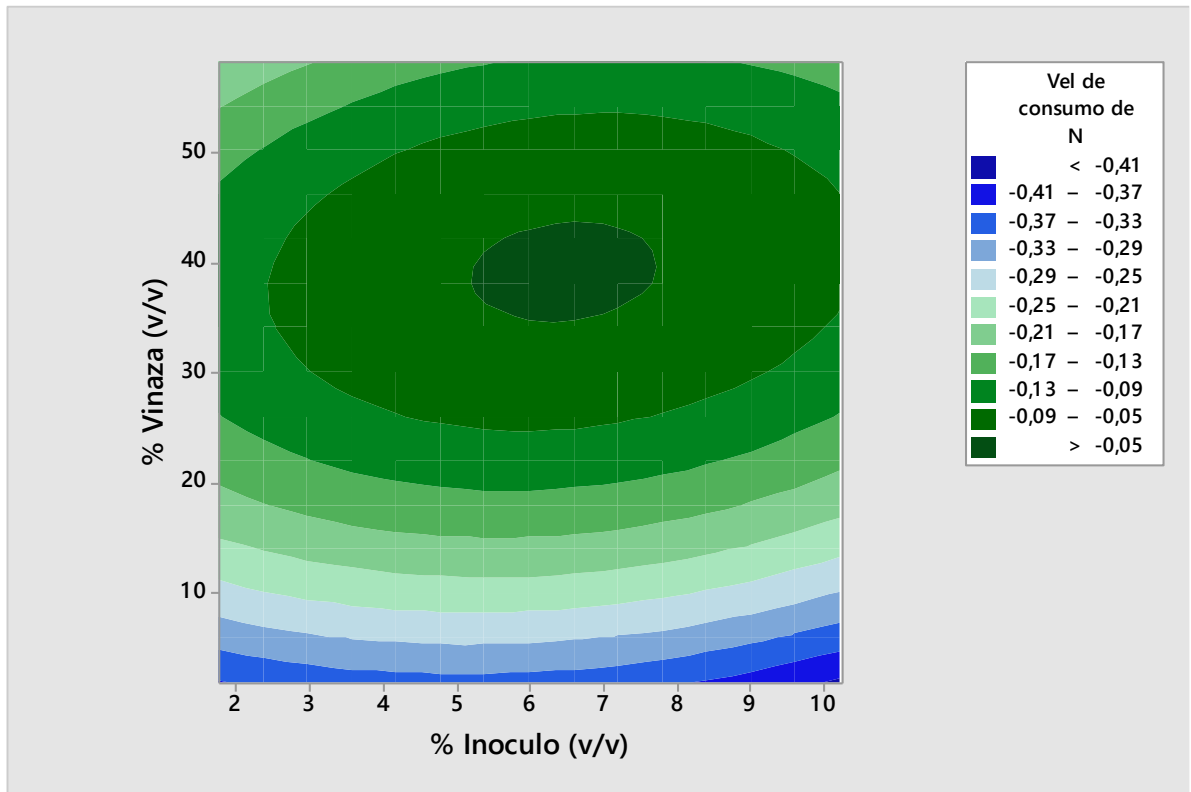


Gráfica 6– Velocidad de consumo de nitrógeno promedio para la cepa *Chlorella vulgaris* cultivada heterotróficamente en un medio formulado con vinaza. Donde la letra “v” hace referencia al porcentaje (v/v) de vinaza y la letra “I” hace referencia al porcentaje (v/v) de inóculo.

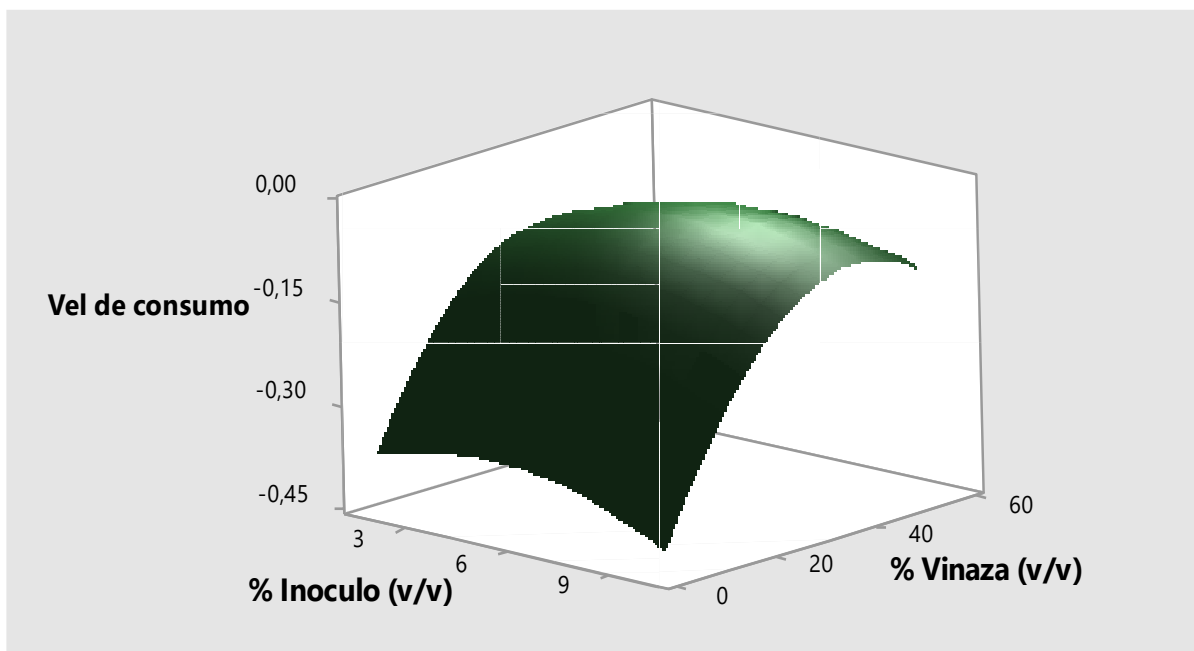
En la gráfica 6 se observa que el tratamiento “v30 I6”, (que corresponde a 6% de inóculo y 30% de vinaza) tiene una menor pendiente en comparación con los demás tratamientos realizados, lo cual significa que la velocidad de consumo de nitrógeno fue menor. Seguido por el tratamiento “v58 I6” (58% vinaza-6% inóculo). Mientras que la mayor velocidad se alcanzó con el tratamiento “v30 I10”, lo que sugeriría en principio una correlación con el tamaño del inóculo empleado. A mayor inóculo, mayor velocidad de consumo del nitrógeno. Sin embargo, entre estos datos aparecen valores de velocidades correspondientes a tratamientos con menores y mayores valores de vinaza.

A continuación se muestra en las gráficas 7 y 8 los resultados del procesamiento estadístico de los datos de velocidad de consumo de nitrógeno en relación al porcentaje de inóculo y vinaza.

En la gráfica de contornos (gráfica 7) y superficie de respuesta (gráfica 9), se observa que la maximización del consumo de nitrógeno ureico y amoniacal por parte de la cepa de *Chlorella vulgaris* Utex 385 se logra en una zona intersectada en el medio de los valores de inóculo y vinaza evaluado. Más concretamente a un porcentaje superior al 30% de vinaza y de un inóculo de aproximadamente un 7%.



Gráfica 7– Contornos de la velocidad de consumo de nitrógeno para *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) en una matriz de vinaza.



Gráfica 8– Superficie de respuesta de la velocidad de consumo de nitrógeno de *Chlorella vulgaris* (UTEX 385) en una matriz de vinaza.

En las gráficas anteriores de la velocidad de consumo de nitrógeno, no se observa una relación directa con el porcentaje de inoculo y el porcentaje de vinaza, implicando que el comportamiento de la velocidad de consumo es variable según el tipo de tratamiento.

Resultados de la cantidad de carbono oxidable total

Los resultados de carbono oxidable y conductividad reportados por el laboratorio Agrilab se muestran en la tabla 3, donde se observa el aumento de la cantidad de carbono oxidable total en todos los tratamientos comparados con el respectivo valor del control negativo.

Adicionalmente por cada aumento de los valores de carbono oxidable total, se evidencia un aumento de la conductividad eléctrica, fenómeno que podría asociarse directamente a un incremento también de compuestos químicos en el medio.

Tabla 3 - Cantidad de carbono oxidable total para los tratamientos representativos de cada uno de los ensayos propuestos en el diseño experimental.

% Vinaza en los tratamientos (v/v)	% Inóculo en tratamientos (v/v)	Carbono orgánico oxidable total (g/L)	Conductividad eléctrica (dS/m)	% Vinaza en controles (v/v)	Carbono orgánico oxidable total (g/L)	Conductividad eléctrica (dS/m)
2	6	17.3	0.58	2	0.29	0.01
10	3	17.6	0.48	10	1.36	0.04
30	6	16.1	0.43	30	4.76	0.08
	10	5.8	0.33			
50	9	11.5	0.29	50	7.9	0.13

2.6 Discusión

De acuerdo a los resultados reportados (grafica 1 y 2) del crecimiento celular de la cepa de *Chlorella vulgaris* UTEX 385 bajo condiciones heterotróficas, se infiere que una concentración de vinaza de hasta el 58% y un valor inicial de carbono oxidable total de 7.9 g/L no ejercen ninguna acción inhibitoria, teniendo un impacto positivo, debido a que en otros reportes proporciones de vinaza igualmente diluidas daban evidencia de inhibición del crecimiento microalgal a cantidades mucho menor de vinaza (Garcia & Higuira, 2013).

En la investigación de Rodriguez y colaboradores (Rodriguez, Gómez, Liliana, & Yamilet, 2014), se encontró que el cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* sobre medios que contenían diferentes concentraciones de vinaza de destilería, presentaron inhibición del crecimiento celular a partir de valores de carga orgánica (expresada como DQO en g/L) de 5.9, correspondientes a una dilución de 1:12%(v/v) de una vinaza de 53 % de sólidos totales. Aproximadamente en términos de sólidos totales la anterior mezcla es equiparable con el stock de vinaza preparado en el presente estudio, sin embargo, aquí no se evaluó el crecimiento microalgal en una solución con 100 % de vinaza. De otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación no son comparables con los de Rodriguez debido a las diferentes formas de estimación de la carga orgánica, sin embargo, si es claro que como parte del tratamiento aplicado a la vinaza seguramente se precipitó carbono oxidable total y por lo tanto pudo haberse generado una disminución en la carga orgánica. Desafortunadamente, no es posible precisar si los valores de DQO en ambos trabajos son del mismo orden de magnitud.

Por otra parte, en el trabajo de (Garcia & Higuira, 2013) sólo se aplicó ajuste de pH y centrifugación para el tratamiento de las vinazas, mientras que en el caso de este estudio se adicionó hidróxido de calcio, que ayudó a precipitar una mayor cantidad de lodo.

A pesar que en algunos reportes (Garcia & Higuira, 2013) se ha afirmado que concentraciones de carga orgánica en términos de DQO (demanda química de oxígeno) mayores de 20 g/L inhiben el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, el trabajo de (Rodriguez, Gómez, Liliana, & Yamilet, 2014) muestra estados inhibitorios a menores valores de carga orgánica (5.9 g/L), por lo cual la presencia de otros compuestos presentes en la vinaza podrían ser los responsables de tal fenómeno. Es por tal razón que el pretratamiento con el hidróxido de calcio, posiblemente, precipita gran parte de estos solidos inhibitorios de gran carga orgánica.

En los tratamientos experimentales realizados en esta investigación se observó un incremento del carbono oxidable total (entre 1 y 50 %) al final del cultivo, el cual podría parcialmente ser explicado en términos del CO₂ formado como parte de la metabolización de la urea o por la liberación al medio de metabolitos de cadenas

carbonadas. Manteniendo las diferencias en el parámetro empleado para la estimación de la carga orgánica, es importante resaltar que bajo la condición incremental observada no se presentó inhibición alguna del crecimiento microalgal.

Por otra parte, la investigación realizada por García e Higuita (García & Higuita, 2013) reportó que el mejor crecimiento de *Chlorella vulgaris* se dió en un medio heterotrófico suplementado con 30% v/v de vinaza con un contenido de sólidos similares a los empleados en el presente estudio. Sin embargo, reportan que a mayores concentraciones de vinaza se obtuvo una carga orgánica superior a los 20 g/L de DQO, lo que según estos autores explicaría la inhibición del crecimiento dado en correspondencia a lo citado en otros trabajos (Liang, Sarkany, & Cui, 2009). Por ende, los resultados encontrados aquí, refutan las hipótesis planteadas en la literatura, debido a que se observa que concentraciones superiores al 30% (v/v), la duplicación celular es mucho más rápida. A mayor concentración de vinaza, la inclinación de la pendiente (en la fase exponencial) es mucho mayor, por tanto esta relación podría ser directamente proporcional. Lo anterior, sucede debido a que a medida que aumenta el porcentaje de vinaza también aumenta la cantidad de carbono oxidable, así como otros nutrientes fósforo, potasio, calcio necesarios para cubrir las funciones fisiológicas de la alga.

Por consiguiente, dentro del rango de valores de carbono oxidable total manejados en este trabajo no hubo inhibición del crecimiento de las microalgas. Mientras que presumiblemente el tratamiento realizado a la vinaza (precipitación de lodos) permitió disminuir compuestos inhibitorios y aumentar la asimilación de los nutrientes por parte de *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, se recomendaría hacer mediciones de carga orgánica en términos de DQO (demanda química de oxígeno) para los tratamientos de este trabajo, o en su defecto encontrar una correlación entre estos dos parámetros a fin de poder realizar un análisis comparativo.

De otro lado, cabe resaltar la importancia de la fase de pre-adaptación de las células microalgales, la cual permitió que estas se encontraran en fase exponencial desde el día cero hasta el día cinco, como se observa en la gráfica 1.

Esta estrategia de pre-adaptación jugó un rol importante en las cinéticas de crecimiento observadas, al permitir que la maquinaria enzimática de la microalga estuviese lista para la asimilación de los nutrientes presentes en la matriz de vinaza y así mejorar el rendimiento de biomasa. Este argumento encuentra soporte en algunos reportes donde la ausencia de una etapa de pre-adaptación favorece la aparición de largos periodos de fase la: entre 2 y 3 días para cultivos mixotróficos de *Chlorella vulgaris* (Cabeza, 2010), tres días para el cultivo heterotrófico de *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus spp* y *Chlorococum infosorium* (Ortega & Reyes, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos de productividad (gráfica 3), el tratamiento que obtuvo el mayor valor de productividad, no correspondió al que contaba con

una mayor masa total de células al final del cultivo. La mayor productividad se obtuvo con un inóculo que correspondía 9%(v/v) con una vinaza al 50%(v/v), mientras que el mayor valor de biomasa alcanzado fue para un tratamiento del 30 % de vinaza y 10 % de inóculo. Estas diferencias se deben a que el parámetro de productividad da cuenta del máximo delta de formación de biomasa por unidad de tiempo, por lo tanto es más conveniente que hacer comparaciones en términos del valor final de biomasa.

El valor óptimo de productividad 0.7 (g biomasa b.s/g medio*día) se estimó para una condición de medio con 10,24% de inóculo y 58,28% de vinaza. Considerando la densidad del medio de cultivo cercana a la del agua, las unidades de productividad empleadas en este trabajo serían equivalentes a las reportadas en literatura ((g biomasa b.s/L medio*día). Allí se encuentra que las productividades en cultivos heterotróficos para *Chlorella vulgaris*, no superan el umbral de 0,150 (g/L*Día) (Montero, Gallo, Liliana, & Inaundis, 2012). Por consiguiente, los resultados alcanzados en este trabajo son hallazgos importantes, debido a que se obtuvo productividades superiores a 0.7 (g/L*Día). La mejoría de productividad también puede atribuirse a una mayor asimilación de los nutrientes de la matriz por la implementación al pre-tratamiento realizado a la vinaza y pre-acondicionamiento de la microalga, pudiendo metabolizar una mayor cantidad de carbono orgánico a medida que aumentaba el porcentaje de vinaza.

Si bien el consumo de nitrógeno por parte de la microalga es tan importante como el consumo de carbono, el nitrógeno contribuye a la biomasa de la microalga en cerca del 1 al 10% de su peso. Adicionalmente, el metabolismo del nitrógeno está ligado al del carbono en la microalga, debido a que es necesario asimilar tanto el carbono orgánico y como el nitrógeno, para obtener la energía que se genera a través del ciclo TCA (ciclo de Krebs) en la cadena de transporte electrónico en la mitocondria. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

De acuerdo a las mediciones de urea y amonio realizadas en el tiempo, pudo evidenciarse una asimilación de ambos nutrientes por parte de la microalga. Sin embargo, desde un punto de vista bioquímico, la urea no puede ingresar directamente a las células en algunas especies de *Chlorella spp*, para su metabolización, sino que se requiere la previa hidrólisis enzimática a amonio. Eso explica lo que se observa en el anexo 6, donde la concentración de amonio fue muy variable (en un inicio disminuía y después volvió a subir). Lo anterior se debe a que la urea se hidroliza a amonio por las enzimas que secreta la microalga para asimilarla, manteniendo un balance entre la concentración de urea y amonio. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011). En la hidrólisis, la microalga transforma la urea en amonio y bicarbonato antes de que el nitrógeno se incorpore a la célula. Las microalgas generalmente poseen dos enzimas que pueden metabolizar la urea, llamadas ureasa y la urea amidoliasa. Sin embargo, muchas microalgas del género *Chlorella* tienen deficiencia de ureasa y metabolizan la urea por medio de la amidoliasa. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

En la gráfica 6 se observó que entre menor sea la pendiente de la recta, más lento consume el nitrógeno presente en el medio y mantiene el balance carbono-nitrógeno por más tiempo. Lo anterior le permitió a la microalga sostenerse en la fase estacionaria por más días, como se observa en la gráfica 2, donde el tratamiento de vinaza al 30%(v/v) se mantuvo en estado estacionario más tiempo que los tratamientos de 58%(v/v) y 2%(v/v).

En general, el nitrógeno tiene un efecto positivo en el crecimiento celular, y las microalgas son capaces de asimilar una gran variedad de fuentes de nitrógeno como amonio, nitrato y urea. (S.L, ATS Ingeniería, 2013) El nitrógeno es asimilado principalmente para formar aminoácidos, sin embargo, requiere esqueletos carbonados y energía en forma de ATP y NADPH para lograr sintetizar glutamina, glutamato y aspartato. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

Sin embargo, en grafica 8 se observa que la superficie de respuesta para la velocidad de consumo de nitrógeno, tiene un comportamiento complejo o atípico, el cual no es posible explicar a partir de las pruebas realizadas, debido a que en un inicio, tiende a crecer hasta que llega a un 30% (v/v) de vinaza, después se estabiliza en el rango de 30% a 45% de vinaza y una vez supera el 45% decrece.

Lo anterior nos permite inferir que hay otros factores que influyen en ésta velocidad, uno de esos puede ser el balance nitrógeno-fosforo, debido a que la concentración de estos sustratos debería estar en una relación de 8:1 para permitir una rápida asimilación del nitrógeno (S.L, ATS Ingeniería, 2013). Al observar el anexo 8, la vinaza es la mayor fuente de fosforo en el medio de cultivo, por consiguiente a medida que aumenta el porcentaje de vinaza también se altera éste balance y así también se altera la velocidad de consumo.

En la tabla 3, se observa la cantidad de carbono orgánico total de las muestras y controles, donde el valor obtenido fue mayor que en los controles negativos que en las muestras. Este aumento de la cantidad de carbono oxidable total pudo deberse a dos procesos metabólicos que ocurren en las células de las microalga.

El primer proceso corresponde a la respiración celular, la cual se debe realizar en presencia de oxígeno y permite que se generen reacciones oxidativas dentro de la misma microalga (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011) para la metabolización del sustrato. Este proceso de respiración es orientado para el crecimiento celular, consumiendo oxígeno y generando dióxido de carbono. Sin embargo estas velocidades de respiración e ingreso de oxígeno varían del ciclo celular (Lloyd, 1974) jugando dos papeles importantes en la microalga, el primero es que sirve como la fuente exclusiva de energía de mantenimiento y biosíntesis en condiciones heterotróficas y provee de esqueletos carbonados esenciales para el crecimiento del microorganismo. (S.L, ATS Ingeniería, 2013)

El segundo proceso metabólico, corresponde a la generación de bicarbonato cuando ocurre la hidrólisis de la urea por la enzima amidoliaza. (Perez, Escalante,

Bashan, & Basha, 2011). Proceso que sucede antes de que amonio sea ingresado a la célula, por ende el bicarbonato, queda disuelto en el medio de cultivo y no es asimilado por la microalga (condiciones heterotróficas), lo que causa un aumentando significativo la cantidad de carbono oxidable total en los sobrenadantes.

Finalmente, la aparición de lodos hacia el final del cultivo en algunos biorreactores se puede explicar por un exceso de flujo de aire en la aireación. Normalmente los métodos de separación de microalgas vía flotación y floculación, se emplea aireación para mejorar la agregación de células. Sin embargo, a pesar de las variaciones que presentaron, las desviaciones estándar de los valores de biomasa estimados a través del tiempo son mayoritariamente aceptables desde un punto de vista estadístico.

Conclusiones

El esquema de cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* empleando medios formulados con vinazas de caña de azúcar evaluado en este trabajo, demostró un mayor aprovechamiento de este co-producto como alternativa para la producción de biomasa microalgal que el reportado por 30%(v/v) como umbral de crecimiento.

La implementación de un tratamiento químico más exhaustivo a la vinaza previa a la preparación de los medios de cultivos permitió posiblemente disminuir la concentración de compuestos inhibitorios y con ello hacer viable el buen crecimiento celular de la microalga a proporciones mayores de vinaza (58 % de vinaza y 10 % de inóculo)

La microalga pudo aprovechar mucho más los nutrientes disueltos en la vinaza y superar el umbral de crecimiento oscilaba en un 30% (v/v) de vinaza. Así mismo, la mayor productividad biomasa para un cultivo heterotrófico, se encontró que el tratamiento de *Chlorella vulgaris*, corresponde a un 10% de inóculo con un 58% de vinaza.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se deja establecido los peldaños conceptuales de viabilidad técnica para lograr valorizar la vinaza de caña de azúcar proveniente de la industria Levapan S.A a través de la maximización del uso de su potencial nutricional para el cultivo de biomasa microalgal.

Así mismo se demostró que los procesos pre-adaptativos en la microalga son cruciales para mejorar el rendimiento del crecimiento celular, debido a que permite disminuir significativamente el tiempo de latencia que presenta el microorganismo cuando se inócula en un nuevo medio de cultivo.

En el esquema de cultivación también se observó un buen aprovechamiento de la urea como fuente de nitrógeno, como también la compleja interacción de la velocidad de consumo con parámetros operativos como el porcentaje de inóculo y el porcentaje de vinaza.

Recomendaciones

Estos inconvenientes de floculación y sedimentación pudieron deberse a un exceso de aireación presentado por el sistema implementado, aun cuando cada unidad experimental contó con una válvula para regulación. Esta condición de exceso de aireación de hecho es un mecanismo usado para aumentar la floculación natural y posterior sedimentación de algunas microalgas. Por ende, se sugiere prestar atención a este parámetro para próximas evaluaciones cinéticas con esta cepa de *Chlorella vulgaris*.

Adicionalmente, a los lodos extraídos de la vinaza durante el pretratamiento, se sugiere hacer una caracterización, para conocer la composición exacta de ellos e identificar algunos factores posiblemente asociados a inhibición para la microalga.

También se recomienda prestar atención a otros parámetros como, pH, temperatura o aireación y si es posible, para evaluar el efecto que tienen sobre la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Por último, se sugiere hacer más mediciones del carbono oxidable total, para confirmar que la elevación de la cantidad carbono se deba a la formación de bicarbonato.

2.6 Bibliografía

- Andersen. (2005). *Algal Culturing Techniques*. San Diego California: ELSEVIER ACADEMIC.
- Aslan, S., & Kapadan, I. (2006). Batch Kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic waste water by algae. *ecological engenieering*, 5248-5250.
- Azama, M., Mohamed, M., Mohamad, Rosfarizan, Rahim, R., & Arbakariya, A. (2010). *improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, Tetraselmis suecica, using sesponce surface methodology*. Selangor, malaysia: Biochemical engineering journal.
- Balasubramanian, A., & Ponnuraj, K. (2010). «Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure». *Journal of Molecular Biology*, 274-283.
- Castro, R. L., & Parra, R. A. (2011). *Aprobechamiento de vinazas como medio de cultivo para la produccion de Chorella vulgaris UTEX 1803 a escala de laboratorio*. Bucaramanga.
- Chinalia, S. S. (2013). *Growth of Chlorella vulgaris on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment*. New York.
- Cocoa, M., Barricak, V., Lucas, S., González, G., & Garcia, M. (2014). *protein production in Spirulina platensis using beet vinasse-supplement culture media*. Valladolid: IChemE.
- Diaz, R. M, & Diaz, R. P. (2012). *produccion de microalgas chlorella vulgaris UTEX 1803 usando como sustrato gricerol residual a escala de laboratorio*. Bucaramanga.
- García, A., & Rojas, C. (2010). Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de. *tecnicaña*, 3-4.
- Garcia, J., & Higueta, J. (2013). *Evaluacion del crecimiento de la cepa de Chlorella vulgaris en diferentes concentraciones de vinaza*. Manizales, colombia.
- Garcia, L. C. (2012). *The Promises of Chlorella vulgaris as the Best Alternative for Biodiesel: A Review*. Philippines: Journal Of Nature Studies.

- García, R. O. (2009). *Eliminación de los nutrientes para el tratamiento biológico del agua residual, utilizando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en el crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico*. La Paz.
- Gonzalez, C. A. (2010). *mejoramiento de la tasa de producción de biomasa de chlorella vulgaris utilizando ciclos de luz artificial y diferentes fuentes de carbono a escala de laboratorio*. Bucaramanga.
- Irisarri, D. (2005). usos industriales y agrícolas de la vinaza de la caña de azúcar. *Técnicaña*, 20-25.
- Ley, B. M. (2003). *Chlorella: The Ultimate Green Food : Nature's Richest Source of Chlorophyll*. Detroit, USA: BL publications.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). *biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. Illinois.
- Lloyd, D. (1974). Dark respiration. In: Stewart. *Algal Physiology and Biochemistry*, 505-529.
- Ocampo CB; Ferro C; Cadena H; Marín D; Lozano L; Ramírez CA; Munstermann L. . (2013). *jerajeraejjsdfjao. acta tropica*, 27- 30.
- Olarte Gómez, E. A., & Valencia Giraldo, M. J. (2016). *EVALUACIÓN DEL USO DE LA MICROALGA Chlorella vulgaris EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES (VINAZAS)*. Bogotá.
- Perez, O., Escalante, F., Bashan, L., & Basha, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Elsevier*, 11-35.
- Probir, D., Mahmoud Ibrahim, T., Mohammed, A. Q., Mohd, A. H., Hareb, M., Al-Jabri, . . . Alghasal. (2016). *Microalgae harvesting by pH adjusted coagulation-flocculation, recycling of the coagulant and the growth media*. Doha, Qatar: Bioresource Technology.
- Qian, L., Wenguan, Z., Min, & Min. (2015). *growing chorella sp. on meat processing wastewater for nutrient removal and biomass production*. minesota: Elsevier .
- Ratanaporn, L. S. (2011). *Heterotrophic Growth of Chlorella sp. KKU-S2 for Lipid Production*. Khon Kaen: International Conference on Food Engineering and Biotechnology.

- S.L, ATS Ingenieria. (2013). Aplicacion de las microalgas: estado de la tecnica. ATS Ingenieria S.L.
- Safi, C., Zeibib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca, C. (2014). *Morphology, composition, production, processing and applications of Chorella vulgaris: A review*. Toulouse, France: ELSEVIER.
- Scull, I. S. (2012). Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal Of Agricultural Science*. 385-389.
- Tijani, H., Abdullah, N., & Yuzir, A. (2015). *integration of microalgae biomass in biomethanation systems*. Johor Bahru, Malaysia: elseiver ltd.
- W. R. Butler, J. J. (1996). *Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle*. new york.
- Wenguang, Z., Yecong, L., Min, M., Bing, H., Hong, Z., Xiaochen, M., . . . Roger, R. (2012). *Growing wastewater-born microalga Auxenochlorella protothecoides UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production*. Saint Poul: Applied Energy.
- Zimmer, M. (1 de Abril de 2000). «Molecular Mechanics Evaluation of the Proposed Mechanisms for the Degradation of Urea by Urease». *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 17, 787-797.
- Blanco, L. T., & Tacon, A. G. (05 de 02 de 2009). *LA PRODUCCION DE ALIMENTO VIVO Y SU IMPORTANCIA EN ACUACULTURA*. [online] Available at: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm> [Accessed 9 Dec. 2016].
- Susana Mirían Perdigón Martín, D. R. (2000). *La vinaza de jugos de caña energética y su aplicación en los suelos cañeros*.
- Solera, I. M. (1985). *LAS VINAZAS EN LA FERTILIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR*.
- Irisarri D. (2005). Usos industriales y agrícolas de la vinaza de caña de azucar. *Revista Tecnicaña*. 17(9):20-25.
- Scull, I., Savón, L., Gutiérrez, O., Valiño, E., Orta, I., Mora, P. O., & Noda, A. (2012). Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal Of Agricultural Science*, 46(4), 385-389.

ANEXO 1- Pretratamiento de para vinazas concentrada

	FACULTAD DE INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUIMICA	
	Tratamiento de reducción de lodos insolubles para una matriz de vinaza.	
Responsable: Juan David Jimenez Tafur Estudiante de Química Farmacéutica	Director: Dr. Nelson Caicedo Jefe de Departamento de Ingeniería Bioquímica	Elaborado: 02/01/2017
		Página: 1 de 1

1. PROPÓSITO

Se propone disminuir la cantidad de lodos insolubles presentes en las vinazas, para el mejoramiento de la estabilidad de la matriz de vinaza.

2. ALCANCE Y LIMITACIONES

A pesar que la separación de los lodos en la vinaza se puede hacer con facilidad, aún la vinaza presenta un otros solidos insolubles que interfieren los ensayos del seguimiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* y se busca la reducción de esos lodos.

3. GENERALIDADES

3.1. Definición

Las vinazas son subproductos resultantes de la transformación de melazas o mieles de caña de azúcar en procesos para la obtención de etanol o levaduras de panadería. Esencialmente corresponden a los mostos residuales de los procesos fermentativos o resultantes de las etapas de destilación.

A pesar de que son consideradas un desecho, la composición química de la vinaza es bastante rica, estando compuesta particularmente por Nitrógeno (N₂), fósforo (P₂O₅), potasio (K₂O) y carbono orgánico (C). (Martín, 2000), sin embargo, su composición exacta depende de la materia prima utilizada en los procesos previos, que pueden ser: melaza de caña concentrada, del jugo de los molinos (mieles) o de mezcla de jugo y melaza (Solera, 1985).

Adicionalmente, las vinazas tambien estan compuestas por gran parte de agua y de solidos solubles e insolubles, siendo los solidos insolubles sulfatos de calcio, sulfatos de potacio y otras sales (dependiendo del vegetal de partida); En cuanto a

los solidos solubles, son de tipo organico en un porcentaje elevado. (Irisarri D. , 2005)

Tradicionalmente las vinazas han encontrado nichos de aplicación en el sector agrícola luego de ser sometidas a procesos de compostaje (Irisarri D. , 2005) debido a que es una una matriz que contiene carbono organico oxidable, nitrogeno, fosforo, macronutrientes y micronutrientes, que pueden ser usadas como sustrato. Sin embargo, estas alternativas de manejo cuentan con desventajas como: requerimiento de grandes extensiones de tierra para el caso del compostaje y costos energéticos asociados a las etapas de secado (Irisarri, 2005) y en especial una baja capacidad de cubrimiento del total de vinaza producida.

4. PROCEDIMIENTO

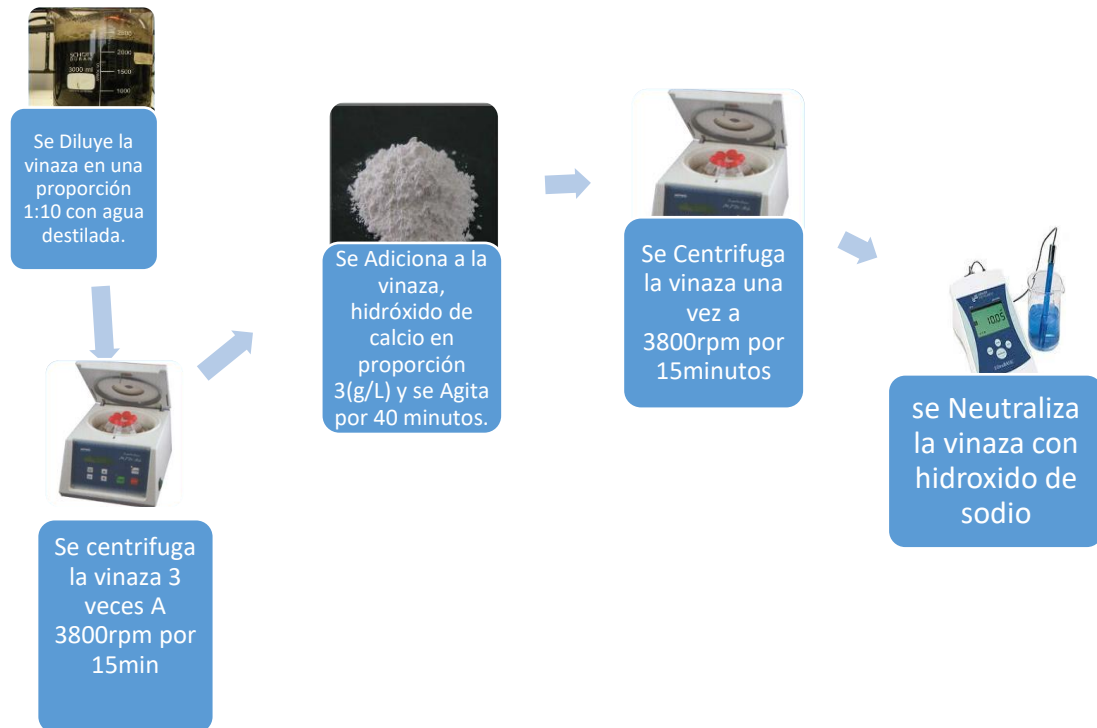
MUESTRA

Vinaza diluida 1:10 con agua destilada Tipo 1.

MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

- ✓ Falcón estériles de 10 mL y 50 mL
- ✓ 2 Probetas de 100mL
- ✓ Agua tipo I estéril
- ✓ Vinaza pura (Anexo 8)
- ✓ Centrifuga
- ✓ Hidróxido de calcio.

METODOLOGIA



5. RECOMENDACIONES

- Cuando se adiciona el hidróxido de calcio se debe agitar muy bien hasta solubilizarlo y usar una espátula para re suspender los grumos que se forman en el fondo del recipiente de agitación.
- Se debe usar soluciones de hidróxido de sodio de alta molaridad, debido a que la vinaza se “bufferiza” después de la adición del hidróxido de calcio.


Bibliografía

García, A., & Rojas, C. (2010). Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de. *tecnicaña*, 3-4.

Irisarri, D. (2005). usos industriales y agricolas de la vinaza de la caña de azucar. *Tecnicaña*, 20-25.

Scull, I. S. (2012). Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal Of Agricultural Science*. 385-389.

Anexo 2 - Protocolo medición de Urea

	FACULTAD DE INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUIMICA	
	Medición de la concentración de Urea en una muestra de vinaza	
Responsable: Juan David Jimenez Tafur Estudiante de Química Farmacéutica	Director: Dr. Nelson Caicedo Jefe de Departamento de Ingeniería Bioquímica	Elaborado: 02/01/2017
		Página: 1 de 5

6. PROPÓSITO

Con la separación de los sobrenadantes de vinaza procedentes de los medios de cultivo de *Chlorella vulgaris*, se propone determinar la concentración de urea de las muestras, y calcular la velocidad de consumo.

7. ALCANCE Y LIMITACIONES

A pesar que la separación de los sobrenadantes se puede hacer con facilidad, la manipulación del kit enzimático se debe hacer con el mayor cuidado, para garantizar que la dilución de los sobrenadantes esté correcta (en los límites del método). Adicionalmente, por el color que posee la matriz de vinaza se hace necesario realizar un blanco adicional.

8. GENERALIDADES

8.1. Definición

De acuerdo los resultados de las mediciones de urea y amonio en el tiempo pudieron evidenciarse una asimilación de ambos nutrientes por parte de la microalga. Sin embargo, desde un punto de vista bioquímico, la urea no puede ingresar directamente a las células en algunas especies de *Chlorella spp*, para su metabolización, sino que se requiere la previa hidrólisis enzimática a amonio. Eso explica lo que se observa en el anexo 6, donde la concentración amonio fue muy variable (en un inicio disminuía y después volvió a subir). Lo anterior se debe a que la urea se hidroliza a amonio por las enzimas que secreta de la microalga para asimilarla, manteniendo un balance entre la concentración de urea y amonio. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

En la hidrólisis, la microalga transforma la urea en amonio y bicarbonato antes de que el nitrógeno se incorpore a la célula. Las microalgas generalmente poseen dos

enzimas que pueden metabolizar la urea, llamadas ureasa y la urea amidoliasa. Sin embargo, muchas microalgas del genero *Chlorella* tienen deficiencia de ureasa y metabolizan la urea por medio de la amidoliasa. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

La ruta catabólica de la enzima amidoliasa, depende de la alofanatoliasa, que cataliza la hidrólisis del alofanato, resultando la hidrólisis de la urea a amonio y bicarbonato. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

En general, el nitrógeno tiene un efecto positivo en el crecimiento celular, y las microalgas son capaces de asimilar una gran variedad de fuentes de nitrógeno como amonio, nitrato y urea. (S.L, ATS Ingeniería, 2013) El nitrógeno es asimilado principalmente para formar aminoácidos, sin embargo requiere esqueletos carbonados y energía en forma de ATP y NADPH para lograr sintetizar glutamina, glutamato y aspartato. (Perez, Escalante, Bashan, & Basha, 2011)

9. MUESTRA

Sobrenadantes de vinaza (separada por centrifugación a 5000 rpm por 10min).

10. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

- ✓ Falcón estériles de 10 mL y 50 mL
- ✓ Micropipetas de 10- 100 microlitros y 100- 1000 microlitros (previamente calibradas)
- ✓ Puntas estériles de micropipeta
- ✓ Agua tipo I estéril
- ✓ Sobrenadantes Vinaza
- ✓ 1 kit urea/amonio megazyme
- ✓ 1 caja de cubetas plásticas
- ✓ 1 espectrofotómetro a 340nm
- ✓ 1 mezclador vortex
- ✓ 1 cronometro

11. REACTIVOS Y PREPARACIÓN

6.1. Preparación de la solución matriz para cuantificación del analito:

a. Vinaza: Esta fue diluida en una relación de 1:10 (factor que depende de la concentración de urea en la muestra).

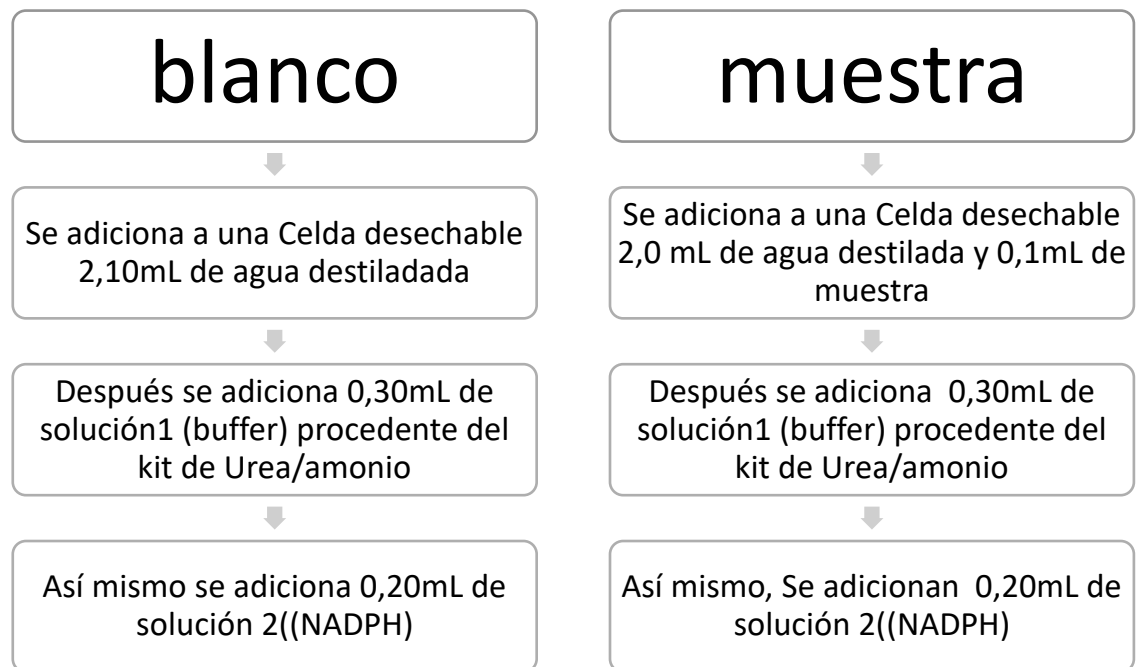
12. PROCEDIMIENTO

- **Pretratamiento de la muestra**

1. Se Toma la muestra de los sobrenadantes de vinaza y se realiza una dilución 1:10.
2. Con las muestras ya diluidas, se prepara un blanco para corregir la interferencia del color de la matriz para esto se adicionará 2,5mL de agua destilada y 0,1 mL de la muestra, se medirá la absorbancia obtenida.

Nota: El valor de ésta absorbancia se le restará a cada medición que se realice en el proceso experimental.

➤ METODOLOGIA



1. Ahora bien, se agitan las celdas y se lee las absorbancias de las soluciones a 340nm (los valores obtenidos corresponderán a A1)
2. Después de 2 minutos, se adicionan 0,02mL de la suspensión 3(GIDH) a la celda blanco y a la muestra.
3. Se Mezclan muy bien y se lee las absorbancias de las soluciones a 340nm (los valores obtenidos corresponderán a A2)
4. Después de 5 minutos, se adiciona a las soluciones 0,05mL de solución 4 (ureasa)

5. Se Mezclan muy bien y después de 5 minutos se lee las absorbancia de las soluciones a 340nm (los valores obtenidos corresponderán a A3)

Opcional

Blanco de color

1. Se realizará un blanco adicional el cual no tendrá la suspensión 3 (GIDH), realizándose el mismo tratamiento midiendo absorbancia a 340nm
2. Se adicionará los 0,05mL de la solución 4 (ureasa) y también se medirá la absorbancia a 340nm

13. CALCULOS

Muestra de cálculo

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

V= volumen final (mL)

MW= peso molecular de la sustancia ensayada (g/mol)

ϵ = coeficiente de extinción molar

d= el camino de la luz (cm)

v = volumen de la muestra

Para el amonio

$$C = \frac{2.64 \times 17,03}{6300 \times 1.0 \times 0.10} \times \Delta A_{amonio}$$

$$C = 0,07082 \times \Delta A_{amonio}$$

$$\Delta A_{amonio} = A2 - A1$$

$$\text{contenido de amnio} = \frac{C_{amonio}}{\text{peso muestra} \left(\frac{g}{L} \text{solucion} \right)} \times 100$$

Para la urea

$$C = \frac{2.67 \times 60.06}{6300 \times 1.0 \times 2} \times \Delta A \text{ urea}$$

$$C = 0,1273 \times \Delta A \text{ urea}$$

$$\Delta A_{urea} = A_3 - A_2$$

$$\text{contenido de urea} = \frac{C \text{ urea}}{\text{peso muestra} \left(\frac{g}{L} \text{ solución} \right)} \times 100$$

14. RESULTADOS

- ✓ Se debe informar los resultados como cantidad de amonio y urea presente en la muestra y cite la base utilizada en los cálculos.

15. RECOMENDACIONES

- Precisión y desviación: Un error inherente en la determinación de la urea en la muestra puede implicar que hubo una mala manipulación del kit. Por eso se debe realizar con especial cuidado y se debe homogenizar muy bien la muestra antes de cualquier medición adicionalmente usar siempre una misma pipeta para disminuir las fuentes de error.
- Control de Calidad: si los resultados del estándar tienen un error de más del 5% implica: error en la manipulación del kit, degradación o pérdida de estabilidad del kit, debido a lo anterior se debe hacer una preparación correcta de un estándar para evaluar la condición de estabilidad del Kit enzimático, antes de su uso.

Bibliografía

- Balasubramanian, A., & Ponnuraj, K. (2010). «Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure». *Journal of Molecular Biology*, 274-283.
- García, A., & Rojas, C. (2010). Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de. *tecnicaña*, 3-4.
- Irisarri, D. (2005). usos industriales y agrícolas de la vinaza de la caña de azúcar. *Tecnicaña*, 20-25.
- Scull, I. S. (2012). Physic-chemical composition of concentrated vinasse for their assessment in animal diets. *Cuban Journal Of Agricultural Science*. 385-389.

Anexo 3- Composición de la formulación de los diferentes tipos de tratamientos

Tabla 1- Formulación cuali-cuantitativa vinaza 2 %

Contenido	Porcentaje	volumen (mL)
Macronutrientes	2%	5
Micronutrientes	2%	5
Tween-80 al 0.002%	2%	5
Antibacterial	0.10%	0.25
Antibiótico	0.10%	0.25
Vinaza	2%	5
Agua	c.s.p	229.5

Tabla 2- Formulación cuali-cuantitativa vinaza 10%

Contenido	Porcentaje	Volumen (mL)
Macronutrientes	2%	5
Micronutrientes	2%	5
Tween-80 al 0.002%	2%	5
Antibacterial	0.10%	0.25
Antibiótico	0.10%	0.25
Vinaza	10%	25
Agua	c.s.p	209.50

Tabla 3- Formulación cuali-cuantitativa vinaza 30 %

Contenido	Porcentaje	volumen (mL)
Macronutrientes	2%	5
Micronutrientes	2%	5
Tween-80 al 0.002%	2%	5
Antibacterial	0.10%	0.25
Antibiótico	0.10%	0.25
Vinaza	30%	75
Agua	c.s.p	159.50


Tabla 4- Formulación cuali-cuantitativa vinaza 50%

Contenido	Porcentaje	volumen (mL)
Macronutrientes	2%	5
Micronutrientes	2%	5
Tween-80 al 0.002%	2%	5
Antibacterial	0.10%	0.25
Antibiótico	0.10%	0.25
Vinaza	50%	125
Agua	c.s.p	109.50

Tabla 5- Formulación cuali-cuantitativa vinaza 58%

Contenido	Porcentaje	volumen (mL)
Macronutrientes	2%	5
Micronutrientes	2%	5
Tween-80 al 0.002%	2%	5
Antibacterial	0.10%	0.25
Antibiótico	0.10%	0.25
Vinaza	58%	145
Agua	c.s.p	89.50

Anexo 4 Curva de calibración de la absorbancia de *Chlorella vulgaris* en una matriz de vinaza.

	FACULTAD DE INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUIMICA	
	Protocolo de la curva de calibración de la absorbancia de <i>Chlorella vulgaris</i> en una matriz de vinaza.	
Responsable: Juan David Jimenez Tafur Estudiante de Química Farmacéutica	Director: Dr. Nelson Caicedo Jefe de Departamento de Ingeniería Bioquímica	Elaborado: 02/01/2017
		Página: 1 de 5

PROPÓSITO

Con el fin de estandarizar el método de medición de las células de *Chlorella vulgaris*, se realizara una curva de calibración de peso seco de esta microalga en una matriz de vinaza.

ALCANCE Y LIMITACIONES

La medición de la biomasa implementando un método espectrofotométrico es fácil, sin embargo cuando se utilizan matrices coloridas, aumenta el error en las mediciones esa por la interferencia de color, la vinaza es una matriz muy colorida por ende, a medida que se aumenta el porcentaje de vinaza también lo hacen las interferencias.

GENERALIDADES

Definición

Chlorella vulgaris es una microalga que pertenece al phylum *Chlorophyta*, familia *Chlorellaceae*. Se caracteriza por que sus células son circulares, su tamaño oscila entre 2 y 10 micras y sus cloroplastos presentan como pigmentos fotosintéticos principales clorofila *a* y *b*, los cuales tienen un pico de absorción máximo alrededor de 430nm y de 675nm. (Ley, 2003) (Gonzalez, 2010)

Un rasgo importante de *Chlorella vulgaris* es que puede ser cultivada fácilmente bajo condiciones *in vitro*, planteándose varias aplicaciones para su cultivo a un nivel

industrial. Además, puede ser usada como ingrediente en alimentos, debido a que presenta un alto contenido de proteínas (45-60%), grasas (20%), carbohidratos (20%), minerales, sales y vitaminas (15%). Adicionalmente, esta microalga, es particularmente rica en calcio, magnesio y hierro teniendo un alto contenido de clorofila, carotenoides y diferentes vitaminas (B1, B2, B6, B12, C y E). (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014)

Chorella vulgaris ha sido ampliamente cultivada desde mitad del siglo XX hasta la actualidad y su biomasa ha sido utilizada para extraer β -carotenos, axantinas y ácido docosahexaenóico (DHA, ácido graso). Todos estos compuestos son de alto valor agregado en distintos sectores económicos como la industria alimentaria y farmacéutica. (Safi, Zeibib, Merah, Pontalier, & Vaca, 2014)

Por otra parte, Las vinazas son subproductos resultantes de la transformación de melazas o mieles de caña de azúcar en procesos para la obtención de etanol o levaduras de panadería. Esencialmente corresponden a los mostos residuales de los procesos fermentativos o resultantes de las etapas de destilación.

A pesar de que son consideradas un desecho, la composición química de la vinaza es bastante rica, estando compuesta particularmente por Nitrógeno (N_2), fósforo (P_2O_5), potasio (K_2O) y carbono orgánico (C). (Martín, 2000), sin embargo, su composición exacta depende de la materia prima utilizada en los procesos previos, que pueden ser: melaza de caña concentrada, del jugo de los molinos (mieles) o de mezcla de jugo y melaza (Solera, 1985).

Adicionalmente, las vinazas también están compuestas por gran parte de agua y de sólidos solubles e insolubles, siendo los sólidos insolubles sulfatos de calcio, sulfatos de potasio y otras sales (dependiendo del vegetal de partida); En cuanto a los sólidos solubles, son de tipo orgánico en un porcentaje elevado. (Irisarri D. , 2005)

MUESTRA

Vinaza diluida 1:10, preparada con agua destilada tipo 1.
Biomasa de *Chlorella vulgaris*.

MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

- ✓ Falcón estériles de 10 mL y 50 mL
- ✓ Micropipetas de 10- 100 microlitros y 100- 1000 microlitros (previamente calibradas)
- ✓ Puntas estériles de micropipeta
- ✓ Agua tipo I estéril
- ✓ Sobrenadantes Vinaza

- ✓ 1 caja de cubetas plásticas
- ✓ 1 espectrofotómetro a 683nm
- ✓ Filtro de membrana de 0.22 micras.
- ✓ 1 mezclador vortex

REACTIVOS Y PREPARACIÓN

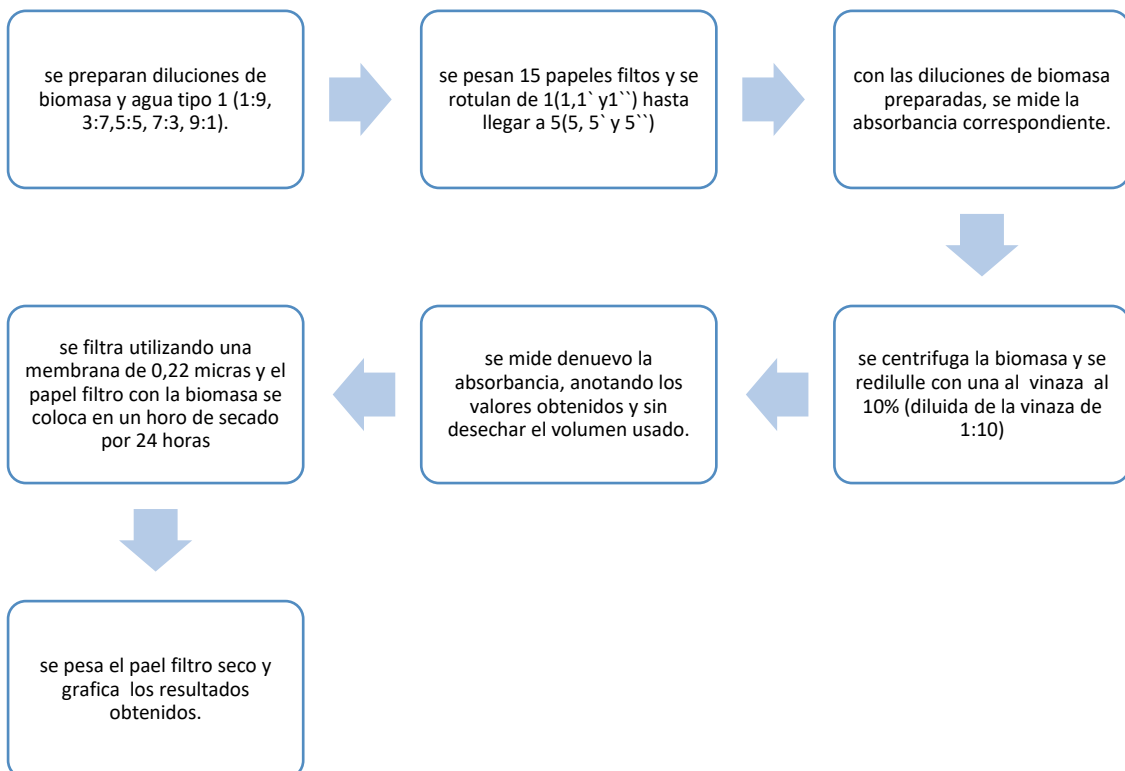
Preparación de la solución matriz para cuantificación del analito:

- a. **Vinaza:** Esta fue diluida en una relación de 1:10 (factor que depende de la concentración de urea en la muestra).
- b. **Biomasa de *Chlorella vulgaris*:** esta fue tomada del stock de biomasa del semillero EBB y fue centrifugada a 3500rpm por 15 minutos, seguido fue resuspendida en solución salina estéril al 0.9%(v/v)

PROCEDIMIENTO

➤ Pretratamiento de la muestra

3. Se Toma la muestra de los sobrenadantes de vinaza y se realiza una dilución 1:10.



16. RESULTADOS

- ✓ Se obtiene la ecuación de la recta para la vinaza trabajada.

17. RECOMENDACIONES

- Precisión y desviación: Un error preparación de las diluciones causaría errores en el valor de la pendiente de la curva de calibración. Por eso se debe realizar con especial cuidado y se debe homogenizar muy bien la muestra antes de cualquier medición adicionalmente usar siempre una misma pipeta para disminuir las fuentes de error.
- Agitar antes de hacer las mediciones espectrofotométricas, debido a que la biomasa suele sedimentarse muy rápido, causando variaciones en la concentración

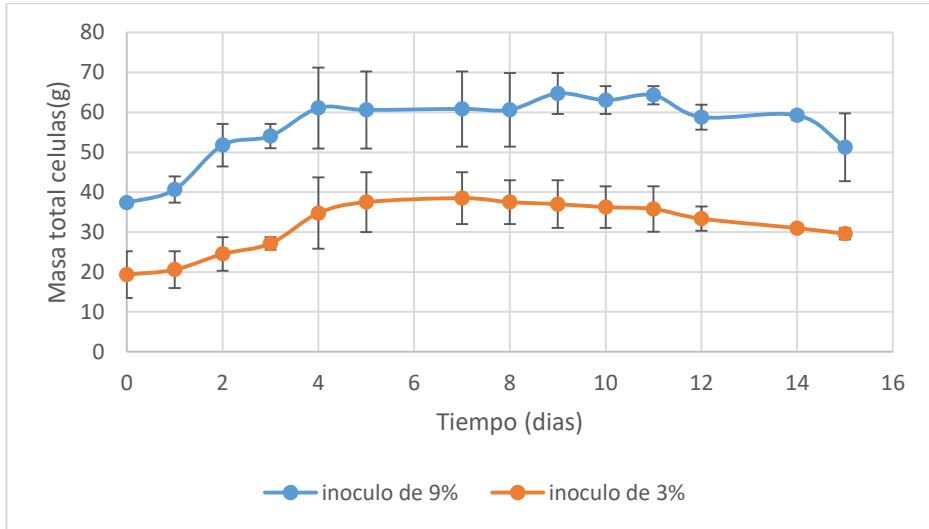
Bibliografía

- Andersen. (2005). *Algal Culturing Techniques*. San Diego California: ELSEVIER ACADEMIC.
- Azama, M., Mohamed, M., Mohamad, Rosfarizan, Rahim, R., & Arbakariya, A. (2010). *improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, Tetraselmis suecica, using sesponce surface methodology*. Selangor, malaysia: Biochemical engineering journal.
- Chinalia, S. S. (2013). *Growth of Chlorella vulgaris on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment*. New York.
- Cocoa, M., Barricak, V., Lucas, S., González, G., & Garcia, M. (2014). *protein production in Spirulina platensis using beet vinasse-supplement culture media*. Valladolid: IChemE.
- Diaz, R. M., & Diaz, R. P. (2012). *produccion de microalgas chlorella vulgaris UTEX 1803 usando como sustrato gricerol residual a escala de laboratorio*. Bucaramanga.
- García, A., & Rojas, C. (2010). Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de. *tecnicaña*, 3-4.
- Garcia, J., & Higueta, J. (2013). *Evaluacion del crecimiento de la cepa de Chlorella vulgaris en diferentes concentraciones de vinaza*. Manizales, colombia.
- Garcia, L. C. (2012). *The Promises of Chlorella vulgaris as the Best Alternative for Biodiesel: A Review*. Philipinas: Journal Of Nature Studies.

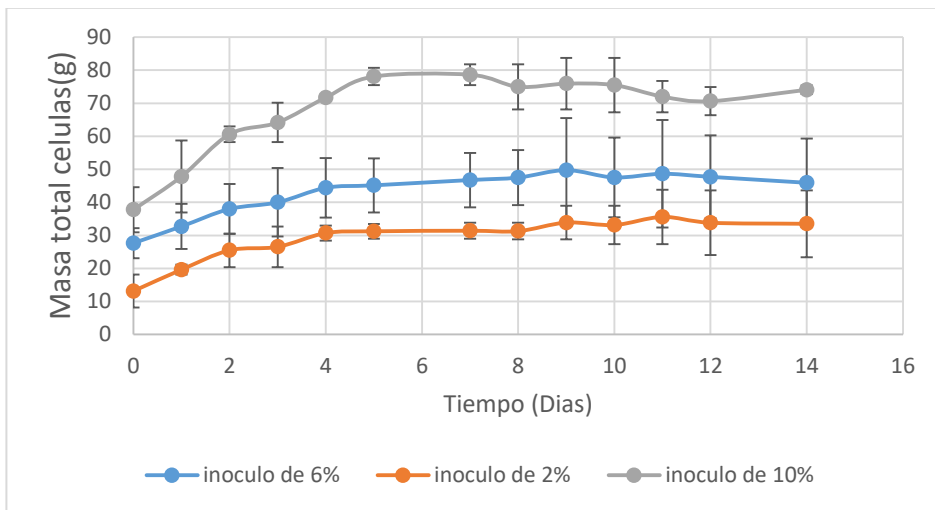
- García, R. O. (2009). *Eliminación de los nutrientes para el tratamiento biológico del agua residual, utilizando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en el crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico*. La Paz.
- Gonzalez, C. A. (2010). *mejoramiento de la tasa de producción de biomasa de chlorella vulgaris utilizando ciclos de luz artificial y diferentes fuentes de carbono a escala de laboratorio*. Bucaramanga.
- Irisarri, D. (2005). usos industriales y agrícolas de la vinaza de la caña de azúcar. *Técnicaña*, 20-25.

Anexo 5- Graficas del crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en vinazas.

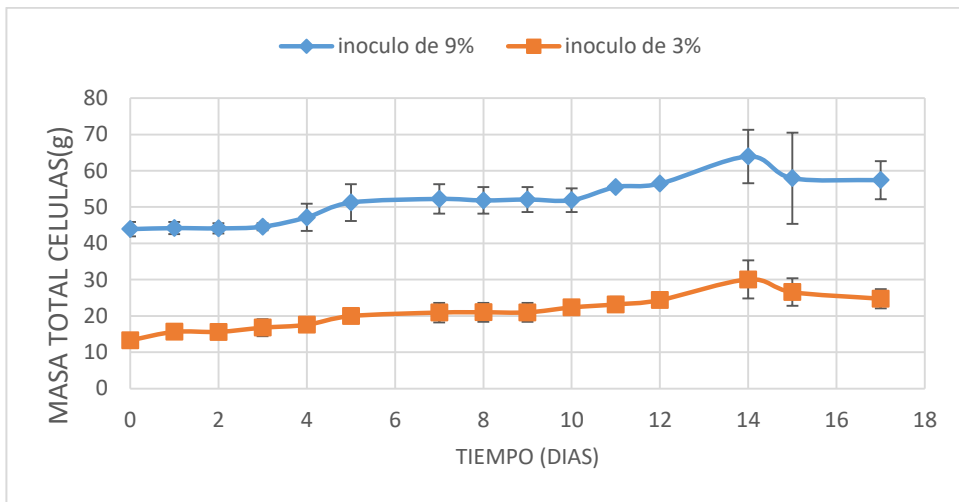
A continuación se muestran las gráficas de la masa celular de la microalga *Chlorella vulgaris* en el tiempo



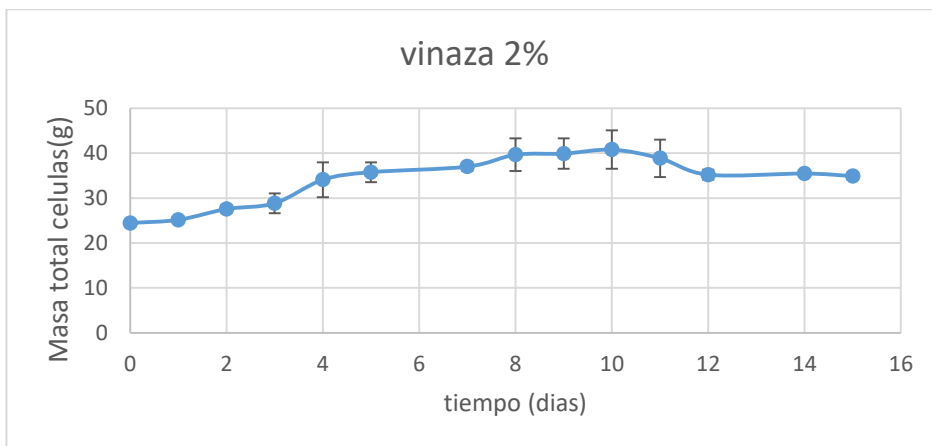
Gráfica 1 - Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en una matriz con vinaza al 50%



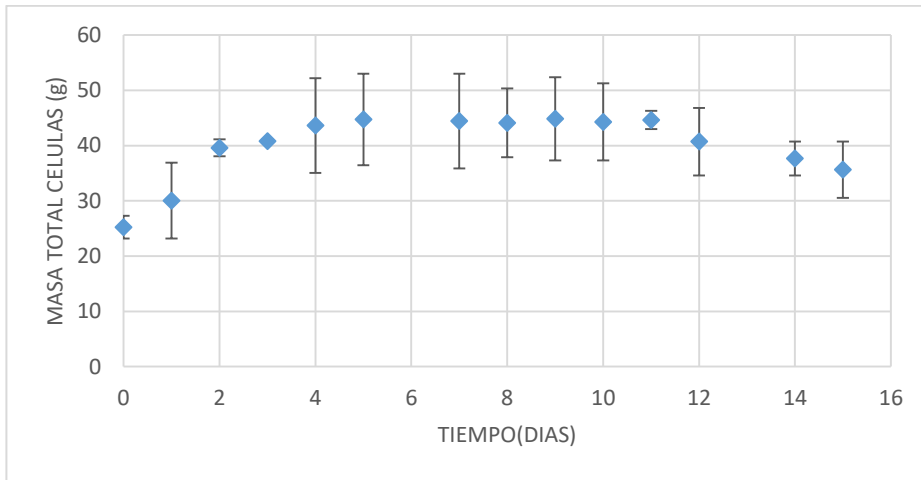
Gráfica 2 - Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en una matriz con vinaza al 30%



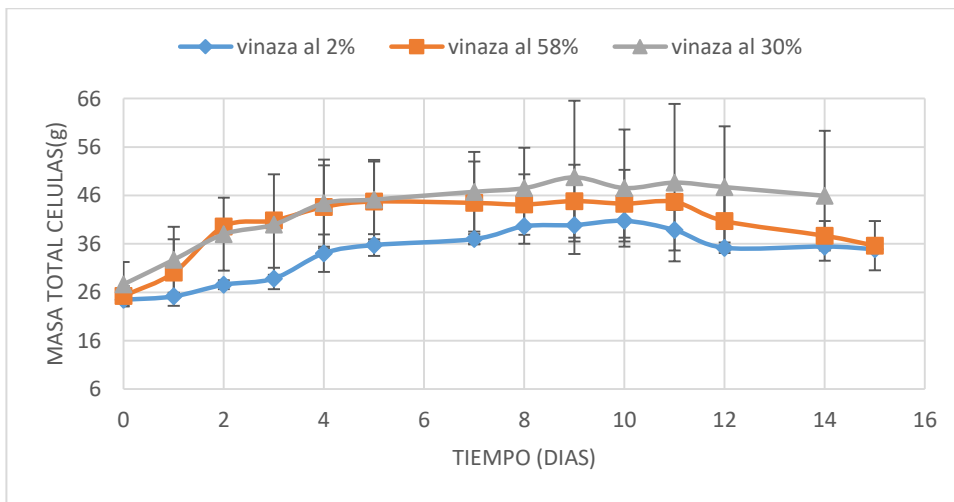
Gráfica 3 - Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en una matriz con vinaza al 10%



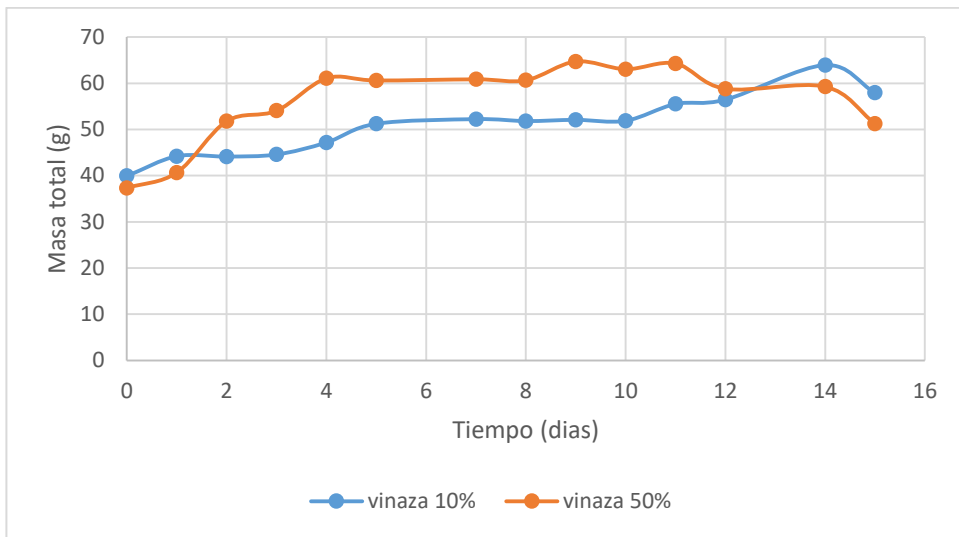
Gráfica 4 - Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en una matriz con vinaza al 2%



Gráfica 5 - Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en una matriz con vinaza al 58%



Gráfica 6– Efecto del porcentaje de vinaza en el crecimiento *Chlorella vulgaris* en una matriz de inoculo al 6%.



Gráfica 7 – Efecto del porcentaje de vinaza en el crecimiento *Chlorella vulgaris* en una matriz de inoculo al 9%.

Anexo 6- Evaluación del consumo de nitrógeno en los sobrenadantes de los 28 tratamientos.

Tabla 1- Seguimiento de la cantidad de urea, amonio y nitrógeno en los primeros 14 ensayos

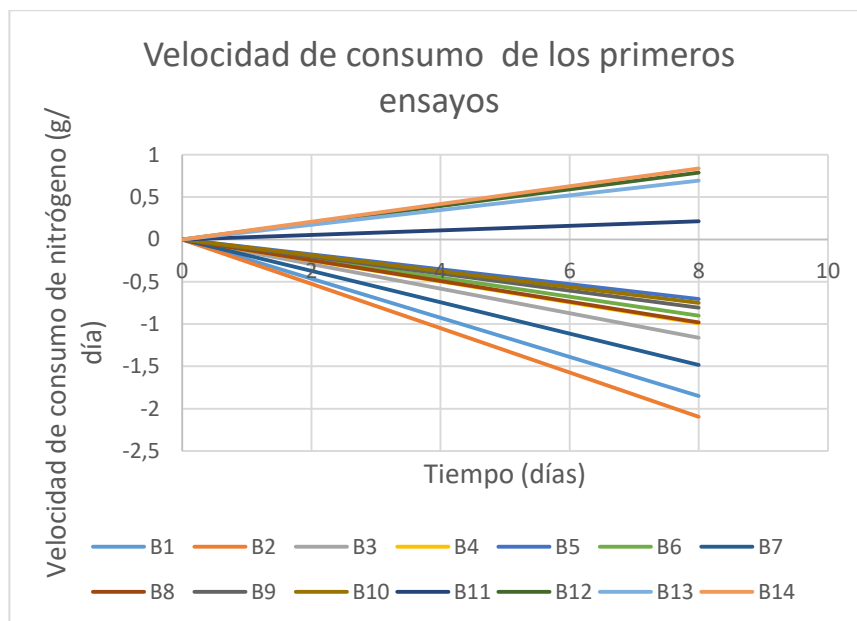
BIOREACTOR	seguimiento UREA día (g/L)			seguimiento AMONIO día (g/L)			seguimiento Nitrógeno total (g/L)		
	Día 0	Día 8	Día 10	Día 0	Día 8	Día 10	Día 0	Día 8	Día 10
B1	0.2775	0.0000	0.0000	0.0517	0.0340	0.0000	0.1720	0.0280	0.0000
B2	0.2775	0.0000	0.0000	0.0517	0.0262	0.1480	0.1720	0.0216	0.1217
B3	0.4850	0.2877	0.0000	0.5326	0.0963	0.2195	0.6642	0.2134	0.1806
B4	0.4850	0.1388	0.0000	0.5326	0.2295	0.2889	0.6642	0.2534	0.2376
B5	0.3603	0.1222	0.0000	0.1686	0.1197	0.2089	0.3067	0.1554	0.1718
B6	0.3603	0.2393	0.0000	0.1686	0.0191	0.1686	0.3067	0.1274	0.1386
B7	0.3603	0.1528	0.0000	0.1686	0.0000	0.2125	0.3067	0.0713	0.1747
B8	0.3603	0.0000	0.0000	0.1686	0.1431	0.0000	0.3067	0.1177	0.0000
B9	0.3603	0.2788	0.0000	0.1686	0.0113	0.0899	0.3067	0.1394	0.0740
B10	0.2444	0.1250	0.0000	0.0078	0.0000	0.0000	0.1204	0.0583	0.0000
B11	0.5869	0.0000	0.0000	0.2918	0.7854	0.0956	0.5137	0.6460	0.0786
B12	0.3603	0.2330	0.0000	0.1686	0.7032	0.2627	0.3067	0.6871	0.2161
B13	0.3603	0.2482	0.0000	0.1686	0.6246	0.1246	0.3067	0.6295	0.1025
B14	0.3603	0.3361	0.0000	0.1686	0.6898	0.1983	0.3067	0.7241	0.1631

En la tabla- 1 se observa el seguimiento de la concentración de urea, amonio y nitrógeno en los días 0, 8 y 10. El termino B seguido por el numero hace referencia a la rotulación de los biorreactores

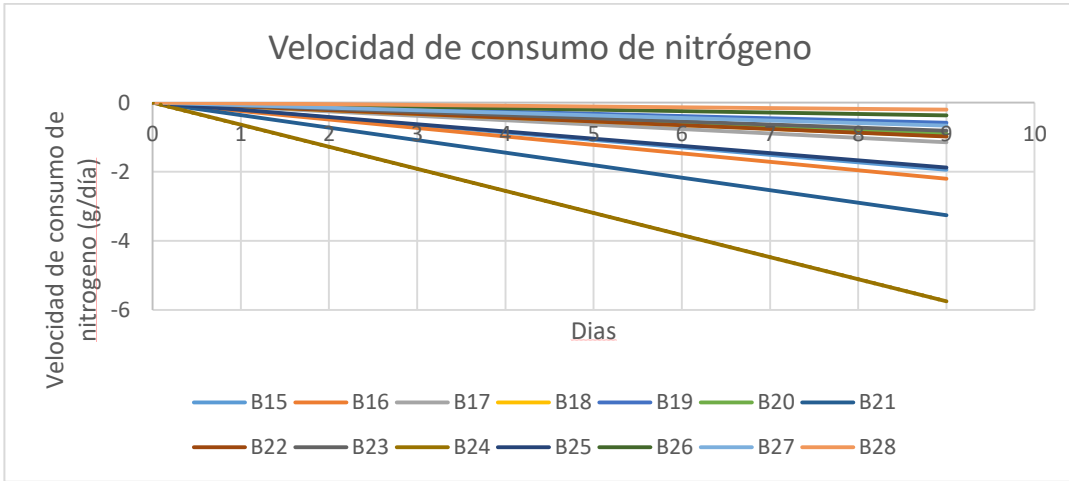
Tabla 2- seguimiento de la cantidad de Urea, Amonio y nitrógeno en los segundos 14 ensayos

BIOREACTOR	seguimiento UREA día g/l			seguimiento AMONIO día (g/L)			seguimiento Nitrógeno total (g/L)		
	Día 0	Día 9	Día 12	Día 0	Día 9	Día 12	Día 0	Día 9	Día 12
B15	0.3666	0.0000		0.0234	0.0340		0.1902	0.0280	0.0000
B16	0.3666	0.0000	0.0000	0.0234	0.0262	0.0000	0.1902	0.0216	0.0000
B17	0.4886	0.2877	0.0000	0.5221	0.0963	0.0779	0.6573	0.2134	0.0641
B18	0.4886	0.2279	0.0000	0.5221	0.1799	0.2889	0.6573	0.2542	0.2376
B19	0.3603	0.3768	0.0000	0.1686	0.0000	0.2089	0.3067	0.1758	0.1718
B20	0.3603	0.2393	0.0000	0.1686	0.0191	0.0269	0.3067	0.1274	0.0221
B21	0.3603	0.0255	0.0000	0.1686	0.0000	0.2125	0.3067	0.0119	0.1747
B22	0.3603	0.0000	0.0000	0.1686	0.1431	0.0000	0.3067	0.1177	0.0000
B23	0.3603	0.2788	0.0000	0.1686	0.0113	0.0899	0.3067	0.1394	0.0740
B24	0.3844	0.0013	0.0000	0.0000	0.0000	0.0404	0.1793	0.0006	0.0332
B25	0.3704	0.0000	0.0000	0.2847	0.0772	0.2372	0.4069	0.0635	0.1951
B26	0.3603	0.2368	0.0000	0.1686	0.1346	0.1919	0.3067	0.2211	0.1579
B27	0.3603	0.0955	0.0000	0.1686	0.1431	0.1246	0.3067	0.1622	0.1025
B28	0.3603	0.0815	0.0000	0.1686	0.2649	0.2691	0.3067	0.2558	0.2213

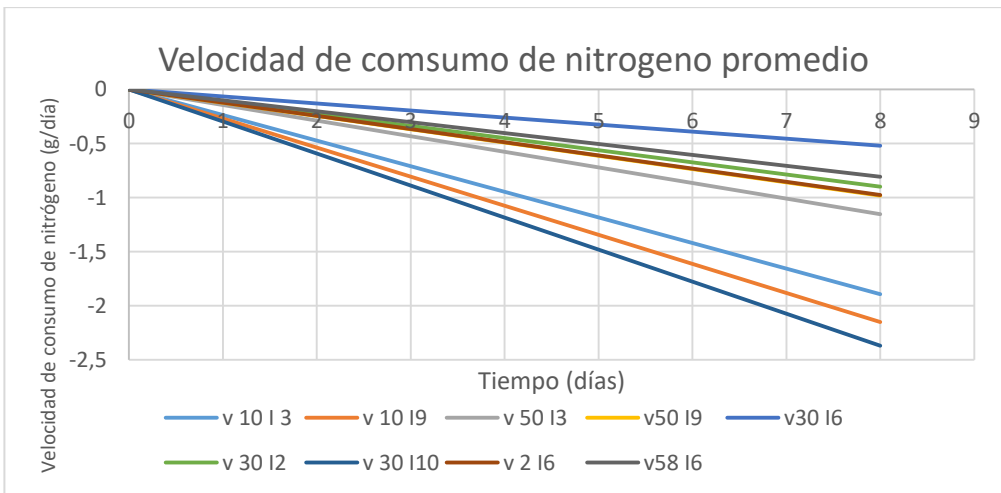
En la tabla- 2 se observa el seguimiento de la concentración de urea, amonio y nitrógeno en los días 0, 9 y 12. El termino B seguido por el numero hace referencia a la rotulación de los biorreactores



Gráfica 1-Velocidad de consumo de nitrógeno para los biorreactores del 15 al 28 del *Chlorella vulgaris* en una matriz de vinaza. El termino **B** seguido por el numero hacen referencia a los biorreactores correspondientes.



Gráfica 2- Velocidad de consumo de nitrógeno para los biorreactores del 1 al 14 del *Chlorella vulgaris* en una matriz de vinaza.



Gráfica 3- Velocidad de consumo de nitrógeno promedio por *Chlorella vulgaris* en una matriz de vinaza. Donde la letra “v” hace referencia al porcentaje (v/v) de vinaza y la letra “I” hace referencia al porcentaje (v/v) de inóculo.

Anexo 7 Caracterización vinaza de la industria Levapan



Calle 75 B No. 76 - 48 Bogotá D.C.
Teléfono: 2231899
Teléfono: 2234887
E-mail: servicios@agrilab.com.co

Página 1 de 1

Laboratorio de Análisis Químicos
Insumos Agrícolas

Registrado ante el ICA según Resolución 001271 del 05 de Mayo de 2014 (Última actualización)

Remitente	UNIVERSIDAD ICESI - Sr. Hernando Calcedo		
Identificación suministrada	Lote B		
Descripción	Líquido café	No. Laboratorio	MO 21256
Fecha de Ingreso	15-sep-16	Fecha de Entrega	29-sep-16
CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE MATERIAL ORGÁNICO LÍQUIDO			
PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDADES	MÉTODO ANALÍTICO
Carbono Orgánico Oxidable Total	93,4	g/L	WALKLEY-BLACK(NTC 5167)
pH	5,38		POTENCIOMÉTRICO
Densidad (20 °C)	1,15	g/c.c.	GRAVIMÉTRICO (NTC 5167)
Conductividad Eléctrica (1.200)	0,99	dS/m	CONDUCTÍMETRO
Sólidos Insolubles	9,13	g/L	GRAVIMÉTRICO (NTC 5167)
Nitrógeno total (Norg+N-NH ₂)	12,9	g/L	SUMATORIA
Nitrógeno Orgánico (N _{Org})	6,61	g/L	MICRO-KJELDAL (NTC 5167)
Nitrógeno Uréico (N-NH ₂)	6,29	g/L	COLORIMÉTRICO (Método Intero)
Fósforo Soluble (P ₂ O ₅)	0,31	g/L	COLORIMÉTRICO (NTC 5167)
Potasio Soluble en agua (K ₂ O)	36,7	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Calcio Soluble (CaO)	4,22	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Magnesio Soluble (MgO)	7,66	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Azufre Soluble(S-SO ₄)	5,36	g/L	TURBIDIMÉTRICO (NTC 5167)
Hierro Soluble	0,15	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Manganeso Soluble	257	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Cobre Soluble	0,6	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Zinc Soluble	39	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Boro Soluble	7,4	p.p.m	COLORIMÉTRICO (NTC 5167)
Sodio Soluble	8,43	g/L	EMISIÓN DE LLAMA (NTC 5167)

* Resultado adicional por solicitud del cliente, Octubre 25 de 2016

OBSERVACIONES:

1. Si usted tiene alguna inquietud, queja o reclamo sobre sus resultados, por favor comuníquese con el Director técnico o con el Coordinador de área.
2. El alcance de la responsabilidad de AGRILAB en el presente informe, se limita a la realización de los análisis de laboratorio relacionados y descritos anteriormente, más NO A GARANTIZAR los productos en su concepción, diseño, calidad y eficiencia.
3. Los resultados analíticos consignados en el presente informe corresponden exclusivamente a la muestra enviada por el cliente y no a otro(s) materiales de la misma procedencia.
4. La contramuestra de la muestra analizada se almacenará por un periodo de tiempo de 6 meses, luego será desechada.

ATENTAMENTE,

ALVARO ANDRES MORENO OSPINA