

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE UN RESIDUO PROVENIENTE DE LA
INDUSTRIA PANELERA COMO FUENTE DE CARBONO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL**

**JOSE NICOLAS SOSA MORENO
PAULA ANDREA VASQUEZ SEGURA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PRIGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE UN RESIDUO PROVENIENTE DE LA
INDUSTRIA PANELERA COMO FUENTE DE CARBONO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL**

**JOSE NICOLAS SOSA MORENO
PAULA ANDREA VASQUEZ SEGURA**

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO.

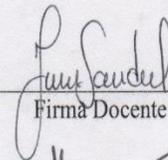
**Director
DIEGO RUBIO
Biólogo**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PRIGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

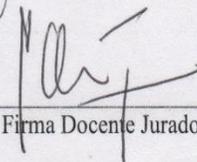
Nota de Aceptación (Dirección de Investigaciones)



Firma Docente Investigador



Firma Docente Jurado 1



Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., Septiembre 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro.

Dr. Jaime Posada Díaz.

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos.

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña.

Vicerrectora Académica y de Posgrados.

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas.

Secretario General.

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña.

Decano Facultad de Ingenierías.

Ing. Julio cesar Fuentes Arismendi.

Director Programa de Ingeniería Química.

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez.

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Este trabajo de grado se lo dedico

A mi padre Jose Vicente Sosa quien ya no está terrenalmente para verme culminar esta etapa de mi vida, pero que Dios me prestó durante mucho tiempo para formarme, apoyarme y enseñarme a luchar para cumplir mis objetivos.

A mi madre, ese primer amor que me ha formado y a quien debo todo lo que hoy soy. La motivación que me dejó mi padre para seguir luchando para honrarla y cuidarla como él lo haría

A mi abuela, hermanos, tíos y demás familiares que han creído en mí y me han dado su apoyo para poder culminar mi carrera.

A Paula por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera, su paciencia y gran participación en el desarrollo de este documento.

A mis amigos, compañeros y demás personas con quienes compartí mi vida académica, de quienes aprendí bastante y disfruté de esta etapa de mi vida.

Jose Nicolas Sosa Moreno.

DEDICATORIA

A mis padres Herbert Yesid Vásquez Navas y Beatriz Segura Díaz, por creer en mí, apoyarme y recordarme cada vez que caía que tenía que levantarme, extender mis alas y volar hacia la meta soñada, sin miedos ni temores porque siempre Dios estaría respaldándome y mostrándome su amor.

A mi hermana María Camila Vasquez Segura y demás familiares por su apoyo brindado a lo largo de la carrera universitaria.

A Nicolás, por tenderme su mano y estar junto a mi cada vez que lo necesitaba, por ser mi complemento en este proyecto y por enseñarme que a cada dificultad hay que verle su lado bueno.

A mis amigos que a lo largo de la carrera me apoyaron, confiaron en mí y que gracias al equipo que formamos hoy podemos cumplir esta meta juntos.

Paula Andrea Vasquez Segura

AGRADECIMIENTOS

¡Sé fuerte y valiente y pon manos a la obra! No tengas miedo ni te desanimes, porque Dios el Señor mi Dios, estará contigo. 1 Crónicas 28:20

Los autores expresan sus agradecimientos a:

En primer lugar a Dios, por su ayuda y fortaleza; las cosas no fueron fáciles pero al tener fe en Él, hoy este sueño anhelado es posible.

A nuestros padres, por darnos la pauta para podernos realizar profesionalmente, iluminar nuestros caminos; por esos consejos llenos de sabiduría en los momentos apropiados y por la confianza brindada a lo largo de nuestra vida.

A Diego Rubio, biólogo investigador de la Universidad de América, por su dirección a lo largo del proyecto.

A la Universidad de América, por formarnos como Ingenieros Químicos y darnos las bases necesarias para desarrollar el proyecto.

A Duvian Alberto Vera Moreno, docente de la Universidad de América, por su colaboración, interés y compromiso con éste proyecto.

A Andrés Ceballos, por ser el intermediario con la empresa Sigra S.A, por sus consejos y colaboración con la realización de cada uno de los análisis necesarios a lo largo del proyecto.

A Juan Andrés Sandoval, Docente de la universidad América, por estar involucrado en el desarrollo de éste proyecto.

A Libardo Mendoza Geney, docente de la universidad América, por sus consejos, colaboración en cada momento de consulta y soporte en este proyecto de investigación.

A María Angélica Cárdenas Quintero, por su tiempo dedicado y su apoyo en los diseños presentados.

A nuestros compañeros de las áreas adyacentes de estudio, por la ayuda presentada durante el desenvolvimiento de éste proyecto.

Y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron durante el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	22
OBJETIVOS	24
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 MICROALGA	25
1.1.1 Aplicaciones biotecnológicas	25
1.2 CHORELLA	27
1.3 CONDICIONES DE CULTIVO	27
1.4 NUTRICIÓN	29
1.4.1 Foto-Autotrófico	29
1.4.2 Heterotrófico	31
1.4.3 Foto-Heterotrófico	32
1.4.4 Mixotrófico	32
1.5 PRODUCCIÓN DE PANELA	33
1.5.1 Proceso de producción	33
1.5.1.1 Apronte	33
1.5.1.2 Tracción	33
1.5.1.3 Pre-Limpieza	33
1.5.1.4 Limpieza	33
1.5.1.5 Clarificación	34
1.5.1.6 Evaporación	34
1.5.1.7 Concentración	34
1.5.1.8 Punteo	34
1.5.1.9 Batido	34
1.5.1.10 Moldeo	34
1.5.1.11 Empaque	34
1.5.1.12 Almacenamiento	34
1.5.2 Residuos	35
1.5.2.1 Palma	35
1.5.2.2 Bagacillos	35
1.5.2.3 Cachaza	35
1.5.2.4 Melote	35
1.5.2.5 Bagazo	35
1.5.2.6 Melado	35
1.5.2.7 Aguas	35
1.6 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	36
1.6.1 Conteos	37
1.6.1.1 Curva de crecimiento	39
2. METODOLOGIA	41

2.1 PRIMERA ETAPA	44
2.1.1 Obtención de la microalga	44
2.1.2 Condiciones de Cultivo	44
2.1.3 Esterilización de materiales	46
2.1.4 Cultivo de microalgas	47
2.1.4.1 Incubadora	47
2.1.4.2 Iluminación	47
2.1.4.3 Agitación	47
2.1.5 Producción de biomasa inicial	48
2.1.5.1 Preparación medio de cultivo	48
2.1.5.2 Preparación de la biomasa inicial	48
2.1.6 Pre-Selección teórica de la fuente de Carbono	49
2.2 SEGUNDA ETAPA	50
2.2.1 Pre-Tratamiento residuo panelero	50
2.2.2 Preparación de los inóculos	51
2.2.3 Pre-Experimento No. 1	51
2.2.3.1 Proporciones sustrato: foliagro	51
2.2.3.2 Recuento de microorganismos y construcción de curvas de crecimiento	52
2.2.4 Pre-Experimento No. 2	54
2.2.4.1 Proporciones suplemento: microalga: medio de cultivo	54
2.2.4.2 Análisis estadístico del Pre-Experimento No. 2	54
2.3 TERCERA ETAPA	55
2.3.1 Desarrollo experimental	55
2.4 CUARTA ETAPA	56
2.4.1 Tratamiento de la biomasa	56
2.4.1.1 Tratamiento de la biomasa para la repetición del experimento	57
2.4.2 Extracción ácidos grasos	57
2.4.1.2 Extracción por solventes para la repetición del experimento	58
2.4.3 Perfil de ácidos grasos	59
3. RESULTADO Y ANÁLISIS	60
3.1 PRIMERA ETAPA	60
3.1.1 Producción de biomasa inicial	60
3.1.2 Pre-selección teórica	60
3.2 SEGUNDA ETAPA	61
3.2.1 Pre-tratamiento del melote y preparación del inóculo	61
3.2.2 Pre-experimento No. 1	63
3.2.3 Pre-experimento No. 2	67
3.3 TERCERA ETAPA	69
3.3.1 Desarrollo experimental	69
3.3.1.1 Repetición del Experimento	71
3.4 CUARTA ETAPA	74
3.4.1 Tratamiento de la biomasa	74
3.4.1.1 Tratamiento de la biomasa para la repetición del experimento	76

3.4.2 Rendimiento y productividad volumétrica	78
3.4.2.1 Rendimiento y productividad volumétrica para la repetición del experimento	79
3.4.3 Perfil de ácidos grasos	80
3.4.3.1 Perfil de ácidos grasos para la repetición del experimento	84
4. DISCUSIÓN	86
5. CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	96

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Usos industriales de las microalgas.	25
Cuadro 2. Condiciones de cultivo.	28
Cuadro 3. Modos de crecimiento de un cultivo de algas (microalgas).	29
Cuadro 4. Condiciones para el sistema de cultivo.	44
Cuadro 5. Sistema de evaluación por puntajes para la pre-selección de los residuos paneleros.	50

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Producción de lípidos y biomasa de diferentes especies bajo condiciones foto-autotróficas, heterotróficas y mixotróficas.	31
Tabla 2. Concentración de biomasa y contenido lipídico comparación entre autotrófico, heterotrófico y mixotrófico <i>C. vulgare</i> .	33
Tabla 3. Relaciones de volumen para el montaje de los tratamientos para el pre-experimento número 1.	52
Tabla 4. Relaciones de volumen para el montaje de los tratamientos para el pre-experimento número 2.	54
Tabla 5. Evaluación de las fuentes de Carbono.	61
Tabla 6. Crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando melote como suplemento.	64
Tabla 7. Crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	65
Tabla 8. Concentración celular promedio para cada uno de los tratamientos.	67
Tabla 9. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 1.	68
Tabla 10. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 2.	69
Tabla 11. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 3.	69
Tabla 12. Análisis de varianza de un factor para las réplicas del experimento.	70
Tabla 13. Análisis de varianza de un factor para las réplicas de la repetición del experimento.	73
Tabla 14. Cantidades de biomasa obtenida por volumen de muestra.	74
Tabla 15. Porcentaje de biomasa seca.	75
Tabla 16. Cantidades de biomasa obtenida por volumen de muestra de cada réplica de la repetición del experimento.	76
Tabla 17. Porcentaje de biomasa seca de cada réplica de la repetición del experimento.	76
Tabla 18. Comparación porcentaje de materia seca y humedad de la relación 1:1 y el blanco.	77
Tabla 19. Rendimiento y productividad volumétrica para el experimento y cultivo de control.	79
Tabla 20. Rendimiento y productividad volumétrica para las réplicas de la repetición del experimento y cultivo de control.	80
Tabla 21. Rendimientos y productividad de la relación 1:1 (melote) y el Blanco.	80
Tabla 22. Composición de los ácidos grasos de la muestra del experimento.	81
Tabla 23. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados.	82

Tabla 24. Comparación bibliográfica de la composición de SFAS, MUFAS y PUFAS.	83
Tabla 25. Composición de los ácidos grasos de la muestra de la repetición del experimento.	84
Tabla 26. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados de la repetición del experimento.	85
Tabla 27. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	97
Tabla 28. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	98
Tabla 29. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	99
Tabla 30. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 4 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	100
Tabla 31. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 5 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	101
Tabla 32. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1 utilizando melote como suplemento.	102
Tabla 33. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2 utilizando melote como suplemento.	103
Tabla 34. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3 utilizando melote como suplemento.	104
Tabla 35. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 4 utilizando melote como suplemento.	105
Tabla 36. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 5 utilizando melote como suplemento.	106
Tabla 37. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1.	107
Tabla 38. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2.	108
Tabla 39. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3.	109
Tabla 40. Concentración celular para cada réplica del experimento.	110
Tabla 41. Concentración celular para cada réplica de la repetición del experimento.	111

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i> en cultivos autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.	30
Gráfica 2. Curva de crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando melote como suplemento.	64
Gráfica 3. Curva de crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	65
Gráfica 4. Comparación curvas de crecimiento celular entre el tratamiento 2 utilizando melote y agua del lavado de las gaveras.	66
Gráfica 5. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del pre-experimento No. 2.	68
Gráfica 6. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del experimento y el cultivo de control.	71
Gráfica 7. Curvas de crecimiento celular de las réplicas de la repetición del experimento.	72
Gráfica 8. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del experimento, repetición del experimento y el cultivo de control.	73
Gráfica 9. Humedad y biomasa seca del experimento (relación 1:1) y del cultivo de control.	75
Gráfica 10. Humedad y biomasa seca de las 4 réplicas de la repetición del experimento.	77
Gráfica 11. Porcentaje de materia seca y humedad de la relación 1:1 y el blanco.	78
Gráfica 12. Perfil de ácidos grasos.	81
Gráfica 13. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados.	82
Gráfica 14. Perfil de ácidos grasos de la repetición del experimento.	84
Gráfica 15. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados en la repetición del experimento.	85
Gráfica 16. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	97
Gráfica 17. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	98
Gráfica 18. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	99
Gráfica 19. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 4 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	100
Gráfica 20. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 5 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.	101
Gráfica 21. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1 utilizando melote como suplemento.	102

Gráfica 22. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2 utilizando melote como suplemento.	103
Gráfica 23. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3 utilizando melote como suplemento.	104
Gráfica 24. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 4 utilizando melote como suplemento.	105
Gráfica 25. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 5 utilizando melote como suplemento.	106
Gráfica 26. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1.	107
Gráfica 27. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2.	108
Gráfica 28. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3.	109
Gráfica 30. Curva de crecimiento de cada réplica de la repetición del experimento.	111

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Diagrama de proceso de la producción de panela.	36
Figura 2. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.	37
Figura 3. Recuento de 5 recuadros de la rejilla central de la cámara de Neubauer.	38
Figura 4. Todos los recuadros grandes (16), cámara de Neubauer.	38
Figura 5. Diagrama del proceso.	41
Figura 6. Esquema fotobiorreactor adaptado.	47
Figura 7. Integración sistema de cultivo.	48
Figura 8. Escalamiento para la preparación de la biomasa inicial.	49
Figura 9. Implementos utilizados para el recuento de microorganismos.	53
Figura 10. Escalamiento desarrollo experimental.	55
Figura 11. Diagrama general del tratamiento de la biomasa.	57
Figura 12. Extracción de ácidos grasos.	58
Figura 13. Biomasa inicial.	60
Figura 14. Melote.	62
Figura 15. Preparación del inóculo.	62
Figura 16. Filtración del melote.	63

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Concentración celular y curvas de crecimiento del pre-experimento No. 1.	97
Anexo B. Concentración celular y curvas de crecimiento del pre-experimento No. 2.	107
Anexo C. Concentración celular y curvas de crecimiento del desarrollo experimental y su repetición.	110
Anexo D. Muestra de cálculos del tratamiento de la biomasa.	112
Anexo E. Cromatografía de gases (perfil de ácidos grasos)	116

ABREVIATURAS

°C:	Grados centígrados
CO₂:	Dióxido de Carbono
cm:	Centímetros
L:	Litros
min:	Minutos
mL:	Mililitros
MUFAS:	Ácidos grasos monoinsaturados
PUFAS:	Ácidos grasos insaturados
SFAS:	Ácidos grasos saturados
V/V:	Proporción volumen /volumen

GLOSARIO

BAGAZO: residuo con gran cantidad de lignina que resulta después de la extracción del jugo de caña.

BIOMASA: material orgánico (contenido energético) obtenido a partir del proceso de fotosíntesis en las plantas.

CACHAZA: residuo proveniente de la etapa de la limpieza de la producción de panela, es característica por ser una espuma espesa y amarillenta con alto grado de fermentación.

CROMATOGRAFÍA: método de análisis y de separación de compuestos químicos, en donde se cuantifica y caracteriza los lípidos obtenidos de la biomasa microalgal.

CULTIVO: conjunto de microorganismos que crecen en un fotobiorreactor, con el objetivo de producir biomasa o un metabolito de interés.

FOTOBIORREACTOR: sistema capaz de generar la fotosíntesis de las clorofilas existentes en los microorganismos, tales como las microalgas marinas.

GAVERA: conjunto de moldes, comúnmente de madera, utilizados para dar forma a la panela.

GUARAPO: jugo de la caña de azúcar fermentado.

GUÁSIMO: planta de la cual es extraída una sustancia viscosa utilizada como aglutinante de las impurezas del jugo de caña.

MELADO: procedente de la última paila en que se termina de cocer y purgar el guarapo.

MELOTE: residuo proveniente de de la agroindustria panelera que resulta de la deshidratación de la cachaza.

MICROALGA: microorganismos que surgen en el agua como lagos, ríos y mares

PANELA: alimento para consumo humano. Producto solido que se obtiene a través de la evaporación y concentración de los jugos de la caña de azúcar

RESIDUO: lo que queda de un todo después de haber quitado una o más partes. Desecho.

TRAPICHE: molino utilizado para extraer el jugo de la caña de azúcar.

RESUMEN

En este proyecto se evaluó la influencia de un residuo panelero como suplemento de cultivo sobre la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*. Se utilizó como medio de cultivo fertilizante foliar (FOLIAGRO) y como suplemento se evaluaron dos de los residuos de la producción de la panela, melote y el agua del lavado de las gaveras en diferentes proporciones volumen/volumen (V/V).

Las microalgas se cultivaron en fotobiorreactores adaptados a temperatura ambiente, fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad con lámpara de luz incandescente y agitación constante por medio de bombas para acuario. Se realizó seguimiento de cultivos durante 10 días para los pre-experimentos y 15 días para el experimento, haciendo uso de la cámara de Neubauer y un microscopio binocular. Se evaluó la concentración celular por medio de las curvas de crecimiento.

Para la obtención de biomasa se dejó sedimentar el cultivo retirando la agitación, se centrifugó cada muestra y la biomasa húmeda obtenida (hasta un 90% de humedad) se secó a 40°C durante 17 horas. Posteriormente, se extrajeron los lípidos por solventes y por medio de una cromatografía de gases se determinó el perfil lipídico.

El melote fue el residuo elegido como suplemento para el desarrollo experimental, con la relación 1:1 entre medio de cultivo y suplemento fue con la que se alcanzó mayor concentración celular (concentración celular máxima 1.08×10^6 Cel/mL). Bajó esta relación, se obtuvo un alto contenido de ácidos grasos insaturados (47,45%), en su mayoría ácido linoléico (32,22%), ácido aplicable en la industria de alimentos.

PALABRAS CLAVE: Cultivo mixotrófico, residuo panelero, melote, biomasa microalgal, lípidos.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se ha evidenciado el desarrollo de la sociedad; gran cantidad de descubrimientos e investigaciones que día a día han contribuido al origen de nuevos productos y por lo tanto al crecimiento industrial, llevando a la creación de compañías productoras que generan toneladas de residuos, los cuales son potenciales de contaminación y causantes del efecto invernadero.

Los residuos industriales siguen convirtiéndose en un problema no sólo ambiental sino económico, ya que las mismas empresas deben asumir altos costos de disposición de éstos. Es preocupante como se prefiere arrojar éstos residuos a vertimientos o rellenos sanitarios, causando acumulación de basuras, en vez de aprovechar los nutrientes que aún contienen y convertirlos en sustancias de mayor valor agregado con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usados en los procesos de mayor valor agregado.

La generación de residuos de la agroindustria en Colombia es muy poca, sin embargo, la mayoría de éstos se consideran peligrosos para la contaminación del agua, ya que la mayoría de estas industrias se encuentran ubicadas en sitios rurales cercanos a lagos y ríos. Una de las agroindustrias más tradicionales en Colombia es la de la producción de panela, siendo actualmente un producto que cumple con todos los requerimientos de vitaminas, carbohidratos, proteínas, grasas, agua y minerales exigidos dentro de una dieta para ser considerado un alimento completo¹.

Por lo anterior, surge la necesidad de buscar la manera de aprovechar los residuos de la industria panelera, de tal manera que contribuya a la sostenibilidad ambiental y por consiguiente permita reducir el impacto ambiental. El grupo de investigación BIOTEC FUA (Línea: Biotecnología con microalgas) ha venido investigando sobre el comportamiento de las microalgas en diferentes medios de cultivo, buscando el uso adecuado de sustratos no convencionales para los procesos de producción de biomasa microalgal, teniendo en cuenta que son una fuente de lípidos y ácidos grasos potenciales para la producción de biodiesel, productos farmacéuticos, acuicultura, entre otras aplicaciones. Las microalgas, son amigables con el medio ambiente puesto que tienen capacidad para tener un crecimiento rápido, aceptan residuos orgánicos como nutrientes y fijan grandes cantidades de CO₂ lo cual permite un fácil cultivo y alta productividad; los requerimientos de agua son limitados y puede ser reutilizada para el mismo cultivo. Además, se destaca por no competir con los cultivos alimenticios o destinados a la producción de fibra.

¹FEDEPANELA. Seguridad alimentaria en familias paneleras de Cundinamarca. 2005. p. 21.

Por lo tanto, teniendo en cuenta cada una de las propiedades expuestas anteriormente, los conocimientos adquiridos en biotecnología, bioprocesos, microbiología y las bases cimentadas por el grupo de investigación biotecnológica, en este proyecto se evaluará el potencial de un residuo industrial panelero en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, esperando que exista un aumento en la acumulación de biomasa para una posterior extracción y uso de lípidos, los cuales son de gran interés para la producción de jabones, lubricantes, biodiesel, detergentes, alimentos, entre otros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de una sustancia proveniente de la industria panelera como fuente de carbono en la producción de biomasa microalgal

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar la fuente de carbono proveniente de un residuo de la producción de panela.
- Realizar las curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* de acuerdo a la concentración de sustrato suministrada.
- Determinar la influencia del sustrato sobre la producción de biomasa.
- Determinar el perfil lipídico de la biomasa con respecto a la concentración de sustrato elegido que presenta mayor rendimiento.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MICROALGA

Las microalgas son, una especie de organización microscópica, organismos unicelulares, filamentosos o coloniales dependiendo su género crecen en suspensión, principalmente, en disoluciones acuosas². Muchas de las especies tienen un rápido crecimiento con una gran productividad; se les considera responsables de la producción de 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono del planeta³, además, son convertidores eficientes de energía solar y productores de diversos metabolitos⁴.

Un cultivo microalgal tiene grandes ventajas en comparación con otros microorganismos ya que mediante la fotosíntesis las microalgas convierten la energía solar en biomasa de donde se puede extraer lípidos, carotenos, aminoácidos, proteínas, entre otros productos de interés biotecnológico. Además, se puede cultivar en cualquier temporada del año, aun en regiones áridas ya que se puede utilizar fuentes no convencionales como medio de cultivo⁵.

1.1.1 Aplicaciones biotecnológicas. Las microalgas son organismos de gran potencia debido a que su campo biotecnológico es de gran dinamismo; son utilizadas en diversas áreas las cuales se presentan a continuación.

Cuadro 1. Usos industriales de las microalgas.

Nutrición	Las microalgas son una excelente fuente de nutrientes tanto para humanos como animales, son usadas a manera de alimentos, espesantes, colorantes, gelificantes y endulzantes ⁶ . La biomasa utilizada para nutrición animal es el 30% de la producción mundial ⁷ .
-----------	--

²BOLAÑOS, E. R. A. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. En: Revista Del Colegio de Microbiólogos Y Químicos Clínicos de Costa Rica. No.14. (2008) p 9.

³GARIBAY-HERNÁNDEZ, A., *et al.* Biodiesel a partir de microalgas. En: BioTecnología. No.13. (2009) p 41.

⁴DEMIRBAS, A., & DEMIRBAS, M. F. Biodiesel from Algae. En: Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel. Primera edición. Londres. Springer, 2010. p 76.

⁵VÁSQUEZ-DUHALT, R., & ARREDONDO-VEGA, B. Microalgas Fuente De Aceites Comestibles Y Terapeuticos. (1991). p 20.

⁶TEBBANI, Op. cit., p. 7.

⁷BOLAÑOS, Op. cit., p. 9.

Cuadro 1. (Continuación)

<p>Farmacéutica</p>	<p>La microalgas son de gran utilidad en el desarrollo de nuevas medicinas ya que contiene polisacáridos⁸ y carotenoides los cuales son utilizados para tratamientos terapéuticos, anti-cancerígenos, antiinflamatorios, anticoagulantes, entre otros⁹.</p>
<p>Cosméticos</p>	<p>Mircoalgas como <i>Spirulina arthospira</i> y <i>Chorella</i> son de gran uso en la industria de cosméticos puesto que ayudan a regenerar la piel, refrescarla, purificarla, y regenerarla de los efectos prematuros de envejecimiento¹⁰. Son utilizadas por medio de productos como cremas, champús en gel, lociones de cuerpo o protectores solares¹¹.</p>
<p>Energía</p>	<p>Utilizada para la producción de energía o calor por combustión directa¹² (conversión termoquímica lo cual involucra la gasificación, licuefacción, pirolisis, y combustión directa para la producción de electricidad. Así mismo en la elaboración de biocombustibles participan microorganismos los cuales son encargados de degradar biológicamente la biomasa (por medio de reacciones químicas y biológicas) haciendo uso de la digestión anaerobia, fermentación alcohólica y producción fotobiológica para producción de biogás, etanol e hidrogeno respectivamente¹³.</p>

⁸TEBBANI, Op. cit., p. 8.

⁹HERNÁNDEZ-PÉREZ, A., & LABBÉ, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. En: Revista de Biología Marina Y Oceanografía. No. 49. (2014). p 169.

¹⁰Ibíd., p. 162.

¹¹CLEMENS, P., & CHRISTIAN, W. Microalgal Biotechnology - Integration and Economy. De Gruyter, 2012 p 32.

¹²TEBBANI, Op. cit., p. 16.

¹³HERNÁNDEZ-PÉREZ, Op. cit., p. 168.

Cuadro 1. (Continuación)

Campo Ambiental	Las microalgas son amigables con el medio ambiente ya que son capaces de fijar cantidades de CO ₂ ¹⁴ ; así mismo son utilizadas para la remoción de contaminantes (fósforo, nitrógeno) y metales pesados en el tratamiento de aguas.
-----------------	--

1.2 CHORELLA

Chorella es una microalga unicelular, de color verde, habitante inherente de aguas residuales, adaptable a diferentes condiciones de cultivo y de crecimiento rápido; rica en proteínas, vitaminas y ácidos grasos¹⁵.

Ésta especie de microalga es conocida por su gran contenido de nutrientes los cuales son asimilados por el ser humano; una de las sustancias resaltadas en esta microalga es beta-1, 3-glucano, un polisacárido que estimula el sistema inmune, destruye los radicales libres y reduce los lípidos en sangre, a si mismo tiene la capacidad de reducir las úlceras gástricas, previene el estreñimiento, la aterosclerosis, hipercolesterolemia, el cáncer, entre otras¹⁶.

1.3 CONDICIONES DE CULTIVO

Los medios de cultivos se pueden definir como ambientes artificiales creados para que la microalga crezca y la reproducción de sus células sea significativa; estos deben semejar a un ambiente natural¹⁷, para ello hay que tener en cuenta diversos factores que contribuyen al desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas.

En el cuadro 2 se encuentran algunas de las condiciones de cultivo más influyentes en la producción de biomasa microalgal.

¹⁴TEBBANI, Op. cit., p. 17.

¹⁵RODRÍGUEZ RAMOS, P., et al. Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. No. 73. Afinidad, (2015) p 125.

¹⁶CLEMENS, Op. cit., p. 35

¹⁷MANJARRÉS POLANIA, J., & MUÑOZ GUZMÁN, L. Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional en la obtención de biomasa y ácidos grasos en cultivos *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2014, p. 8-45.

Cuadro 2. Condiciones de cultivo.

Condiciones de cultivo.	
Temperatura	La temperatura es un factor muy importante en un medio de cultivo, ya que cada clase de microalga requiere un valor para no inhibir o incluso morir. La mayoría de las especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C ¹⁸ , sin embargo la <i>Chlorella</i> puede crecer entre 5 y 42°C ¹⁹ .
Luz	Así como en las plantas, la luz es la promotora de la fotosíntesis, se deben tener en cuenta, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo. En los cultivos a gran escala es recomendable inyectar CO ₂ (0.5%) para contribuir al proceso fotosintético ²⁰ .
Aireación	La aireación hace referencia a la agitación. Es de gran relevancia para la homogenización de los nutrientes y pH, evita la sedimentación de las microalgas, disminuye la pérdida de biomasa ya que evita la adherencia de ésta a las paredes del birreactor; asimismo asegura que todas las células de la población estén expuestas a la luz y los nutrientes y permite el intercambio de gases entre el medio y el cultivo ²¹ .

¹⁸HERRERA PRADA, N. A., & MONTENEGRO, L. C. Utilización de la microalga *chlorella vulgaris* en la remoción de contaminantes orgánicos provenientes de las aguas residuales de la empresa conalsebos a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2010, p. 20.

¹⁹RUIZ, A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia, (2011) p 34.

²⁰HERRERA PRADA, Op. cit., p 20.

²¹RUIZ, A. Op. cit. p. 35

1.4 NUTRICIÓN

Las microalgas son microorganismos capaces de asimilar los nutrientes bajo diferentes condiciones de cultivo, por lo general, todas las especies crecen mediante la fijación de carbón inorgánico (CO₂) y absorbiendo energía lumínica²². Se han estudiado principalmente cuatro modos de cultivo, los cuales se prestan a continuación.

Cuadro 3. Modos de crecimiento de un cultivo de algas (microalgas).

MODO DE CULTIVO	FUENTE DE ENERGÍA	FUENTE DE CARBÓN	REQUERIMIENTOS DE LUZ	VARIACIÓN DE METABOLISMO
Foto-autotrófico	Luz	Inorgánica	Obligatorio	No hay variación entre las fuentes
Heterotrófico	Orgánica	Orgánica	No requiere	Variación entre las fuentes
Foto-heterotrófico	Luz	Orgánica	Obligatorio	Utilización simultánea de la fuentes
Mixotrófico	Luz y orgánica	Inorgánica y Orgánica	No obligatorio	Utilización simultánea de la fuentes

Fuente: Perez-Garcia, O., & Bashan, Y. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. En: Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design. (2015) p 62.

1.4.1 Foto-Autotrófico. Es el método de cultivo más común ya que todas las especies de microalgas son fotosintéticas²³. Un cultivo bajo esta condición requiere de una fuente de energía y carbón. Convencionalmente, la fuente de energía es suministrada por la luz solar y el requerimiento de carbón, puede ser completamente satisfecho por el CO₂ presente en el aire o se puede suplir con aguas residuales, residuos industriales cuyos nutrientes sean asimilables por la especie²⁴.

Una desventaja que ha sido investigada es el rendimiento producción de biomasa que se puede obtener en un cultivo autotrófico comparado con los otros modos de

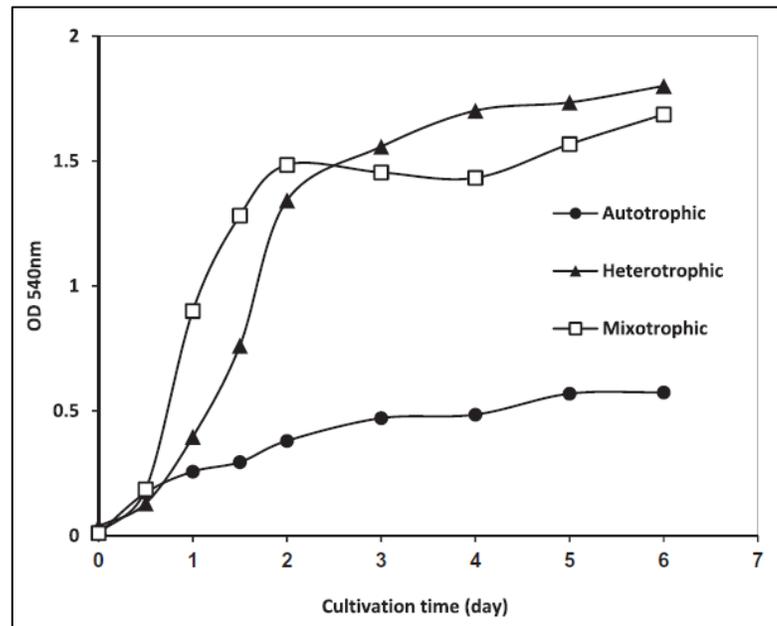
²²PEREZ-GARCIA, O., & BASHAN, Y. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. En: Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design. (2015) p 62.

²³PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M. E., DE-BASHAN, L. E., & BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. En: Water Research. No. 45. (2011) p 12.

²⁴ZHAN, J., RONG, J., & WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. En: International Journal of Hydrogen Energy. (2016) p 3.

cultivo. Kim *et al.*,²⁵ reportan para un cultivo autotrófico iluminado con luz fluorescente y como fuente de carbono bicarbonato de sodio una densidad óptica la cual es la relación entre la luz transmitida o reflejada y la luz incidente; medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm de 0.6 d^{-1} , comparado con un cultivo heterotrófico (1.8 d^{-1}) y mixotrófico (1.7 d^{-1}), es hasta tres veces menor como se puede ver en la figura 1.

Gráfica 1. Crecimiento de *C. sorokiniana* en cultivos autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.



Fuente: KIM, S., *et al.* Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic. En: Bioresource Technology. No. 144. (2013). p 10.

Los rendimientos en la acumulación de biomasa y lípidos no sólo se ven afectados por el modo de cultivo, sino también por la especie. Lin y Wu²⁶ reportan diferentes rendimientos de producción de biomasa y lípidos, donde se puede ver que en algunas especies como *Chlorella sp.* El rendimiento de biomasa y lípidos es mayor en el cultivo autotrófico que en el heterotrófico. La acumulación de lípidos es una de las ventajas que tiene el modo de cultivo autotrófico, como se puede ver en la

²⁵ KIM, S., *et al.* Growth rate, organic carbón and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic. En: Bioresource Technology. No. 144. (2013). p 10.

²⁶ LIN, T. y WU, J. Effect of carbón sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. En: Bioresource Technology. No. 184. (2015). p. 104.

tabla 1 el rendimiento es mayor que el reportado bajo un cultivo heterotrófico y similar al mixotrófico en las diferentes especies de microalgas.

Tabla 1. Producción de lípidos y biomasa de diferentes especies bajo condiciones foto-autotróficas, heterotróficas y mixotróficas.

Microalgae	Autotrophic		Heterotrophic		Mixotrophic	
	Lipid content (%)	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Biomass (g/L)
<i>Marine</i>						
<i>Chlorella</i> sp. Y8-1	16.5	0.22	5.9	0.17	35.5	0.45
<i>Chlorella</i> sp.	30.0	0.38	21.0	0.48	25.5	1.45
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	2.0	3.00	0.8	4.00
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0	-	-	-	33.0	-
<i>Nannochloropsis</i> sp.	28.0	0.37	20.0	0.38	27.5	1.20
<i>Freshwater</i>						
<i>Chlorella</i> sp.	13.5	0.60	13.0	0.75	15.0	1.40
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	20.0	0.8	16.0	0.2	53.0	3.0

Fuente: LIN, T. y WU, J. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. En: Bioresource Technology. No. 184. (2015). p. 104.

A pesar de su gran acumulación de lípidos no es el modo de cultivo más utilizado en biorefinerías por las dificultades que involucra realizar un cultivo autotrófico en sistemas abiertas y cerrados²⁷.

1.4.2 Heterotrófico. Este modo de cultivo depende de la capacidad de la especie de microlaga para asimilar y metabolizar los nutrientes de una fuente orgánica. Las especies heterotróficas, usan los compuestos orgánicos en el medio de cultivo como fuente de carbón y energía²⁸ en ausencia de luz²⁹.

Las fuentes orgánicas en este modo de cultivo son responsables del 80% del costo del medio de cultivo³⁰ y pueden ser una desventaja ya que los sustratos convencionales que se utilizan son glucosa, acetato³¹ y glicerol³² (para algunas especies) pueden ser costosos. Malorie Gélinas *et al.*³³, menciona la posibilidad de usar fuentes de carbón no convencionales diferentes a las aguas residuales, entre ellas, hidrolizado de maíz, caña de azúcar, suero de soya, entre otros, obteniendo resultados positivos, con aun mayor productividad que los sustratos

²⁷PEREZ-GARCIA, O., et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Op. cit., p. 14

²⁸ZHAN, J., Op. cit., p. 7

²⁹KIM, S., *et al.* Op. cit., p 8.

³⁰MITRA, D., *et al.* Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. En: Algal Research. No. 1. (2012) p 41.

³¹Ibid., p.42

³²ZHAN, J., Op. cit., p. 8

³³GÉLINAS, M., *et al.* Residual corn crop hydrolysate and silage juice as alternative carbon sources in microalgae production. En: Algal Research. No. 12. (2015) p 34.

convencionales, lo que resultaría favorable económicamente, ya que son residuos o co-productos de menor valor.

Octavio Perez³⁴, encuentra en el crecimiento heterotrófico una ventaja sobre el foto-autotrófico, al no requerir luz el cultivo se puede hacer en un fermentador como biorreactor, lo cual representa una gran disminución de costos y una relativa facilidad en las condiciones de operación. Asimismo, Perez, expone que un cultivo bajo condiciones heterotróficas se ve limitado por: No todas las especies tienen la capacidad de crecer en un modo de cultivo heterotrófico; la contaminación y competencia que se puede presentar entre el sustrato y la microalga; y la posible inhibición por exceso de sustrato orgánico³⁵.

1.4.3 Foto-Heterotrófico. A diferencia del heterotrófico requiere de luz como fuente de energía y además de una fuente orgánica de carbón, la cual debe estar libre de CO₂³⁶, ya que bajo este modo de cultivo no es posible absorber y metabolizar dicho compuesto³⁷.

1.4.4 Mixotrófico. El cultivo mixotrófico, hace uso de una fuente de carbón orgánica y a su vez de energía lumínica haciendo que el dióxido de carbón sea fijado a través de la fotosíntesis influenciada por las condiciones lumínicas y la fuente orgánica sea absorbida a través de la respiración aeróbica³⁸, dando lugar a que los metabolismos respiratorios y fotosintéticos ocurran al mismo tiempo³⁹.

Tamarys Heredia *et al.*⁴⁰, concluyó que la concentración de biomasa con la especie utilizada (*Chlorella vulgaris*) era mayor que la obtenida en condiciones autotróficas o heterotróficas (ver tabla 2). Además, Heredia *et al* definen que el uso de aguas residuales o enriquecidas como fuente de carbón tiene una menor eficiencia en la producción de biomasa y lípidos, con respecto a los residuos orgánicos como los agrícolas, ya que estas aguas pueden tener cierto grado de turbidez lo que afectará el metabolismo fotosintético del cultivo⁴¹. A diferencia del cultivo heterotrófico, el uso de la luz en condiciones mixotróficas representa una

³⁴PEREZ-GARCIA, O., et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Op. cit., p. 15.

³⁵ Ibid., p. 15.

³⁶PEREZ-GARCIA, O., et al. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. Op. cit., p. 63.

³⁷ZHAN, J., Op. cit., p. 9.

³⁸WANG, J., YANG, H Y WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and Prospects. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. No. 172. (2014) p 3307-3329.

³⁹LIN, T.-S., & WU, J.-Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. En: Bioresource Technology. No. 184. (2015) p 102.

⁴⁰HEREDIA-ARROYO, T., *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. En: Biomass and Bioenergy. No.35. (2015) p 2247.

⁴¹ Ibid., p. 2248

ventajas en la obtención de pigmentos y carotenoides fotosintéticos como el beta-caroteno de alto valor comercial⁴².

Tabla 2. Concentración de biomasa y contenido lipídico comparación entre autotrófico, heterotrófico y mixotrófico *C. vulgairs*.

	Autotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
Biomasa (g/L)	0,40 ± 0,12	0,75 ± 0,38	1,40 ± 0,10
Contenido de Lípidos (%)	27,38 ± 22,94	30,58 ± 26,50	13,82 ± 9,91

Fuente: HEREDIA-ARROYO, T., *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. En: *Biomass and Bioenergy*. No.35. (2015) p 2247.

1.5 PRODUCCIÓN DE PANELA

La panela es un producto muy conocido en nuestro país y también a nivel mundial, es rico en sacarosa y diversos nutrientes que son útiles para la alimentación humana.

1.5.1 Proceso De Producción. El proceso inicia desde el apronte de la caña y su traslado hasta el trapiche. Las etapas son las siguientes: apronte, extracción, limpieza, evaporación, concentración, punteo, batido, moldeo, empaque y almacenamiento.

1.5.1.1 Apronte. Es la recolección de la caña cortada, su transporte desde el sitio de cultivo hasta el trapiche y su almacenamiento en el depósito del trapiche⁴³ (que no debe ser mayor a 5 días).

1.5.1.2 Tracción. También llamada etapa de molienda, es el paso de la caña a través del molino, de esta etapa resulta el jugo (guarapo) crudo como producto principal y el bagazo húmedo⁴⁴.

1.5.1.3 Pre-Limpieza. Consiste en retirar del jugo las materias sólidas no pertenecientes al proceso como la arena, bagacillo, hojas e insectos, haciendo uso de la decantación y floculación⁴⁵.

1.5.1.4 Limpieza. Esta etapa es de gran importancia puesto que se retiran las impurezas sólidas por tres medios consecutivos: físico el cual se hace por medio

⁴²ZHAN, J., Op. cit., p. 10

⁴³ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES Y CULTIVADORES DE CAÑA PANELERA, Z. S. C. La tecnología del cultivo de caña panelera. Corpoica. 1999. p 21.

⁴⁴FONSECA, E., & DURÁN, N. Consejos técnicos para tener en cuenta durante el proceso de producción de la panela de buena calidad. Fedepanela, 2001. p 6.

⁴⁵FONSECA, Op. cit., p. 7

de la decantación del jugo, térmicos el cual es ejecutado en las primeras pailas y bioquímico por medio de aglutinantes, por lo general naturales (guásimo) ; se divide en dos sub-etapas⁴⁶.

1.5.1.5 Clarificación. La clarificación se lleva a cabo en la primera paila descachazadora, allí por medio de un floculante las partículas pequeñas que se encuentran mezcladas con el jugo, se agrupan o aglutinan facilitando su remoción. De esta etapa resulta la cachaza⁴⁷.

1.5.1.6 Evaporación. Se da en un rango de temperatura de 95°C y 100°C; emplear la temperatura adecuada es importante ya que el objetivo de esta etapa es eliminar el 90% del agua presente en el jugo limpio⁴⁸.

1.5.1.7 Concentración. En ésta etapa se obtiene la panela líquida mezclada con el aceite vegetal encargado de lubricar la paila y el agente antiespumante, el cual evita la formación excesiva de espuma, el derramamiento del jugo y por consiguiente pérdidas de éste⁴⁹.

1.5.1.8 Punteo. En esta parte se concentran mucho más las mieles, el tiempo debe ser inferior a media hora y la temperatura debe estar entre los 118°C y los 128°C⁵⁰.

1.5.1.9 Batido. Mediante paleo manual se incorpora aire a las mieles espesas que ha salido del punteo y agregación a las gaveras⁵¹.

1.5.1.10 Moldeo. Una vez enfriada la mezcla y con una nueva textura se procede a dar la forma final haciendo uso de moldes⁵².

1.5.1.11 Empaque. La panela por lo general es empacada en cajas de cartón, selladas con pegantes naturales o tecnologías sellantes adecuadas.

1.5.1.12 Almacenamiento. La panela es un producto con cualidades higroscópicas, por este motivo se debe evitar almacenar en lugares húmedos y contaminados⁵³.

⁴⁶OSORIO, G. Buenas prácticas agrícolas -BPA- y buenas prácticas de manufactura -BPM- en la producción de caña y panela. 2007

⁴⁷Ibid. p. 7

⁴⁸Ibid. p. 7

⁴⁹Ibid. p. 8

⁵⁰Ibid. p. 8

⁵¹Ibid. p. 9

⁵²OSORIO, Op. cit., p. 12.

⁵³Ibid., p. 12

1.5.2 Residuos. Los residuos de la producción de panela son en su mayoría sólidos y orgánicos, no son potencialmente tóxicos, lo que les hace reutilizables.

1.5.2.1 Palma. También denominado cogollo, obtenido de la etapa del corte de la caña corresponde aproximadamente a 16 toneladas por hectárea, en lugares donde el corte se hace por parejo⁵⁴.

1.5.2.2 Bagacillos. Surgen de la molienda. Son pequeños trozos de caña molida y exprimida que se mezclan con el jugo; son retirados en la pre-limpieza ya que son contaminantes de la panela⁵⁵.

1.5.2.3 Cachaza. Subproducto de la fabricación de la panela, es obtenido por medio de la clarificación del jugo. Se utilizan plantas naturales las cuales hacen que se forme una capa sobre la superficie del jugo (cachaza) de apariencia coloidal y gran capacidad de fermentación⁵⁶.

1.5.2.4 Melote. Se obtiene de la deshidratación de la cachaza, su apariencia es densa, espesa y pegajosa, su color va del verde pardo al café oscuro⁵⁷.

1.5.2.5 Bagazo. Residuo fibroso que queda de la caña después de ser exprimida, es utilizado como fuente de energía para el mismo proceso y así mismo como materia prima para la elaboración de diversos productos⁵⁸.

1.5.2.6 Melado. Mieles residuales de los fondos.

1.5.2.7 Aguas. Son aquellas originadas de la limpieza de las áreas, equipos y utensilios del proceso, tienen baja carga de materia orgánica, pH ácido e inestable y muy altos contenidos de DBO y DQO, que no permiten un sencillo desarrollo microbiano para su descomposición. Por su composición fisicoquímica, la forma más fácil para su manejo es en fresco, es decir a medida de su generación se va disponiendo⁵⁹.

⁵⁴TORRES, E., *et al.* Cartilla de orientación para el uso de los subproductos de la caña y la panela en alimentación bovina y porcina. Fedepanela, 2007. p 3.

⁵⁵Ibid., p. 3.

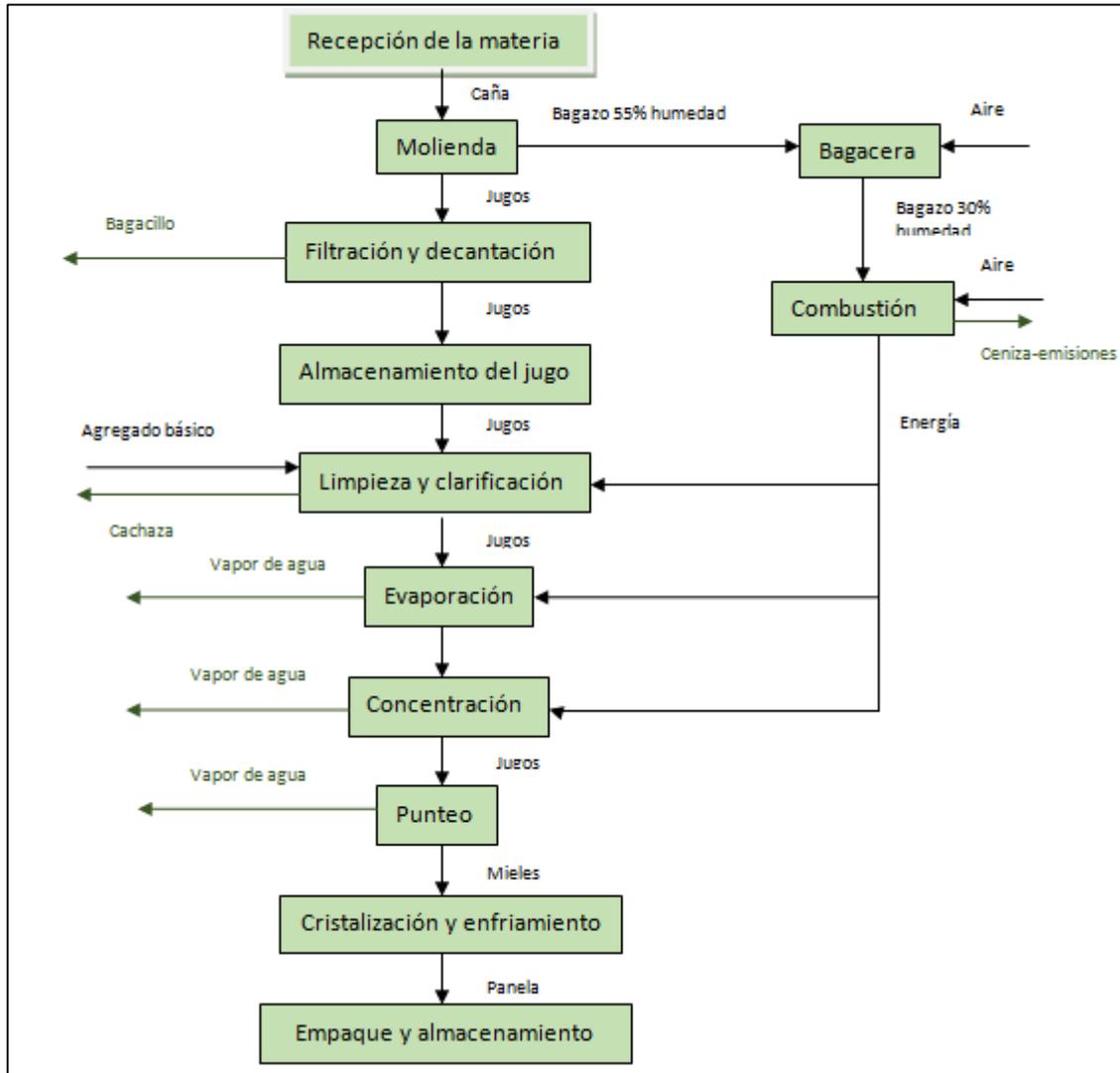
⁵⁶Ibid., p. 4.

⁵⁷GARCÍA, H., *et al.* Guía tecnológica para el manejo integral del sistema productivo de caña panelera. Corpoica, 2007 p 7.

⁵⁸SUBIRÓS RUIZ, F. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1995.

⁵⁹FONSECA ACOSTA, E. Componente Tecnológico Proceso y Manejo Ambiental. FEDEPANELA, 2012 p. 13

Figura 1 Diagrama de proceso de la producción de panela.



1.6 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

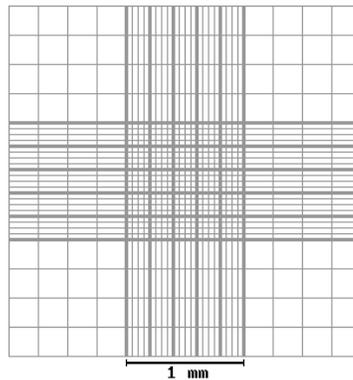
La determinación de la producción de Biomasa es un proceso derivado de los bioprocesos que tiene gran relevancia, puesto que por medio de ésta se da a conocer la eficiencia que tuvo el experimento por medios cuantitativos y así mismo la asimilación de los nutrientes, producción entre otros⁶⁰.

Existen múltiples métodos de cuantificación como lo son la espectrofotometría, clorofilas y conteos.

⁶⁰ ARNÁIZ, C., ISAC, L., LEBARTO, J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. En: Grupo de tratamiento de aguas residuales. Escuela Universitaria Politécnica. Sevilla. (2000) p 45.

1.6.1 Conteos. Es un método que hace uso de una cámara (Neubauer, Thoma, Burkner, etc.) y un microscopio el cual permitirá el conteo celular en la cuadrícula de la cámara ⁶¹(ver figura 2), éste conteo puede hacerse de diversas maneras: recuadro central, recuento de 5 cuadros grandes (central y cuatro esquineros) y recuento de los 16 recuadros grandes, figura 3 y figura 4 respectivamente.

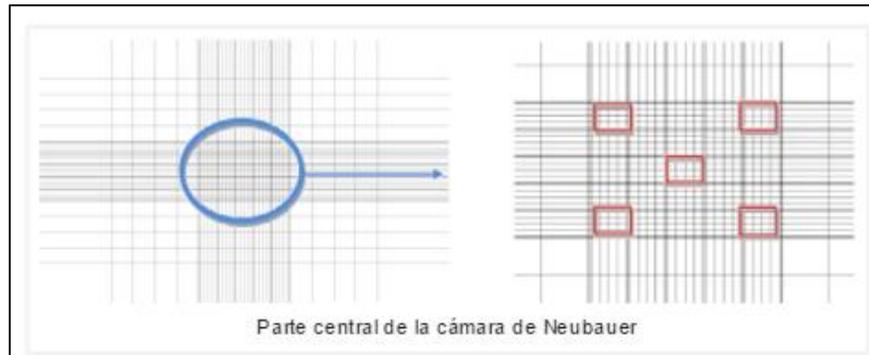
Figura 2. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.



Fuente: CELEROMICS.
Conteo celular con Hematocitómetro. Uso Elemental del Hematocitómetro. p 3. [En línea] [Citado el 23 de marzo de 2017] Disponible en: <
<http://www.celeromics.com/es/resources/TechnicaI%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Paso1.php>>

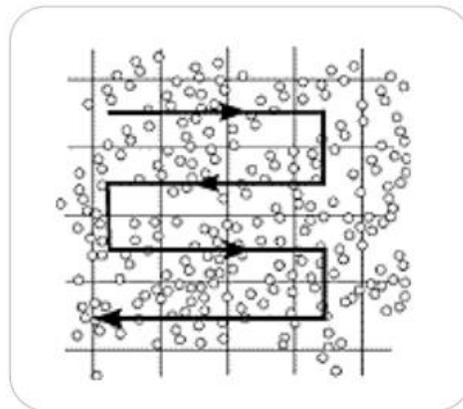
⁶¹ ARNÁIZ, C., Op. Cit., p. 46.

Figura 3. Recuento de 5 recuadros de la rejilla central de la cámara de Neubauer.



Fuente: BURGOS. Y. Cultivo de microalgas. Conteo de microalgas. [En línea] [Citado el 23 de marzo de 2017] Disponible en: <http://microalgasmodulo1.blogspot.com.co/2013/03/conteo-de-microalgas.html>

Figura 4. Todos los recuadros grandes (16), cámara de Neubauer.



Fuente: CELEROMICS. Conteo celular con Hematocitómetro. Uso Elemental del Hematocitómetro. p 4. [En línea] [Citado el 23 de marzo de 2017] Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con->

La cantidad de muestra que debe agregarse en la cámara de Neubauer es de 10 μL ⁶².

Este método es el más utilizado en la actualidad debido a la facilidad que presenta; sin embargo una de las grandes desventajas es que al ser la muestra poco representativa puede presentar errores de hasta un 30%, así mismo el pipeteo, la cantidad de volumen suministrado⁶³ y el error del ojo humano son otras de las grandes desventajas que puede presentar éste método.

1.6.1.1 Curva de crecimiento. La curva de crecimiento básicamente muestra el incremento y caída de una población de microorganismos⁶⁴. La finalidad de una curva de crecimiento, es ilustrar la variación de la concentración celular (como peso seco o total de población) con respecto al tiempo⁶⁵. La forma que toma la curva y el espacio de tiempo involucrado en cada fase dependerá de varios factores en las condiciones de cultivo (nutrientes, temperatura, concentración de O_2 , entre otros)⁶⁶.

➤ Fases

- Fase De Adaptación: Ésta fase hace referencia al tiempo en el que el microorganismo asimila las condiciones de cultivo a las que es sometido⁶⁷.

⁶²BASTIDAS, O. Conteo celular con Hematocitómetro. Uso elemental del Hematocitómetro. Technical note – Neubauer chamber cell counting. Celeromics. [Citado el 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.celeromics.com.es/resources/docs/articles/conteo-camara-neubauer.pdf>.

⁶³ Ibid., p.6

⁶⁴CHEREMISINOFF, N. Biotechnology for Waste and Wastewater Treatment. William Andrew Publishing/Noyes, 1996. [Citado el 25 de febrero de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpBWWT0002/viewerType:toc/root_slug:biotechnology-waste-wastewater/url_slug:kt003VLPP5

⁶⁵SCHASCHKE, C. Dictionary of Chemical Engineering. Oxford University Press, 2014. [Citado el 25 de febrero de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpDCE00021/viewerType:toc/root_slug:dictionary-chemical-engineering/url_slug:kt00TW5UY3?b-q=growth_curve&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default

⁶⁶FEINER, G. Meat Products Handbook - Practical Science and Technology. Woodhead Publishing, 2006. [Citado el 25 de marzo de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpMPHPST0H/viewerType:toc/root_slug:meat-products-handbook/url_slug:kt00C5TQT2?b-q=growth_curve&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default

⁶⁷SPERLING, M. Basic Principles of Wastewater Treatment, Volume 2. IWA Publishing, 2007. [Citado el 25 de marzo de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpBPWTV007/viewerType:toc/root_slug:basic-principles-wastewater/url_slug:kt00U9XGU1?b-

- Fase Exponencial: Una vez los microorganismos han asimilado el ambiente al cual fueron sometidos, comienzan a reproducirse logarítmica o exponencialmente debido al consumo de sustrato en el medio. La única limitante es la capacidad de los microorganismos para procesar el sustrato⁶⁸.
- Fase Estacionaria: Debido a un agotamiento del nutriente esencial las células comienzan a morir⁶⁹. La tasa de crecimiento celular es igual al de mortalidad⁷⁰.
- Fase De Muerte: Es una fase de decadencia reflejada en una línea recta constante y exponencial⁷¹, en la cual la tasa de mortalidad supera la de crecimiento debido a la ausencia de sustrato⁷².

⁶⁸ Ibid. p. 46.

⁶⁹CHEREMISINOFF, N. Op. cit., p. 61.

⁷⁰SPERLING, M. Op. cit., p. 48

⁷¹ Ibid., p. 47

⁷²CHEREMISINOFF, N. Op. cit., p.63

2. METODOLOGIA

El desarrollo de esta investigación se dividió en cuatro fases. En la primera fase se establecieron teóricamente las condiciones de cultivo a trabajar, y se llevó a cabo la preparación del inóculo, la producción de biomasa inicial y una evaluación teórica de los residuos paneleros. En la segunda fase se realizaron una serie de pre-experimentos cualitativos y cuantitativos con dos de los residuos paneleros a utilizar como fuente de carbono adicional. Para la tercera fase, se realizó el experimento y se evaluó la incidencia en la producción de biomasa y ácidos grasos con la relación y residuo elegido en la etapa anterior; además de evaluar el crecimiento microalgal en el medio de cultivo (foliagro) sin suplemento. La cuarta y última fase, es la obtención de biomasa seca y la extracción y caracterización de lípidos obtenidos. La figura 5 muestra el proceso expresado anteriormente.

Figura 5. Diagrama del proceso.

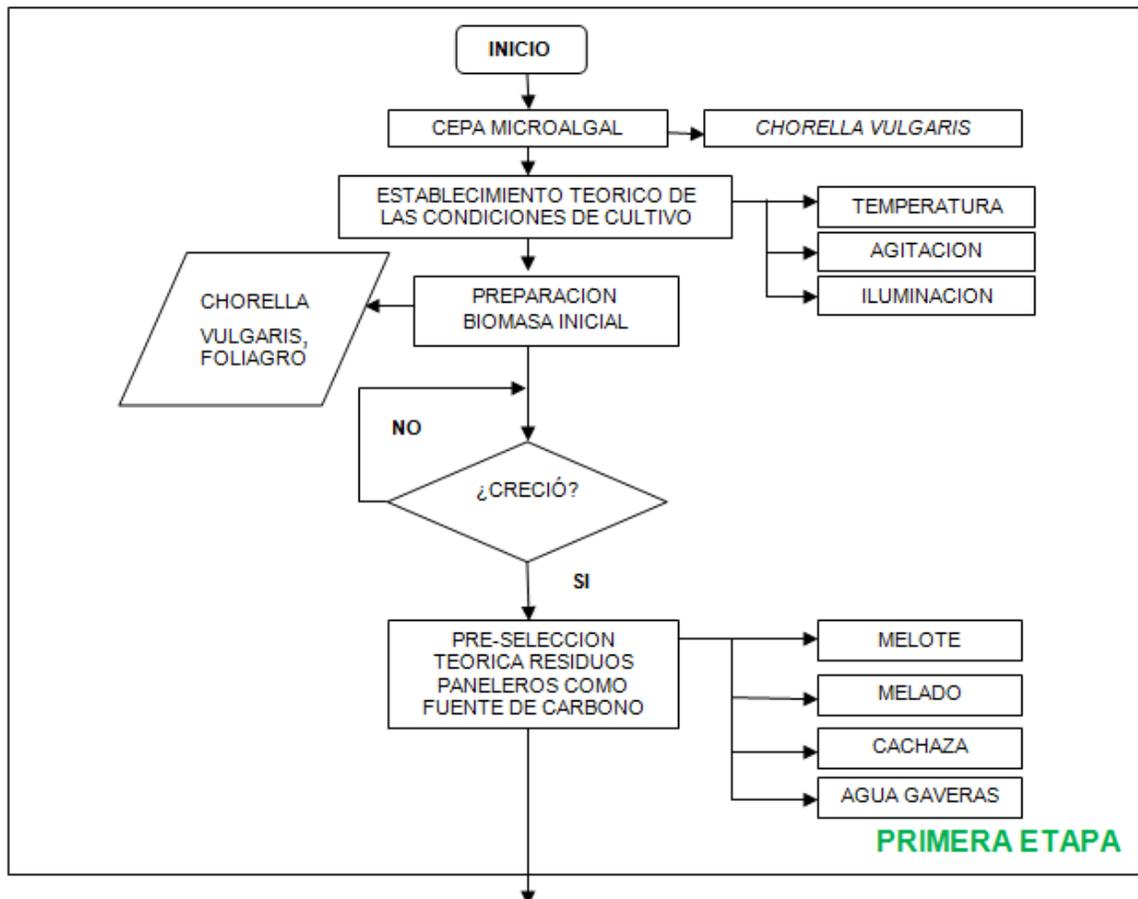


Figura 5. (Continuación).

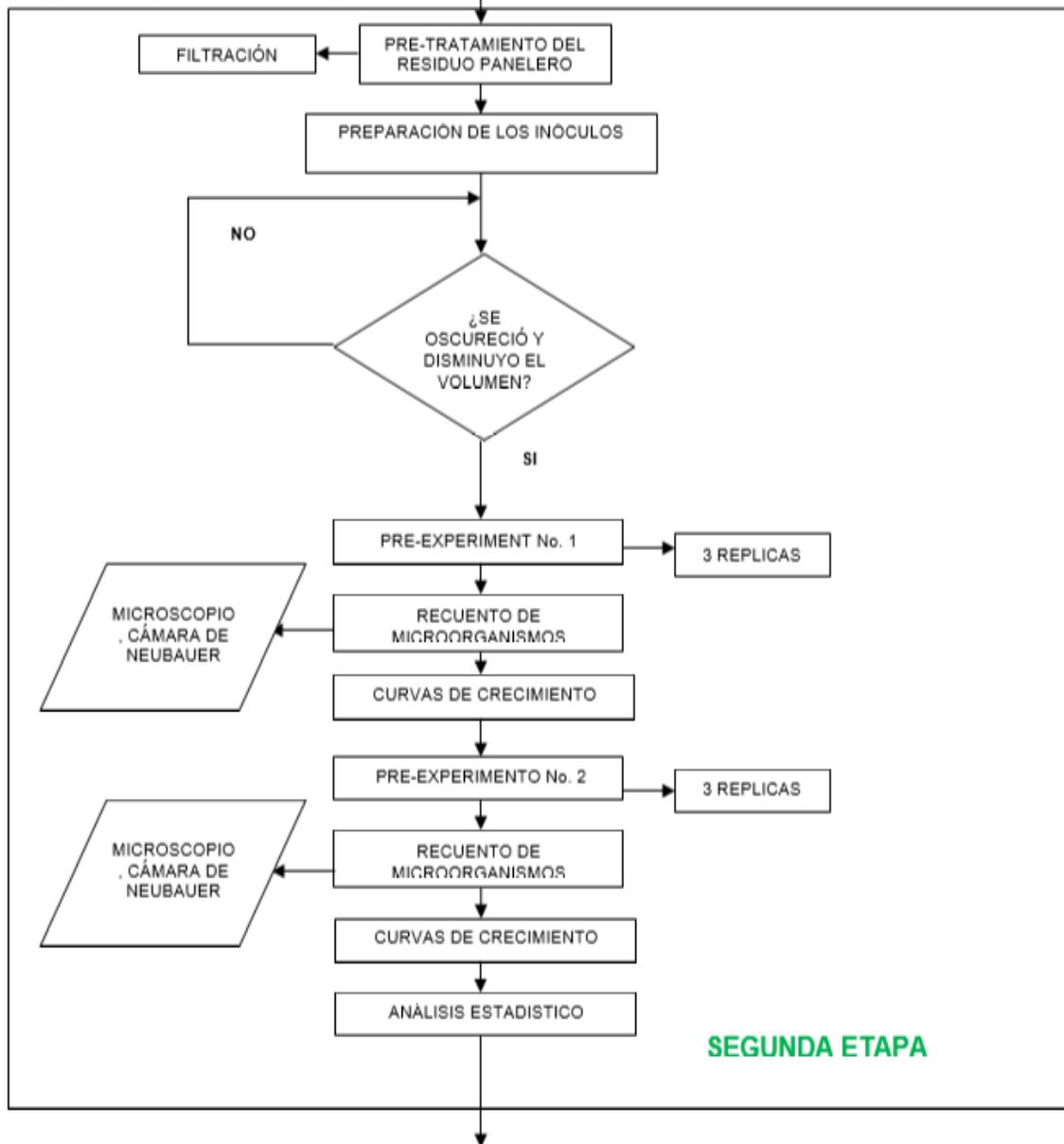


Figura 5. (Continuación).

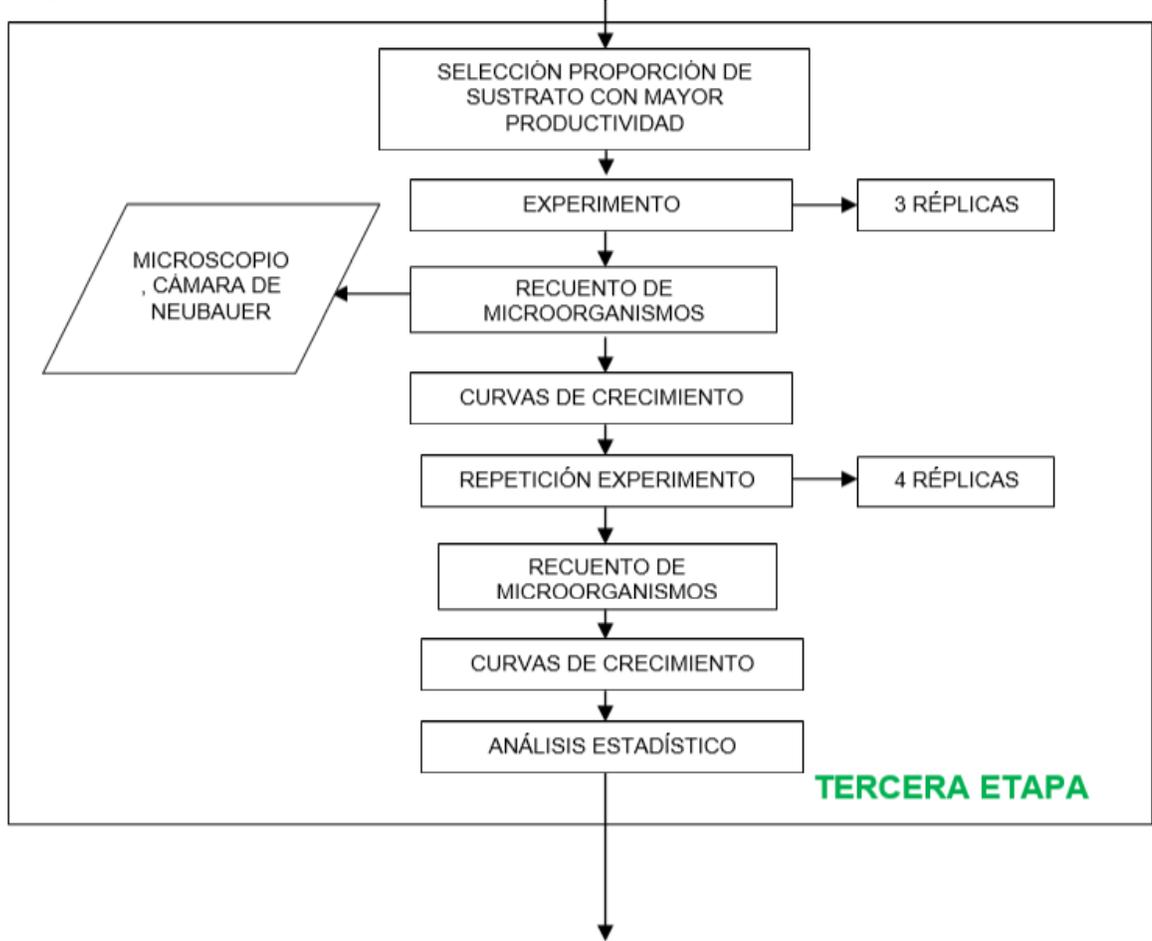
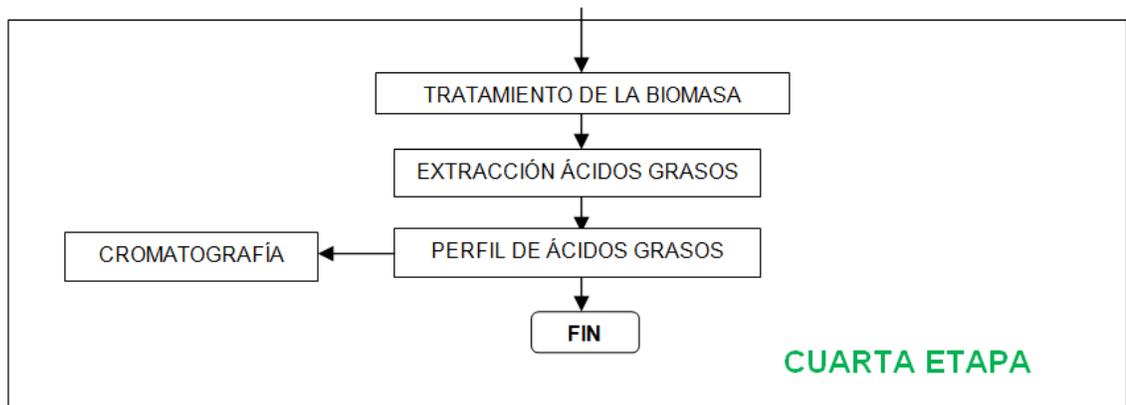


Figura 5. (Continuación).



2.1 PRIMERA ETAPA

Consiste en fijar las condiciones del cultivo microalgal, el fotobiorreactor que se utilizará y la producción inicial de biomasa para su posterior utilización.

2.1.1 Obtención De La Microalga. La microalga *Chlorella vulgaris* fue suministrada por el grupo de investigación de biotecnología con microalgas de la Fundación Universidad de América (BIOTECFUA), especie utilizada en investigaciones anteriores realizadas por el grupo.

2.1.2 Condiciones de Cultivo. Al realizar un cultivo microalgal hay múltiples variables a controlar para garantizar un óptimo crecimiento del cultivo. Basados en la literatura e investigaciones previas⁷³, se establecieron las condiciones de cultivo mostradas en el cuadro 4 en donde la condición de cultivo hace referencia a lo desarrollado en el proyecto y la influencia en los cultivos es lo que el parámetro permite que suceda en el cultivo.

Cuadro 4. Condiciones para el sistema de cultivo.

PARÁMETRO	INFLUENCIA EN LOS CULTIVOS	CONDICIÓN DE CULTIVO
Temperatura (16-27°C)	La temperatura tiene un efecto importante en la biomasa microalgal y su respectiva composición de ácidos grasos. Un aumento de ésta permite el incremento de ácidos grasos saturados, mientras que la disminución origina gran cantidad de insaturaciones ⁷⁴	Los cultivos se mantienen incubados en una cava de poliestireno a temperatura ambiente.

⁷³CAICEDO, L., RODRIGUEZ, S. Obtención de biomasa y azúcares reductores a partir de microalgas producidas en un fotobiorreactor airlift a escala laboratorio. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2016. p. 55.

⁷⁴VERMA, N., *et al.* Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. En: African Journal of Biotechnology. Vol 9. No. 10 (2010) p 1407.

Cuadro 4. (Continuación)

PARÁMETRO	INFLUENCIA EN LOS CULTIVOS	CONDICIÓN DE CULTIVO
Agitación	Favorece una distribución homogénea de las células microalgales, metabolitos, el calor y la transferencia de gases a través de la interface gas-líquido. El objetivo principal de la aireación y la agitación, es mantener las células en suspensión, lo cual permite que éstas se acerquen a la fuente de luz, ya sea en la superficie del recipiente, o en las paredes transparentes del fotobiorreactor ⁷⁵⁷⁶	Se hace uso de bombas de pecera marca Shark RS-610.
Iluminación	Infiere sobre la fotosíntesis de los microorganismos y por ende en su metabolismo.	Se hace uso de un temporizador análogo marca Completel (T 100) para garantizar fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad, y una lámpara de luz incandescente con un bombillo marca Philips con una potencia de 60 W.

⁷⁵ BERMÚDEZ, L. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia Facultad Ingeniería, Departamento Ingeniería Química y Ambiental. 2012; p. 23

⁷⁶ CALDERÓN, S., RAMÍREZ, D. Evaluación de la influencia lumínica sobre la producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2013. p. 18.

Cuadro 4. (Continuación)

PARÁMETRO	INFLUENCIA EN LOS CULTIVOS	CONDICIÓN DE CULTIVO
Nutrientes	Influye directamente en el crecimiento y producción de biomasa.	Basados en previas investigaciones, se usa el fertilizante foliagro en una concentración de 0.2% V/V ⁷⁷⁷⁸ .
Fuente adicional de carbono	Uno de los principales nutrientes que las algas toman del medio para su crecimiento es el carbono el cual es fundamental porque ayuda a las microalgas a controlar su pH y porque influye en su metabolismo, este puede ser obtenido de la atmósfera, suministrado a través de inyección de CO ₂ o adicionando algún nutriente rico en carbono como por ejemplo la glucosa ⁷⁹ .	Se hace uso de un residuo obtenido de la producción de la panela como fuente de Carbono adicional para el cultivo microalgal.

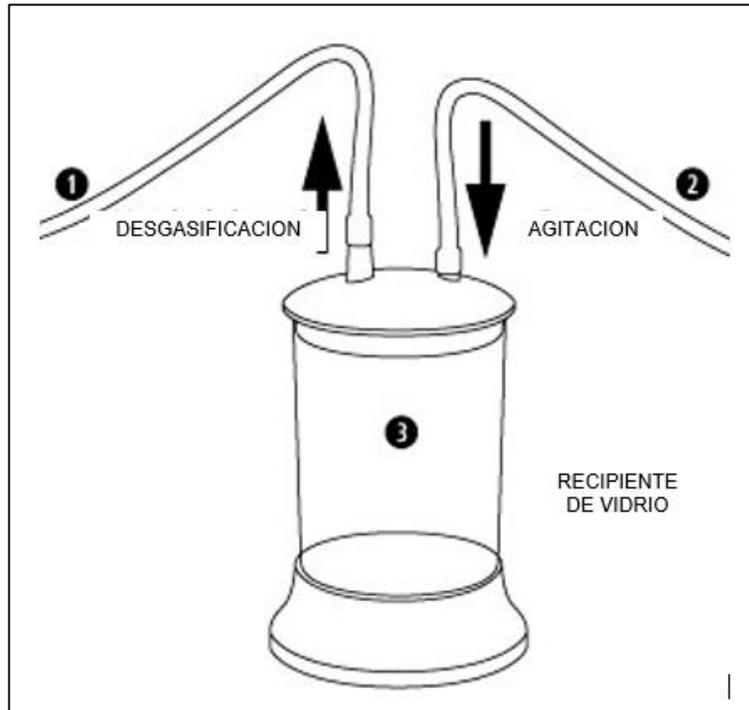
2.1.3 Esterilización De Materiales. Con el fin de evitar cualquier contaminación en el cultivo, se esterilizaron los fotobiorreactores adaptados (figura 6) y el medio de cultivo en una autoclave a una presión de 1,2 bares y una temperatura de 121°C durante 20 min. Este procedimiento se realizó en la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, en el laboratorio de Microbiología.

⁷⁷HERNANDEZ, Op. cit., p. 39.

⁷⁸ÁNGEL, C.; PIMENTA W. Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo bold basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor, para la obtención de ácidos grasos. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2012. p. 64.

⁷⁹CALDERON, Op. cit., p. 17.

Figura 6. Esquema fotobiorreactor adaptado.



2.1.4 Cultivo de microalgas.

2.1.4.1 Incubadora. En una incubadora tal como la de la figura 7, se realiza el montaje del sistema, integrando cada una de las condiciones descritas en el numeral anterior. La incubadora tiene las siguientes características:

- Es una cava de poliestireno expandido de 2 cm de espesor y tiene un volumen de 35 L.
- La parte superior (tapa) y la cara frontal de la cava se cortaron, y en su lugar se utilizó vidrio con el fin de permitir el paso de la luz emitida por la lámpara.

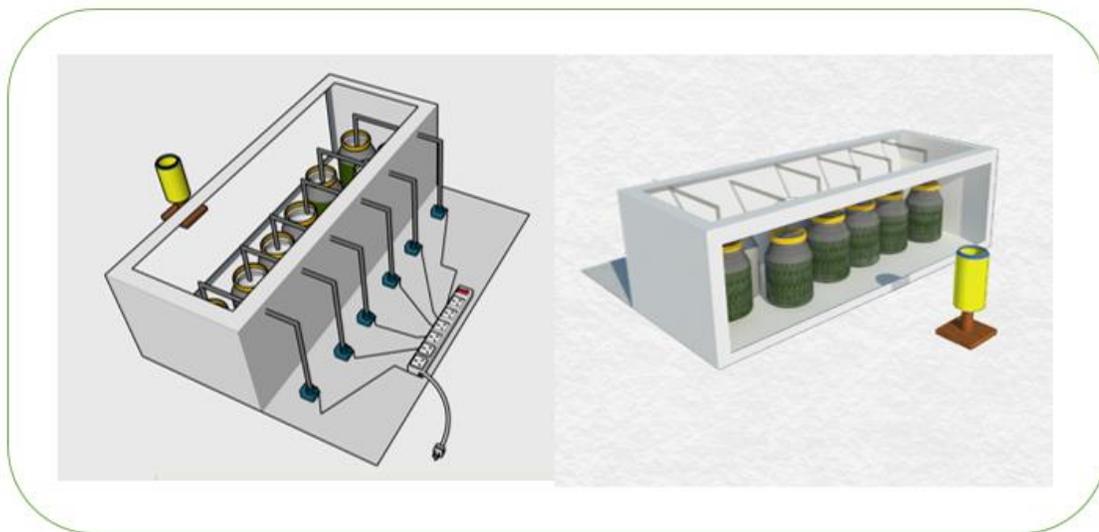
2.1.4.2 Iluminación.

- La lámpara de luz incandescente se instaló en frente de la incubadora para suministrar así luz y calor al cultivo.

2.1.4.3 Agitación.

- En la parte trasera de la cava se abrieron unos orificios con el fin de darle paso a la manguera que provenía de las bombas para la debida aireación de los cultivos.

Figura 7. Integración sistema de cultivo.

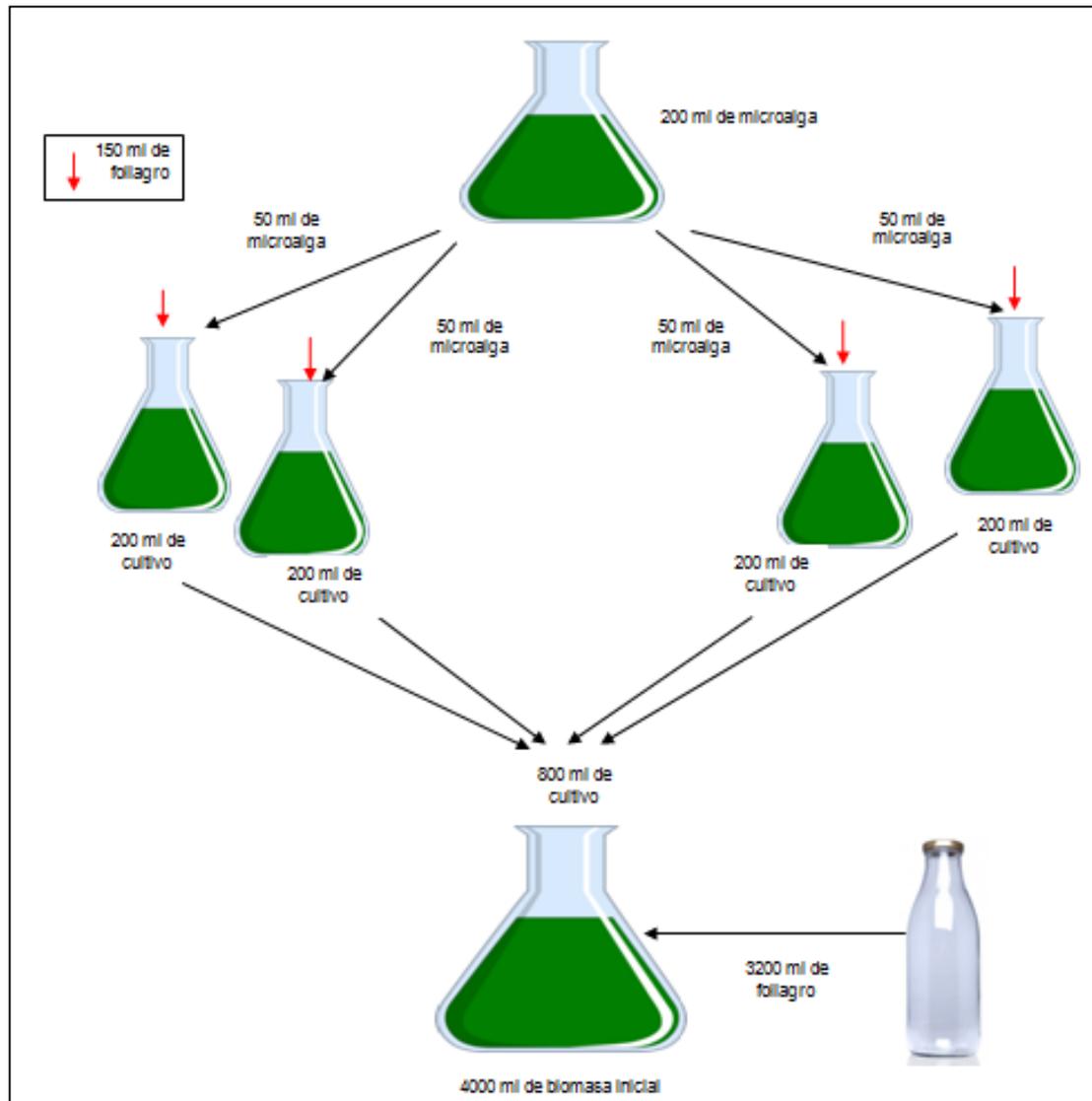


2.1.5 Producción de Biomasa Inicial.

2.1.5.1 Preparación medio de cultivo. Se utilizó el fertilizante comercial Foliagro, se preparó con una concentración 0.2% V/V, es decir 2 mL de fertilizante por 1000 mL de agua destilada. Una vez preparado, se esterilizó en el laboratorio de investigación de la Universidad América, en un horno marca Nabertherm, con una temperatura de 140°C durante 4 horas.

2.1.5.2 Preparación de la biomasa inicial. La microalga suministrada se encontraba activa; cultivada en medio de cultivo foliagro. Se distribuyeron 200 mL de la microalga obtenida en cuatro recipientes de 1 L (fotobiorreactores adaptados) previamente esterilizados, con un volumen aproximado de 150 mL de fertilizante foliar; se incubaron y mantuvieron agitadas por medio de las bombas de acuario. Posteriormente, se mezcla el contenido de los cuatro reactores en un fotobiorreactor de 4 L, continuando con el proceso, se afora completamente de medio de cultivo, siendo éste el suministro de microalga para las siguientes fases. Ver figura 8.

Figura 8. Escalamiento para la preparación de la biomasa inicial.



2.1.6 Pre-Selección teórica de la fuente de Carbono. Como se expresó en el marco teórico (1.5.2) los residuos obtenidos de la producción de panela son cogollo, bagacillos, bagazo, cachaza, melote, melado y agua del proceso de lavado de los equipos, entre ellos las gaveras.

Se descartan los residuos sólidos (cogollo, bagacillos y bagazo) debido a que son materiales lignocelulósicos y volátiles, por lo cual son destinados a procesos termoquímicos.

Los residuos líquidos: melado, cachaza y agua del lavado de las gaveras, junto con el melote, residuo semisólido son evaluados de acuerdo a su precio, disponibilidad, conservación y otros usos; asignando en cada uno de los anteriores

parámetros, un puntaje calificativo para cada uno como se muestra en el cuadro 5. Posteriormente se hace la sumatoria de los diferentes parámetros para cada uno de los residuos y mediante ésta operación se seleccionan los dos residuos que tuvieron el mayor puntaje.

Cuadro 5. Sistema de evaluación por puntajes para la pre-selección de los residuos paneleros.

Parámetros	Rango	Puntaje
A. Precio	Alto	1
	Medio	5
	Bajo	10
B. Disponibilidad	Alta	10
	Media	5
	Baja	1
C. Conservación	Compleja	1
	Moderada	5
	Sencilla	10
D. Otros Usos	Consumo humano	1
	Reintegración al proceso	5
	Consumo animal	10

2.2 SEGUNDA ETAPA

En ésta etapa se realiza la preparación de los inóculos, consiste en la inoculación de la biomasa inicial producida en la anterior etapa en el nuevo medio que será suplementado con los residuos que se eligieron en la anterior etapa. Así mismo se determinan las concentraciones que se evaluarán por medio de conteos celulares, los cuales serán representados en curvas de crecimiento para cada uno de los pre-experimentos cuantitativos realizados.

2.2.1 Pre-Tratamiento residuo panelero. Se tiene en cuenta que dentro de los procesos de la producción de panela pueden mezclarse pequeños sólidos e insectos con los jugos, debido a que la mayoría de plantas de producción de panela (trapiches) se encuentran al aire libre. De esta manera, no sólo los jugos son contaminados con partículas no pertenecientes a éstos, sino también los diversos residuos que se producen.

Considerando un proceso inicial con el melote se definió la necesidad de realizarle un pre tratamiento para viabilizar su uso como suplemento para el cultivo, debido a que este residuo tiene una tonalidad oscura y una consistencia pastosa que puede afectar el crecimiento celular microalgal; por tal motivo se realiza una filtración y una dilución previa con agua destilada (15 g de melote por L de agua destilada) , con el fin de extraer los sólidos que se encuentran y así mismo

disminuir la turbidez que presenta para que la luz penetre el cultivo microalgal y favorecer así el proceso fotosintético.

En cuanto al agua de las gaveras, únicamente se mantuvo en refrigeración una vez obtenida de la Finca el Refugio para evitar la presencia de microorganismos que propicien la fermentación. Además, cabe resaltar que al agua con la que se cultivó no se le adicionó cloro y que fue extraída de la tercera lavada de las gaveras.

La filtración se realiza en embudos de vidrio, papel filtro marca CHM de grado cuantitativo y erlemeyers de 500 mL para almacenar el filtrado; además para acelerar el proceso, simultáneamente se hace una filtración al vacío usando un motor de 20 W potencia, el sistema de vacío, el embudo de Buhner y papel filtro.

2.2.2 Preparación de los inóculos. Se hace una prueba cualitativa haciendo uso de dos fotobiorreactores adaptados de 1L, en donde, en cada uno de éstos se cultiva microalga con uno de los residuos seleccionados, en una proporción 1:1 del residuo y la microalga (biomasa inicial). La prueba cualitativa consiste en observar el color que toman los cultivos con respecto al tiempo, y así mismo el volumen contenido. Si a los 12 días la tonalidad del cultivo es verde oscuro y presenta una disminución en el volumen, indica que la microalga asimiló el residuo; si por el contrario el color es grisáceo, el volumen es igual y se genera espuma, indica que el cultivo se contaminó y por lo tanto no podrá ser utilizado para la continuación del proyecto.

Una vez determinado lo anterior y al cumplirse las condiciones de la evaluación cualitativa para determinar la adaptación de la fuente de carbono suministrada al cultivo (residuo) con la microalga, se tomará como inóculo el cultivo realizado, para los posteriores pre-experimentos cuantitativos.

2.2.3 Pre-Experimento No. 1. Este pre-experimento se realiza con el fin de corroborar que el suplemento de cultivo tiene influencia en el crecimiento celular; además de establecer un rango de las posibles concentraciones a trabajar. Para ello, se usan cinco fotobiorreactores adaptados con capacidad de 1 L para cada uno de los residuos elegidos, en ellos se manejará un volumen de trabajo de 300 mL, 100 mL de microalga y los 200 mL restantes son una variación de la relación volumen/volumen entre la fuente de carbono y el medio de cultivo.

Para este pre-experimento se realizan tres réplicas con el fin de revalidar los datos obtenidos.

2.2.3.1 Proporciones sustrato: foliagro. Teniendo en cuenta que el volumen y la concentración celular de microalgas no variaron: $5,42 \times 10^5$ Cel/mL para el melote y $5,70 \times 10^5$ Cel/mL para el agua de las gaveras, se definieron las proporciones del sustrato y el medio como se muestra en la tabla 3. El residuo para ésta fase

experimental y las siguientes, se considera como sustrato ya que empieza a utilizarse como suplemento nutritivo de cultivo, y más precisamente como una fuente adicional de carbono.

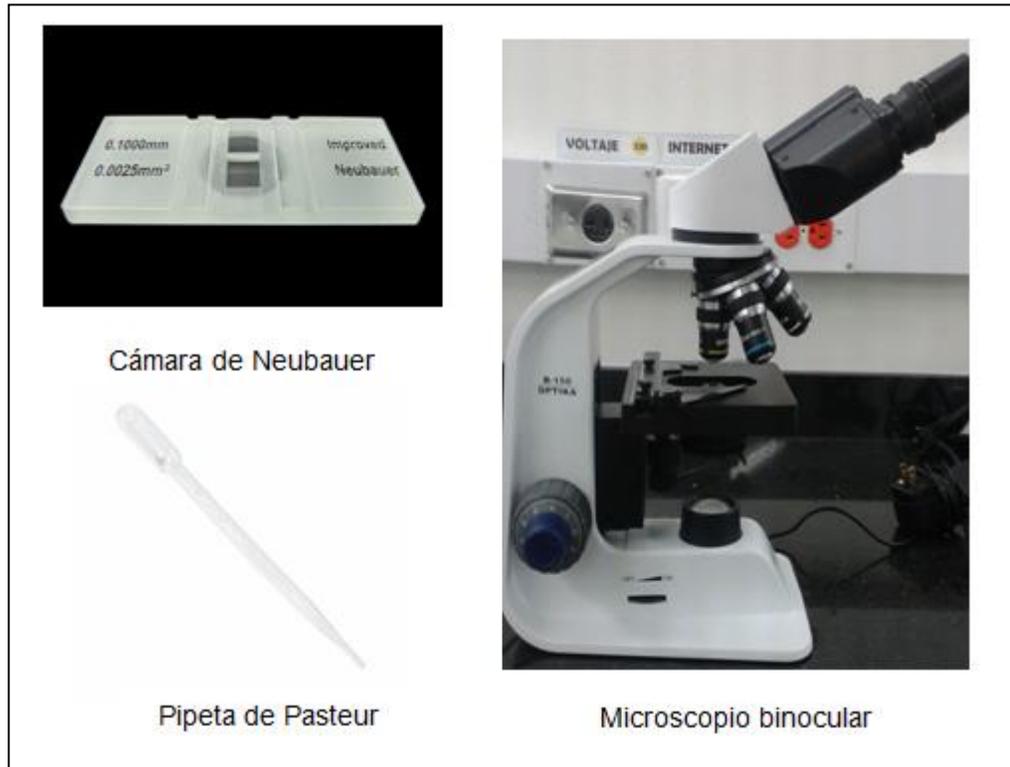
Tabla 3. Relaciones de volumen para el montaje de los tratamientos para el pre-experimento número 1.

	Microalga [mL]	Suplemento (Agua de las gaveras/melote) [mL]	Foliagro [mL]	Volumen total de trabajo [ml]
Tratamiento 1	100	200	-	300
Tratamiento 2	100	100	100	300
Tratamiento 3	100	150	50	300
Tratamiento 4	100	50	150	300
Tratamiento 5	100	134	66	300

2.2.3.2 Recuento de Microorganismos y Construcción de Curvas de Crecimiento. Los conteos se realizan para todos los tratamientos durante 10 días haciendo uso de un microscopio binocular marca Optika a un objetivo de 10x, un cámara de Neubauer, cubre objetos y una pipeta de Pasteur de polietileno de 1 mL llevando a cabo el siguiente procedimiento: Se coloca el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer, se toma la muestra del cultivo microalgal y se deposita entre la cámara y el cubre objetos un volumen estándar 0.1 mm³. Posteriormente se ubica la cámara en la platina del microscopio sujetándola con las pinzas y se enfoca la cuadrícula con ayuda de los anillos macro y micrométrico asegurando que el foco de luz penetre la muestra. Finalmente se hace el recuento de las células en cinco cuadrantes: el central y los cuatro esquineros, como lo muestra la figura 4. Recuento de cinco recuadros grandes, cámara de Neubauer.

Los implementos utilizados en el proceso anteriormente descrito se pueden observar en la figura 9.

Figura 9. Implementos utilizados para el recuento de microorganismos.



La determinación de la concentración celular se realiza mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Concentración celular en Células por mililitro [Cel/mL].

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadrantes}}$$

FUENTE: BASTIDAS, O. Conteo celular con Hematocitómetro. Uso elemental del Hematocitómetro. Technical note – Neubauer chamber cell counting. Celeromics. [Citado el 6 de marzo de 2017]. Disponible en:
<http://www.celeromics.com.es/resources/docs/articles/conteo-camara-neubauer.pdf>.

Con los datos obtenidos y haciendo uso del software Excel se construye las gráficas del crecimiento celular, ubicando en el eje de las abscisas el tiempo en días y en el eje de las ordenadas la concentración celular.

2.2.4 Pre-Experimento No. 2. Partiendo del pre-experimento No. 1 y de la evaluación teórica de los residuos descrita en el numeral **2.1.6**, se elige el residuo con el cual se va a continuar y realizar el segundo pre-experimento. Con base en el tratamiento que alcance una mayor concentración celular, se establecen las nuevas relaciones volumétricas, teniendo en cuenta que el volumen del inóculo y del medio permanecerá constantes; variando así en este pre-experimento únicamente la cantidad del residuo para descartar que el aumento en la concentración celular del experimento no fue únicamente influenciado por el foliagro. La experimentación se lleva a cabo en fotobiorreactores adaptados de 1 L y diferentes volúmenes de trabajo, inferiores a 500 mL. Para este pre-experimento se realizan tres réplicas con el fin de revalidar los datos obtenidos.

2.2.4.1 Proporciones suplemento: microalga: medio de cultivo. La selección de las proporciones del suplemento en el medio se fija tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Relaciones de volumen para el montaje de los tratamientos para el pre-experimento número 2.

	Microalga [mL]	Suplemento (Melote) [mL]	Foliagro [mL]	Volumen total de trabajo [mL]
Tratamiento 1	100	200	100	400
Tratamiento 2	100	100	100	300
Tratamiento 3	100	50	100	250

2.2.4.2 Análisis estadístico del Pre-Experimento No. 2. Para realizar el análisis estadístico de pre-experimento No. 2, se tomaron los datos del número de células bajo los mismos parámetros metodológicos de recuento de microorganismos (ver numeral 2.2.3.2).

Para determinar si hay diferencias significativas entre las repeticiones de cada tratamiento y entre los tratamientos se desarrolla un Análisis de varianza "ANOVA" de un factor ya que se comparan varios grupos con una sola variable cuantitativa, tomando como variable independiente la concentración de suplemento y como variable respuesta la concentración celular⁸⁰. Se tiene en cuenta el valor de F con respecto al F crítico y saber así si descartar o no alguna de las muestras. Las hipótesis que se plantean son: H₀: No hay cambios significativos en las

⁸⁰MANJARRÉS POLANIA.,Op. cit., p. 48.

concentraciones celulares; H_1 : Hay cambios significativos en las concentraciones celulares.

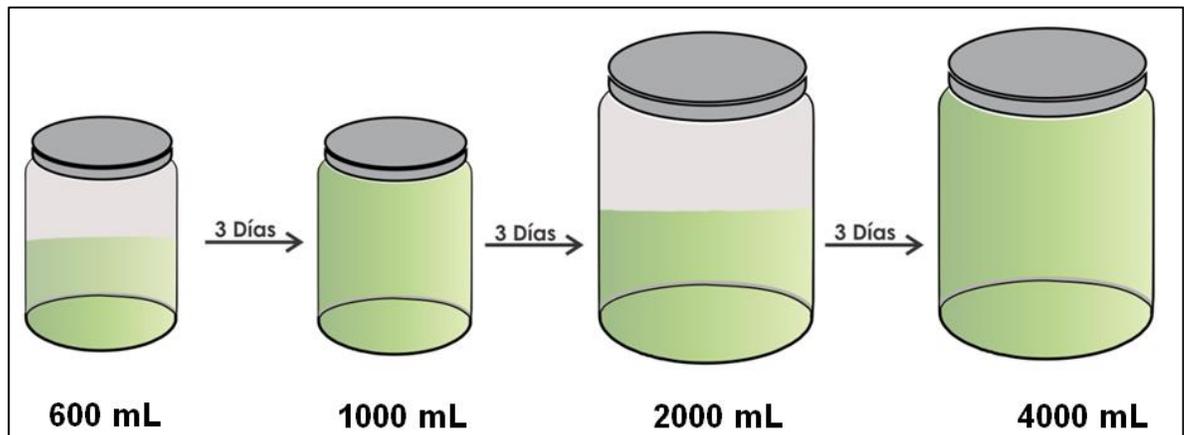
Para la elaboración del ANOVA se hace uso de la herramienta de análisis de datos del software Excel, usando la opción de Análisis de varianza de un factor.

2.3 TERCERA ETAPA

2.3.1 Desarrollo Experimental. El experimento consistió en llevar a volúmenes superiores el mejor resultado obtenido en el pre-experimento No. 2, es decir la proporción 1:1:1 entre microalga, foliagro y melote (ver resultados 3.2.3).

Con dicha relación, se procede a realizar el cultivo en 5 fotobiorreactores adaptados de 1 L, iniciando con un volumen de trabajo de 600 mL, cada tres días se aumenta dicho volumen. Al cabo de los primeros 3 días se lleva del volumen inicial a 1 L, seguido de esto, tres de los recipientes se pasan a tres fotobiorreactores de 4 L y se aumenta su volumen a 2 L cada uno de estos. Nueve días después del inicio de cultivo, se aforan los tres fotobiorreactores a los 4 L de su capacidad. Para el aumento del volumen se agrega únicamente melote y medio de cultivo (foliagro) en una relación 1:1, manteniendo así el tratamiento elegido de los pre-experimentos realizados. (Ver figura 10)

Figura 10. Escalamiento desarrollo experimental.



Además, se cultivó la microalga únicamente con el fertilizante foliagro (sin suplemento) como cultivo de control, para poder determinar la influencia que tiene el suplemento en la producción de biomasa y acumulación de ácidos grasos. El cultivo de control se realiza de igual manera en un fotobiorreactor de 4 L, manejando una relación 1:1 de inóculo y medio de cultivo.

Para el experimento y cada una de sus réplicas, así como para el medio de control se hizo un seguimiento de cultivos por 15 días, única diferencia para el desarrollo

de recuento de microorganismos y elaboración de las curvas de crecimiento expresadas en el numeral **2.2.3.2**.

Se realizó una repetición completa del experimento con cuatro réplicas con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa y así mismo poder extraer más lípidos que en el experimento, donde se obtuvo 0.1 g de grasa para hacer la cromatografía pero no la suficiente para poder hacer una réplica de éste análisis, con esta repetición se busca corroborar los resultados.

Para el cultivo microalgal se manejó la misma relación 1:1 entre el medio de cultivo y suplemento, a diferencia del experimento, se aforaron completamente los biorreactores adaptados sin hacer escalamiento, cada una de las cuatro réplicas se cultivó con 300 mL de inóculo de melote, 1850 mL de medio y 1850 mL de suplemento (melote).

El seguimiento de cultivos se realizó durante 15 días, se realizaron los respectivos conteos celulares para cada reactor de igual manera que el experimento. Con los datos obtenidos se procede a realizar las curvas de crecimiento y el análisis de varianza (ANOVA de un factor) para determinar si hay una diferencia significativa en la toma de datos entre las réplicas y repeticiones del experimento.

2.4 CUARTA ETAPA

2.4.1 Tratamiento de la biomasa. Para el tratamiento de la biomasa se sigue la secuencia mostrada en la figura 11 la cual inicia con el proceso de sedimentación en el cual se retira el sistema de aireación y se deja en reposo los reactores durante 5 días con el fin de obtener la mayor cantidad de biomasa sedimentada por gravedad. Se retira el sobrenadante y la biomasa acumulada en el fondo de los recipientes es centrifugada para separar la humedad que aun tenga esta; para esto se hace uso de una centrifuga marca Fanem con una velocidad de 2800 rpm por un periodo de 10 minutos y una capacidad de centrifugar hasta 8 tubos de 14 mL. Estos procedimientos se realizan en el laboratorio 106 (investigación) de la Fundación Universidad de América.

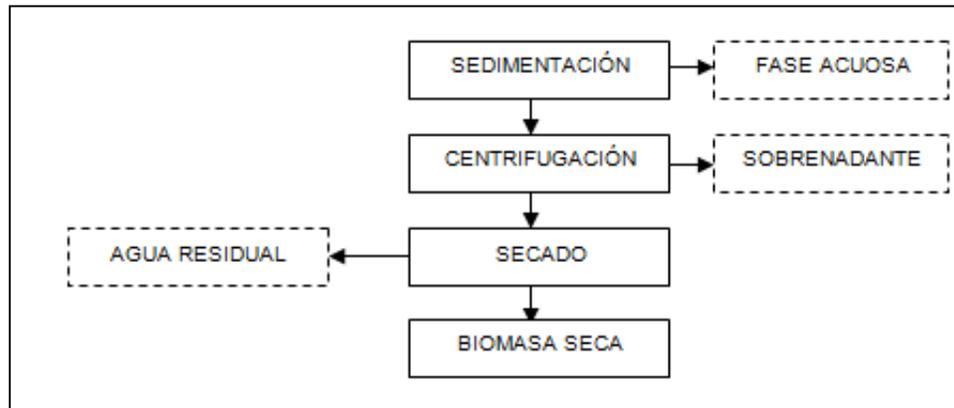
La biomasa que se logre separar es llevada a secado en estufa para retirar al máximo la humedad.

La muestra experimental centrifugada que contiene el residuo seleccionado es llevada al laboratorio de Nutriánálisis⁸¹, empresa colombiana especializada en análisis y ensayos de laboratorio en alimentos balanceados, alimentos de mascotas, aminoácidos, aguas, azúcares, suplementos, entre otros, donde se lleva a cabo el proceso de secado en estufa a 103°C durante 7 horas.

⁸¹NUTRIANALISIS. [En línea]. [Citado el 4 de marzo de 2017]. Disponible en: <<http://www.nutrianalisis.com/servicios/>>

Para la muestra de inóculo/ foliagro, el secado es realizado en una estufa marca Nabertherm ubicada en el laboratorio de investigación de la Fundación Universidad de América; éste procedimiento se realizó a 40°C durante 17 horas.

Figura 11. Diagrama general del tratamiento de la biomasa.



2.4.1.1 Tratamiento de la biomasa para la repetición del experimento. Se dejó sedimentar el cultivo durante 3 días, se retiró el sobrenadante de cada uno de los fotobiorreactores y el restante se centrifugó a 2800 rpm durante 10 minutos y así poder separar la biomasa obtenida del medio de cultivo.

El secado de la biomasa se realizó en las instalaciones de la Universidad de América en un horno de marca Nabertherm a 40°C durante 10 horas para las cuatro muestras y así poder disminuir a un 80% la humedad para poder realizar la extracción de los lípidos utilizando la metodología de Bligh & Dyer⁸², los datos resultantes de biomasa seca fueron anotados y una de las muestras fue dejada en el horno por 7 horas más (total: 17 horas) para poder compararla con el blanco (cultivo sin suplemento, únicamente Foliagro) que se secó bajo las mismas condiciones.

2.4.2 Extracción ácidos grasos. El método utilizado para la extracción de los ácidos grasos es el Bligh & Dyer⁸³, debido a que es un método fácil, rápido y eficiente. Éste proceso consiste en la homogeneización mediante agitación magnética a 800 rpm, de la biomasa con una mezcla de metanol cloroformo en proporción 2:1, seguido de la adición de cloroformo y homogeneización durante 30 s, con posterior adición de agua y homogeneización durante 30 s adicionales, seguido a esto; se realiza una filtración y una centrifugación; después de la cual se separan las fases de metanol y cloroformo, y se remueve el cloroformo por

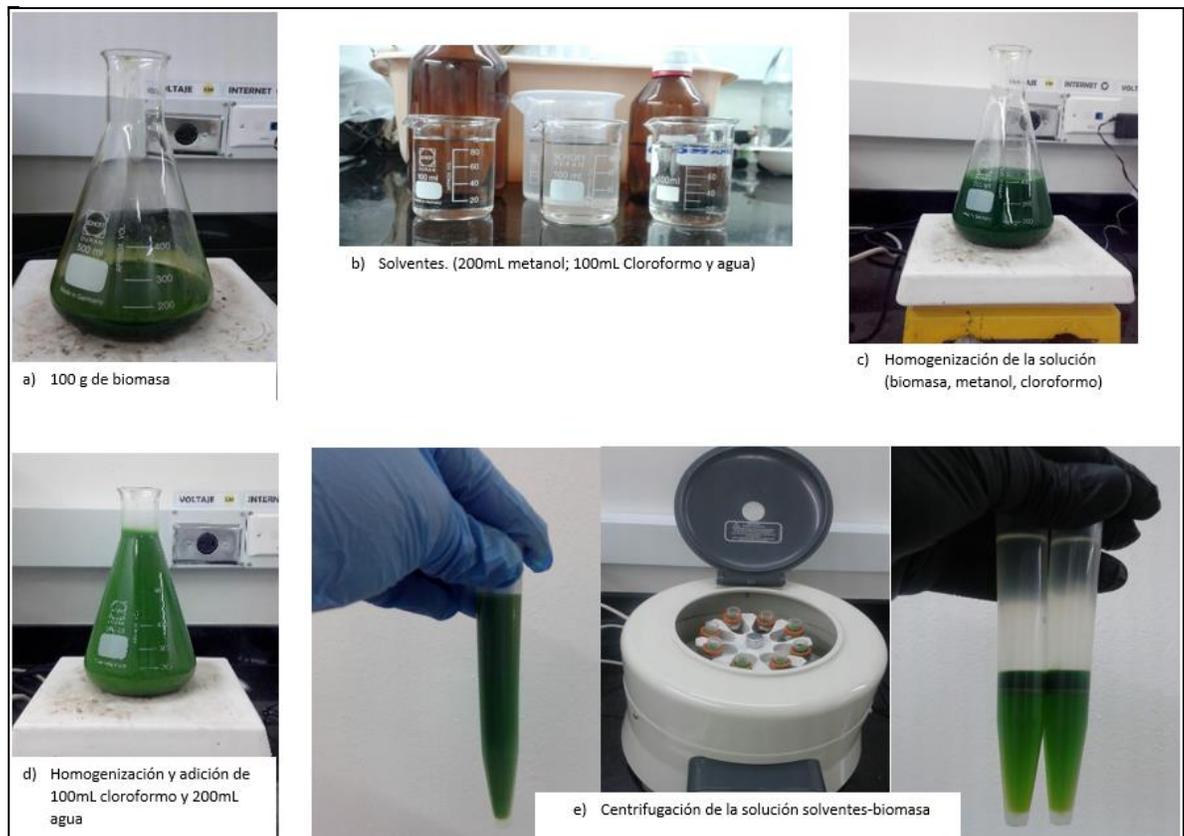
⁸²BLIGH, E., DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. En Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Vol. 37. No. 8.(1959) p. 912

⁸³Ibid., p. 912.

evaporación⁸⁴. Finalmente se determina la cantidad de lípidos extraídos haciendo uso de una balanza gravimétrica.

El proceso detallado anteriormente se puede observar en la figura 12.

Figura 12. Extracción de ácidos grasos.



2.4.1.2 Extracción por solventes para la repetición del experimento. En un Erlenmeyer se pesaron 100 g de biomasa húmeda, cantidad para la cual, de acuerdo con la metodología de Bligh & Dyer, se utilizan 100 mL de cloroformo y 200 mL de metanol.

Primero, la biomasa se homogenizó en una plancha de calentamiento y agitación magnética, con 100 mL de cloroformo y 200 mL de metanol durante 2 minutos. Posteriormente se agregó 100mL de cloroformo y se homogenizó nuevamente la mezcla durante 30 s, acabado dicho tiempo, se agrega a la mezcla 200 mL de agua y se continúa homogenizando por otros 30 s.

⁸⁴ TEJADA, L., *et al.* Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. en: Revista facultad de ingeniería. Vol. 24. No. 39, (2015) p. 47.

Los 600 mL homogenizados, se centrifugan a 2800 rpm durante 10 minutos para poder separar la fase que contiene los lípidos extraídos de los solventes y los residuos de biomasa.

Los lípidos se encuentran disueltos en gran cantidad de cloroformo, por lo cual es necesario evaporar el solvente para poder obtener únicamente la fase lipídica. La evaporación se realiza en la empresa Sigra S. A en un rotoevaporador marca Bucci a una temperatura de 60°C.

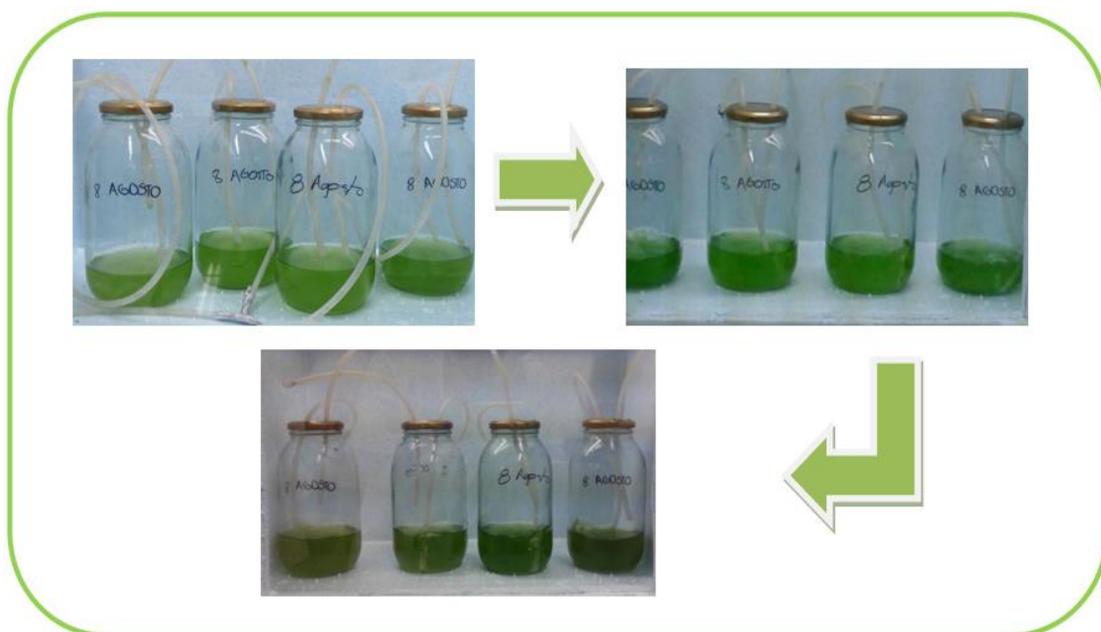
2.4.3 Perfil de ácidos grasos. Una vez extraído el aceite microalgal es llevado al departamento de investigación de la empresa Sigra s. a, en donde se realiza la separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos por medio de una cromatografía de gases. El equipo utilizado es un cromatógrafo marca Autosystem Gas Chromatographic Perkin Elmer, columna SP(TM)-2340 Supelco, haciendo uso de una técnica AOCS.

3. RESULTADO Y ANÁLISIS

3.1 PRIMERA ETAPA

3.1.1 Producción de biomasa inicial. El crecimiento y adaptación de la microalga en el medio de cultivo se hace evidente con el cambio de color, inicialmente el cultivo tiene un color verde claro, donde las células inician un proceso de adaptación y asimilación de los nutrientes del medio, al cabo de 30 días, el color del cultivo se torna de un verde mucho más oscuro y hay una disminución en el volumen (ver figura 13) , esto debido al consumo del medio una vez adaptada la microalga a las condiciones de cultivo, lo cual muestra que el fertilizante foliar es adecuado para el crecimiento microalgal. Periódicamente se fue suministrando medio de cultivo para realizar el escalamiento hasta llegar a un volumen de 4 L y finalmente obtener una concentración de 1×10^6 Cel/mL.

Figura 13. Biomasa inicial.



3.1.2 Pre-selección teórica. Para el desarrollo de éste proyecto se tuvieron en cuenta cuatro residuos generados de la industria panelera; se pre-seleccionaron dos, evaluando diferentes parámetros expuestos en el numeral 2.1.6 en el cuadro 5. El puntaje que se le da a cada parámetro, se realizó en base a la experiencia de los trabajadores de la finca el refugio ubicada en la vereda de Copó, Tocaima, Cundinamarca, además de asesores técnicos de la Federación Nacional de Productores de Panela (Fedepanela), y la experiencia personal manipulando los residuos en el desarrollo de la presente investigación. La comparación de los residuos y su respectiva calificación se muestra en la tabla 5

Tabla 5. Evaluación de las fuentes de Carbono.

Residuo	Parámetros				Total
	A	B	C	D	
Melote	10	10	10	10	40
Melado	1	5	10	1	17
Cachaza	10	1	1	5	17
Agua del lavado de las Gaveras	10	10	5	5	30

Donde A: Precio, B: Disponibilidad, C: Conservación, D: Otros usos.

Teniendo en cuenta que se busca obtener la mayor calificación, los residuos que se eligieron fueron el melote y agua del lavado de las gaveras.

El melado fue descartado debido a que es fuente de consumo humano, además de su poca disponibilidad, ya que el objetivo de la industria panelera es la solidificación de las mieles buscando la menor cantidad de residuos en éstas. Así mismo se descartó la cachaza debido a su conservación, que hace referencia a la manipulación de este residuo, por su alto contenido de microorganismos se fermenta rápidamente; además su disponibilidad es muy poca, pues es utilizado para la elaboración del melote en un proceso de cocción.

Los residuos elegidos para el pre-experimento fueron el melote y el agua del lavado de las gaveras. Del melote que es el residuo mejor calificado, es importante resaltar que su nivel de conservación es sencillo ya que sólo requiere de refrigeración debido a que proviene de un proceso de cocción, donde se elimina la presencia de microorganismos disminuyendo que la probabilidad de que se fermente en el cultivo microalgal. En cuanto al agua del lavado de las gaveras, a pesar de ser reintegrado al proceso en ocasiones, no es de gran aplicación, en los trapiches locales, es utilizada para regar los cultivos de caña, pero siempre y cuando estas sean frescas (que no se hayan dejado reposar).

3.2 SEGUNDA ETAPA

3.2.1 Pre-tratamiento del melote y preparación del inóculo. Se realizó una prueba preliminar con la fuente de carbono que obtuvo mayor puntaje en la evaluación del inciso anterior debido a que el color y la textura de éste residuo es muy oscura y viscosa (figura 14), lo cual podría afectar el cultivo microalgal haciéndolo turbio e impidiendo el paso de luz afectando el proceso metabólico de las células.

Figura 14. Melote.



El uso del melote sin una previa filtración en esta prueba dio lugar a la generación de espuma y unas partículas fibrosas que no hacían parte del desarrollo del cultivo (ver figura 15). De igual manera la agitación sacó a relucir pequeños desechos como bagacillo y abejas que se encontraban en el melote. El crecimiento celular se vio afectado ya que el cultivo tuvo un cambio en la coloración, de verde pasó a un color gris.

Figura 15. Preparación del inóculo.



Para evitar la presencia de partículas fibrosas no deseadas en el cultivo y disminuir la turbidez del mismo, se realiza un pre-tratamiento al melote como se

describió en la metodología; resaltando la filtración realizada la cual observamos el resultado en la figura 16 presentada a continuación. En la imagen, se muestra el melote diluido el cual antes del filtrado tiene un color café oscuro y al ser filtrado toma un color amarillo.

Figura 16. Filtración del melote.



3.2.2 Pre-experimento No. 1. Para el desarrollo del pre-experimento se decidió el melote y el agua del lavado de las gaveras, ya que con el pre-experimento cualitativo se pudo observar que, a pesar de la contaminación evidenciada en el cultivo con melote como suplemento, el color permaneció verde oscuro la mayor parte del tiempo que estuvo cultivado.

Los cultivos se realizaron de acuerdo con la metodología expresada y a cada uno de estos se les realizó un seguimiento, expresado en los conteos celulares. A continuación, se muestra los conteos promedio para cada uno de los residuos y su respectiva curva de crecimiento, en el Anexo A se encuentra detalladamente los seguimientos de cultivo de cada uno de los tratamientos, para cada una de las réplicas y sus respectivas curvas de crecimiento.

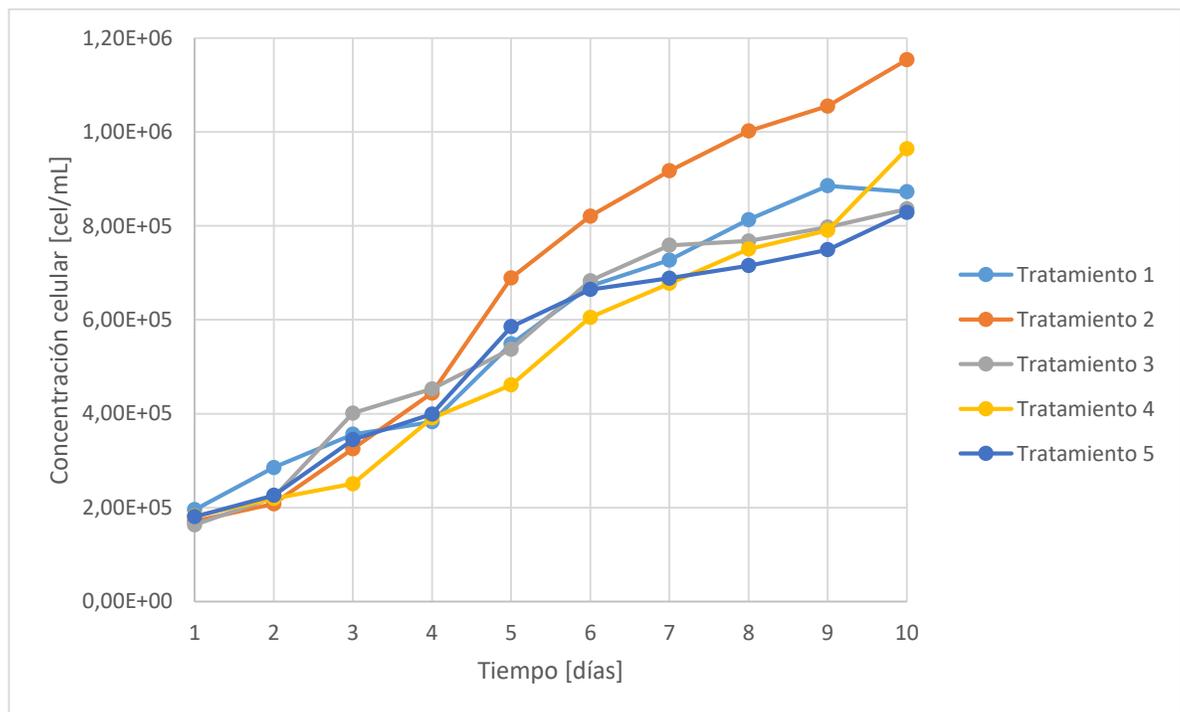
En el pre-experimento con melote se observó que la concentración inicial más baja fue la del tratamiento 3: $1,63 \times 10^5$ Cel/mL y la más alta la del tratamiento 1: $1,95 \times 10^5$ Cel/mL. La fase de adaptación ocurrió entre los días uno y dos, y luego se nota un crecimiento exponencial en todos los recipientes sin evidenciar la fase estacionaria, ni de muerte, a excepción del tratamiento 1 que se observa una disminución en la concentración. (Ver gráfica 2).

En el día cuatro se hacen notorio el crecimiento celular acelerado que ocurre en el tratamiento dos con respecto a los otros, siendo éste el que mayor crecimiento obtuvo hasta el día diez ($1,15 \times 10^5$ Cel/mL). (Ver gráfica 2).

Tabla 6. Crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]				
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
1,95	1,71	1,63	1,82	1,81
2,85	2,08	2,22	2,19	2,26
3,56	3,25	4,01	2,51	3,45
3,83	4,44	4,53	3,91	3,99
5,49	6,89	5,37	4,61	5,85
6,72	8,21	6,83	6,05	6,65
7,27	9,17	7,59	6,77	6,89
8,13	10,0	7,68	7,51	7,15
8,85	10,6	7,97	7,91	7,49
8,73	11,5	8,36	9,64	8,29

Gráfica 2. Curva de crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando melote como suplemento.



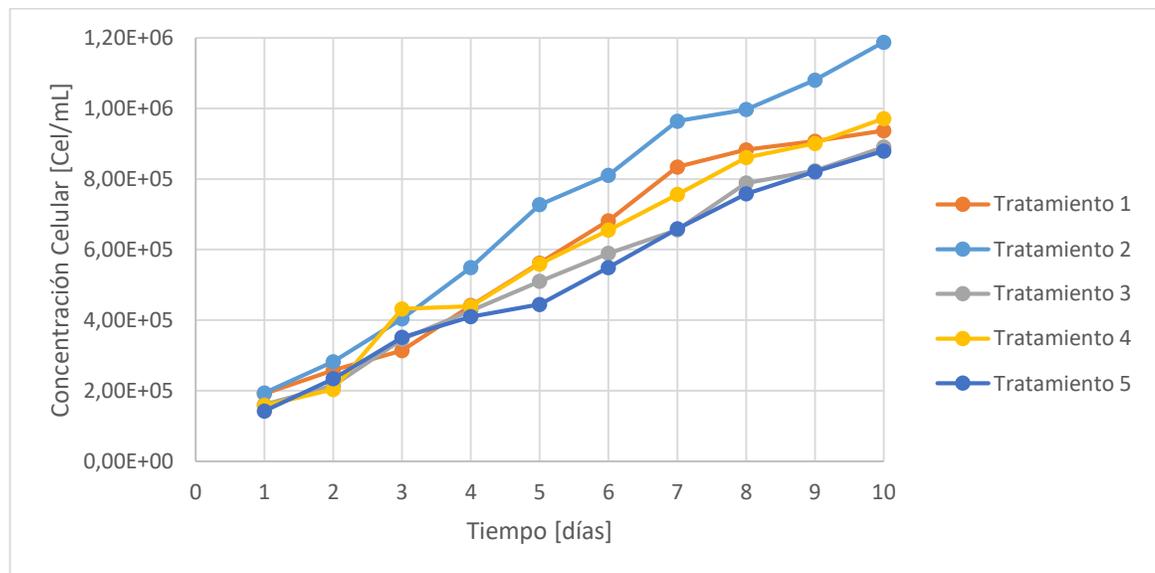
Al utilizar el agua del lavado de las gaveras como suplemento se evidencia que la concentración inicial más baja es la del tratamiento 5, y la más alta, la del tratamiento 2 al igual que al usar melote como suplemento, $1,43 \times 10^5$ Cel/mL y $1,94 \times 10^5$ Cel/mL respectivamente. La fase de adaptación es la misma que la del

melote y así mismo el comienzo del crecimiento exponencial. Contrario al pre-experimento realizado con melote, desde un principio es notorio el crecimiento celular del tratamiento 2 con relación a los otros, llegando al día diez con la mayor concentración celular ($1,19 \times 10^6$ Cel/mL) lo cual indica el potencial que puede tener este residuo como suplemento. (Ver grafica 3).

Tabla 7. Crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]				
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
1,92	1,94	1,61	1,58	1,43
2,58	2,83	2,15	2,04	2,34
3,14	4,04	3,46	4,32	3,51
4,41	5,49	4,27	4,39	4,10
5,62	7,27	5,10	5,59	4,45
6,82	8,11	5,89	6,55	5,49
8,34	9,64	6,56	7,56	6,59
8,83	9,97	7,89	8,61	7,58
9,07	10,8	8,23	9,01	8,21
9,37	11,9	8,91	9,71	8,79

Gráfica 3. Curva de crecimiento celular promedio de las tres réplicas para cada uno de los tratamientos utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

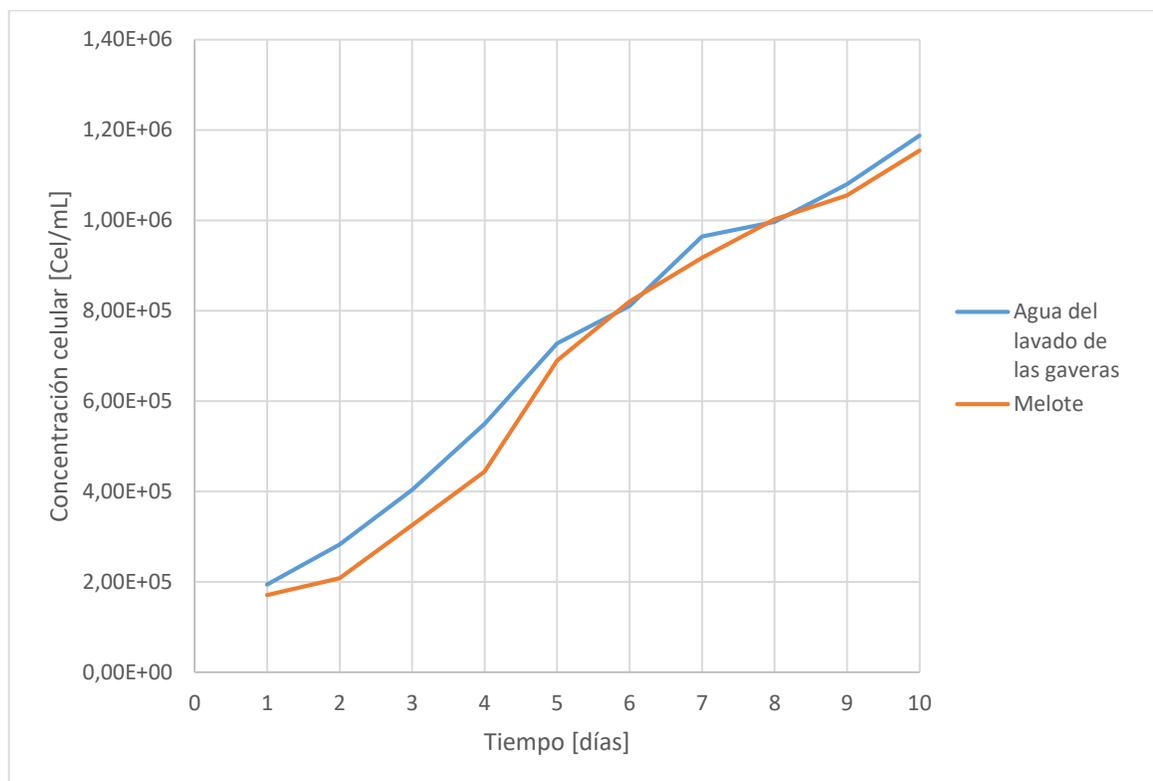


Para el pre-experimento realizado con ambos residuos, el tratamiento cinco fue el que presentó menor concentración celular. Las respectivas gráficas (2 y 3) de estos tratamientos, evidencian que la fase de adaptación de la microalga es más demorada y su fase exponencial no supera los cuatro días.

Con el fin de evaluar el efecto de cada una de las concentraciones trabajadas, se elige la que mejor adaptación y crecimiento obtuvo con cada uno de los residuos utilizados. En este caso los resultados coinciden ya que como se mencionó anteriormente el tratamiento que obtuvo mayor crecimiento fue el dos, tanto con el melote como el agua del lavado de las gaveras. Sin embargo, entre éstos dos hubo un crecimiento mayor en el del agua de las gaveras diferenciándose por $3,07 \times 10^4$ Cel /mL.

Al existir crecimiento con los dos residuos evaluados y al no presentarse una diferencia significativa entre estos (gráfica 4), se recurrió nuevamente al análisis de la tabla 5 haciendo relevancia específicamente a la conservación, presentándose mayor dificultad con el trato, transporte y conservación del agua del lavado de las gaveras debido a su alto contenido de microorganismos que facilitan la fermentación en este residuo.

Gráfica 4. Comparación curvas de crecimiento celular entre el tratamiento 2 utilizando melote y agua del lavado de las gaveras.



Por lo anterior, se elige el melote para continuar con la experimentación, dejando fijo el volumen de foliagro (100 mL) y basados en la relación volumétrica 1:1 del tratamiento 2 que mostró la mayor concentración celular con el fin de descartar así la posibilidad de que el aumento en la concentración celular no es influenciado únicamente por el medio de cultivo.

3.2.3 Pre-experimento No. 2. El tratamiento 2, el cual se cultivó en una relación 1:1, nuevamente fue el que presentó una mayor concentración celular, alcanzando en promedio $1,15 \times 10^6$ Cel/mL. De acuerdo con la gráfica 5 se puede ver que el tratamiento 1 fue el que alcanzó una menor concentración celular ($7,37 \times 10^5$ Cel/mL) esto debido a que cuando hay exceso de la fuente orgánica se puede presentar una inhibición en el crecimiento⁸⁵, en este caso al cultivarse con más melote que medio de cultivo se saturó de fuente de carbono. Por otra parte el tratamiento 3, gráficamente es el único en el que se observa que su fase exponencial termina al cabo de nueve días de experimentación, sin embargo, alcanzó una mayor concentración celular promedio que el tratamiento 1, superándolo en $2,27 \times 10^4$ Cel/mL.

En el anexo B se encuentra detalladamente el seguimiento de cultivos, concentración celular y curvas de crecimiento del pre-experimento No. 2.

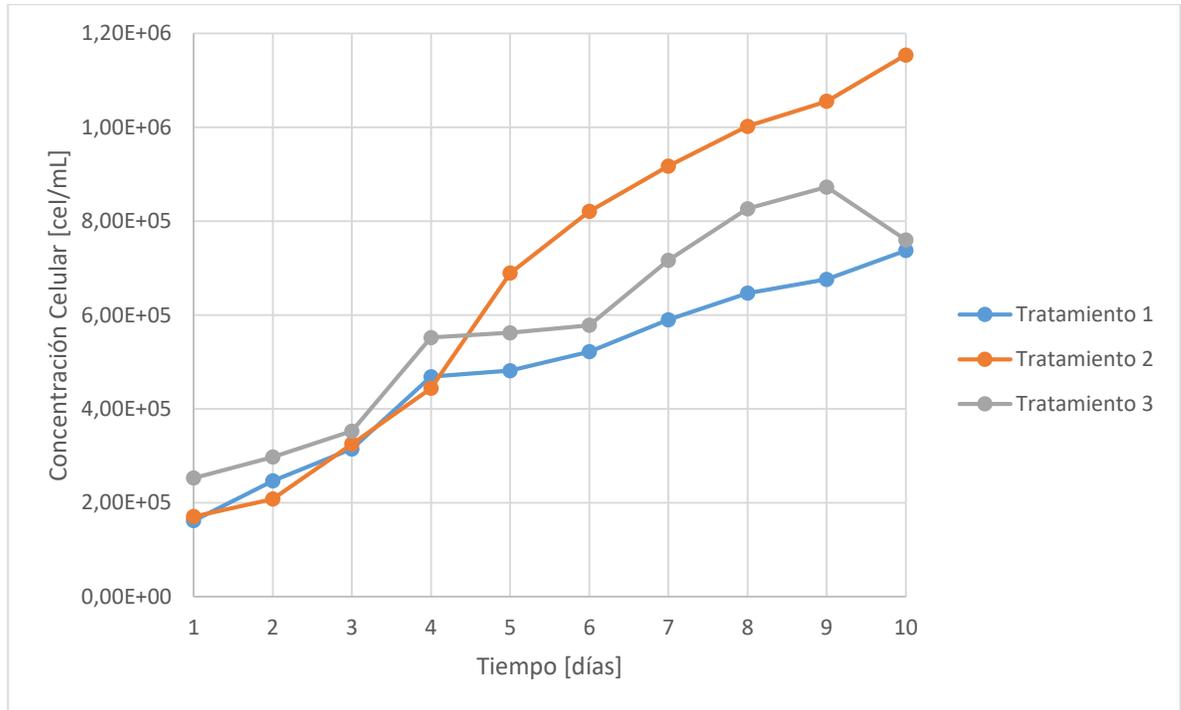
Por lo anterior mencionado, de este pre-experimento se elige la relación 1:1 entre suplemento y medio de cultivo para evaluar su crecimiento en un fotobiorreactor adaptado de mayor volumen, y así mismo, extraer de éste los lípidos que permitan evaluar la influencia del suplemento en la acumulación de lípidos.

Tabla 8. Concentración celular promedio para cada uno de los tratamientos.

Concentración celular [Cel/mL]		
[x10 ⁵]		
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
1,62	1,71	2,53,
2,47	2,08	2,97
3,15	3,25	3,53
4,69	4,44	5,52
4,81	6,89	5,62
5,22	8,21	5,78
5,90	9,17	7,17
6,47	10,0	8,27
6,76	10,6	8,73
7,37	11,5	7,60

⁸⁵PEREZ-GARCIA, O., et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Op. cit., p. 15.

Gráfica 5. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del pre-experimento No. 2.



Para determinar si hay diferencias significativas entre las réplicas de cada tratamiento en el pre-experimento, se realizó un análisis de varianza de un factor, teniendo como variable dependiente la concentración celular y como variable independiente el volumen de suplemento en cada tratamiento; la hipótesis nula H_0 plantea que no hay cambios significativos en las concentraciones celulares; la hipótesis alterna H_1 por el contrario plantea: Hay cambios significativos en las concentraciones celulares.

En las tablas 9, 10, 11 se muestra los resultados obtenidos para cada tratamiento. Tabla 9. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 1.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,826E+10	2	1,913E+10	0,5027	0,610	3,35413
Dentro de los grupos	1,0274E+12	27	3,8052E+10			
Total	1,0657E+12	29				

Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en las concentraciones celulares de cada réplica en

los cultivos del tratamiento 1, descartando así cualquier error humano en el conteo de microorganismos.

Tabla 10. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 2.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,0614E+11	2	5,3071E+10	0,3811	0,687	3,3541
Dentro de los grupos	3,76E+12	27	1,3926E+11			
Total	3,8662E+12	29				

Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en las concentraciones celulares de cada réplica en los cultivos del tratamiento 2, descartando así cualquier error humano en el conteo de microorganismos.

Tabla 11. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento 3.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	746666667	2	373333333	0,0075	0,992	3,3541
Dentro de los grupos	1,3371E+12	27	4,9522E+10			
Total	1,3378E+12	29				

Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en las concentraciones celulares de cada réplica en los cultivos del tratamiento 3, descartando así cualquier error humano en el conteo de microorganismos.

3.3 TERCERA ETAPA

3.3.1 Desarrollo experimental. Se realizó el montaje en cuatro fotobiorreactores adaptados con la relación 1:1 seleccionada en el pre-experimento número dos y bajos las condiciones establecidas. En uno de los reactores fue cultivado el blanco (cultivo control) y en los tres restantes (tres réplicas del experimento) se cultivó la microalga en medio de cultivo y suplemento. Durante un periodo de quince días se realizó el seguimiento de cultivos mediante la cámara de Neubauer y un microscopio binocular para las tres réplicas y el cultivo de control. En el Anexo C se encuentra el seguimiento de cultivos y las respectivas gráficas de crecimiento celular.

Para determinar si hay diferencias significativas entre las réplicas del experimento, se realizó un análisis de varianza de un factor, teniendo como variable dependiente la concentración celular y como variable independiente el volumen de suplemento del tratamiento; la hipótesis nula H_0 plantea que no hay cambios significativos en las concentraciones celulares; la hipótesis alterna H_1 por el contrario plantea: Hay cambios significativos en las concentraciones celulares.

Mediante la tabla 12 se muestra el análisis de varianza de un factor para las tres réplicas del experimento.

Tabla 12. Análisis de varianza de un factor para las réplicas del experimento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,1982E+10	2	1,5991E+10	0,3540	0,704	3,2199
Dentro de los grupos	1,8972E+12	42	4,5171E+10			
Total	1,9292E+12	44				

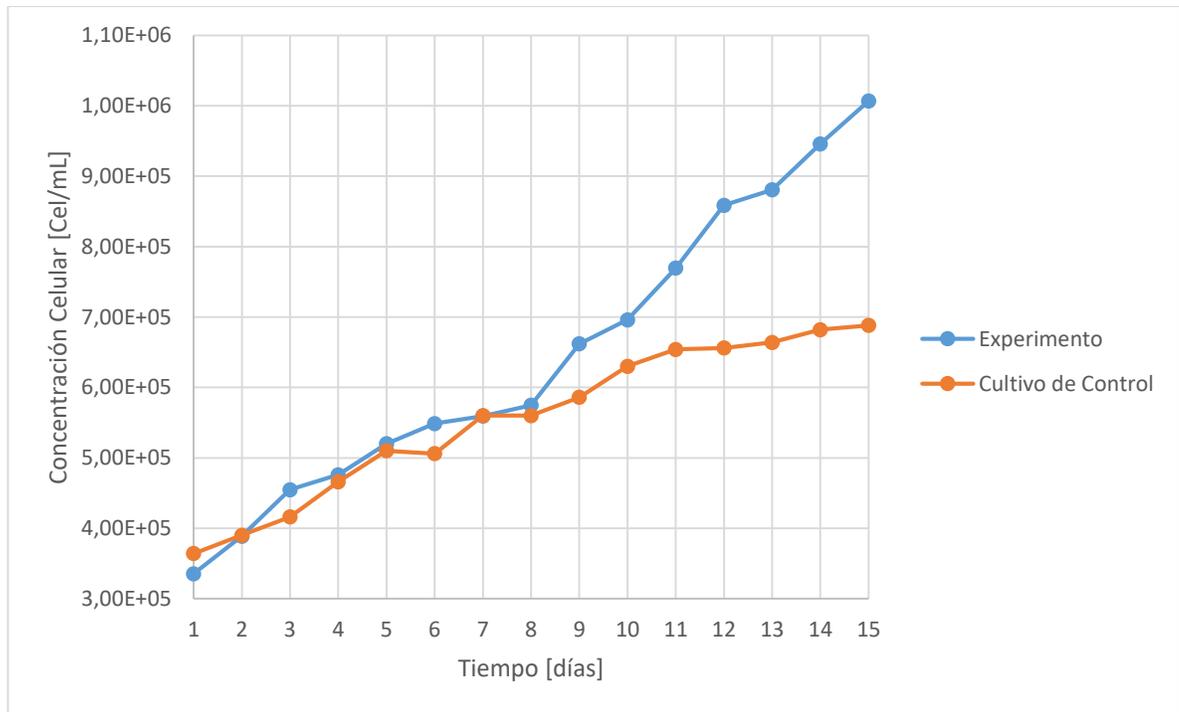
Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en las concentraciones celulares de cada réplica en los cultivos del experimento y poder así construir la gráfica 4 utilizando el crecimiento celular promedio de las tres réplicas ya que la diferencia no es significativa y analizar así la influencia del suplemento en el crecimiento celular comparado con el cultivo de control.

En la gráfica 6, es visible que el cultivo de control tarda más en adaptarse al cultivo y la que menor concentración celular alcanza. En cuanto al cultivo suplementado con melote, se ve que inicia su fase exponencial prematuramente manteniéndola incluso hasta el final del experimento. La concentración celular promedio máxima alcanzada en el cultivo utilizando melote como fuente de carbono es de $1,01 \times 10^6$ Cel/mL, algo menor a la máxima obtenida en los pre-experimentos realizados con esta relación de volumen.

Es posible determinar que existe influencia del melote como suplemento en el crecimiento celular, pues, al cabo de los quince días supera en $3,19 \times 10^5$ Cel/mL al cultivo de control, sin embargo, la influencia no es tal como la del Glicerol, reportada en el trabajo de investigación de Manjarrés y Muñoz⁸⁶, quienes utilizaron dicha fuente orgánica como suplemento de cultivo, reportando una concentración celular máxima promedio de $2,35 \times 10^7$ Cel/mL.

⁸⁶MANJARRÉS POLANIA., Op. cit., p. 58.

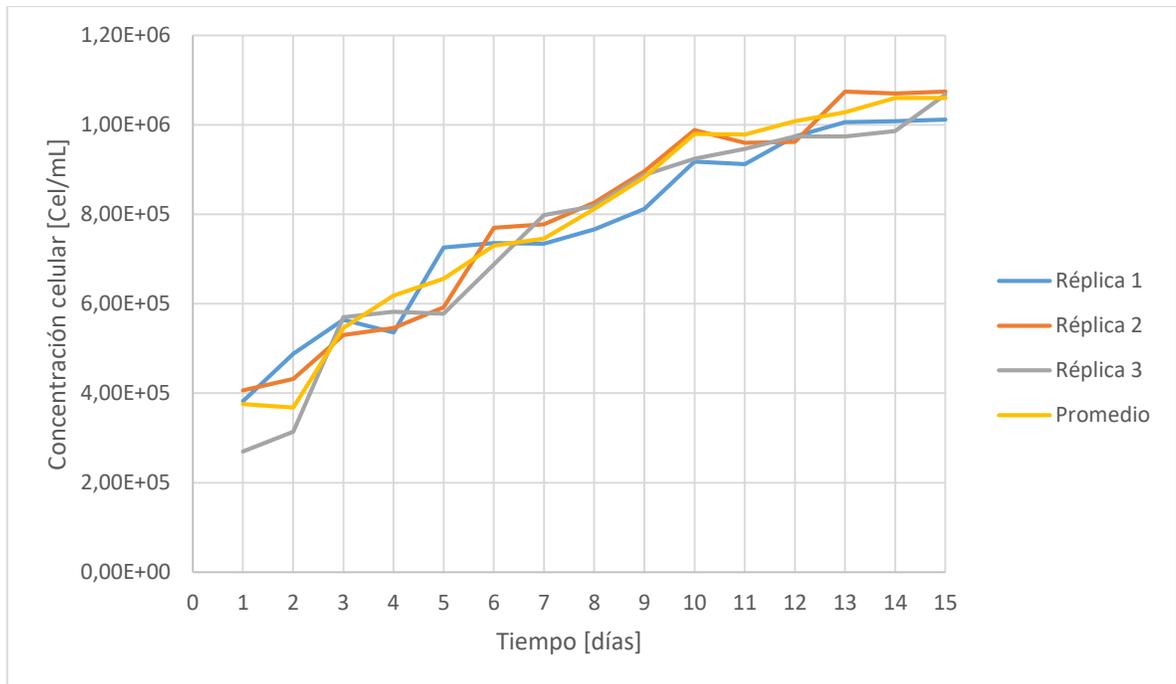
Gráfica 6. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del experimento y el cultivo de control.



3.3.1.1 Repetición del Experimento. De las cuatro réplicas realizadas en la repetición del experimento se alcanzó una concentración celular máxima de 1.07×10^6 Cel/mL, concentración a la cual llegaron dos de los cultivos, por otra parte la concentración mínima obtenida fue de 1.01×10^6 Cel/mL obtenida en la réplica 1 al cabo de los 15 días de seguimiento de cultivo. En el Anexo C se muestra detalladamente los datos obtenidos durante el seguimiento de cultivos, las respectivas concentraciones celulares.

En esta repetición, a diferencia del experimento, se pudo observar (gráfica 7) que al cabo de 13 días de cultivo se llegaba a una fase estacionaria para tres de las réplicas, la restante al cabo de los 15 días de experimentación continuaba su fase exponencial.

Gráfica 7. Curvas de crecimiento celular de las réplicas de la repetición del experimento.



Comparando los resultados obtenidos en la experimentación y la repetición, en la repetición se obtuvieron mayores concentraciones celular al cabo de 15 días pero no la concentración máxima alcanzada. Para poder comparar los resultados obtenidos se utiliza el promedio de las concentraciones celulares.

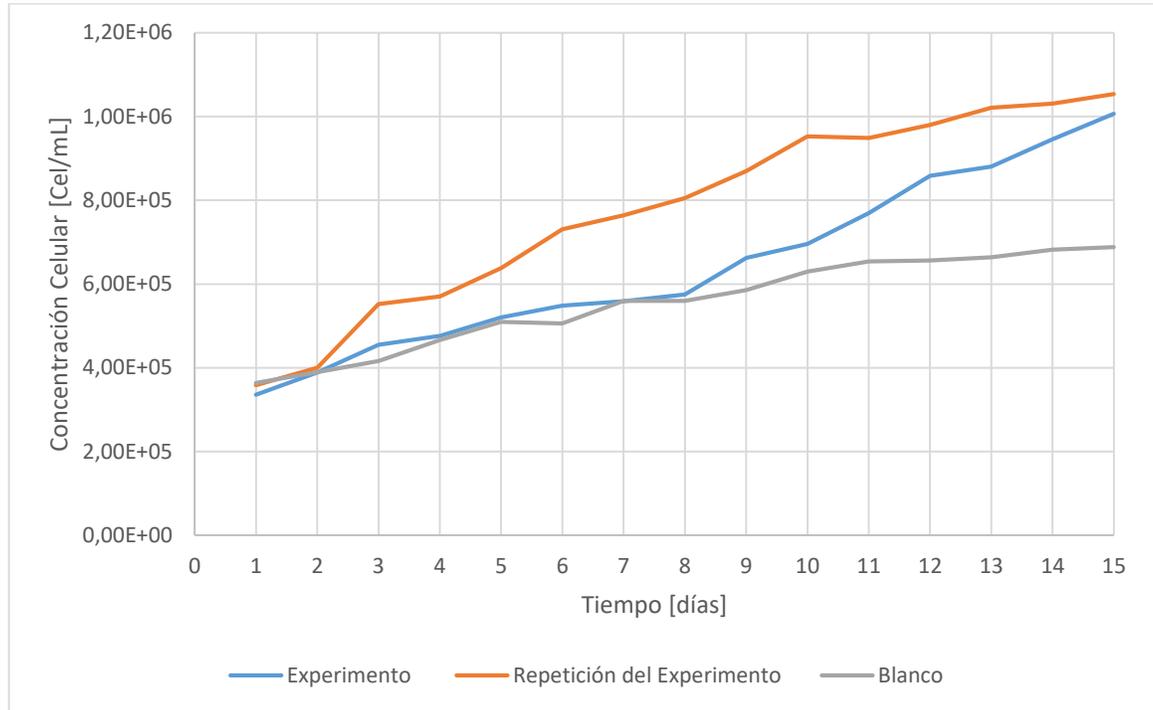
Como se puede ver en la gráfica 8, en la repetición del experimento se alcanzó una mayor concentración celular y por lo tanto mayor acumulación de biomasa. Además es posible ver que las fases de adaptación son diferentes, el tiempo de asimilación de nutrientes del experimento es similar al del cultivo de control (8 días) por el contrario, la repetición del experimento tarda menos en la adaptación (4 días) y su fase de crecimiento exponencial por lo tanto fue de mayor tiempo.

Comparando las concentraciones celulares del experimento con el blanco hay una diferencia de $3,19 \times 10^5$ Cel/mL, y comparando la repetición del experimento con el blanco la diferencia es de $3,66 \times 10^5$ Cel/mL. Es decir en el experimento se obtuvo hasta un 46% de células por mililitro y en la repetición un 53% más a comparación del blanco, confirmando la influencia del melote como suplemento con respecto al cultivo de control.

Las diferencias en las concentraciones celulares entre el experimento y la repetición, se pueden atribuir al escalamiento que se realizó en el experimento puesto que cada vez que se iba aumentando el volumen hasta aforar la capacidad

del fotobiorreactor se iba diluyendo la concentración con el medio de cultivo y el suplemento, mientras que en la repetición, el volumen inicial fue el volumen total de los reactores.

Gráfica 8. Comparación curvas de crecimiento celular promedio del experimento, repetición del experimento y el cultivo de control.



Para determinar si hay diferencias significativas entre las réplicas del experimento, se realizó un análisis de varianza de un factor, teniendo como variable respuesta la concentración celular; la hipótesis nula H_0 plantea que no hay cambios significativos en las concentraciones celulares; la hipótesis alterna H_1 por el contrario plantea: Hay cambios significativos en las concentraciones celulares.

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13. Análisis de varianza de un factor para las réplicas de la repetición del experimento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,2052E+10	3	4017244444	0,0740	0,974	2,7694
Dentro de los grupos	3,038E+12	56	5,4249E+10			
Total	3,05E+12	59				

Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, razón por la cual se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en las concentraciones celulares de cada réplica realizada.

3.4 CUARTA ETAPA

3.4.1 Tratamiento de la biomasa. Se siguió el procedimiento descrito en la metodología; en el cual el primer paso consistió en dejar sedimentar durante 10 días el cultivo realizado, se sacó el agua sobrante y se centrifugó, con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua y recuperar al mismo tiempo la mayor cantidad de biomasa.

Se realizó el anterior procedimiento tanto al blanco como a la relación de mayor crecimiento (1:1), sin embargo de éste último solo se hizo el tratamiento de la biomasa de la réplica 2 y 3; debido a que la 1, al quitar la agitación durante 10 días para dejar sedimentar el cultivo, hubo una falta de oxígeno y se ocasionó una contaminación reflejada en el color grisáceo-café y un mal olor.

En la tabla 14 se muestran la cantidad de biomasa húmeda resultante del proceso de centrifugación. En el blanco la biomasa húmeda se envasó en dos capsulas y al finalizar se mezcló obteniendo un valor total de 56,633 g, en cuanto a la biomasa húmeda obtenida para la relación 1:1 se mezcló con el fin de obtener una cantidad significativa (288,03 g) para ser llevada al laboratorio Nutriánálisis s.a.

Tabla 14. Cantidades de biomasa obtenida por volumen de muestra.

	RELACIÓN 1:1		
	BLANCO	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3
Volumen total de la muestra (mL)	3800	3800	3800
Volumen total de muestra centrifugada (mL)	950	940	900
Peso cápsula (g)	52,08	53,51	207,99
Peso capsula + biomasa húmeda (g)	81,11	81,11	410,04
Peso biomasa húmeda (g)	29,03	27,60	202,05

Una vez obtenida la biomasa húmeda, se procede a hacer el secado en estufa, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de ácidos grasos.

En la tabla 15 se expresa la cantidad de biomasa seca y porcentaje de humedad obtenido para cada muestra haciendo uso de la ecuación 2 y 3 respectivamente.

Ecuación 2. Porcentaje de materia seca

$$\text{Porcentaje de materia seca} = \frac{\text{Biomasa seca obtenida (g)}}{\text{Biomasa húmeda obtenida (g)}} * 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de humedad

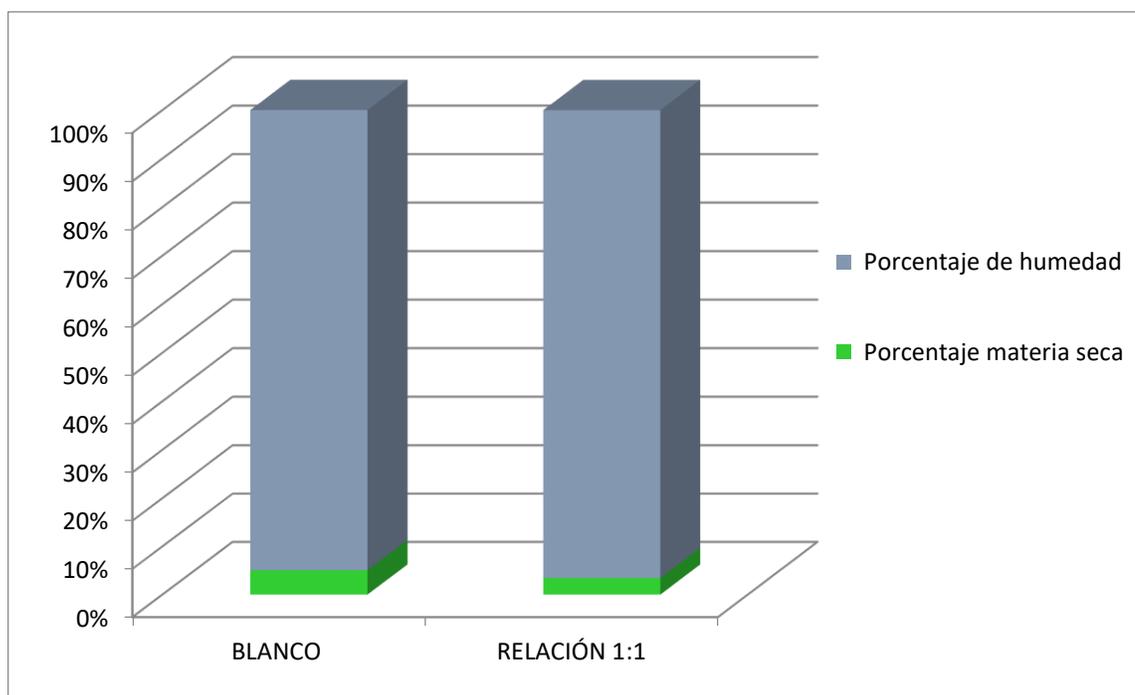
$$\text{Porcentaje de Húmedad} = 1 - \text{porcentaje de materia seca}$$

Tabla 15. Porcentaje de biomasa seca.

	BLANCO	RELACIÓN 1:1
Biomasa húmeda total (g)	56,63	202,05
Biomasa seca total (g)	2,86	6,95
Porcentaje materia seca (%)	5,05	3,44
Porcentaje de humedad (%)	94,95	96,54

La gráfica 9 muestra el porcentaje de humedad para la relación 1:1, como para el blanco, siendo éste bastante alto para ambos casos 96,56% y 94,95% respectivamente.

Gráfica 9. Humedad y biomasa seca del experimento (relación 1:1) y del cultivo de control.



3.4.1.1 Tratamiento de la biomasa para la repetición del experimento. El tratamiento de la Biomasa para la repetición del experimento se realizó de la misma manera que para el experimento principal; sin embargo, de éste último se contaminó la réplica 1 por el tiempo que se dejó en ausencia de agitación para inducir la sedimentación, se decide dejar la repetición del experimento 3 días para prevenir pérdidas de cultivo.

En la tabla 16 se muestra el volumen resultante después de haber dejado sedimentar los cultivos y haber sacado el sobrenadante, así mismo, se observa el volumen centrifugado de cada una de las réplicas y la cantidad de biomasa húmeda obtenida.

Tabla 16. Cantidades de biomasa obtenida por volumen de muestra de cada réplica de la repetición del experimento.

	RELACIÓN 1:1			
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4
Volumen total de la muestra (mL)	3800	3800	3800	3800
Volumen total de muestra centrifugada (mL)	2800	3700	3200	3590
Peso cápsula (g)	65,68	83,56	79,53	76,50
Peso capsula + biomasa húmeda (g)	117,06	163,29	170,27	168,35
Peso biomasa húmeda (g)	51,37	79,73	90,74	91,85

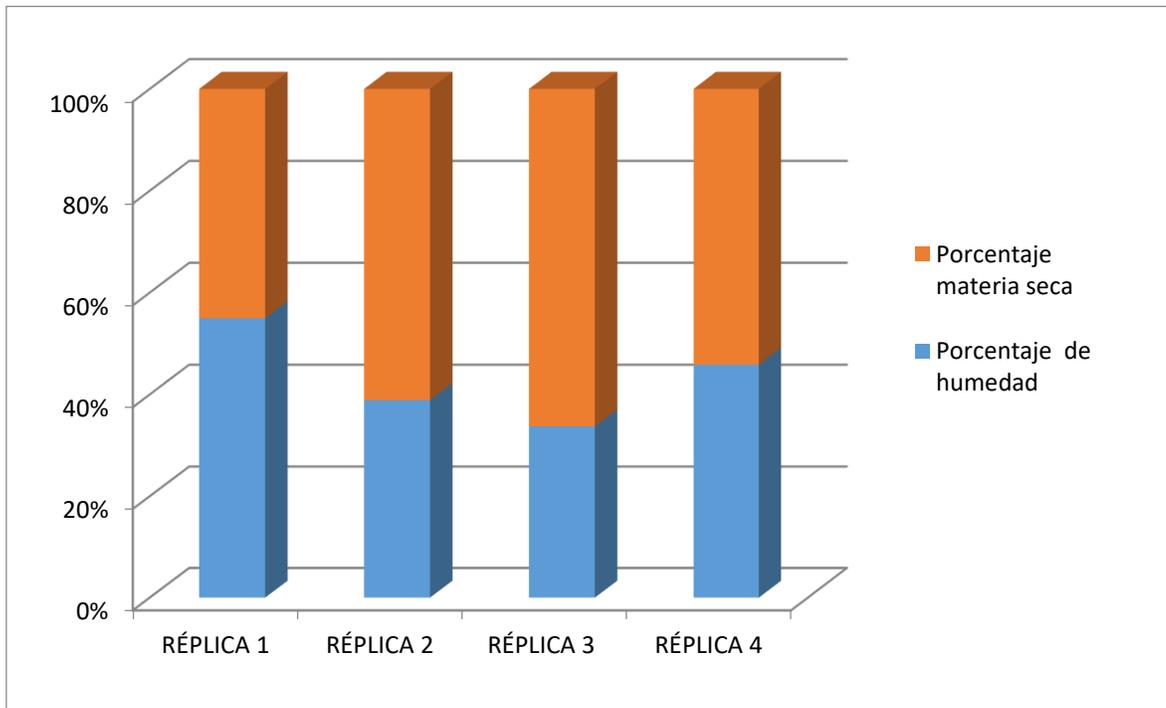
Una vez obtenida la biomasa húmeda se realiza el secado en estufa siguiendo los pasos mencionados para éste proceso en la metodología. Los datos obtenidos para cada réplica se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Porcentaje de biomasa seca de cada réplica de la repetición del experimento.

	RELACIÓN 1:1			
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4
Peso biomasa húmeda (g)	51,37	79,73	90,74	91,85
Peso cápsula (g)	65,68	83,56	79,53	76,50
peso cápsula +biomasa seca (g)	88,82	132,29	139,68	126,24
Peso biomasa seca (g)	23,14	48,73	60,15	49,74
Porcentaje materia seca (%)	45,04	61,12	66,28	54,16
Porcentaje de humedad (%)	54,96	38,88	33,72	45,84

En la gráfica 10 se puede observar el contenido de humedad y la biomasa seca de cada una de las réplicas del cultivo microalgal (repetición del experimento).

Gráfica 10. Humedad y biomasa seca de las 4 réplicas de la repetición del experimento.



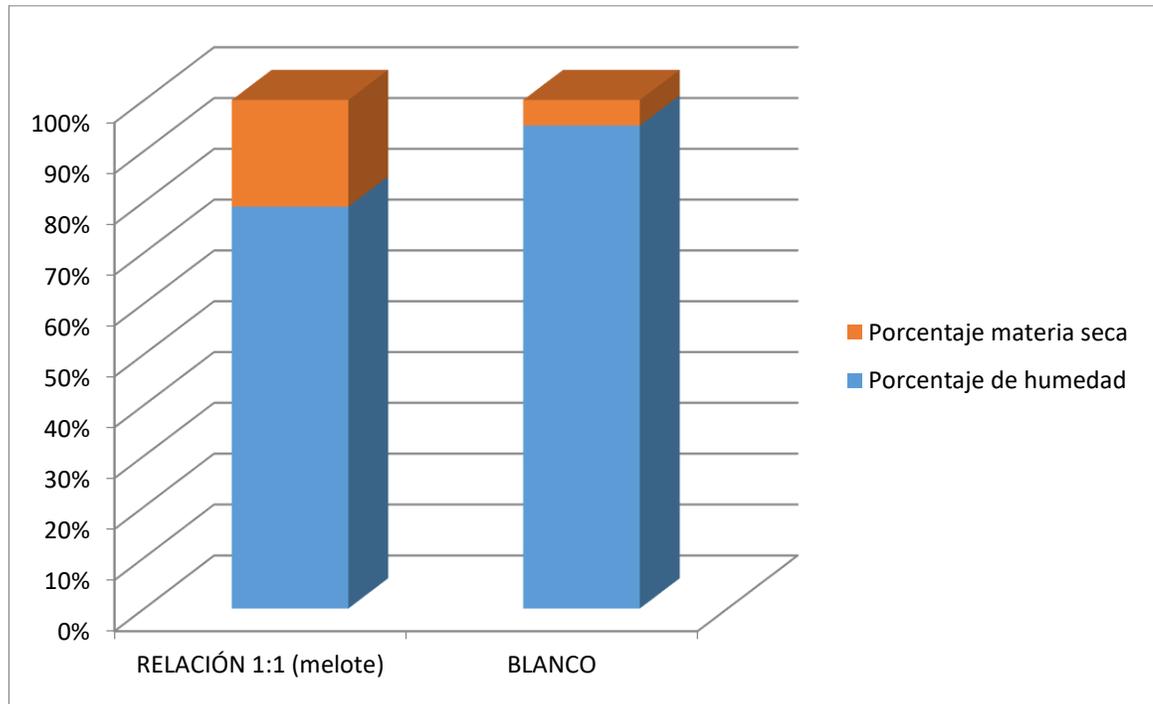
Según lo descrito en la metodología, una muestra que se dejó durante 17 horas (réplica 1) para poder ser comparada con el blanco, ya que se realizó bajo las mismas condiciones de éste, los datos obtenidos se encuentran en la Tabla 18

Tabla 18. Comparación porcentaje de materia seca y Humedad de la relación 1:1 y el blanco.

	RELACIÓN 1:1 (melote)	BLANCO
Peso biomasa húmeda (g)	51,37	56,63
Peso biomasa seca (g)	10,75	2,86
Porcentaje materia seca (%)	20,93	5,05
Porcentaje de humedad (%)	79,07	94,95

En la gráfica 11 se observa la comparación del blanco con la relación 1:1, en cuanto a la humedad y porcentaje de materia seca obtenidos bajo las mismas condiciones.

Gráfica 11. Porcentaje de materia seca y humedad de la relación 1:1 y el blanco.



3.4.2 Rendimiento y productividad volumétrica. Para determinar el rendimiento y la productividad volumétrica del cultivo realizado se hace uso de las ecuaciones 4, 5 y 6. En la tabla 19 se muestra los resultados obtenidos.

Ecuación 4. Rendimiento biomasa húmeda.

$$\text{Rendimiento húmedo}^{87} = \frac{\text{Biomasa húmeda obtenida (g)}}{\text{Volumen de medio (L)}}$$

Ecuación 5. Rendimiento biomasa seca.

$$\text{Rendimiento seco}^{88} = \text{Rendimiento húmedo} * \text{porcenta de materia seca}$$

Ecuación 6. Productividad volumétrica.

$$\text{Productividad}^{89} = \frac{\text{Gramos de biomasa obtenida}}{\text{Días} * \text{Volumen (L)}}$$

⁸⁷SUÁREZ, M., CHICAGUI, J. Evaluación de la influencia del dióxido de carbono en la concentración inicial de *Chlorella vulgaris* sobre la producción de lípidos a escala laboratorios. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de ingeniería, programa de Ingeniería Química. 2014. p. 120.

⁸⁸Ibid., p. 121.

⁸⁹Ibid., p. 121.

Tabla 19. Rendimiento y productividad volumétrica para el experimento y cultivo de control.

	BLANCO	RELACIÓN 1:1
Biomasa húmeda total (g)	56,63	202,05
Porcentaje materia seca (%)	5,05	3,44
Días	15	15
Volumen (L)	3,8	7,6
Rendimiento biomasa húmeda (g/L)	14,90	26,59
Rendimiento biomasa seca (g/L)	0,75	0,91
Productividad (g/d*L)	0,05	0,06

En las gráficas 7 y 8 se observó que al cabo de 15 días hubo mayor crecimiento celular en el cultivo suplementado en comparación con el blanco; de la misma manera en la tabla 19 se evidencia que los rendimientos para la relación 1:1 fue mayor que para el blanco, sin embargo; la productividad fue mayor para el blanco. Se debe tener en cuenta que el secado no puede ser punto de comparación para la experimentación debido a que éste se realizó a diferentes condiciones para las respectivas muestras: el blanco se secó en los laboratorios de la universidad a 40°C durante 17 horas, mientras que la muestra de la relación que obtuvo el mayor crecimiento y con la cual se realizó el experimento (relación 1:1) se llevó a el laboratorio Nutriánálisis Ltda.; allí el secado fue a una temperatura de 103°C durante 7 horas, tal cual la descripción de la sección **2.4.1**.

3.4.2.1 Rendimiento y productividad volumétrica para la repetición del experimento. Para hallar el rendimiento y la productividad volumétrica de la repetición del experimento se hace uso de las mismas ecuaciones utilizadas en el experimento (ver ecuación 2 y 3), los resultados obtenidos de los cálculos realizados con las anteriores ecuaciones mencionadas se observan en la tabla 20 en donde se evidencia un rendimiento (húmedo y seco) similar entre las réplicas 2, 3 y 4; mientras que la réplica 1 difiere significativamente con respecto a las otras en los rendimientos y productividad.

Se realiza una comparación del Blanco y los cultivos suplementados con melote en la repetición del experimento ya que el tratamiento de la biomasa para ambos casos se hizo bajo las mismas condiciones, de ésta manera se puede evidenciar en la tabla 20 que el rendimiento de la materia seca y la productividad del blanco es menor que el de las 4 réplicas realizadas.

Tabla 20. Rendimiento y productividad volumétrica para las réplicas de la repetición del experimento y cultivo de control.

	RELACIÓN 1:1				BLANCO
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4	
Biomasa húmeda (g)	51,37	79,73	90,74	91,85	56,63
Porcentaje materia seca (%)	45,04	61,12	66,28	54,16	5,05
Días	15	15	15	15	15
Volumen (L)	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
Rendimiento biomasa húmeda (g/L)	13,52	20,98	23,88	24,17	14,90
Rendimiento biomasa seca (g/L)	6,09	12,82	15,83	13,09	0,75
Productividad (g/d*L)	0,41	0,85	1,06	0,87	0,05

Los rendimientos y la productividad hallados para la muestra 1 (réplica 1) bajo las mismas condiciones del blanco y su respectiva comparación con éste se encuentra en la tabla 21, se observa, que bajo las mismas condiciones de cultivo y secado, la relación 1:1 la cual contiene como fuente adicional de carbono, melote, tiene un mayor rendimiento de biomasa seca y por ende una mayor productividad que el blanco.

Tabla 21. Rendimientos y productividad de la relación 1: 1 (melote) y el Blanco.

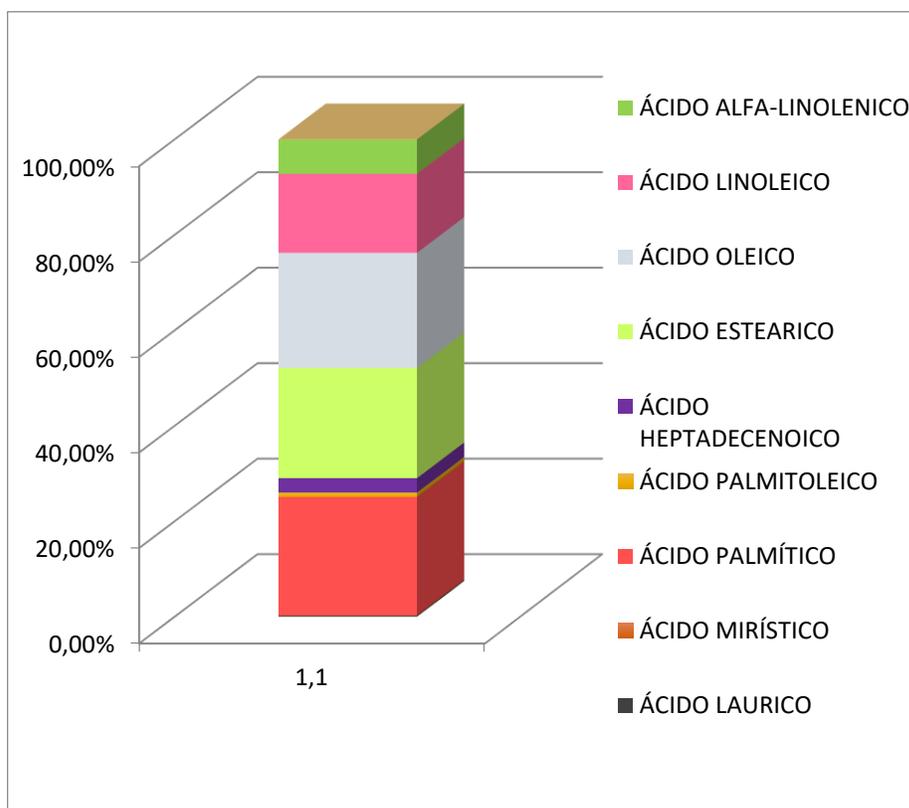
	RELACIÓN 1:1	BLANCO
Biomasa húmeda (g)	51,3746	56,633
Porcentaje materia seca (%)	21	5,05
Días	15	15
Volumen (L)	3,8	3,8
Rendimiento biomasa húmeda (g/L)	13,52	14,90
Rendimiento biomasa seca (g/L)	2,83	0,75
Productividad (g/d*L)	0,19	0,05

3.4.3 Perfil de ácidos grasos. En la tabla 22 se muestra la composición de los ácidos grasos obtenidos de la cromatografía de gases a la biomasa microalgal resultante; cabe resaltar que éste proceso solo se realizó a la concentración de melote que presentó el mayor rendimiento (Relación 1:1).

Tabla 22. Composición de los ácidos grasos de la muestra del experimento.

	FAMES	NOMBRE DEL COMPUESTO	COMPOSICIÓN (%)
1	C12:0	ÁCIDO LAURICO	0,22
2	C14:0	ÁCIDO MIRÍSTICO	0,07
3	C16:0	ÁCIDO PALMÍTICO	24,79
4	C16:1	ÁCIDO PALMITOLEICO	0,91
5	C17:1	ÁCIDO HEPTADECENOICO	3,03
6	C18:0	ÁCIDO ESTEARICO	23,06
7	C18:1n-9c/t	ÁCIDO OLEICO	24,16
8	C18:2n-6c/t	ÁCIDO LINOLEICO	16,51
9	C18:3n-3	ÁCIDO ALFA-LINOLENICO	7,21
10	-	-	0,02
11	-	-	0,02

Gráfica 12. Perfil de ácidos grasos.



En la gráfica 12 se muestra el perfil de ácidos grasos; cabe resaltar que hubo 2 compuestos no identificados en la cromatografía los cuales representan el 0,04%.

Tabla 23. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados.

FAMES	NOMBRE	COMPOSICIÓN
SFAS	SATURADOS	48,14%
MUFAS	MONOINSATURADOS	28,10%
PUFAS	INSATURADOS	23,72%
	TOTAL	99,96%
n- 3	OMEGA 3	7,21%
n- 6	OMEGA 6	16,51%
n-9	OMGEA 9	24,16%
	RELACIÓN n-6/n-3	2,29%

En la tabla 23 se expresa el porcentaje de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados; resaltando el alto contenido de ácidos grasos saturados obtenido (SFAS) equivalente al 48,14%, sobresaliendo el ácido palmítico y esteárico con una composición de 24,79% y 23,06% respectivamente, de la misma manera los ácidos grasos mono insaturados (MUFAS) equivalentes al 28,10% siendo el más representante el ácido oleico con un porcentaje de 24,16% y finalmente los insaturados (PUFAS) con un 23,72%, distinguiendo el ácido linoleico con 16,51%.

El alto contenido de saturados (SFAS) hace de ésta biomasa apta para la producción de cosméticos, jabones, lubricantes y detergentes.

Gráfica 13. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados.

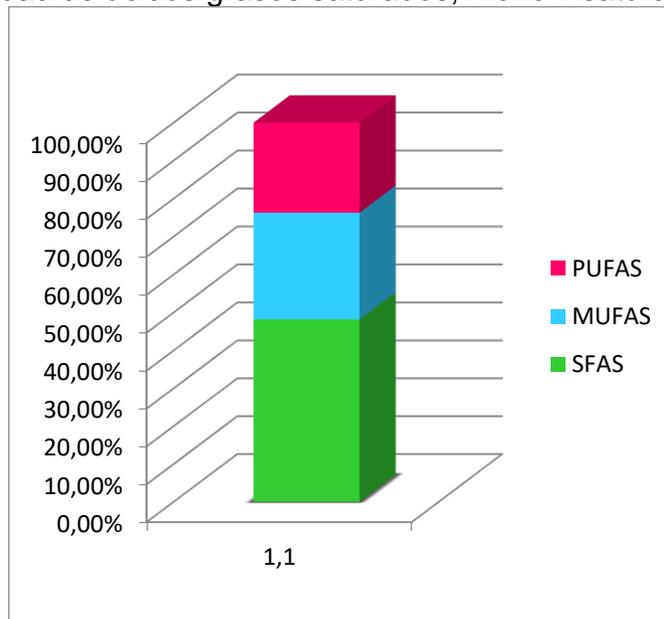


Tabla 24. Comparación bibliográfica de la composición de SFAS, MUFAS y PUFAS.

COMPOSICIÓN REPORTADA EN BIBLIOGRAFÍA				
TIPO DE ÁCIDO GRASO	Manjarrés y Muñoz(2014) ⁹⁰	Serrano., N. (2012) ⁹¹	Gouveia, L. y Oliveira, A. C. (2009) ⁹²	Liu, C.-P. Y Lin, L.-P. (2001) ⁹³
SFAS	29,50%	28,90%	35,50%	41,30%
MUFAS	24,40%	12,10%	23,40%	43,60%
PUFAS	46,10%	59,00%	41,10%	14%

En la tabla 24 se exponen las debidas composiciones de ácidos grasos obtenidos en 4 artículos: El primero de ellos (Manjarrés., J. Muñoz., L. (2014) hacen uso del glicerol como fuente de carbono adicional para la producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor de panel plano,; el siguiente articulo realizado por Manjarrés., J. Muñoz., L. (2014) en el cual evalúan cuatro cepas nativas, dentro de ellas la *Chlorella vulgaris*, para su potencial uso en la producción de biodiesel, Gouveia, L. and Oliveira, A. C. (2009). al igual que el autor anterior, evalúa cinco cepas dentro de ellas, la estudiada en este proyecto, determinando sus ácidos grasos para la posterior producción de biodiesel; finalmente Liu, C.-P. and Lin, L.-P. (2001) el cual hace uso de diversos métodos para la extracción de lípidos, teniendo en cuenta los efectos de las condiciones del cultivo.

Los resultados experimentales obtenidos para la relación 1:1, en el cual se hace uso del melote como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal, se encuentra dentro de los rangos reportados por la bibliografía; sin embargo se tiene en cuenta que éstos difieren debido a varios factores como lo son: las condiciones de cultivo, los nutrientes suministrados, entre otros.

Con el presente trabajo se demuestra que el melote se puede emplear como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal; obteniendo de éste gran cantidad de ácidos grasos saturados, resaltando porcentualmente el ácido palmítico y esteárico, los cuales son utilizados para la producción de lubricantes, cosméticos, farmacéutica, jabones y detergentes.

⁹⁰MANJARRÉS POLANIA.,Op. cit., p. 62.

⁹¹Serrano., N. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 91.

⁹²Gouveia, L. and Oliveira, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol 36. No. 2. 2009. p. 269-274.

⁹³Liu, C.-P. and Lin, L.-P. Ultra structural Study and Lipid Formation of Isochrysis sp. CCMP1324. Botanical Bulletin of Academia Sinica. Vol 42. No. 3. 2001. p. 207-214.

3.4.3.1 Perfil de ácidos grasos para la repetición del experimento. En la tabla 25 se muestra la composición de los ácidos grasos obtenidos de la cromatografía de gases a la biomasa microalgal resultante de la repetición del experimento.

Tabla 25. Composición de los ácidos grasos de la muestra de la repetición del experimento.

	FAMES	NOMBRE COMPUESTO	DEL	COMPOSICIÓN (%)
1	C8:0	ÁCIDO CAPRÍLICO		6,08
2	C10:0	ÁCIDO CÁPRICO		0,41
3	C12:0	ÁCIDO LAURICO		1,07
4	C14:0	ÁCIDO MIRÍSTICO		0,71
5	C16:0	ÁCIDO PALMÍTICO		19,88
6	C16:1	ÁCIDO PALMITOLEICO		1,28
7	C17:0	ÁCIDO MARGÁRICO		2,9
8	C17:1	ÁCIDO HEPTADECENOICO		7,16
9	C18:0	ÁCIDO ESTEARICO		5,29
10	C18:1n- 9c/t	ÁCIDO OLEICO		7,76
11	C18:2n- 6c/t	ÁCIDO LINOLEICO		32,22
12	C18:3n-3	ÁCIDO LINOLENICO	ALFA-	15,23

Gráfica 14. Perfil de ácidos grasos de la repetición del experimento.

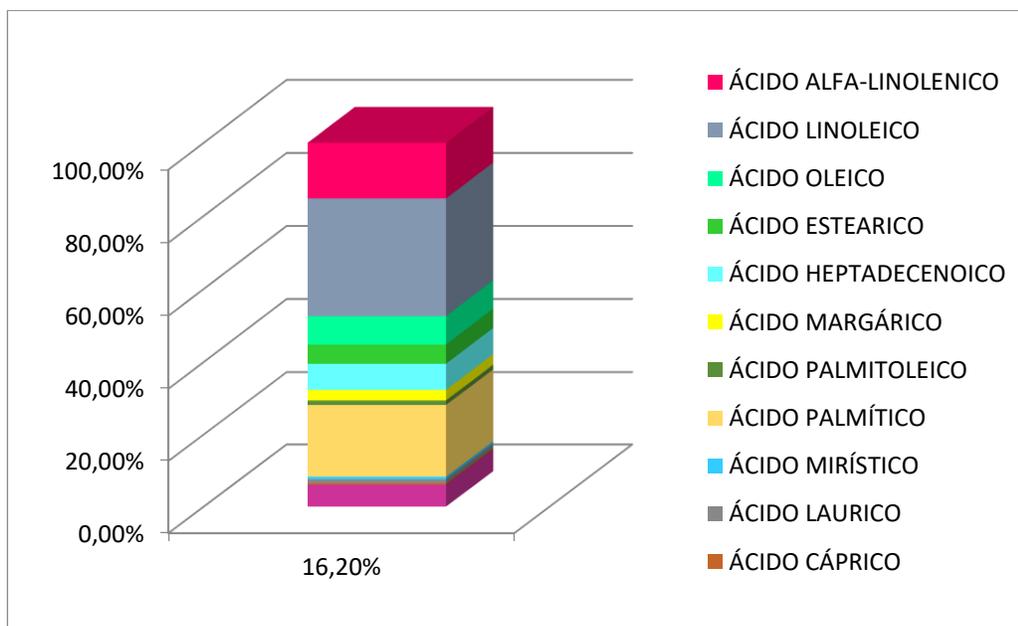
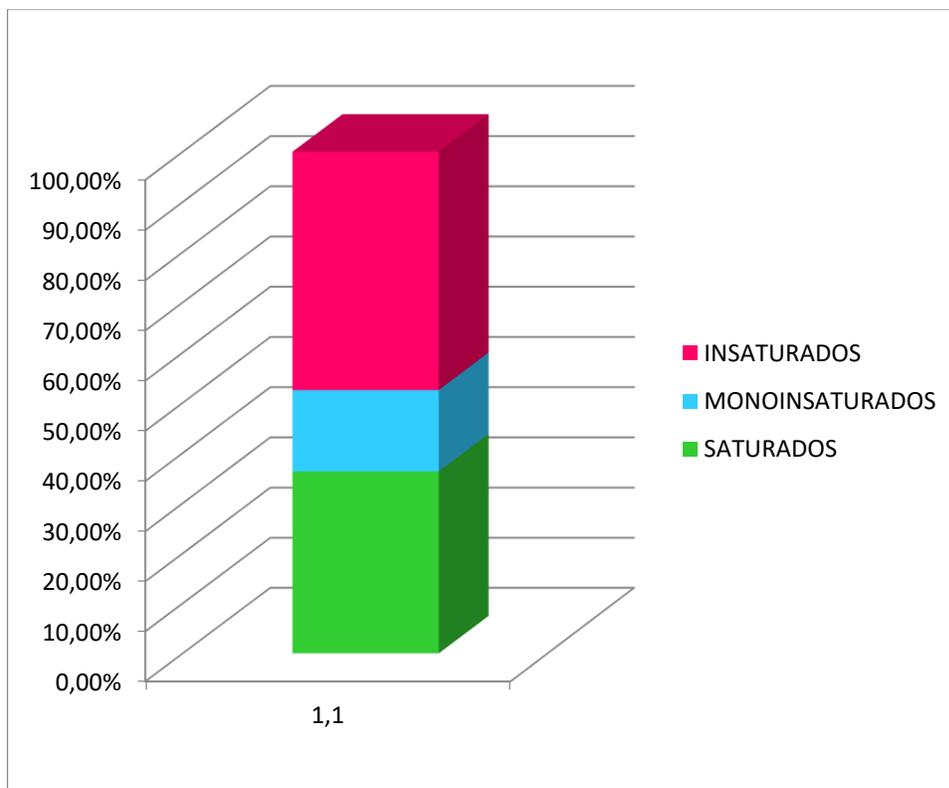


Tabla 26. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados de la repetición del experimento.

FAMES	NOMBRE	COMPOSICIÓN (%)
SFAS	SATURADOS	36,34
MUFAS	MONOINSATURADOS	16,2
PUFAS	INSATURADOS	47,45
TOTAL		99,99
n- 3	OMEGA 3	15,23
n- 6	OMEGA 6	32,22
n-9	OMGEA 9	7,76
RELACIÓN n-6/n-3		2,12

En la tabla 26 se muestra la cantidad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados e insaturados resultantes del análisis cromatográfico realizado a la muestra. En ésta ocasión los ácidos insaturados son los que obtienen mayor porcentaje (47,45 %), siendo éstos útiles en la industria alimenticia.

Gráfica 15. Cantidad de ácidos grasos saturados, mono insaturados e insaturados en la repetición del experimento.



4. DISCUSIÓN

El melote y el agua del lavado de las gaveras fueron los residuos elegidos para este proyecto, principalmente porque no compiten con la alimentación humana como lo hace el melado, adicionalmente su conservación era más sencilla que el de la cachaza. Estos residuos al ser generados en la producción de panela contienen gran cantidad de azúcares los cuales permiten el desarrollo de microorganismos que son propicios de fermentación.

El melote, es producto de la deshidratación de la cachaza, proceso que se realiza a elevadas temperaturas con el fin de darle un mayor tiempo de preservación disminuyendo la cantidad microbiana, razón por la cual resultó más sencilla su recolección, transporte y conservación debido a que solamente necesitó de refrigeración y durante el desarrollo del proyecto no presentó fermentación, por el contrario, el agua del lavado de las gaveras, resultó complejo su transporte y conservación, ya que a pesar de mantenerla congelada al momento de utilizarla presentaba indicios de fermentación.

Para el pre-experimento 2, se descartó el agua del lavado de las gaveras, debido a los problemas presentados con la conservación; al ser más sencillo preservar el melote, y al no haber una diferencia significativa en el crecimiento celular (gráfica 4) se opta continuar la experimentación con éste.

Como se puede ver en la comparación de las curvas de crecimiento (gráfica 8) entre el experimento, repetición del experimento y el blanco, se puede ver que en los dos primeros se alcanzó una mayor concentración celular, demostrando la influencia que tiene el melote como suplemento. El experimento supera hasta en un 46% la concentración celular del blanco, mientras que, la repetición del experimento lo supera en un 53%.

La repetición del experimento alcanzó mayores concentraciones celulares con respecto al experimento, esto debido a que en la metodología de cultivo del experimento, cada tres días se iba aumentando el volumen de trabajo adicionando medio de cultivo y melote, diluyendo así el cultivo y la concentración celular. En la repetición del experimento no se aumentó periódicamente el volumen de trabajo, por el contrario desde el primer día el volumen de trabajo era el volumen total del fotobiorreactor adaptado.

Comparando la influencia sobre la concentración celular entre el melote y glicerol, suplemento utilizado en otro trabajo de investigación de la línea de biotecnología con microalgas; el glicerol tiene una mayor influencia (concentración máxima $2,29 \times 10^7$ Cel/mL) que el melote (concentración máxima $1,08 \times 10^6$ Cel/mL). Sin embargo, el melote supera al glicerol en productividad de biomasa: $0.19 \text{ g d}^{-1}\text{L}^{-1}$ y $0.016 \text{ g d}^{-1}\text{L}^{-1}$ respectivamente. Cabe resaltar que las condiciones del tratamiento

de la biomasa (secado) variaron, pues Muños y Manjarrés⁹⁴, hicieron uso de una liofilización y en el presente trabajo un secado en horno.

Se decidió realizar la extracción de lípidos en Nutriánalisis debido a que al intentar aplicar la metodología de Bligh & Dyer se presentaron inconvenientes como: separar los residuos de biomasa presentes en la muestra para poder obtener la fase de solvente-lípidos y la falta de un equipo para poder separar el solvente de los lípidos. En Nutriánalisis, se realizó el secado de la biomasa a 103°C, temperatura a la cual es posible que ya se hayan desnaturalizado los lípidos; sin embargo, se obtuvo 0.1 g de grasa la cual fue llevada a Sigrá S.A para realizar el análisis de cromatografía. Al ser muy poca la cantidad de grasa obtenida, no se puede realizar una repetición de la cromatografía, por tal motivo se hace una repetición del experimento. La biomasa obtenida se deshidrató en esta ocasión a 40°C durante 10 horas y se extrajeron los lípidos por el método de Bligh & Dyer en las instalaciones de la Universidad América. En éste procedimiento no fue posible observar claramente la fase de lípidos después de la centrifugación; por este motivo se separaron las fases obtenidas (5), eliminando el residuo de biomasa y el cloroformo; las tres sobrantes se distribuyeron en recipientes de vidrio y fueron llevados a Sigrá S.A con el fin de evaporar el cloroformo haciendo uso de un rotaevaporador y de ésta manera obtener grasa para realizar la repetición de la cromatografía.

Los resultados de las cromatografías realizadas fueron diferentes debido a que como se expuso anteriormente el proceso realizado para el secado y la extracción de ácidos grasos no se realizó bajo las mismas condiciones.

Al realizar el secado de la muestra del experimento a 103 °C los lípidos se pudieron desnaturalizar, provocando poca cantidad de aceite microalgal, el cual tuvo que ser disuelto en hexano para poder realizar la cromatografía; de ésta manera los resultados pudieron ser alterados por la adición de éste disolvente, obteniendo gran cantidad de ácidos grasos saturados y menor cantidad de ácidos grasos insaturados.

Por lo anterior expuesto se consideran más acertados los resultados obtenidos en la cromatografía de la muestra de la repetición del experimento, ya que en el tratamiento de la biomasa el secado se hizo a una temperatura inferior a la que se podrían desnaturalizar los lípidos, permitiendo que estos permanezcan en la muestra. De la misma manera la cantidad de aceite obtenido fue conveniente para realizar réplicas sin necesidad de diluir la muestra con solventes, arrojando todas (3) el mismo resultado. En lo que respecta al uso de los lípidos obtenidos de biomasa microalgal cultivada con melote como suplemento, ésta puede ser utilizada para la industria de alimentos ya que tiene gran cantidad de ácidos grasos insaturados (47,45%).

⁹⁴ MANJARRÉS POLANIA.,Op. cit., p. 58.

Este proyecto es factible debido a que se le puede dar un valor agregado al melote utilizándolo como suplemento de cultivo microalgal, ya que como lo muestra este trabajo de investigación, hay crecimiento celular, acumulación de biomasa y lípidos aprovechables.

Sería posible cultivar microalgas cerca a los trapiches paneleros aprovechando los residuos frescos, es decir, a medida que se van produciendo se van disponiendo en los reactores donde se tengan los cultivos, disminuyendo costos de transporte y conservación, integrando de esta manera dos procesos: producción de panela y biomasa.

5. CONCLUSIONES

- Se seleccionó el melote como suplemento de cultivo, debido a su bajo costo, alta disponibilidad, sencilla conservación, facilidad en la manipulación y porque no compite con alimentos de consumo humano, además, porque es asimilable por la microalga e influyente sobre su crecimiento celular.
- Las curvas de crecimiento permiten ver el potencial del melote como suplemento de cultivo, que al cabo de los días de duración de los pre-experimentos y aun del experimento permanecían en fase exponencial y en pocas curvas se puede ver claramente una fase de muerte celular.
- Utilizando el melote como suplemento en una relación 1:1 con el medio de cultivo se alcanzó una mayor concentración celular (concentración celular máxima $1,08 \times 10^6$ Cel/mL) que el cultivo de control (concentración celular máxima 6.88×10^5) demostrando que la adición del suplemento sí tiene influencia en el crecimiento celular.
- La productividad volumétrica del cultivo se ve influenciada por la presencia del melote en medio Foliagro dando como resultado una productividad de 0.19 g/ día L mientras que el cultivo de control tan sólo alcanzó 0.05 g/ día L.
- El perfil lipídico obtenido de la biomasa tiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (PUFAs) correspondiente a un 47,45%, además de un 36,34% de saturados y un 16,2% de monoinsaturados.

BIBLIOGRAFÍA

ÁNGEL, C.; PIMENTA W. Evaluación de la incidencia del nitrógeno en el medio de cultivo bold basal para la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor, para la obtención de ácidos grasos. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2012. p. 64.

Anónimo. Secado por aspersión. [En línea]. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. [Citado el 4 de marzo de 2017]. Disponible en: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/manizales/4070035/lecciones/cap7/leccion7_7.htm

ARNÁIZ, C., ISAC, L., LEBARTO, J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. En: Grupo de tratamiento de aguas residuales. Escuela Universitaria Politécnica. Sevilla. (2000) p 45.

ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES Y CULTIVADORES DE CAÑA PANELERA, Z. S. C. La tecnología del cultivo de caña panelera. Corpoica. 1999. p 21.

BARQUERO, M. Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases. UCR, 2006 . [Citado el 14 de mayo de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=g3o_PUTmr3wC&printsec=frontcover&dq=cromatografia+de+gases+pdf&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

BASTIDAS, O. Conteo celular con Hematocitómetro. Uso elemental del Hematocitómetro. Technical note – Neubauer chamber cell counting. Celeromics. [Citado el 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.celeromics.com.es/resources/docs/articles/conteo-camara-neubauer.pdf>.

BERMÚDEZ, L. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia Facultad Ingeniería, Departamento Ingeniería Química y Ambiental. 2012; p. 23

BOLAÑOS, E. R. A. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. En: Revista Del Colegio de Microbiólogos Y Químicos Clínicos de Costa Rica. No.14. (2008) p 9.

BLIGH, E., DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. En Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Vol. 37. No. 8. (1959) p. 912

CAICEDO, L., RODRIGUEZ, S. Obtención de biomasa y azúcares reductores a partir de microalgas producidas en un fotobiorreactor airlift a escala laboratorio.

Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2016. p. 55.

CALDERÓN, S., RAMÍREZ, D. Evaluación de la influencia lumínica sobre la producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Tesis de investigación Ingeniería Química. Universidad de América. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química. 2013. p. 18.

CASTRO, K., & ORTIZ, E. Determinación de la incidencia de la relación carbono:nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2013, p. 29.

CHEREMISINOFF, N. Biotechnology for Waste and Wastewater Treatment. William Andrew Publishing/Noyes, 1996. [Citado el 25 de febrero de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpBWWT0002/viewerType:toc/root_slug:biotechnology-waste-wastewater/url_slug:kt003VLPP5

CLEMENS, P., & CHRISTIAN, W. Microalgal Biotechnology - Integration and Economy. De Gruyter, 2012 p 32.

DEMIRBAS, A., & DEMIRBAS, M. F. Biodiesel from Algae. En: Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel. Primera edición. Londres. Springer, 2010. p 76.

ERNÁNDEZ-PÉREZ, A., & LABBÉ, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. En: Revista de Biología Marina Y Oceanografía. No. 49. (2014). p 169.

ESCUADERO, R. Planta de producción de microalgas con fines energéticos. 2012

FEDEPANELA. Seguridad alimentaria en familias paneleras de Cundinamarca. 2005. p. 21.

FEINER, G. Meat Products Handbook - Practical Science and Technology. Woodhead Publishing, 2006. [Citado el 25 de marzo de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpMHPST0H/viewerType:toc/root_slug:meat-products-handbook/url_slug:kt00C5TQT2?b-q=growth-curve&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default

FONSECA, E. Componente Tecnológico Proceso y Manejo Ambiental. FEDEPANELA, 2012 p. 13

FONSECA, E., & DURÁN, N. Consejos técnicos para tener en cuenta durante el

proceso de producción de la panela de buena calidad. Fedepanela, 2001. p 6.
GARCÍA, H., *et al.* Guía tecnológica para el manejo integral del sistema productivo de caña panelera. Corpoica, 2007 p 7.

GARIBAY-HERNÁNDEZ, A., *et al.* Biodiesel a partir de microalgas. En: BioTecnología. No.13. (2009) p 41.

GÉLINAS, M., *et al.* Residual corn crop hydrolysate and silage juice as alternative carbon sources in microalgae production. En: Algal Research. No. 12. (2015) p 34.

GOUVEIA, L. and OLIVEIRA, A. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol 36. No. 2. 2009. p. 269-274.

HEREDIA-ARROYO, T., *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. En: Biomass and Bioenergy. No.35. (2015) p 2247.

HERNANDEZ, G. A. Evaluación de las incidencias de salinidad y ph sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2014, p. 30.

HERNÁNDEZ, L., *et al.* ABC de la panela. Fedepanela. 2009. p 10.

HERRERA PRADA, N. A., & MONTENEGRO, L. C. Utilización de la microalga *chlorella vulgaris* en la remoción de contaminantes orgánicos provenientes de las aguas residuales de la empresa conalsebos a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2010, p. 20.

INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS, I. T. Deshidratación: secado y liofilización. 2011.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación, presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. Bogotá. NTC 1486. 2008, 6 ed.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. Bogotá, NTC 4490. 1998.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. Bogotá, NTC 5613. 2008.

KIM, S., *et al.* Growth rate, organic carbón and nutrient removal rates of *Chlorella sorokinianain* autotrophic, heterotrophic and mixotrophic. En: Bioresource Technology. No. 144. (2013). p 10.

LIN, T.-S., & WU, J.-Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. En: Bioresource Technology. No. 184. (2015) p 102.

LIU, C.-P. & LIN, L.-P. Ultra structural Study and Lipid Formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. Botanical Bulletin of Academia Sinica. Vol 42. No. 3. 2001. p. 207-214.

MANJARRÉS POLANIA, J., & MUÑOZ GUZMÁN, L. Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional en la obtención de biomasa y ácidos grasos en cultivos *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá. Fundación universidad de América. Departamento de Ingeniería Química, 2014, p. 8-45.

MIGUEL, L., BERM, S. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional, 2012.

MITRA, D., *et al.* Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. En: Algal Research. No. 1. (2012) p 41.

MOLINA GRIMA, E., *et al.* Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. En: Biotechnology Advances. No. 20. (2003) p 498.

NUTRIANALISIS. [En línea]. [Citado el 4 de marzo de 2017]. Disponible en: <<http://www.nutrianalisis.com/servicios/>>

OBANDO, J. J. J. Evaluacion tecno-economica de la produccion de biocombustibles a partit de microalgas. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Manizales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2011, p. 19.

OSORIO, G. Buenas prácticas agrícolas -BPA- y buenas prácticas de manufactura -BPM- en la producción de caña y panela. 2007

PALOMINO M, A. Extracción de aceite de microalgas. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Santiago de Cali. Universidad del Valle. Departamento de Ingeniería Química, 2013, p. 20.

PEREZ-GARCIA, O., & BASHAN, Y. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic

Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. En: Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design. (2015) p 62.

PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. En: Water Research. No. 45. (2011) p 12.

RODRÍGUEZ RAMOS, P., *et al.* Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. No. 73. Afinidad, (2015) p 125.

RUIZ, A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia, (2011) p 34.

SCHASCHKE, C. Dictionary of Chemical Engineering. Oxford University Press, 2014. [Citado el 25 de febrero de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpDCE00021/viewerType:toc/root_slug:dictionary-chemical-engineering/url_slug:kt00TW5UY3?b-q=growth-curve&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default

SERRANO., N. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia. 2012. p. 91.

SPERLING, M. Basic Principles of Wastewater Treatment, Volume 2. IWA Publishing, 2007. [Citado el 25 de marzo de 2017]. Disponible en: https://app.knovel.com.ez.uamerica.edu.co/web/toc.v/cid:kpBPWTV007/viewerType:toc/root_slug:basic-principles-wastewater/url_slug:kt00U9XGU1?b-

SUBIRÓS RUIZ, F. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1995.

TEBBANI, S., *et al.* CO₂ Biofixation by Microalgae: Automation Process. Primera edición. Gran Bretaña. Wiley, 2014. p 4.

TEJADA, L., *et al.* Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. En: Revista facultad de ingeniería. Vol. 24. No. 39, (2015) p. 47.

TORRES, E., *et al.* Cartilla de orientación para el uso de los subproductos de la caña y la panela en alimentación bovina y porcina. Fedepanela, 2007. p 3.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. Medición de pigmentos fotosintéticos. [Citado el 07 de marzo de 2017] Disponible en: <http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/limnologia/tps/TP4.pdf> p 1.

VÁSQUEZ-DUHALT, R., & ARREDONDO-VEGA, B. Microalgas Fuente De Aceites Comestibles Y Terapeuticos. (1991). p 20.

VERMA, N., *et al.* Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. En: African Journal of Biotechnology. Vol 9. No. 10 (2010) p 1407.

WANG, J., YANG, H Y WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and Prospects. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. No. 172. (2014) p 3307-3329.

ZHAN, J., RONG, J., & WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. En: International Journal of Hydrogen Energy. (2016) p 3.

ANEXOS

ANEXO A.

CONCENTRACIÓN CELULAR Y CURVAS DE CRECIMIENTO DEL PRE-EXPERIMENTO No. 1.

Tabla 27. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
2,04	2,40	1,32	1,92
2,88	3,44	1,42	2,58
3,54	3,88	2,00	3,14
4,00	4,56	4,68	4,41
4,38	6,56	5,92	5,62
5,10	8,34	7,02	6,82
6,44	8,60	9,98	8,34
7,74	8,74	10,0	8,83
7,72	9,26	10,2	9,07
7,74	9,26	11,1	9,37

Gráfica 16. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

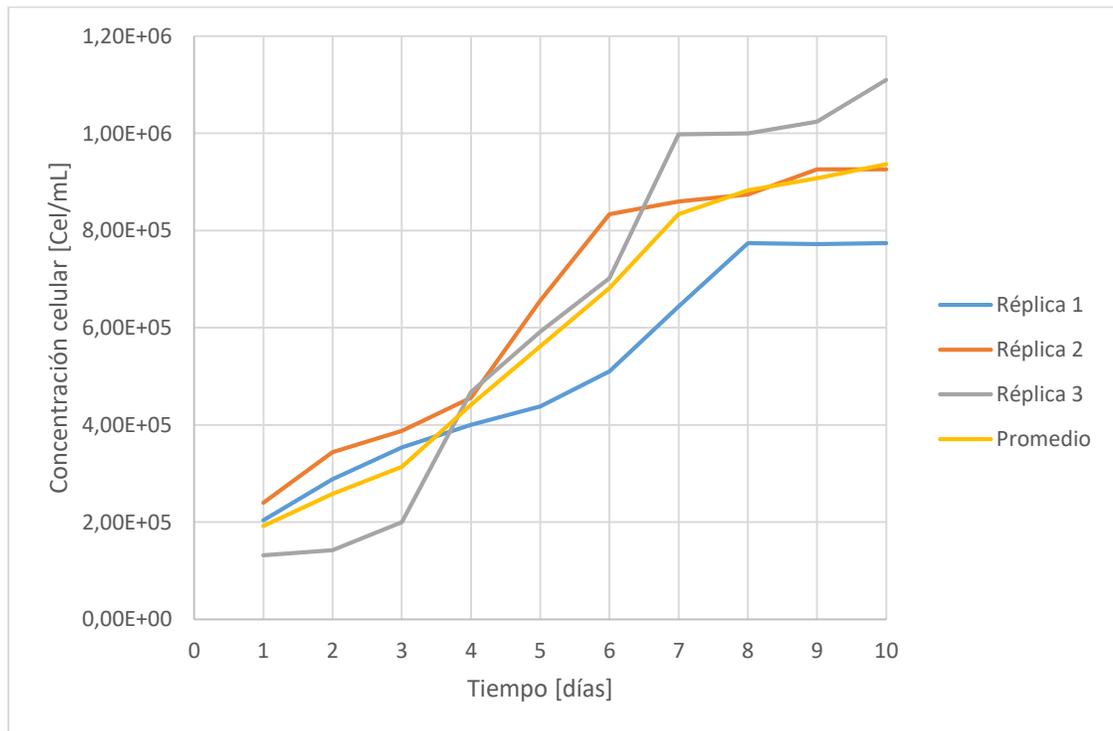


Tabla 28. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,62	2,40	1,80	1,94
2,66	3,80	2,02	2,83
4,36	4,58	3,18	4,04
6,20	5,22	5,06	5,49
8,06	8,24	5,52	7,27
8,64	9,08	6,60	8,11
9,84	9,44	9,64	9,64
1,07	9,60	9,60	9,97
1,11	11,2	10,2	10,8
1,21	12,0	11,5	11,9

Gráfica 17. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

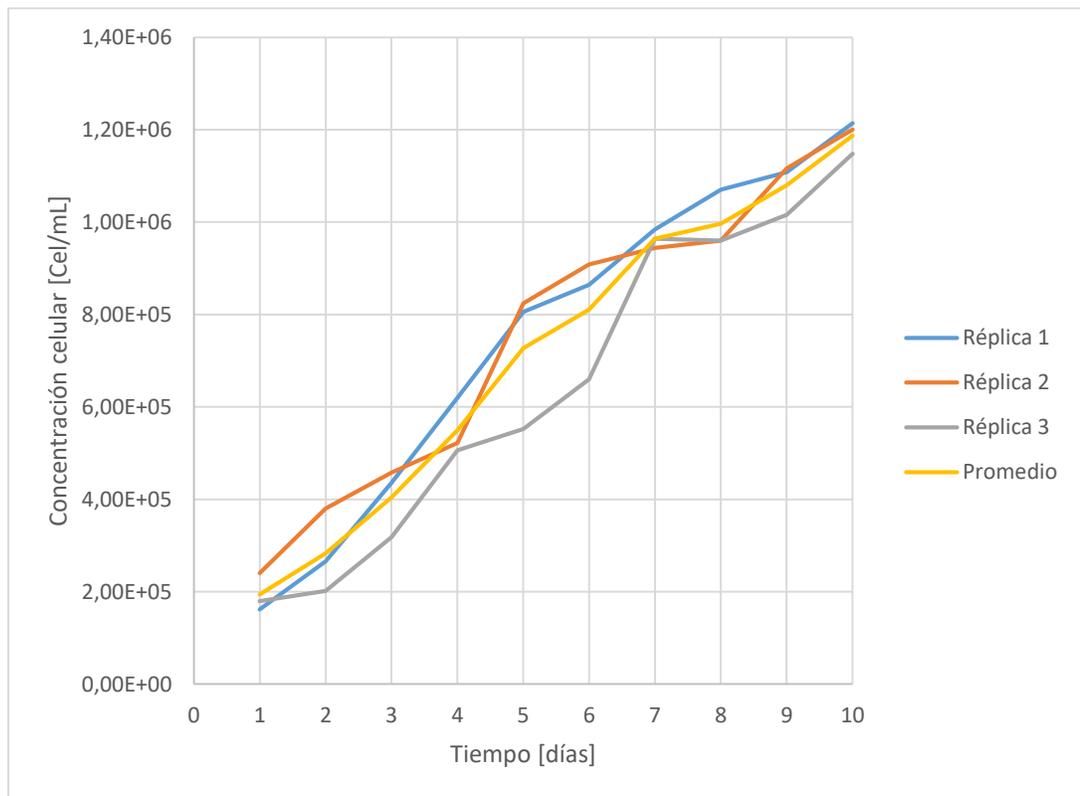


Tabla 29. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
2,00	1,70	1,12	1,61
2,48	2,52	1,44	2,15
3,52	3,90	2,96	3,46
4,04	4,08	4,70	4,27
4,02	6,20	5,08	5,10
4,52	6,56	6,60	5,89
4,12	5,54	10,0	6,56
7,24	6,68	9,74	7,89
7,40	7,90	9,40	8,23
7,68	8,00	11,0	8,91

Gráfica 18. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

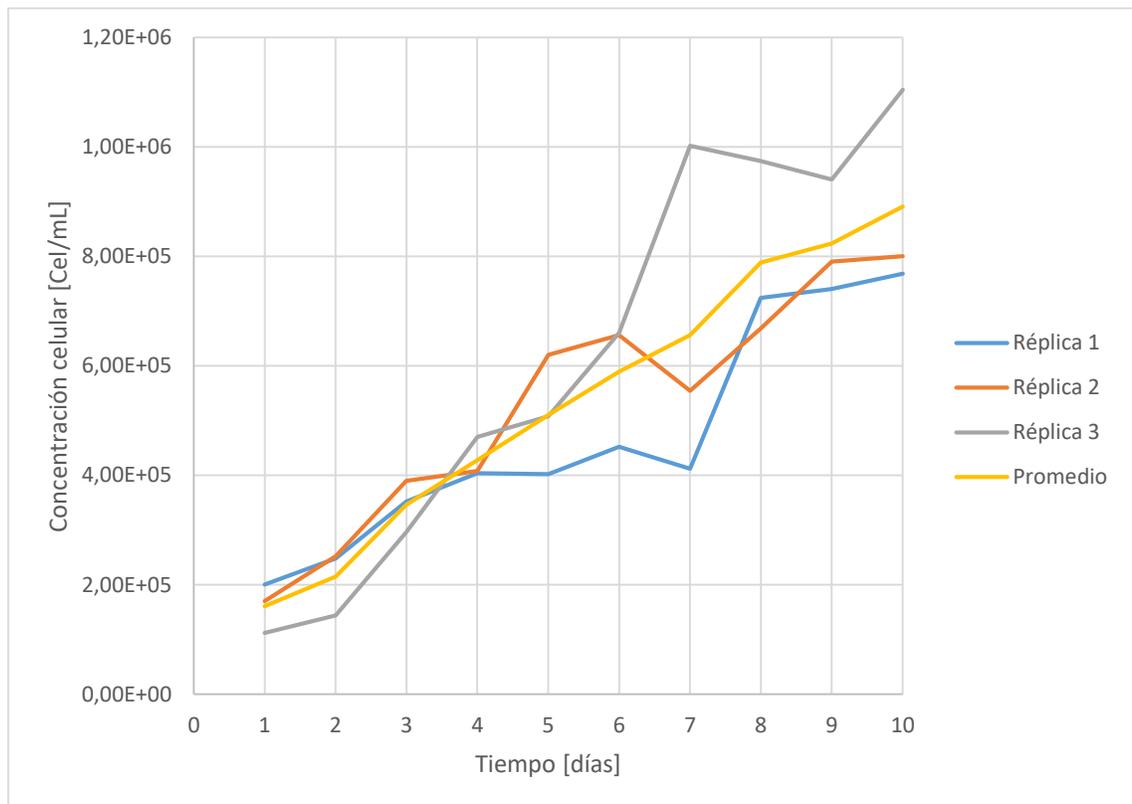


Tabla 30. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 4 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,66	1,32	1,76	1,58
2,76	1,42	1,94	2,04
5,78	3,08	4,10	4,32
5,10	3,72	4,36	4,39
5,82	4,64	6,32	5,59
6,72	6,82	6,12	6,55
7,42	7,36	7,90	7,56
9,44	8,44	7,94	8,61
9,92	8,52	8,58	9,01
10,7	10,5	7,98	9,71

Gráfica 19. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 4 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

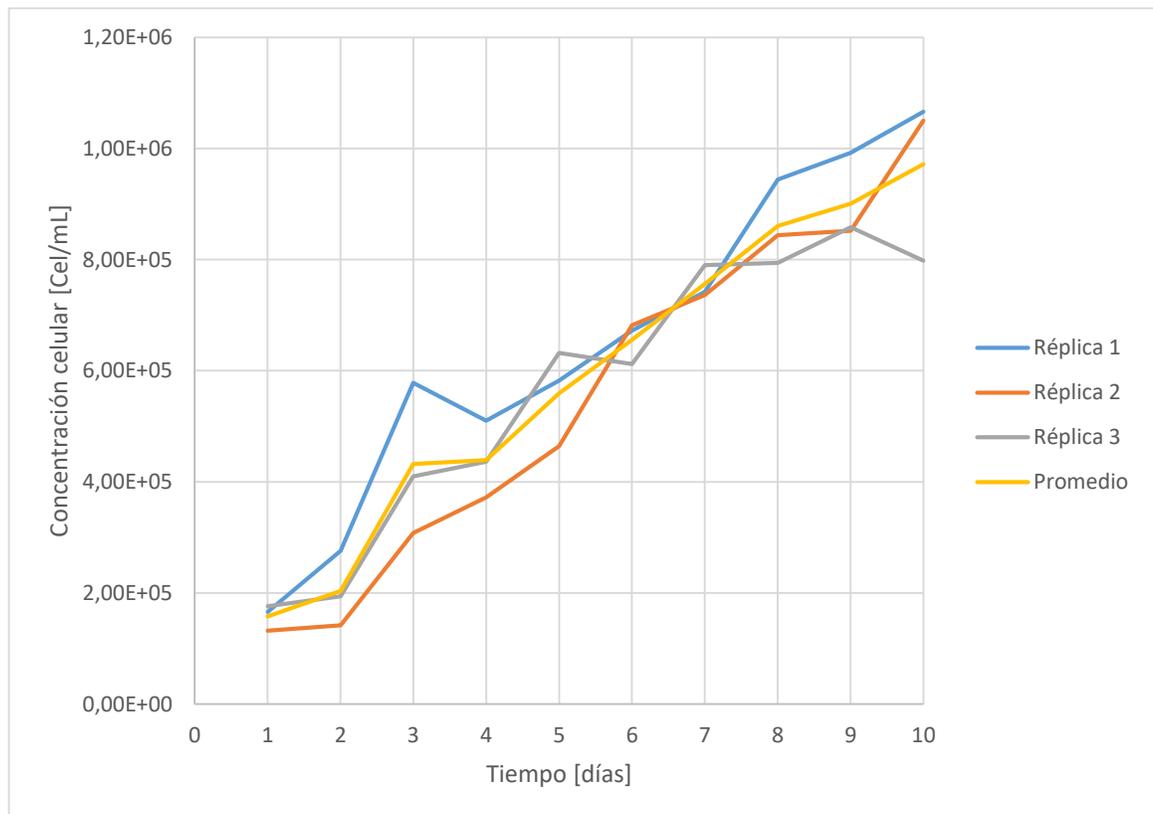


Tabla 31. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 5 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,22	1,78	1,28	1,43
2,20	3,04	1,78	2,34
2,76	3,18	4,60	3,51
3,82	4,40	4,08	4,10
4,66	5,10	3,58	4,45
4,70	7,72	4,06	5,49
5,44	8,14	6,18	6,59
6,92	9,00	6,82	7,58
7,04	10,0	7,54	8,21
7,26	10,6	8,56	8,79

Gráfica 20. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 5 utilizando agua del lavado de las gaveras como suplemento.

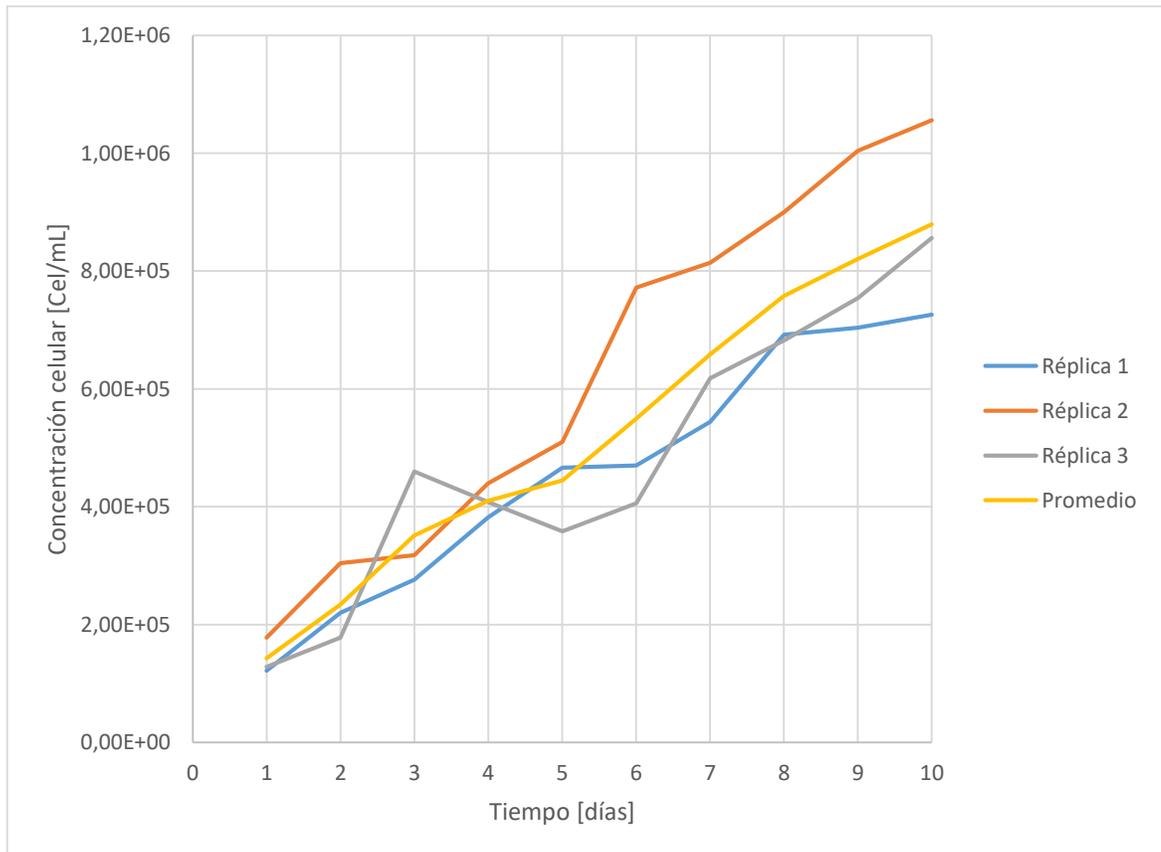


Tabla 32. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1 utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
2,68	1,52	1,66	1,95
3,26	2,08	3,22	2,85
2,62	2,46	5,60	3,56
3,14	3,34	5,00	3,83
3,56	5,46	7,44	5,49
5,26	8,34	6,56	6,72
5,64	9,04	7,14	7,27
6,96	9,30	8,14	8,13
7,04	10,5	8,98	8,85
7,62	10,3	8,22	8,73

Gráfica 21. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1 utilizando melote como suplemento.

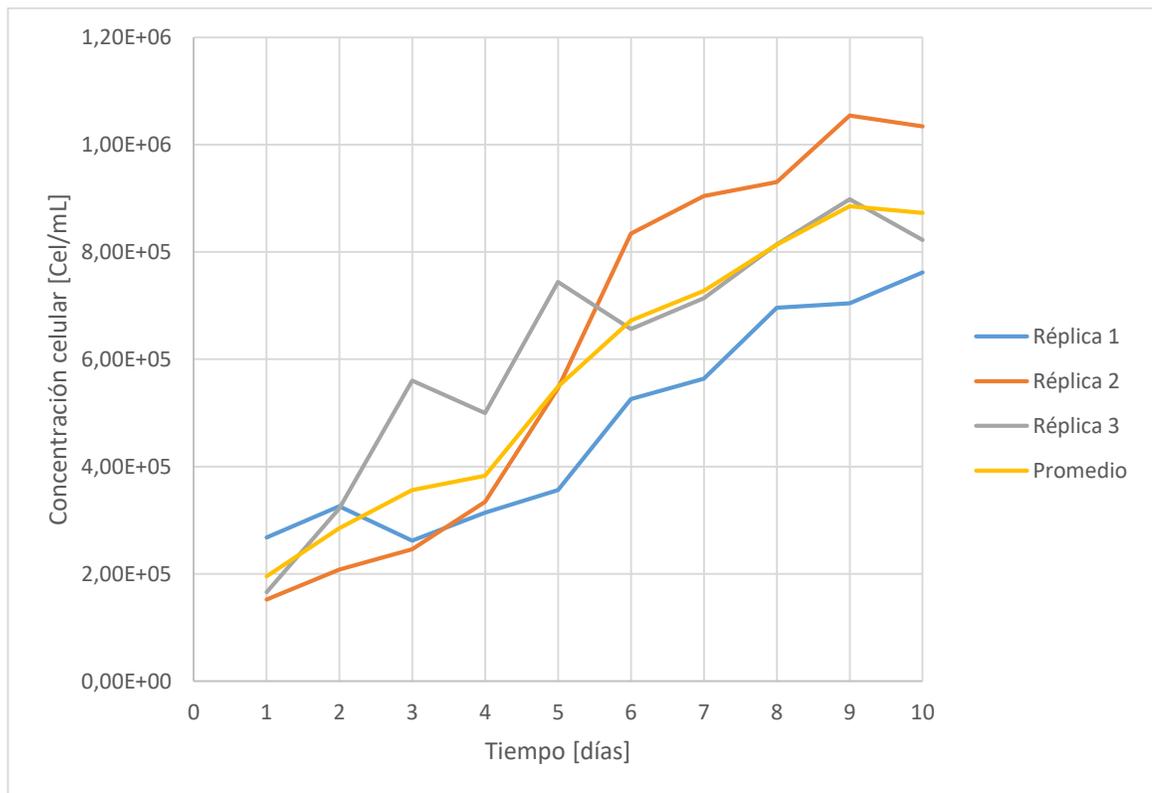


Tabla 33. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2 utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,80	1,70	1,62	1,71
1,98	1,74	2,52	2,08
3,46	2,98	3,32	3,25
4,20	4,48	4,64	4,44
5,40	7,78	7,50	6,89
7,16	9,08	8,38	8,21
7,34	10,7	9,50	9,17
8,46	12,1	9,54	10,0
9,98	12,1	9,62	10,6
10,4	12,1	12,2	11,5

Gráfica 22. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2 utilizando melote como suplemento.

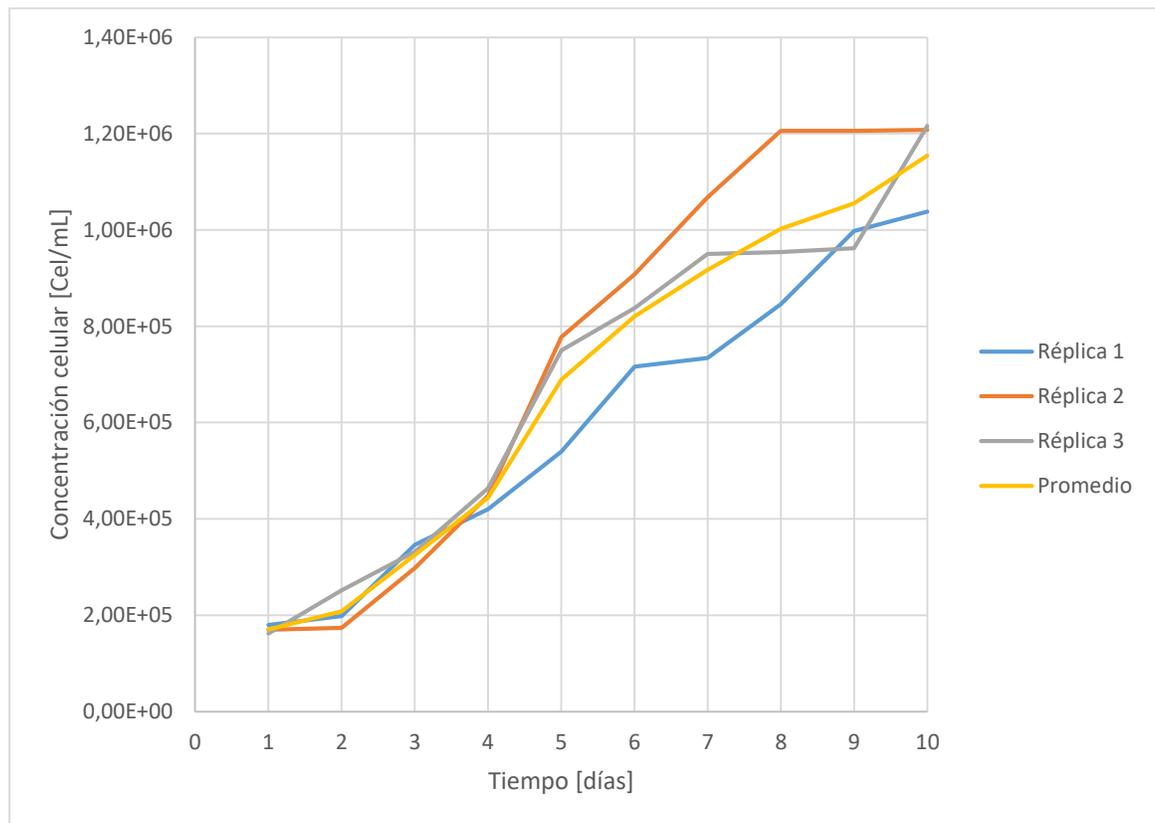


Tabla 34. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3 utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,74	1,52	1,64	1,63
2,04	1,64	2,98	2,22
3,68	3,06	5,30	4,01
4,02	4,08	5,48	4,53
4,40	4,40	7,32	5,37
7,36	5,68	7,46	6,83
7,54	6,16	9,06	7,59
7,98	6,82	8,24	7,68
8,08	8,10	7,74	7,97
8,22	8,62	8,24	8,36

Gráfica 23. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3 utilizando melote como suplemento.

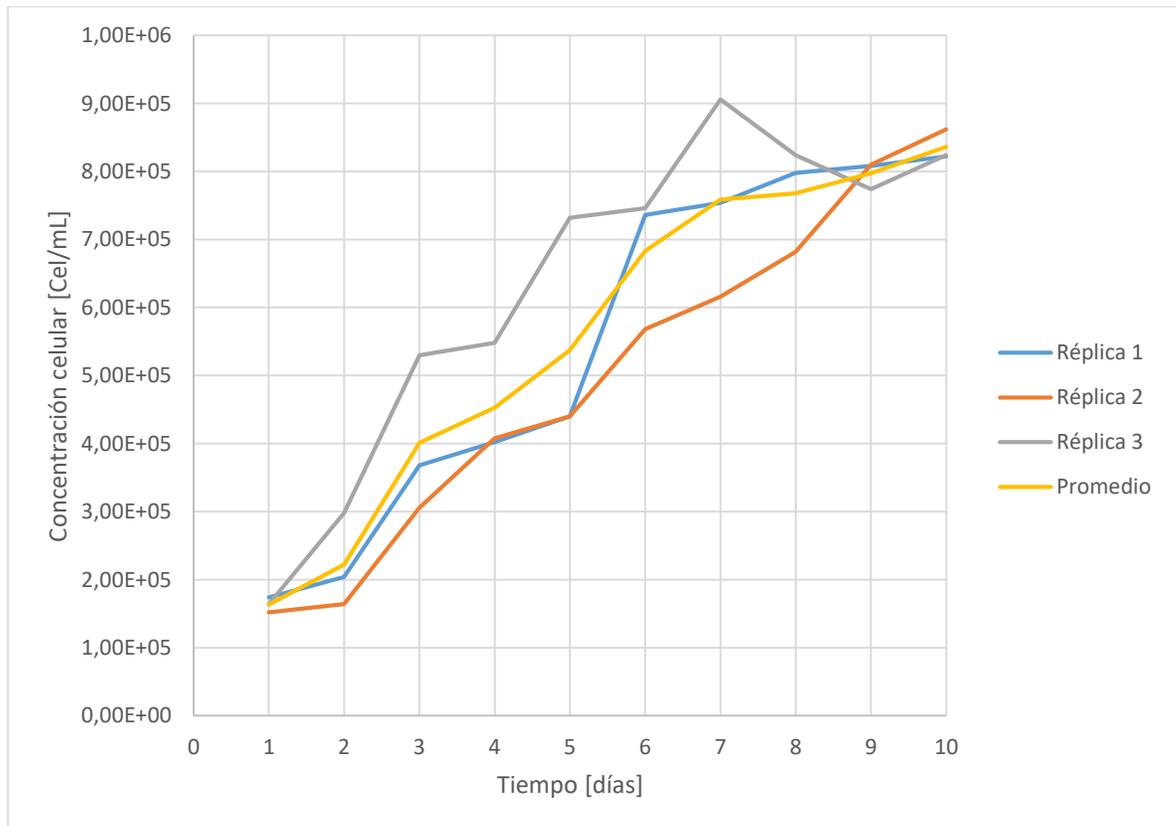


Tabla 35. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 4 utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
2,22	1,72	1,52	1,82
2,24	2,10	2,24	2,19
2,60	2,64	2,28	2,51
5,26	3,30	3,16	3,91
6,00	3,98	3,86	4,61
6,12	7,24	4,80	6,05
6,98	7,78	5,56	6,77
7,02	8,50	7,00	7,51
7,04	9,20	7,48	7,91
8,62	10,5	9,82	9,64

Gráfica 24. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 4 utilizando melote como suplemento.

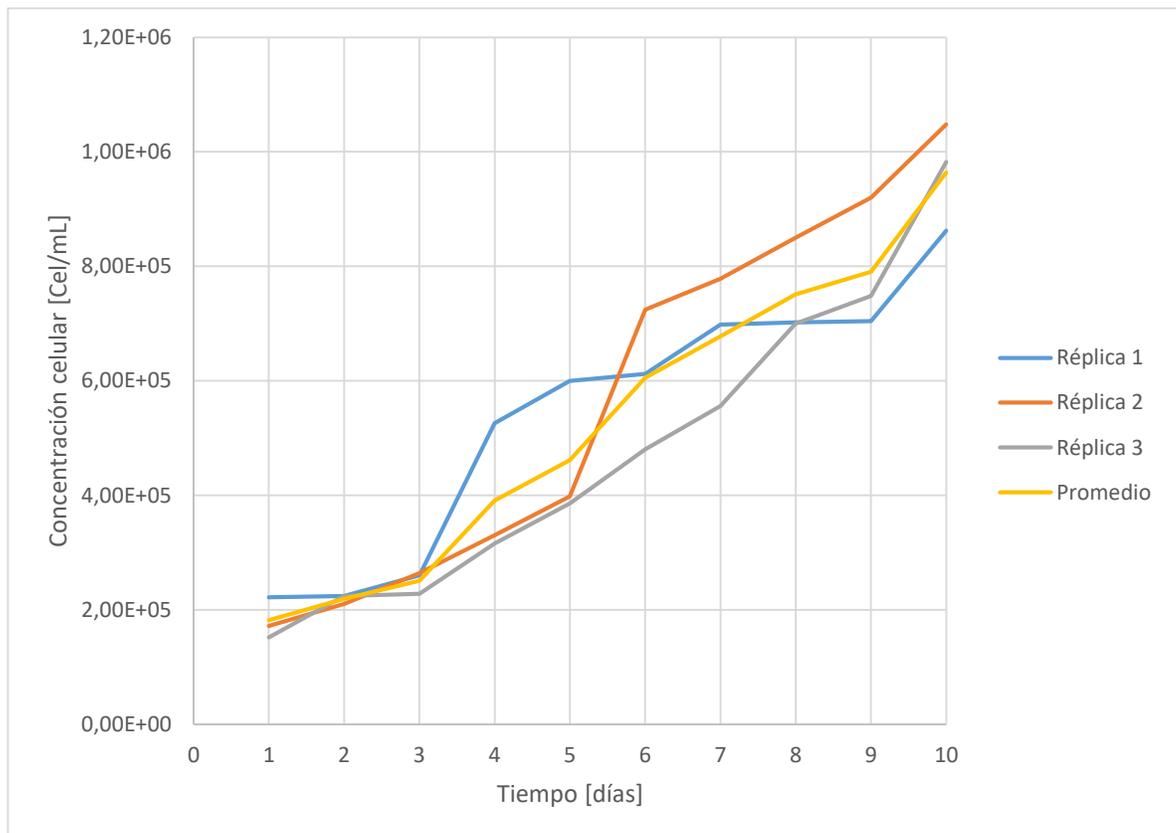
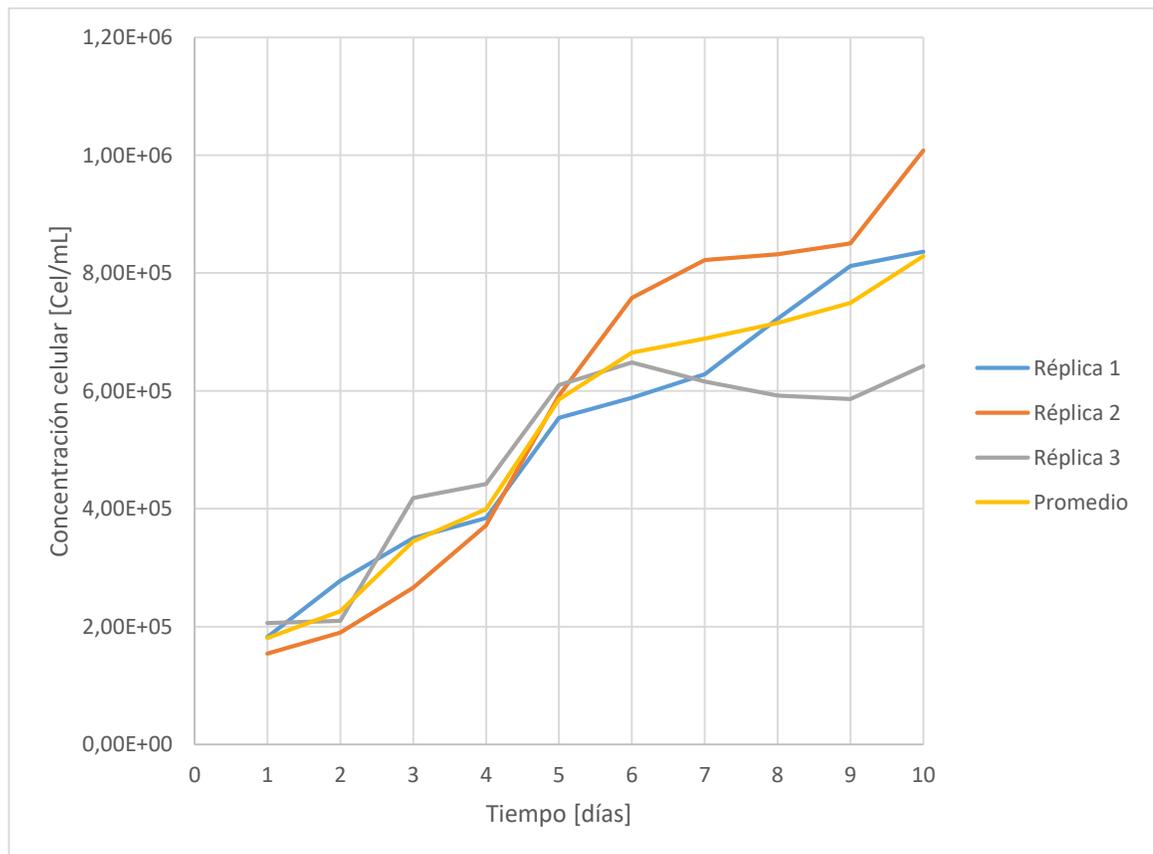


Tabla 36. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 5 utilizando melote como suplemento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,82	1,54	2,06	1,81
2,78	1,90	2,10	2,26
3,50	2,66	4,18	3,45
3,84	3,72	4,42	3,99
5,54	5,92	6,10	5,85
5,88	7,58	6,48	6,65
6,28	8,22	6,16	6,89
7,22	8,32	5,92	7,15
8,12	8,50	5,86	7,49
8,36	10,1	6,42	8,29

Gráfica 25. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 5 utilizando melote como suplemento.



ANEXO B.

CONCENTRACIÓN CELULAR Y CURVAS DE CRECIMIENTO PRE- EXPERIMENTO No. 2.

Tabla 37. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 1.

Concentración celular [Cel/mL]			
[x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,80	1,64	1,42	1,62
2,60	2,28	2,52	2,47
3,64	2,82	2,98	3,15
5,58	4,54	3,94	4,69
5,30	5,14	4,00	4,81
6,16	4,72	4,78	5,22
6,18	6,02	5,50	5,90
6,98	7,18	5,24	6,47
7,06	7,28	5,94	6,76
7,18	7,46	7,48	7,37

Gráfica 26. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 1.

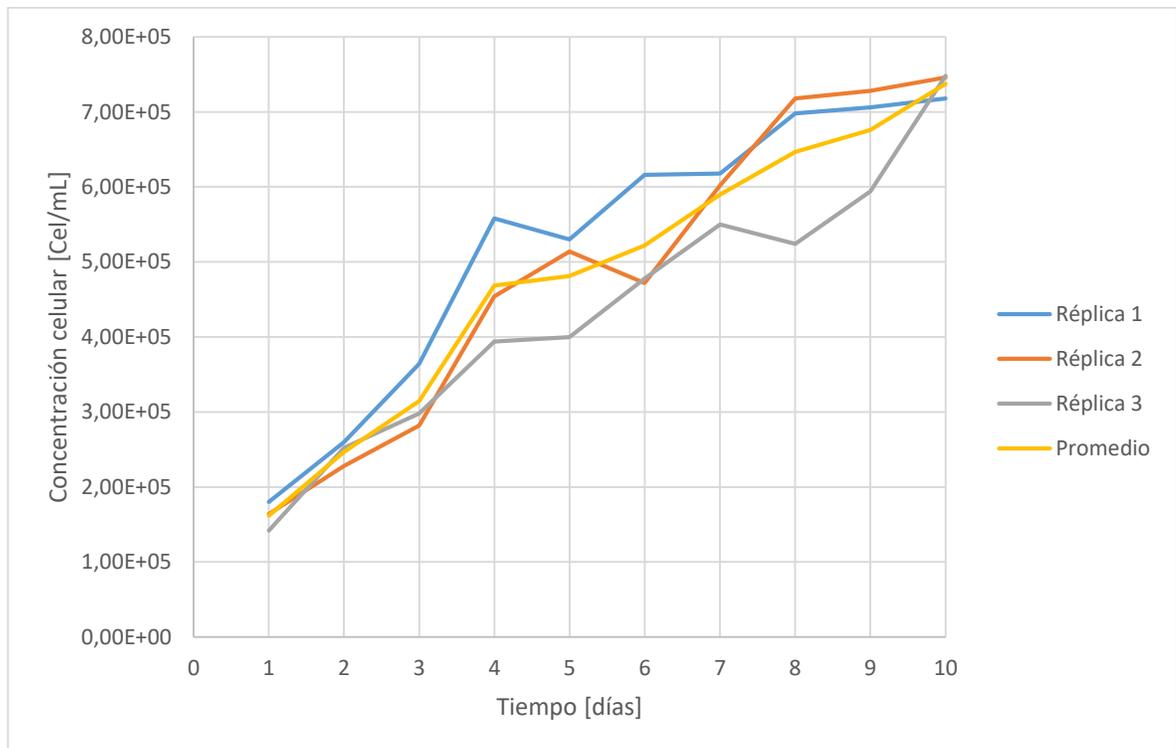


Tabla 38. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 2.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
1,80	1,70	1,62	1,71
1,98	1,74	2,52	2,08
3,46	2,98	3,32	3,25
4,20	4,48	4,64	4,44
5,40	7,78	7,50	6,89
7,16	9,08	8,38	8,21
7,34	10,7	9,50	9,17
8,46	12,1	9,54	10,0
9,98	12,1	9,62	10,6
1,04	12,1	12,2	11,5

Gráfica 27. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 2.

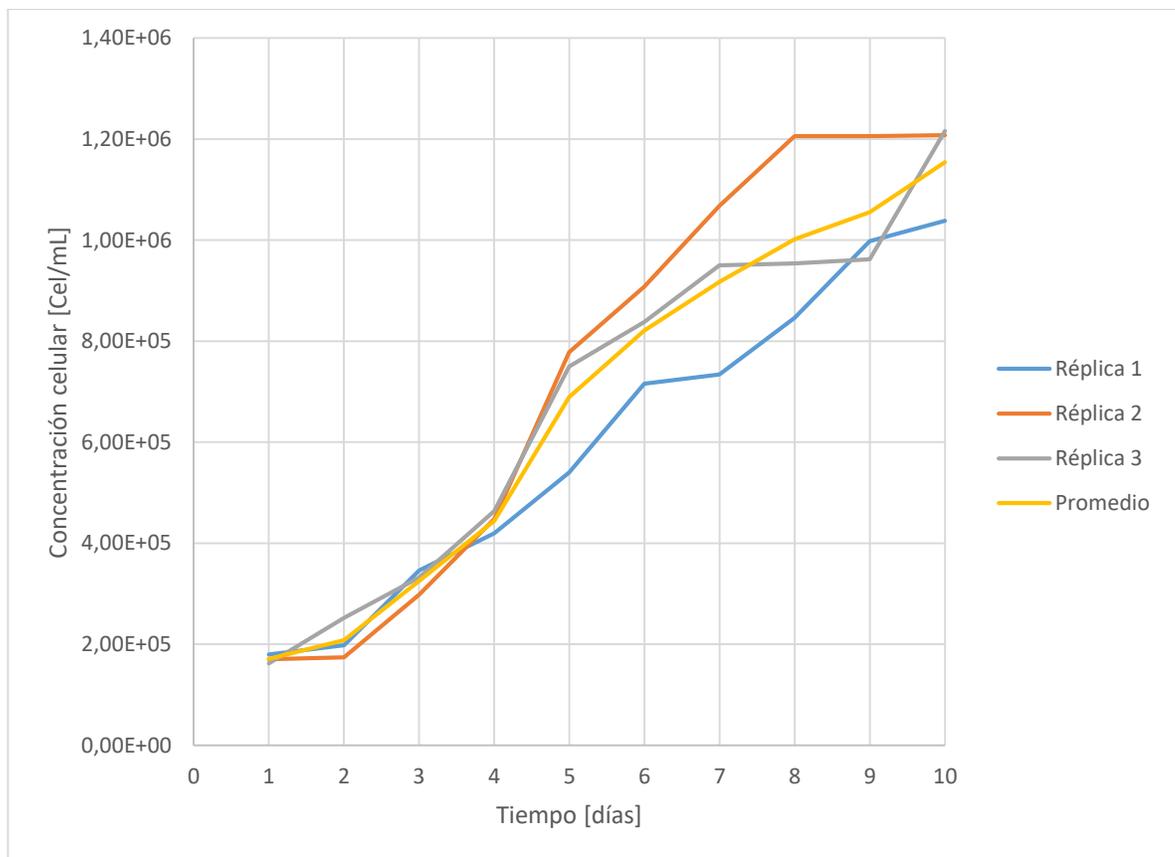
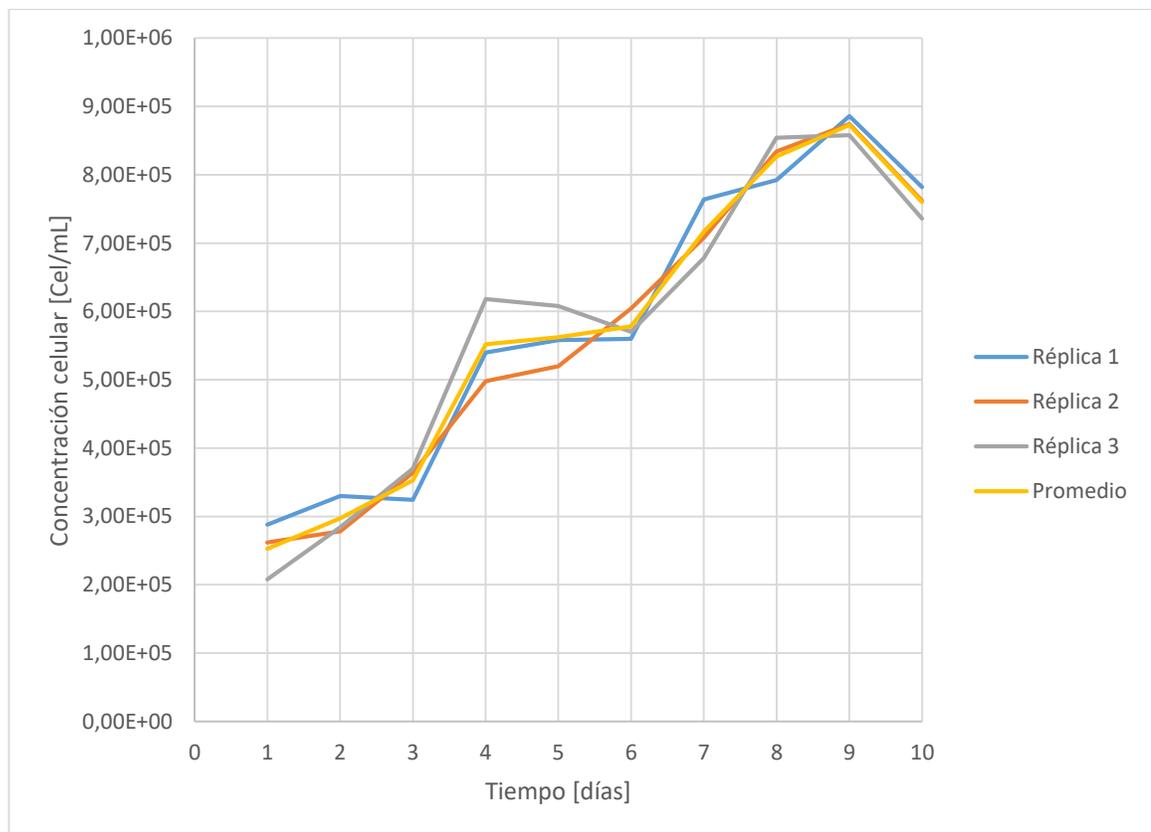


Tabla 39. Concentración celular para cada réplica del tratamiento 3.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
2,88	2,62	2,08	2,53
3,30	2,78	2,84	2,97
3,24	3,64	3,70	3,53
5,40	4,98	6,18	5,52
5,58	5,20	6,08	5,62
5,60	6,04	5,70	5,78
7,64	7,08	6,78	7,17
7,92	8,34	8,54	8,27
8,86	8,74	8,58	8,73
7,82	7,62	7,36	7,60

Gráfica 28. Curva de crecimiento de cada réplica del tratamiento 3.



ANEXO C.

CONCENTRACIÓN CELULAR Y CURVAS DE CRECIMIENTO DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL Y SU REPETICIÓN.

Tabla 40. Concentración celular para cada réplica del experimento.

Concentración celular [Cel/mL]			
[x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
3,40	3,32	3,34	3,35
3,76	4,20	3,70	3,89
4,50	4,62	4,52	4,55
4,66	4,82	4,80	4,76
5,32	5,18	5,10	5,20
5,44	5,88	5,14	5,49
5,58	5,90	5,30	5,59
5,90	5,54	5,80	5,75
6,88	6,18	6,80	6,62
7,38	6,08	7,42	6,96
7,94	6,80	8,34	7,69
9,28	7,40	9,08	8,59
9,40	7,84	9,18	8,81
9,90	7,98	10,5	9,46
9,98	9,38	10,8	10,1

Gráfica 29. Curva de crecimiento de cada réplica del experimento.

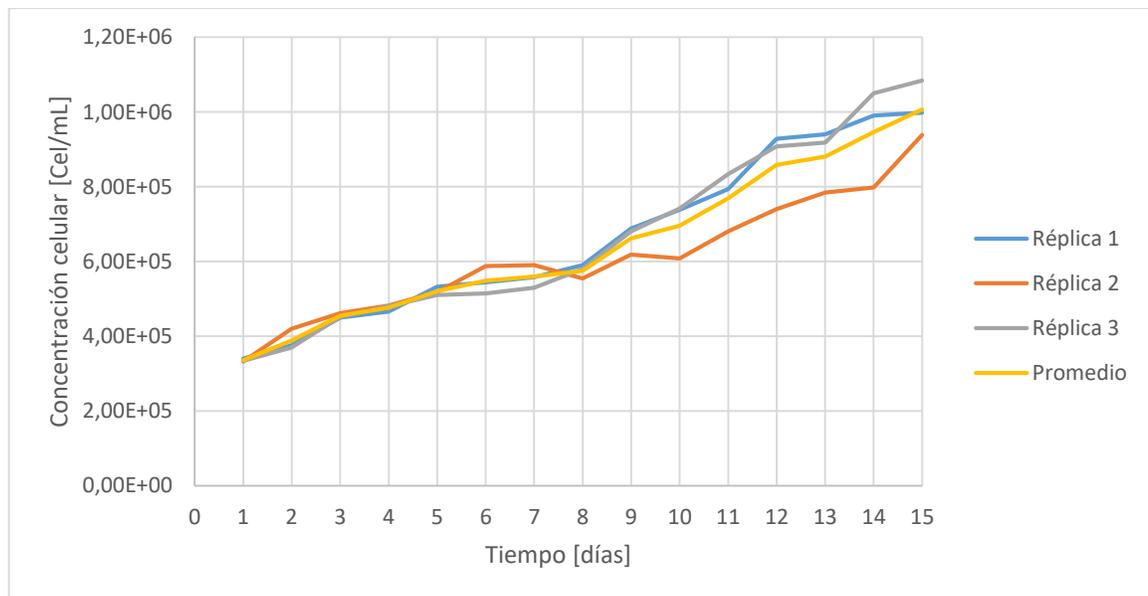
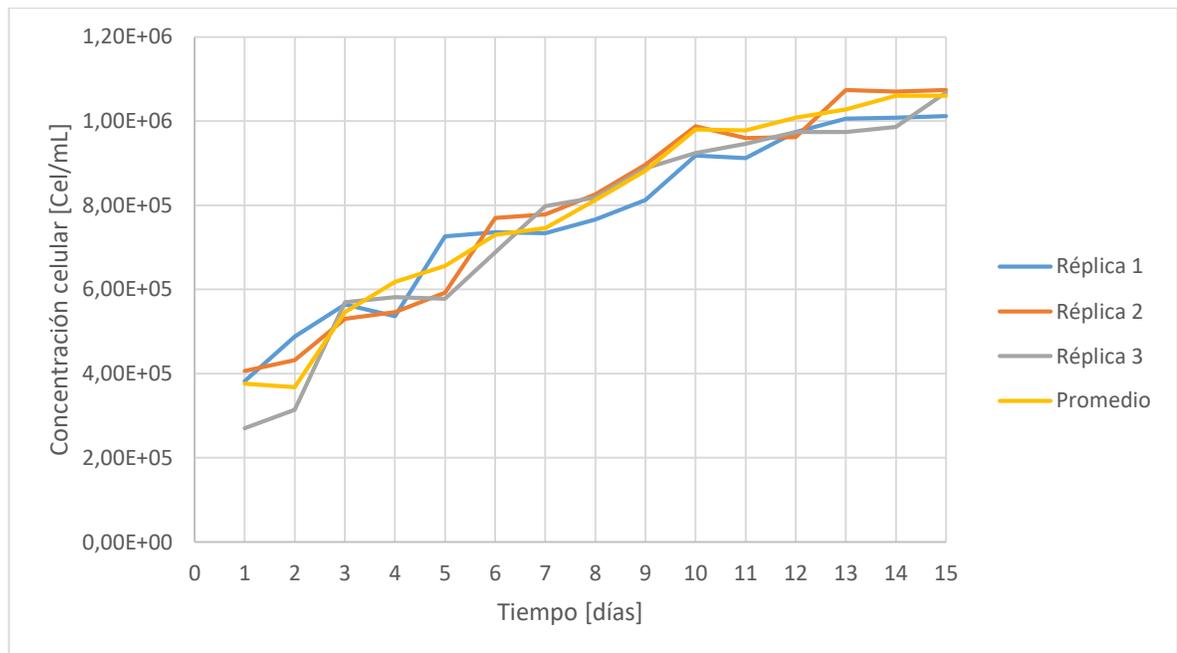


Tabla 41. Concentración celular para cada réplica de la repetición del experimento.

Concentración celular [Cel/mL] [x10 ⁵]			
Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
3,82	4,06	2,70	3,76
4,88	4,32	3,14	3,68
5,64	5,30	5,70	5,46
5,36	5,46	5,82	6,18
7,26	5,92	5,78	6,56
7,36	7,70	6,88	7,30
7,34	7,78	7,98	7,46
7,66	8,26	8,18	8,12
8,12	8,96	8,88	8,82
9,18	9,88	9,24	9,80
9,12	9,60	9,46	9,78
9,74	9,62	9,74	10,1
10,1	10,7	9,74	10,3
10,1	10,7	9,86	10,6
10,1	10,7	10,7	10,6

Gráfica 29. Curva de crecimiento de cada réplica de la repetición del experimento.



ANEXO D.

MUESTRA DE CÁLCULOS DEL TRATAMIENTO DE LA BIOMASA.

$$\text{Porcentaje de materia seca} = \frac{\text{Biomasa seca obtenida (g)}}{\text{Biomasa húmeda obtenida (g)}}$$

- EXPERIMENTO

$$\text{Porcentaje de materia seca blanco} = \frac{2,8605}{56,633} * 100 = 5,05\%$$

$$\text{Porcentaje de materia seca relación 1:1} = \frac{6,9504}{202,5} * 100 = 3,44\%$$

- REPETICIÓN DEL EXPERIMENTO

$$\text{Porcentaje de materia seca réplica 1} = \frac{23,1375}{51,3746} * 100 = 45\%$$

$$\text{Porcentaje de materia seca réplica 2} = \frac{48,7294}{79,7294} * 100 = 61\%$$

$$\text{Porcentaje de materia seca réplica 3} = \frac{60,1453}{90,7389} * 100 = 66\%$$

$$\text{Porcentaje de materia seca réplica 4} = \frac{49,743}{91,852} * 100 = 54\%$$

% Materia seca para la réplica 1 después de 17 horas de secado

$$\text{Porcentaje de materia seca réplica 1} = \frac{10,7525}{51,3746} * 100 = 21\%$$

$$\text{Porcentaje de Humedad} = 1 - \% \text{ Materia seca}$$

- EXPERIMENTO

$$\text{Porcentaje de humedad blanco} = 1 - 5,05\% = 94,95\%$$

$$\text{Porcentaje de humedad relación 1:1} = 1 - 3,44\% = 96,54\%$$

- REPETICIÓN EXPERIMENTO

$$\text{Porcentaje de humedad réplica 1} = 1 - 45\% = 55\%$$

$$\text{Porcentaje de humedad réplica 2} = 1 - 61\% = 39\%$$

$$\text{Porcentaje de humedad réplica 3} = 1 - 66\% = 34\%$$

$$\text{Porcentaje de humedad réplica 4} = 1 - 54\% = 46\%$$

Porcentaje de humedad para la réplica 1 después de 17 horas de secado

$$\text{Porcentaje de humedad réplica 1} = 1 - 21\% = 79\%$$

$$\text{Rendimiento húmedo} = \frac{\text{Biomasa húmeda obtenida (g)}}{\text{Volumen de medio (g)}}$$

- EXPERIMENTO

$$\text{Rendimiento húmedo blanco} = \frac{56,633}{3,8} = 14,9034 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento húmedo relación 1:1} = \frac{202,05}{3,8} = 26,5855 \text{ g/L}$$

- REPETICIÓN EXPERIMENTO

$$\text{Rendimiento húmedo réplica 1} = \frac{51,3746}{3,8} = 13,5196 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento húmedo réplica 2} = \frac{79,7294}{3,8} = 20,9814 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento húmedo réplica 3} = \frac{90,7389}{3,8} = 23,8787 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento húmedo réplica 4} = \frac{91,8520}{3,8} = 24,1716 \text{ g/L}$$

Rendimiento de la biomasa húmeda para la réplica 1 después de 17 horas de secado

$$\text{Rendimiento húmedo réplica 1} = \frac{51,3746}{3,8} = 13,5196 \text{ g/L}$$

Rendimiento seco = Rendimiento húmedo * % Materia seca

- EXPERIMENTO

$$\text{Rendimiento seco blanco} = 14,9034 * 5,05\% = 0,7526 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento seco relación 1: 1} = 26,5855 * 3,44\% = 0,9145 \text{ g/L}$$

- REPETICIÓN EXPERIMENTO

$$\text{Rendimiento seco réplica 1} = 13,5196 * 45\% = 6,0888 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento seco réplica 2} = 20,9814 * 61\% = 12,8235 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento seco réplica 3} = 23,8787 * 66\% = 15,8277 \text{ g/L}$$

$$\text{Rendimiento seco réplica 4} = 24,1716 * 54\% = 13,0903 \text{ g/L}$$

Rendimiento de la biomasa seca para la réplica 1 después de 17 horas de secado

$$\text{Rendimiento seco réplica 1} = 13,5196 * 21\% = 2,8391 \text{ g/L}$$

$$\text{Productividad} = \frac{\text{Biomasa obtenida (g)}}{\text{Dias * Volumen (L)}}$$

- EXPERIMENTO

$$\text{Productividad blanco} = \frac{2,8605}{15 * 3,8} = 0,0502 \text{ g /dL}$$

$$\text{Productividad relación 1: 1} = \frac{6,9504}{15 * 3,8} = 0,06097 \text{ g /dL}$$

- REPETICIÓN EXPERIMENTO

$$\text{Productividad réplica 1} = \frac{23,1375}{15 * 3,8} = 0,4059 \text{ g /dL}$$

$$\text{Productividad réplica 2} = \frac{48,7294}{15 * 3,8} = 0,8549 \text{ g /dL}$$

$$\text{Productividad réplica 3} = \frac{60,1453}{15 * 3,8} = 1,0552 \text{ g /dL}$$

$$\text{Productividad réplica 4} = \frac{49,7430}{15 * 3,8} = 0,8727 \text{ g /dL}$$

Productividad para la réplica 1 después de 17 horas de secado

$$\text{Productividad réplica 1} = \frac{10,7525}{15 * 3,8} = 0,1886 \text{ g /dL}$$

ANEXO E.
CROMATOGRAFÍA DE GASES (PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS)

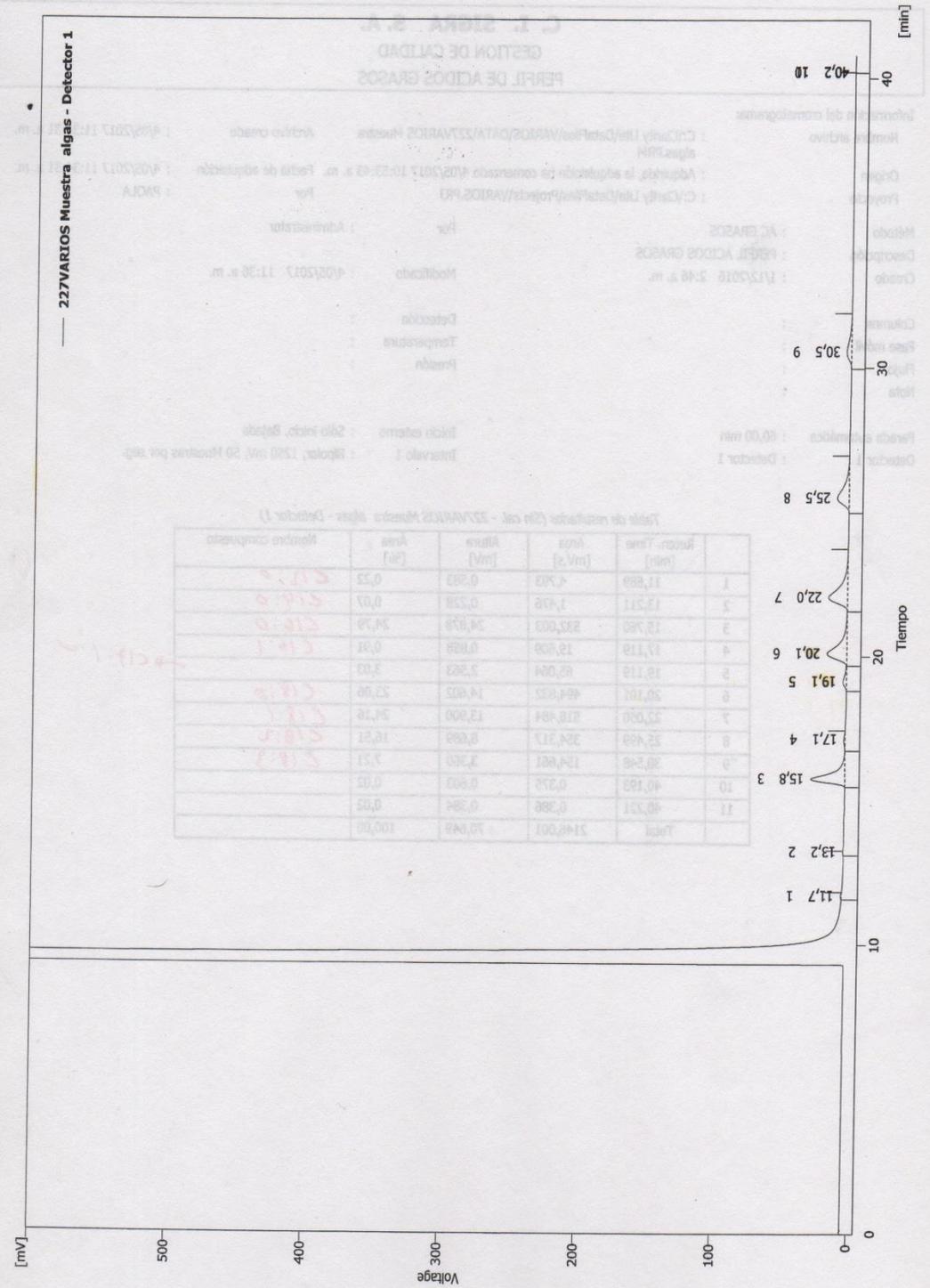
C. I. SIGRA S. A.
GESTION DE CALIDAD
PERFIL DE ACIDOS GRASOS

Información del cromatograma:

Nombre archivo : C:\Clarity Lite\DataFiles\VARIOS\DATA\227\VARIOS Muestra algas.PRM Archivo creado : 4/05/2017 11:34:31 a. m.
 Origen : Adquirida, la adquisición ha comenzado 4/05/2017 10:53:43 a. m. Fecha de adquisición : 4/05/2017 11:34:31 a. m.
 Proyecto : C:\Clarity Lite\DataFiles\Projects\VARIOS.PRJ Por : PAOLA
 Método : AC GRASOS Por : Administrator
 Descripción : PERFIL ACIDOS GRASOS
 Creado : 1/12/2016 2:46 a. m. Modificado : 4/05/2017 11:36 a. m.
 Columna : Detección :
 Fase móvil : Temperatura :
 Flujo : Presión :
 Nota :
 Parada automática : 60,00 min Inicio externo : Sólo inicio, Bajada
 Detector 1 : Detector 1 Intervalo 1 : Bipolar, 1250 mV, 50 Muestras por seg.

Tabla de resultados (Sin cal. - 227\VARIOS Muestra algas - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Altura [mV]	Área [%]	Nombre compuesto
1	11,689	4,793	0,583	0,22	C12:0
2	13,211	1,476	0,228	0,07	C14:0
3	15,760	532,003	24,878	24,79	C16:0
4	17,119	19,609	0,858	0,91	C16:1
5	19,119	65,064	2,563	3,03	C17:1 ✓
6	20,101	494,832	14,602	23,06	C18:0
7	22,050	518,484	13,900	24,16	C18:1
8	25,499	354,317	8,689	16,51	C18:2
9	30,548	154,661	3,360	7,21	C18:3
10	40,193	0,375	0,603	0,02	
11	40,221	0,386	0,384	0,02	
	Total	2146,001	70,649	100,00	



C. I. SIGRA S. A.
GESTION DE CALIDAD
PERFIL DE ACIDOS GRASOS

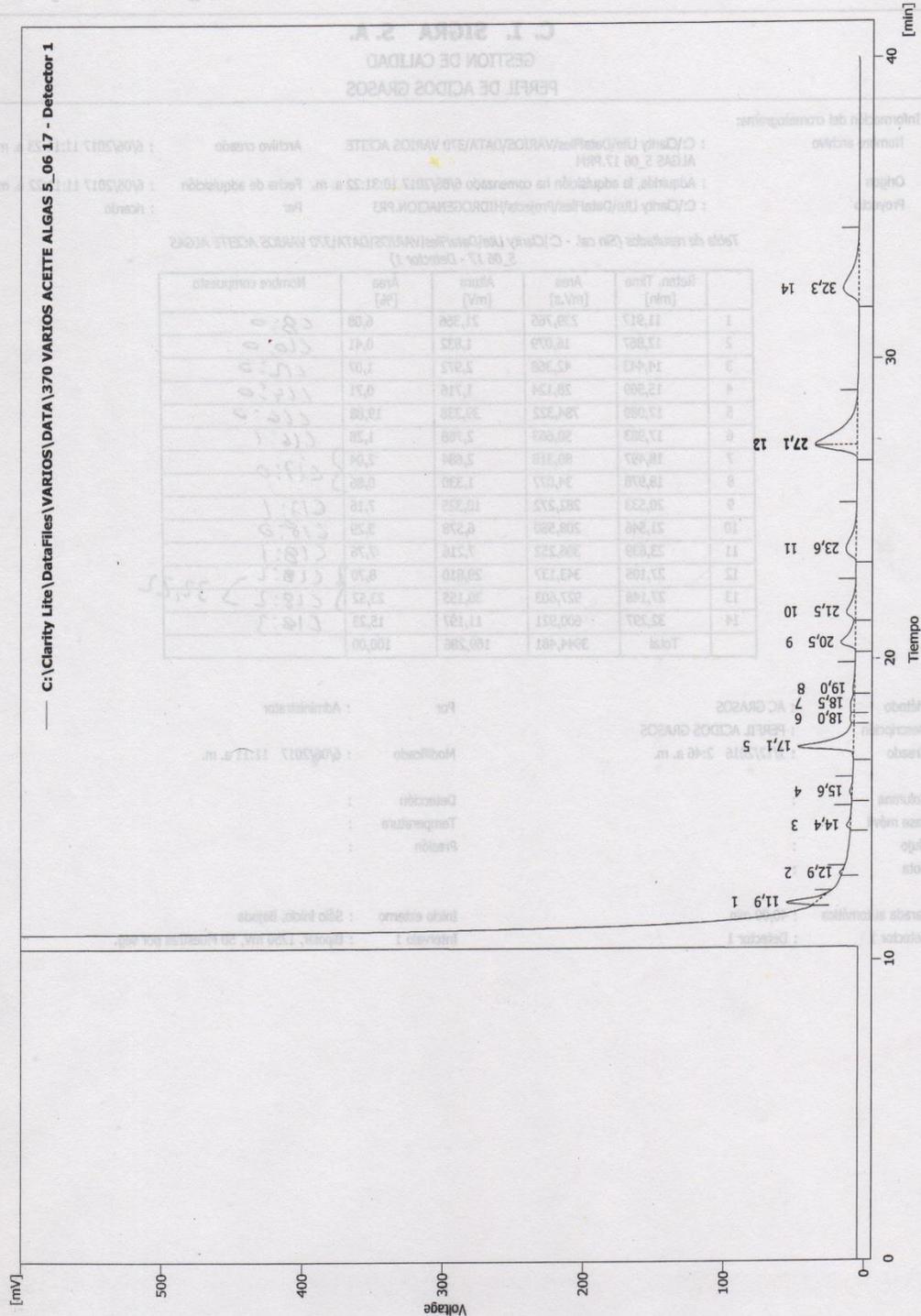
Información del cromatograma:
 Nombre archivo : C:\Clarity Lite\DataFiles\ARIOS\DATA\370 VARIOS ACEITE ALGAS 5_06 17.PRM Archivo creado : 6/06/2017 11:11:23 a. m.
 Origen : Adquirida, la adquisición ha comenzado 6/06/2017 10:31:22 a. m. Fecha de adquisición : 6/06/2017 11:11:22 a. m.
 Proyecto : C:\Clarity Lite\DataFiles\Projects\HIDROGENACION.PRJ Por : ricardo

Tabla de resultados (Sin cal. - C:\Clarity Lite\DataFiles\ARIOS\DATA\370 VARIOS ACEITE ALGAS 5_06 17 - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Altura [mV]	Area [%]	Nombre compuesto
1	11,917	239,765	21,366	6,08	C8:0
2	12,867	16,079	1,832	0,41	C10:0
3	14,443	42,368	2,972	1,07	C12:0
4	15,569	28,124	1,716	0,71	C14:0
5	17,089	784,322	39,338	19,88	C16:0
6	17,983	50,663	2,768	1,28	C16:1
7	18,497	80,318	2,684	2,04	C17:0
8	18,978	34,077	1,330	0,86	
9	20,533	282,272	10,325	7,16	C17:1
10	21,546	208,580	6,578	5,29	C18:0
11	23,639	306,252	7,216	7,76	C18:1
12	27,105	343,137	29,810	8,70	C18:2 } 32,22
13	27,148	927,603	30,155	23,52	
14	32,297	600,921	11,197	15,23	C18:3
	Total	3944,481	169,286	100,00	

Método : AC GRASOS Por : Administrator
 Descripción : PERFIL ACIDOS GRASOS Modificado : 6/06/2017 11:11 a. m.
 Creado : 1/12/2016 2:46 a. m.
 Columna : Detección :
 Fase móvil : Temperatura :
 Flujo : Presión :
 Nota :
 Parada automática : 40,00 min Inicio externo : Sólo inicio, Bajada
 Detector 1 : Detector 1 Intervalo 1 : Bipolar, 1250 mV, 50 Muestras por seg.

C:\Clarity Lite\DataFiles\VARIOS\DATA\370 VARIOS ACEITE ALGAS 5_06 17 - Detector 1



Peak	Retention Time [min]	Area [mV]				
1	11.917	11.917	11.917	11.917	11.917	11.917
2	12.917	12.917	12.917	12.917	12.917	12.917
3	14.417	14.417	14.417	14.417	14.417	14.417
4	15.617	15.617	15.617	15.617	15.617	15.617
5	17.117	17.117	17.117	17.117	17.117	17.117
6	17.517	17.517	17.517	17.517	17.517	17.517
7	18.017	18.017	18.017	18.017	18.017	18.017
8	18.517	18.517	18.517	18.517	18.517	18.517
9	19.017	19.017	19.017	19.017	19.017	19.017
10	20.517	20.517	20.517	20.517	20.517	20.517
11	21.517	21.517	21.517	21.517	21.517	21.517
12	23.617	23.617	23.617	23.617	23.617	23.617
13	27.117	27.117	27.117	27.117	27.117	27.117
14	32.317	32.317	32.317	32.317	32.317	32.317
Total		394,481	100,000	100,000	100,000	100,000

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros **Jose Nicolas Sosa Moreno y Paula Andrea Vasquez Segura** en calidad de titulares de la obra *Evaluación del potencial de un residuo proveniente de la industria panelera como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal*, elaborada en el año 2016, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el **Repositorio Digital Institucional – Lumieres**, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, Intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la *licencia Creative Commons* que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución - no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución - no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución - no comercial - compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input checked="" type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD ROM y/o Impreso	x	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	x	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		x

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, a los 2 días del mes de agosto del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Jose Nicolas	Sosa Moreno
Documento de identificación No	Firma
1.010.211.552	Jose Nicolas Sosa M.

Autor 2

Nombres	Apellidos
Paula Andrea	Vasquez Segura
Documento de identificación No	Firma
1.026.580.743	Paula Andrea Vasquez S.