UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

EFECTO DE LA PRESIÓN Y TIEMPO SOBRE LA OBTENCION DE BIOMASA SECA DE *Chlorella vulgaris*

TESIS

PRESENTADO POR:

MARÍA TEREZA YUGRA FLORES

Para optar por el Título Profesional de:

INGENIERO PESQUERO

ASESOR

DR. WALTER MERMA CRUZ

ILO- PERÚ

2019

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
"Universitas Universitatis"

ESCUELA PROFESIONAL
DE INGENIERÍA PESQUERA

"Año de la Lucha Contra la Corrupción e Impunidad

ACTA DE SUSTENTACIÓN

El Jurado suscribiente, ha calificado el trabajo de TESIS:

TITULADO: **"EFECTO DE LA PRESION Y TIEMPO SOBRE LA OBTENCION DE BIOMASA SECA DE *Chlorella vulgaris*"**,

.....

PRESIDENTE	:	DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA
PRIMER MIEMBRO	:	MSc. SUCY ALICIA CABALLERO APAZA
SEGUNDO MIEMBRO	:	MG. RICHARD PONCE CUSI

Presentado por el (la) BACHILLER:

MARIA TEREZA YUGRA FLORES

.....

Participando en calidad de asesor (es): **Dr. WALTER MERMA CRUZ**

Después de las preguntas respectivas y habiendo el jurado tomado el tiempo para la deliberación de la misma.

SE DECLARA .....APROBADO..... (APROBADO/DESAPROBADO) por ..Unanimidad..... (UNANIMIDAD/MAYORIA), con el calificativo de ..15..... (EXCELENTE/MUY BUENO/BUENO/REGULAR/DEFICIENTE), equivalente a ...bueno.....; quedando expedito para que se le confiera el Título Profesional de .....Ing. Pesquero.....

Ilo, 12 de Diciembre del 2019

DRA. SHEDA MENDEZ ANCCA
Presidente de Jurado

MSc. SUCY ALICIA CABALLERO APAZA
Primer Miembro

MG. RICHARD PONCE CUSI
Segundo Miembro

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta parte de mi vida con buena salud, llenarme de bendiciones y protegiendo a quienes están conmigo y quiero.

A mis padres Carmen y Jesús que con su cariño inigualable y la educación que me brindaron en casa, me enseñaron que con perseverancia y paciencia toda meta se convierte en una realidad.

A mis hermanas Karen y Karol, que con nuestras travesuras de siempre me enseñaron que, a pesar de las adversidades tener compañeros que sean nuestro soporte, lo es todo para seguir adelante.

A mi tío Oscar que es un segundo padre para mí y mis hermanas, él es un pilar importante en nuestras vidas y nos alienta siempre en todo lo que realizamos y queremos lograr.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Walter Merma por aceptar ser mi asesor, por las observaciones hechas y por su continuo apoyo para esta tesis; y en su momento al inicio de este proyecto al ser Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera por la autorización para uso del equipo liofilizador y otros, además del uso de los Laboratorios de Cultivo de Microalgas.

Al Dr. Edwin Félix Poicon Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera por brindarme autorización de usar Laboratorios para Cultivo de microalgas y Laboratorio de Liofilización; materiales y equipos para poder ejecutar mi tesis desde la mitad de la ejecución del proyecto hasta la culminación de la ejecución de esta investigación.

A Yesica Alvares por brindarme sus conocimientos en cuanto al cultivo de microalgas y su apoyo en el escalamiento masivo (fotobioreactores).

A IMARPE – ILO por las facilidades para el recojo de agua de mar filtrada que fue muy importante para la ejecución de esta tesis.

A la Empresa Pesquera Austral Group S.A.A. y a mis compañeros de Aseguramiento de la Calidad de esta planta pesquera, que gracias a ellos pude tener el análisis de proximales de biomasa húmeda microalgal y biomasa seca.

Gracias a todos….

RESUMEN

La ejecución del proyecto de investigación se desarrolló en los Laboratorios de Cultivo de Microalga y en el Laboratorio de Liofilización de la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo, el propósito del proyecto fue determinar el efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris*. La microalga fue cultivada en agua de mar filtrada enriquecida con el medio F/2 Guillard, se obtuvo biomasa húmeda a través del proceso de centrifugación del cultivo para luego dividir la biomasa en tres partes (para 3 tratamientos), ultracongelarse y someter cada parte a un tiempo de liofilizado diferente (12 h., 24 h. y 36 h.) posteriormente la biomasa seca fue analizada proximalmente.

Observándose que en cuanto a Porcentaje de perdida de humedad la microalga sometida a 12 horas de liofilización arrojo un 63.79% con un Peso de biomasa seca final de 15.16 gramos, a diferencia del sometido a 24 horas que obtuvo un Peso Final de biomasa seca de 13.22 gramos y un Porcentaje de humedad promedio de 68.45%; este último tratamiento redujo considerablemente la humedad de la Biomasa Húmeda considerándola como una buena opción para someter Biomasa microalgal a un secado por liofilización, en cuanto al último tratamiento (Tratamiento 3) se obtuvieron datos de 13.71 gramos en cuanto a promedio de Peso biomasa seca y el Promedio de Porcentaje de Humedad Perdida se obtuvo un 67.20%. Todos estos resultados obtenidos de cálculos de datos directos de pesado de frascos para liofilizar.

En cuanto al efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris*, según el análisis estadístico de datos obtenidos concluyo que si se desea obtener cantidad (mayor peso en harina) se debe liofilizar la biomasa húmeda a 12 horas con una presión de 0.04 mbar. Pero si se desea tener calidad para transformar la harina en alimento por la proteína obtenida y la perdida de humedad

obtenida entonces debemos optar por liofilizar a 24 horas la biomasa húmeda.

PALABRAS CLAVE: Microalga, Biomasa Húmeda, Liofilización.

ABSTRACT

The execution of the research project was carried out in the Microalgae Cultivation Laboratories and in the Freeze Drying Laboratory of the Universidad Nacional Moquegua – Filial Ilo, the purpose of the project was to determine the effect of pressure and time on obtaining dry biomass of *Chlorella vulgaris*. The microalgae were cultivated in filtered seawater enriched with the F / 2 Guillard medium, wet biomass was obtained through the centrifugation process of the crop and then divided the biomass into three parts (for 3 treatments), freeze and subject each part to a different lyophilisate time (12 h., 24 h. and 36 h.) subsequently the dried biomass was analyzed proximally.

Noting that as regards the percentage of moisture loss, the microalgae subjected to 12 hours of lyophilization yielded 63.79% with a final dry Biomass Weight of 15.16 grams, unlike the one submitted at 24 hours that obtained a Final Dry Biomass Weight of 13.22 grams and an average humidity percentage of 68.45%; This last treatment significantly reduced the humidity of the Wet Biomass considering it as a good option to subject microalgal Biomass to a drying by lyophilization, as for the last treatment (Treatment 3) data of 13.71 grams were obtained in terms of average Dry Biomass Weight and The Average Percentage of Lost Humidity was obtained by 67.20%. All these results obtained from calculations of direct data of weighing bottles to lyophilize.

Regarding the effect of pressure and time on obtaining Dry Biomass from *Chlorella vulgaris*, according to the statistical analysis of data obtained, I conclude that if you want to obtain quantity (greater weight in flour), you must lyophilize the Wet Biomass at 12 hours with a pressure of 0.04 mbar. But if you want to have quality to transform the flour into food for the protein obtained and the loss of moisture obtained then we must choose to lyophilize the wet biomass within 24 hours.

KEY WORDS: Microalgae, Wet Biomass, Lyophilization.

ÍNDICE

PÁGINA DE JURADO ii
DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
RESUMEN v
ABSTRACT vii
ÍNDICE viii
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xiii
ÍNDICE DE ANEXOS xiv

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 3

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA 3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 4
1.2.1. INTERROGANTE GENERAL 4
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN 4
1.4. OBJETIVOS 5
1.4.1. OBJETIVO GENERAL 5
1.4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 5
1.5. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS 6

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 7

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO 7
2.2. BASES TEÓRICAS 10
2.2.1. MICROALGA 10
2.2.2. CULTIVO DE MICROALGAS 12
2.2.2.1. TIPOS DE CULTIVO 14
2.2.2.2. FACTORES PARA EL CULTIVO 14
2.2.3. Microalga *Chlorella vulgaris* 15

2.2.4. LIOFILIZACIÓN 17
2.2.5. TIEMPO EN LA LIOFILIZACIÓN 18
2.2.6. PRESION EN LA LIOFILIZACIÓN 19
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 19
2.3.1. MICROALGA 19
2.3.2. CULTIVO DE MICROALGAS 20
2.3.3. Microalga *Chlorella vulgaris* 20
2.3.4. CENTRIFUGACIÓN 20
2.3.5. BIOMASA MICROALGAL 21
2.3.5.1. BIOMASA HÚMEDA DE MICROALGA 21
2.3.5.2. BIOMASA SECA DE MICROALGA 21
2.3.6. ULTRACONGELACIÓN 22
2.3.7. LIOFILIZACIÓN 22
2.3.8. PORCENTAJE DE HUMEDAD 23

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO 24

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN 24
3.2. TIPO DE DISEÑO 24
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 25
3.3.1. VARIABLE INDEPENDIENTE 25
3.3.2. VARIABLE DEPENDIENTE 25
3.4. POBLACIÓN Y/O MUESTRA DE ESTUDIO 26
3.4.1. POBLACIÓN 26
3.4.2. MUESTRA 26
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS 26
3.5.1. TÉCNICAS 26
3.5.2. DISEÑO CUASI EXPERIMENTAL 27
3.6. MATERIALES Y EQUIPOS 28
3.6.1. MATERIA PRIMA 28
3.6.2. MATERIALES DE LABORATORIO 28
3.6.3. EQUIPOS 29
3.6.4. INSUMOS 30
3.6.5. INDUMENTARIA DE TRABAJO 30
3.6.6. OTROS 30
3.7. MÉTODOS Y ANÁLISIS DE DATOS 31
3.7.1. METODOLOGÍA 31
3.7.1.1. CULTIVO DE MICROALGA *Chlorella vulgaris* EN LABORATORIO, EN CONDICIONES SEMI CONTROLADAS 31
3.7.1.1.1. FASE CEPARIO 31
3.7.1.1.2. FASE INICIAL 34
3.7.1.1.3. FASE INTERMEDIA 36

3.7.1.1.4. FASE MASIVO 38
3.7.1.2. ABASTECIMIENTO DE AGUA DE MAR 40
3.7.1.3. PREPARACIÓN DE MEDIO F/2 GUILLARD 41
3.7.1.4. LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y ESERILIZACIÓN DE MATERIALES 42
3.7.1.4.1. Para material de vidrio 42
3.7.1.4.2. Para material de plástico y manguera 42
3.7.1.5. OBTENCION DE BIOMASA HÚMEDA 43
3.7.1.6. ULTRACONGELACION DE BIOMASA 44
3.7.1.7. LIOFILIZACIÓN DE BIOMASA 47
3.7.2. ANÁLISIS DE DATOS 49
3.7.2.1. ULTRACONGELACIÓN 49
3.7.2.2. LIOFILIZACIÓN 49
3.7.2.3. OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA 49
3.7.2.4. OBTENCION DE PORCENTAJE DE HUMEDAD PERDIDA 50
3.7.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS 50

CAPÍTULO IV: RESULTADO Y DISCUSIÓN 52

4.1. RESULTADOS 52
4.1.1. DECRECIMIENTO DE LA TEMPERATURA DE LA MUESTRA DE MICROALGA 52
4.1.2. OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA 54
4.1.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE PRESION Y TIEMPO PARA LA OBTENCION DE BIOMASA SECA 65
4.1.3.1. ANALISIS PARA %HUMEDAD PERDIDO POR TRATAMIENTO 68
4.1.3.2. ANALISIS DE BIOMASA SECA (EN GRAMOS) POR TRATAMIENTO 68
4.1.4. ANALISIS PROXIMAL DE LA BIOMASA SECA OBTENIDA 70
4.2. DISCUSIÓN 72

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 74

5.1. CONCLUSIONES 74
5.2. RECOMENDACIONES 75

BIBLIOGRAFÍA 777

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Datos de cantidad de agua de mar e inóculo para el cultivo de microalga Chlorella vulgaris _____ *399*

Tabla N° 02: Peso de Muestras de Microalga en Frascos para liofilizar _____ *455*

Tabla N° 03: Fecha de colocación de Frascos para liofilizar en ultracongelador por tratamiento _____ *477*

Tabla N° 04: Decrecimiento de la Temperatura de las muestras de microalga por Tratamiento _____ *522*

Tabla N° 05: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 1 _____ *544*

Tabla N° 06: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 2 _____ *584*

Tabla N° 07: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 3 _____ *618*

Tabla N° 08: Datos obtenidos de equipo liofilizador _____ *67*

Tabla N° 09: Datos obtenidos de equipo liofilizador y promedios *677*

Tabla N° 10: Promedios de %Humedad Perdido por Tratamiento *688*

Tabla N° 11: Análisis de varianza de %Humedad perdido por tratamiento _____ *688*

Tabla N° 12: Comparación de medias para determinación de %Humedad perdida _____ *699*

Tabla N° 13: Promedios de biomasa seca (en gramos) por Tratamiento _____ *69*

Tabla N° 14: Análisis de varianza de biomasa seca _____ *70*

Tabla N° 15: Comparación de medias de biomasa seca (en gramos) _____ *70*

Tabla N° 16: Resultados de Análisis de Proximales de biomasa seca obtenida por Tratamiento _____ *71*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Microalga Chlorella vulgaris _____ *16*

*Figura N° 02: Diseño cuasi experimental*_____ *277*

*Figura N° 03: Diagrama de flujo de la metodología a seguir para obtener harina de microalgas en tres diferentes tiempos de liofilización*_____ *32*

*Figura N° 04: Traslado de cepa de microalga Chlorella vulgaris y acondicionamiento de microalga*_____ *333*

Figura N° 05: Microalga Chlorella vulgaris después de 5 días de acondicionamiento _____ *333*

Figura N° 06: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en matraz de 250 ml _____ *355*

Figura N° 07: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en matraz de 500 ml _____ *355*

*Figura N° 08: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en matraz de 1 Litro*_____ *36*

*Figura N° 09: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en botellas de 7 Litros*_____ *37*

Figura N° 10: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en botellas de 20 Litros _____ *38*

*Figura N° 11: Cultivo de microalga Chlorella vulgaris en fotobiorreactores*_____ *38*

Figura N° 12: Bombeo de agua de mar a tanque de almacenamiento _____ *40*

Figura N° 13: Medio F/2 modificado Guillard _____ *41*

Figura N° 14: Centrifugación en fotobiorreactores _____ *43*

Figura N° 15: Biomasa húmeda de microalgas obtenida _____ *44*

*Figura N° 16: Frascos para liofilizar con muestra de microalga dentro de ultracongelador*_____ *45*

Figura N° 17: Seguimiento de temperatura durante ultracongelación _____ *46*

Figura N° 18: Muestras de microalga en el equipo liofilizador ___ *488*

Figura N° 19: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 1 _____ **57**

Figura N° 20: Biomasa seca Tratamiento 1 Repetición 2 _____ *56*
Figura N° 21: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 2 _____ 60
Figura N° 22: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 3 _____ 64

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 01: MATRIZ DE CONSISTENCIA _____ *912*

ANEXO N° 02: TABLA DE COMPOSICIÓN DE MEDIO GUILLARD MEDIO F/2 MODIFICADO (GUILLARD 1975) _____ *923*

ANEXO N° 03: *ESCALAMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS* ___ *94*

ANEXO N° 04: METODOLOGÍA DE CULTIVO DE MICROALGAS ___ *96*

ANEXO N° 05: METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE BIOMASA HÚMEDA _____ *97*

ANEXO N° 06: METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA _____ *98*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la acuicultura se ha convertido en el boom en cuanto a desarrollo de la sostenibilidad pesquera. Para alcanzar la comercialización de peces producto de la actividad acuícola es necesario contar con una fuente llena de proteínas, grasas, vitaminas, entre otros estándares alimenticios necesarios para la especie, por lo tanto, la demanda de un pienso alimenticio es demasiada. Para elaborarlos se necesita una fuente rica en proteína y grasa, para el cual todavía se utiliza la harina de pescado, eso genera una presión para la explotación de anchoveta, recurso que es fuente indispensable de los requerimientos para la puesta en marcha de la producción del alimento balanceado.

Una opción a reemplazo de la harina de pescado es la producción de harina de microalga, que contiene hasta un 78% de proteína y además porque su producción es de muy fácil manejo, y además al ir cultivando estos microorganismos beneficia al planeta produciendo oxígeno y aminorando la contaminación atmosférica.

Para la obtención de harina de microalga, e incluso de cualquier alimento se utilizan diversos métodos para el secado, sin embargo, es necesario que la técnica a utilizar conserve los valores nutricionales intactos del alimento en cuestión.

Es conocido que existen muchas técnicas para conservar diferentes alimentos, pero son muy pocos los que se conocen que mantengan las propiedades innatas del alimento en sí. La industria alimentaria busca diseñar nuevas estrategias de conservación que se adapten a los diversos productos y que permitan mantener, o inclusive prolongar, su vida útil sin deteriorar su calidad.

Por tal motivo este proyecto pretendió determinar el efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris* para determinar cuál es el tiempo adecuado a liofilizar esta microalga teniendo en cuenta la mayor pérdida de humedad finalizado la liofilización.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Las microalgas poseen la capacidad para mitigar las emisiones de CO_2, producir lípidos, por su eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa y rápido crecimiento es un recurso potencial para la producción de biodiesel. Además, son fuente de gran cantidad de proteína. apta para consumo de peces como alimento vivo.

Estos últimos años alrededor del mundo se ve una gran contaminación atmosférica, un “asesino silencioso” como lo llama la ONU (2019) es producto de la emisión de gases de fábricas, automóviles, entre otros, los árboles cada vez son menos en tierra por deforestación, y para la obtención de algo de aire limpio tenemos en mira a las plantas acuáticas (algas y microalgas).

Es conocido que existen muchas técnicas para conservar diferentes alimentos, pero son muy pocos los que se conocen que mantengan las propiedades innatas del alimento en sí. La industria alimentaria busca diseñar nuevas estrategias de conservación que se adapten a los diversos productos y que permitan mantener, o inclusive prolongar, su vida útil sin deteriorar su calidad.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. INTERROGANTE GENERAL

¿Cuál es el efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa de *Chlorella vulgaris*?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La liofilización es el proceso de conservación que se realiza mediante sublimación. Este proceso se realiza con el fin de que los alimentos que son sometidos a este proceso no pierdan por completo su sabor y aroma característico (Alzate, C., 2008) así mismo se conservan sus valores nutricionales.

Chlorella vulgaris es una especie de microalga que presenta un alto contenido de lípidos totales, produciendo así 0.15 $gL^{-1}d^{-1}$ en comparación de *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloris sp.*, *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis*. Así mismo, la microlaga *Chlorella vulgaris* se adapta fácilmente a diversos métodos de cultivo debido a que presenta un corto ciclo de crecimiento por lo que el tiempo de cultivo es mucho menor. (Montero-Sánchez, Y.; *et al*, 2012, 37-43.)

La presente investigación tiene como objetivo determinar el efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*, lo cual nos aseguraría tener la certeza de que se redujo la mayor cantidad de la humedad en el producto y así elevar otros aspectos de composición química (como lípido y proteína) en el mismo, el cual se sometió el proceso de liofilización, y esto sirva para futuros proyectos de

investigación para su uso como alimento vivo, en la producción de biodiesel u otros afines a la obtención de biomasa seca de microalgas.

Barreto (2018) en su investigación "*Evaluación de microalgas para su uso en la elaboración de piensos para acuicultura*" se centra en la caracterización química de la biomasa liofilizada de cinco especies de microalgas (*Nannochloropsis gaditana, Chlorella vulgaris, Spirogyra sp., Anabaena sp*. y *Tisochrysis lutea*) y su potencial para ser utilizadas como ingrediente en la elaboración de piensos acuícolas. Tras el cosechado del cultivo mediante centrifugación, la biomasa microalgal se congeló a -18ºC para su posterior liofilización y triturado, se obtuvieron como resultados que el contenido en proteína cruda varió desde 25,25% (*Spirogyra sp.*) hasta 60,88% (*Anabaena sp.*), y el contenido en lípidos totales lo hizo desde 6,53% (*C. vulgaris*) hasta 21,28% (*N. gaditana*). El dato a tener en cuenta es sobre la microalga *Chlorella* vulgaris sobre el porcentaje de proteína (43.19%) y lípidos totales (6.53%) que son indicios de que durante el cultivo se utilizó como nutriente CO_2.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la presión y el tiempo sobre la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris*

1.4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Establecer una presión constante para liofilizar microalga *Chlorella vulgaris*

2. Establecer tres tiempos adecuados para liofilizar microalga *Chlorella vulgaris*.
3. Evaluar el efecto de tiempo en la obtención de mayor cantidad de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris* a una presión constante.
4. Evaluar el efecto de tiempo para la mayor pérdida de humedad en la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris* a una presión constante.

1.5. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

H_O = La presión y el tiempo no afectan significativamente en la obtención de biomasa seca de *Chlorella vulgaris.*

H_i = La presión y el tiempo afectan significativamente en la obtención de biomasa seca de *Chlorella vulgaris.*

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Cabrera & Pulla (2014) en su tesis *"Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual"* para obtener su grado académico de Ingeniero Civil; construyeron un respirómetro a escala (para laboratorio) el cual les proporciona datos de cuanto oxigeno consume las microalgas cultivadas, a su vez, también realizaron la liofilización de *Chlorella y Scenedesmus* (y otras 3 especies no identificadas) a un tiempo de 24 h, consiguiendo así, protocolos de experimentación para la obtención de lípidos para producir biocombustible, con diferentes solventes como Metanol, Cloroformo, Hexano, Etanol y Acetona, su experimento muestra que los contenidos de lípidos más clorofila de las familias de microalgas experimentadas varían de 5.2 a 23.7% de su peso seco, según el solvente utilizado. El dato del tiempo de liofilizado de las microalgas sirvió como dato para uno de los tratamientos usados. Los autores señalan que obtuvieron mayor porcentaje de lípidos con la muestra de microalga liofilizada (13.9%) a diferencia de una muestra seca triturada de microalga (5.7%); manifiestan que consideran la liofilización como un método útil para la conservación de la calidad y deshidratación de muestras.

En el caso de Obeid, Beaufils, Camy, Takache, Ismail & Pontalier (2018) en su artículo titulado *"Extracción de dióxido de carbono supercrítico y fraccionamiento de lípidos de microalgas liofilizadas Nannochloropsis*

oculata y Chlorella vulgaris" el cual busca investigar las consecuencias de evitar la desintegración de la pared celular antes de la extracción supercrítica de dióxido de carbono. Para lo cual probaron diferentes parámetros operativos (uso de codisolvente, presión y tiempo) en microalgas (*Chlorella vulgaris y Nannochloropsis oculata*). Sus muestras congeladas de estas microalgas fueron sometidas a una presión de 0,01 bar, durante 48 h a una temperatura de – 80°C, para supuestamente obtener una biomasa completamente seca. Sus resultados de extracción fueron un 97% de los lípidos neutros de microalga *C. vulgaris* usando etanol (10% v / v) como codisolvente neutral en el caso de los lípidos de microalga *N. oculata* representaron un 83%. Los parámetros dados para el proceso de liofilización utilizados en este artículo no se pudieron tomar para este proyecto de tesis debido a que el equipo liofilizador con el que se realizó el proceso de deshidratado de la biomasa microalgal utiliza como presión 0.04 mbar para materia vegetal.

A su vez Bermúdez (2012) en su investigación para optar por el grado académico de Magister en Ingeniería Química "*Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel*", evaluó la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas de Colombia y comparó los resultados con palma africana, la principal materia prima para producir biodiesel allí en Colombia; obteniendo que las microalgas *Scenedemus ovalternus y Chlorella vulgaris* presentaron las mayores productividades de lípidos con 18,8 y 18,7 mg / L x día , respectivamente, equivalentes a 4,1 veces la productividad de aceite de palma africana, estos datos se obtuvieron también debido que durante el cultivo de estas microalgas se añadió CO_2 como nutriente para estresar y que la microalga produzca mayor cantidad de lípidos; la biomasa microalgal seca utilizada para los análisis de grasa fueron liofilizadas a una presión de 0,8 mBar durante un tiempo de 72 horas lo cual da indicio de que a mayor presión atmosférica mayor cantidad de hora del proceso de liofilizado; por este motivo se debe utilizar menor presión atmosférica.

Según Robles y Granados (2014) en su paper "*Determinación de citotoxicidad y parámetros de capacidad. Antioxidante de biomasa purificada de las microalgas Porphyridium cruentum*" publicado en The 12th Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology (LACCEI'2014) en el cual sometieron a su biomasa de *Porphyridium cruentum* a un vacío de $4.34x10^{-5}$ atm (0.44 mbar), y por un tiempo de 72 h. para así poder demostrar que el extracto liofilizado tiene una capacidad antioxidante equivalente a 0.6674 g de ácido ascórbico, a su vez contiene 0,1% p / p de carotenoides y 2% p / p de β-ficoeritrina; a través de ensayos de viabilidad celular el extracto fue evaluado, demostrando que no tiene ningún efecto citotóxico en una muestra dada de células madre mesenquimales humanas durante un estudio de 48 h. Como aporte a este proyecto de tesis, se observa también que a mayor presión atmosférica el tiempo de liofilización es mayor, por tal motivo para disminuir el factor tiempo es que se trabajó con una presión constante baja, que es lo apropiado para el proceso de liofilización.

Medina, A. R., Grima, E. M., Giménez, A. G., & González, M. J. I. (1998) en su paper titulado "*Downstream processing of algal Polyunsaturated fatty acids*" después de una centrifugación de la biomasa húmeda de *Phaeodactylum tricornutum,* esta es sometida (al mismo procedimiento que se utiliza para determinar ácidos grasos en la harina de pescado) directamente a etanol (al 96% de pureza) para obtener ácidos grasos y produjo un rendimiento de 90%, que a diferencia de una muestra de la misma microalga en biomasa liofilizada se obtiene un 96% de ácidos grasos, dando como resultado que la liofilización es un proceso adecuado para conservar la calidad de la microalga.

En el paper "*Uso de biomassa de microalga para biossorção de lantanídeos*" de Heidelmann, G; *et al* (2017) se determinó que usando microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada mezclada con sustancias acuosas de diferente pH se revela la capacidad de biosorción de las especies iónicas de Lantano sobre biomasa de microalga *Chlorella vulgaris*, que

presentó un valor de 1.11 *Chlorella vulgaris* mg / g (0.8 mmol / g). La investigación fue irrelevante para este proyecto debido a que no menciona parámetros o condiciones del proceso de liofilizado, o algún dato de cantidad obtenida para realizar algún comparativo con el peso obtenido de este proyecto de tesis. Al igual que en su siguiente investigación complementaria "*Uso de biomassa de microalgas para biossorção de elementos terras-raras"* también utiliza a la microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada y además microalga *Ankistrodesmus falcatus* liofilizada mezclada con solución acuoso de ClH (Acido clorhídrico) o NaOH (Hidróxido de sodio) para determinar la biosorción de elementos tierra-rara, obteniendo valores de 92,38% (microalga *Chlorella vulgaris*) e 89% (*Ankistrodesmus falcatus)* de biosorción. Pero da detalles del cultivo como el tiempo en la fase cepario e inicial (15 días), que daría indicios de querer al final cosechar mayor cantidad de biomasa o al escalar a una fase masiva poder duplicar el cultivo.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. MICROALGA

Según Greenwell, Laurens, Shields, Lovitt & Flynn (2009) las microalgas son:

> "un grupo grande y diverso de organismos unicelulares foto y heterotróficos, tienen impacto global en los últimos años por los valiosos productos naturales que producen, su capacidad para remediar efluentes y su potencial como cultivos energéticos.
> El cultivo masivo de microalgas se remonta a mediados del siglo XX a partir del cual se pueden identificar todas las metodologías actualmente

en uso, incluidos los estanques abiertos, pistas de rodadura poco profundas y fotobioreactores cerrados".

Para Muller-Feuga, Moal, & Kaas (2003) (como se citó en Greenwell et al., 2009) estipula que el cultivo de microalgas es un proceso clave en acuicultura de peces y mariscos marinos, proporcionando una fuente directa de nutrición para estadios larvarios de bivalvos moluscos y crustáceos, y como alimento para zooplancton para larvas de peces marinos.

Para Yánez (2016) las microalgas, algas fitoplanctónicas o "carbón verde", son organismos microscópicos fotosintéticos que viven en suspensión en la zona eutrófica de una columna de agua. Son de crecimiento rápido y son parte esencial de la cadena trófica de los ambientes acuáticos (Pacheco, 2013). Como cualquier planta, para subsistir necesita de CO_2, luz y agua a partir de los cuales pueden producir biomasa y liberar O_2 (Hakeem, Jawaid, & Rashid, 2014). Además, las microalgas producen una variedad de metabolitos los que se utilizan en nutrición humana, piensos para animales, control de contaminación, biofertilizantes y tratamiento de efluentes (Yánez, 2016).

Debido a que son autotróficos, las microalgas son las principales responsables de la producción primaria en los ambientes acuáticos marinos, dulceacuícolas o salobres (Reynolds, 2006). Además, estas actúan como principal componente en la base de la cadena alimentaria de los ambientes acuáticos. Comúnmente las algas fitoplanctónicas son bioindicadores de la calidad de las aguas, debido a la rápida respuesta en las variaciones ambientales (de Assis., 1998).

Las microalgas se encuentran clasificadas en cuatro tipos: diatomeas, algas verdes, cianobacterias y algas doradas que se organizan como fitoplancton y filamentosas. Al igual que las plantas mayores, producen y almacenan aceites en forma de triacilgliceroles (TAG) y en comparación con las algas multicelulares y especies vegetales superiores, tienen la capacidad de almacenar mayor proporción de lípidos. De alrededor de

50.000 especies de microalgas que existen en el mundo, cerca de 30.000 han sido utilizadas para distintas investigaciones (Brennan y Owende, 2010).

Los cultivos de microalgas poseen numerosas ventajas: a gran escala son simples en su implementación y según para qué procesos pueden resultar interesantes desde el punto de vista económico. Muchas microalgas crecen en ambientes salinos e hipersalinos, por lo que no compiten con la agricultura tradicional por los limitados recursos de tierra arable y agua dulce (Catalá, 2013)

Los cultivos de microalgas ha sido una importante herramienta para elucidar diversos aspectos de la biología de las especies, principalmente cuanto à variabilidad morfológica, la plasticidad fenotípica, características bioquímicas, metabolismo vegetativo y reproductivo, ciclo de vida, contribuyendo así mismo para aumentar el conocimiento sobre la ecología y taxonomía de estos organismos (Lourenço, 2006).

Su aumento gradual, es el interés para el cultivo de microalgas, debe no solo por su importancia ambiental y biológica, más bien por su producción de compuestos de relevancia comercial como proteínas, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados, y pigmentos como carotenoides y clorofila (Derner; Ohse; Villela, 2006). En los últimos años las investigaciones con microalgas con fines comerciales se expandieron, y hubo un aumento en las investigaciones que buscan la producción de biodiesel teniendo como fuente estos microorganismos, una vez identificado su potencial como materia prima (Lourenço, 2006)

2.2.2. CULTIVO DE MICROALGAS

El cultivo de microalgas tiene una gran aceptación debido a:

- Mayor eficiencia fotosintética que las plantas superiores (Meng, Yang, Xu, Zhang, Nie & Xian, 2009; Posten y Schaub, 2009), logrando convertir entre el 3 y el 8 % de la energía solar en biomasa, mientras que el rendimiento observado en las plantas es de aproximadamente un 0,5 % (Lardon, Helias, Sialve, Steyer & Bernard, 2009).
- Tasa de crecimiento elevada, duplicando su biomasa en aproximadamente 24 horas (Meng, *et al.,* 2009).
- Periodos de cosecha muy cortos (menores a diez días dependiendo del proceso), lo que permite múltiples o continuas cosechas a diferencia de las plantas que se cosechan una o dos veces por año (Vyas, Verma, & Subrahmanyam, 2010).
- Cálculos teóricos estiman que las microalgas tienen el potencial para producir mayor cantidad de biomasa y de aceite por hectárea que cualquier planta oleaginosa (Chisti, 2007; Mata, Martins, & Caetano, 2010).
- Fácil cultivo, crecen casi en cualquier lugar y solo necesitan luz del sol y algunos nutrientes. Pueden cultivarse en zonas áridas y semi-áridas, donde no pueden desarrollarse cultivos agrícolas, pueden utilizar agua no potable y su cultivo no requiere la adición de herbicidas o pesticidas (Avagyan, 2008).
- Capaces de fijar grandes cantidades de CO_2 (Amin, 2009; Sydney et al., 2010), su demanda estequiométrica de CO_2 es de aproximadamente 1,7 kg de CO_2/kg de biomasa seca (Packer, (2009); Posten y Schaub, (2009); Rodolfi, Chini Zittelli, Bassi, Padovani, Biondi, Bonini, & Tredici, (2009).
- Capacidad para utilizar los nutrientes de aguas residuales en su crecimiento (especialmente nitrógeno y fósforo) (Xue, Zhang, Luo, & Tan, 2006; Kim, Park, Park, Kim, Jeune, Chang, & Acreman (2007); Chinnasamy, Bhatnagar, Hunt & Das (2010); Xin, Hong-ying, Ke & Jia (2010), podría disminuir el costo del medio de cultivo y evitar la descarga de estos nutrientes a cuerpos de agua.
- La biomasa residual, posterior a la extracción de los lípidos, encuentra aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica, agropecuaria e

incluso en la producción de alcoholes combustibles y en la generación de energía (Wang et al., 2008; Zamalloa, Boon & Verstraete, 2012).

2.2.2.1. TIPOS DE CULTIVO

Atendiendo a la fuente de energía y de carbono las microalgas se pueden cultivar en distintos modos (Makareviciene, Skorupskaite & Andruleviciute, 2013):

- **Autotrófico:** Utiliza luz, natural o artificial, como fuente de energía y CO2 como fuente de carbono.
- **Heterotrófico**: La energía y el carbono se obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofia. Los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados pero el control del proceso es máximo rindiendo elevadas productividades (Doucha y Lívanský, 2011; Perez-Garcia et al., 2011)
- **Mixotrófico:** Las microalgas realizan la fotosíntesis, pero en presencia de una fuente de carbono orgánico (Abreu et al., 2012; Mitra et al., 2012). Dependiendo del régimen de operación, los cultivos de microalgas pueden clasificarse en estancos, semicontinuos, continuos e inmovilizados (Yuan-Kun y Hui, 2004).

2.2.2.2. FACTORES PARA EL CULTIVO

- **Agua:** Para que los cultivos mencionados existan, es necesario contar con grandes volúmenes de agua, para el crecimiento y producción de aceite. Las fuentes de agua pueden ser: aguas salinas provenientes del mar, aguas dulces (ríos, lagos u otros) o aguas residuales provenientes del sector agropecuario. En caso de aguas residuales, las cuales poseen nitrógeno y fosforo el aporte de nutrientes es menor (Knauer & Southgate, 1996).

- **Nutrientes:** Para la producción de biomasa de microalgas es necesario tener en cuenta el tipo de alga utilizado debido a que tienen diferente comportamiento acorde a los tipos de nutrientes. Cuando se utiliza el método de cultivo de micro algas por medio de la masificación, se prepara un medio donde las microalgas puedan alcanzar su máximo rendimiento productivo. Uno de los medios de cultivo universalmente más utilizados es el F/2 de GUILLARD que ha demostrado ser eficiente para el crecimiento de un gran número de micro algas, pero que demanda la utilización de una gran cantidad de nutrientes (Knauer & Southgate, 1996).
- **Dióxido de carbono:** Los cultivos de microalgas tienen la capacidad para utilizar altos volúmenes de CO2 provenientes de procesos industriales y de generación de energía eléctrica. Los estanques para el cultivo de estas algas pueden ser altamente eficientes en la utilización de este gas, hasta 90% o más del CO2 inyectado en los estanques es utilizado de manera eficaz por los microorganismos (Rawat, Kumar, Mutanda & Bux, 2011)
- **Luz:** Para un crecimiento adecuado de la biomasa microalgal autotróficamente, se hace necesario una fuente de luz que garantice una adecuada función metabólica de los microorganismos. Dicha fuente de luz puede ser de la luz solar en un día común o de una fuente externa (lámparas, Led's entre otros) cuidando que la iluminación no sature la microalga y se produzca daño fotoquímico (Molina, Acien, Garcia & Yusuf, 1999).

2.2.3. Microalga *Chlorella vulgaris*

Es un género de alga verde unicelular, sus células tienen forma esférica y miden de 2 a 10 µm de diámetro, no poseen flagelo. Es una especie de microalga que se reproduce rápidamente a través de la fotosíntesis en medios autotróficos, heterotróficos y mixotróficos. La microalga *Chlorella vulgaris* (**Figura N° 01**) es una de las especies más estudiadas e

investigadas como un recurso para reemplazar los combustibles fósiles y para alimento. (Bermeo, 2011).

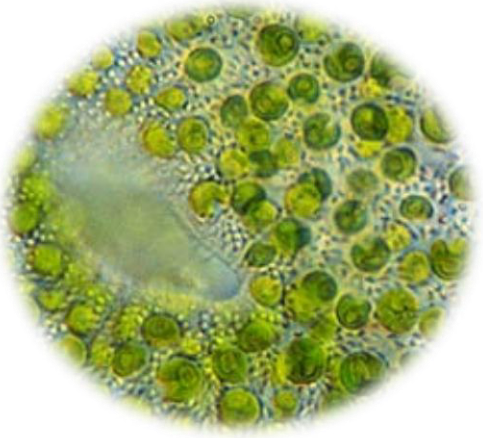


Figura N° 01: Microalga *Chlorella vulgaris*
Vista en microscopio de microalga *Chlorella vulgaris*.
Fuente: Wikipedia (página web)

La clasificación científica de esta especie de microalga es:

Taxonomía

Imperio: Eukaryota
Reino: Plantae
Phylum: Chlorophyta
Clase: Trebouxiophyceae
Orden: Chlorellales
Familia: Chlorellaceae
Género: *Chlorella*
Especie: *Chlorella vulgaris*
(Beyerinck, 1890)

Presenta forma de vida unicelular o colonial, y puede acumular pigmentos como cloro la a e b, -caroteno y xantolas. La principal forma de reserva es el almidón, pero bajo ciertas condiciones pueden almacenar aceite. La reproducción puede ser por división binaria, esporas asexuales y reproducción sexual (Hoek, Mann, & Jahns, 1995).

La microalga *Chlorella vulgaris* ha sido utilizada por su calidad proteica (Morris, Quintana, Almares & Hernández, 1999) e incluso presenta propiedades antitumorales (Noda, Ohno, Tanaka, Kamiya, Okuda, Yadomae & Shoyama, 1996). Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio (Huss, Frank, Hartmann, Hirmer, Kloboucek, Seidel, & Kessler, 1999; Morris *et al.,* 1999)

A nivel comercial *Chlorella* y *Chlamydomonas* son citadas como géneros empleados para la producción de proteínas y algunos aminoácidos específicos como triptófano, lisina y leucina (Uribe 1994; Morris y Moran 2002; Andrade, R. D., Torres, R., Montes, E. J., & Fernández, A. C. 2006).

2.2.4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es definida por Orrego (2008) como:

> "Un proceso de secado mediante sublimación, que se ha desarrollado con el fin de reducir las pérdidas de los compuestos responsables del sabor y el aroma en los alimentos, los cuales se pierden durante los procesos convencionales de secado. El proceso de liofilización consta principalmente de dos pasos; el primero consiste en congelar el producto y en el segundo paso el producto es secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida".

Los alimentos liofilizados han tenido un auge con el fin de preparar productos para astronautas, montañistas y comandos militares, pero ahora también se ha ampliado al público en general, gracias a que los alimentos liofilizados poseen un sabor intenso, su consistencia crocante y su carácter novedoso. (Ramirez, 2006)

2.2.5. TIEMPO EN LA LIOFILIZACIÓN

El tiempo es un factor muy importante en el proceso de liofilización de los alimentos, teniendo así que cada producto se liofiliza a un tiempo determinado.

El proceso de liofilización en alimentos se ha considerado como el mejor método de deshidratación que además de conservar las características organolépticas y nutritivas de los alimentos le otorga un valor agregado del 1200% (Ramírez, 2006)

El tiempo de liofilización de un alimento pretende reducir la mayor cantidad de agua presente en dicho alimento y ofrecer un producto con sus características físicas intactas y asegurándonos que se conserve la calidad o valor nutricional de dicho alimento.

Para un investigador liofilizar es extraer más del 95% de agua presente en el producto a liofilizar, para un comerciante esto significa que lleva diez veces más mercancía y sin gastos de conservación; y a su vez con un valor agregado. (Ramírez, 2006)

2.2.6. PRESION EN LA LIOFILIZACIÓN

Alvarado (1996) estableció que cuando se deshidrata por medio de congelación y vacío el proceso se denomina liofilización; pero cuando se trabaja en congelación sin uso de un sistema de vacío se denomina liofilización atmosférica.

El proceso de liofilización consta principalmente de dos pasos; primero la congelación del producto y el segundo el secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (Orrego, 2008).

Hasta antes de 1905 los trabajos de secado a bajas temperaturas se realizaban sin el uso de vacío, debido a que las bombas de vacío mecánicas no se encontraban disponibles en aquella época, fueron Benedict y Manning quienes introdujeron en el proceso de liofilización (Ramírez. 2006).

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

2.3.1. MICROALGA

Las microalgas son una especie que constituyen el fitoplancton (Ynga, G., 2011), son una gran fuente de vitaminas, pigmentos y proteínas (Legido, Mourelle & Gómez, 2015)

2.3.2. CULTIVO DE MICROALGAS

También llamados sistemas de producción, se dividen en dos grupos abiertos y cerrados. Se denomina cultivo en sistemas abiertos, en cuerpos de agua grandes y en contacto directo con el medio ambiente, como: lagos o estanques y los sistemas cerrados son aquellos llamados foto-biorreactores los cuales no mantienen con el medio ambiente, son herméticos (Palomino, Estrada & López, 2010).

2.3.3. Microalga *Chlorella vulgaris*

La microalga *Chlorella vulgaris* es una de las especies de microalgas más estudiadas e investigadas como un recurso para reemplazar los combustibles fósiles y para alimento. (Bermeo, 2011).

2.3.4. CENTRIFUGACIÓN

Es uno de muchos métodos que se utilizan para separan sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza rotatoria, la cual transmite a la masa pastosa una fuerza mayor a la de la gravedad, que provoca la sedimentación de los sólidos y que quede como sobrenadante la parte liquida (Bermeo, 2011).

2.3.5. BIOMASA MICROALGAL

Según la Real Academia Española (RAE) la biomasa en biología es definida como materia total de los seres que viven en un lugar determinado. Así mismo también como materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Entonces definimos biomasa microalgal como materia total producto de la cosecha de un cultivo de microalgas.

2.3.5.1. BIOMASA HÚMEDA DE MICROALGA

Producto bruto que se obtiene al cosechar un cultivo de microalgas. Entre los métodos de recuperación de la biomasa se pueden encontrar centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación (Chen et al. 2011, Ho et al. 2011, Rawat et al. 2011, Abdel-Raouf et al. 2012).

La centrifugación es un excelente método para la separación de la biomasa, ya que es rápido y eficaz, pero de elevado costo comercial. (Fernández, D., Chica, C., & Parra, M. 2013)

2.3.5.2. BIOMASA SECA DE MICROALGA

Producto que se obtiene después de haber sometido a la biomasa húmeda a algún proceso de secado, como: secado al sol, secado en estufa, liofilización, entre otros.

El proceso de liofilización en alimentos se ha considerado como el mejor método de deshidratación que además de conservar las características organolépticas y nutritivas de los alimentos le otorga un valor agregado del 1200% (Ramírez, 2006)

2.3.6. ULTRACONGELACIÓN

La ultracongelación es una técnica innovadora de gran importancia, capaz de garantizar la completa optimización del proceso de producción y ofrece grandes ventajas al productor y consumidor, el cual puede degustar productos siempre frescos de óptimo sabor y presentación con un gran surtido de formas y gustos. Esta propiedad es aprovechada para el proceso de liofilización, el cual consta principalmente de dos pasos; el primero consiste en congelar el producto y en el segundo paso el producto es secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (Orrego, 2008)

2.3.7. LIOFILIZACIÓN

Es un método de conservación que une a los dos mejores procesos de preservación en alimentos como son la congelación y la deshidratación. este método es conocido por ser aquel que reduce las pérdidas de sus propiedades naturales (Ramírez, 2006), en este proceso el alimento a liofilizar es sometido a una congelación a bajas temperaturas (normalmente a -80°C), a un vacío y a una baja presión.

2.3.8. PORCENTAJE DE HUMEDAD

La humedad en los alimentos es un parámetro de suma importancia desde el punto de vista económico, calidad, cualidades sensoriales y nutricionales, al ser fuente propicia para el crecimiento de bacterias y hongos los cuales deterioran los alimentos. Debido a esto se analiza el porcentaje de humedad en productos alimenticios.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló durante los meses de agosto a octubre del año 2019, en los Laboratorios de:

- Cultivo de Microalgas
- Cultivo Masivo de Microalgas
- Liofilización

De la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo ubicada en Ciudad Jardín S/N, en el distrito de Pacocha, Provincia de Ilo, departamento de Moquegua, Perú.

3.2. TIPO DE DISEÑO

El diseño de la investigación es cuasi experimental, debido que, para la obtención de los resultados finales, se controla todos los factores (parámetros del cultivo, además del tiempo y presión a liofilizar).

Según Hernández (2002) define como cuasi experimental lo siguiente:

"**Cuasi Experimental:** Poseen aparentemente todas las características de los experimentos verdaderos. La principal diferencia con estos es según

los casos, en la imposibilidad de manipular la variable independiente y/o asignar aleatoriamente los sujetos a las condiciones experimentales".

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Presión y tiempo

Indicadores:

MBar y horas.

3.3.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Biomasa seca de Chlorella vulgaris

Indicadores:

Gramos.

% de humedad

3.4. POBLACIÓN Y/O MUESTRA DE ESTUDIO

3.4.1. POBLACIÓN

La población para este estudio estuvo constituida por la biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* que se sembró y cultivó en los Laboratorios de cultivo de Microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua.

3.4.2. MUESTRA

Son todas las microalgas de *Chlorella vulgaris* centrifugadas que constituyen la población, denominada ahora biomasa húmeda, que serán sometidas al proceso de liofilización para obtener harina de microalgas (biomasa seca).

3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. TÉCNICAS

Muestreo al azar. Debido que de toda la biomasa húmeda se procedió a seleccionar al azar, cuáles serían sometidas a diversos tiempos de liofilización.

3.5.2. DISEÑO CUASI EXPERIMENTAL

El diseño es cuasi experimental, para ello se aplicaron tres tratamientos cada uno con tres repeticiones, para determinar la mayor pérdida de humedad al ser sometidos a diferentes tiempos de liofilización. Como se muestra en la **Figura N° 02**

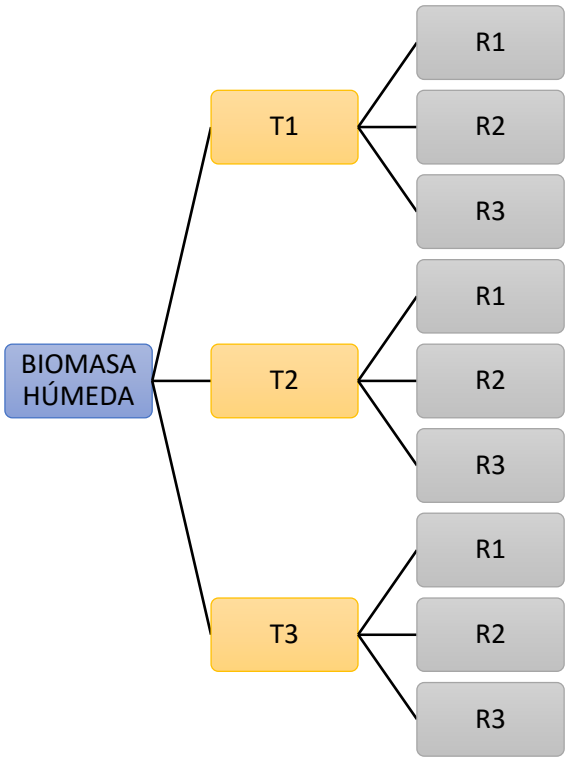


Figura N° 02: Diseño cuasi experimental
Fuente: elaboración Propia (2019)

Donde:

T1: Tratamiento 1 Liofilización a 12 horas

T2: Tratamiento 2 Liofilización a 24 horas

T3: Tratamiento 3 Liofilización a 36 horas

R1, R2 y R3: Repeticiones por cada tratamiento

3.6. MATERIALES Y EQUIPOS

3.6.1. MATERIA PRIMA

- Cepa de microalga (*Chlorella vulgaris)*
- Agua de mar filtrada, esterilizada y enriquecida.

3.6.2. MATERIALES DE LABORATORIO

3.6.2.1. Material de vidrio

- Tubo de ensayo de 10 ml
- Matraz enlermeyer de 250 ml
- Matraz enlermeyer de 500 ml
- Matraz enlermeyer de 1000 ml
- Botella transparente e 1000 ml
- Botella ámbar de 1000 ml
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 2 ml
- Pipeta de 10 ml

3.6.2.2. Material plástico

- Botella de 7 L.
- Botella de 20 L.

- Manga plástica crystal 12x5”
- Aspersor de alcohol de 500 ml
- Manguera 5/32”
- Paliglobos
- Válvulas de 5 mm de diámetro
- Uniones simples para manguera, de 5 mm de diámetro
- Uniones T para manguera, de 5 mm de diámetro

3.6.2.3. Otros

- Bombilla para pipeta
- Mechero de alcohol
- Parafilm de 4”
- Gradillas
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Papel Tisú
- Ligas elásticas
- Cinta adhesiva
- Escobillones

3.6.3. EQUIPOS

- Centrifugadora
- Multiparámetro
- Autoclave
- Selladora
- Blower
- Balanza de precisión
- Refrigerador
- Ultracongelador
- Fluorescentes
- Liofilizador

- Bomba de vacío

3.6.4. INSUMOS

- Productos químicos (F/2 Medio Guillard)
- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Jabón neutro
- Detergente
- Hipoclorito de sodio al 10%

3.6.5. INDUMENTARIA DE TRABAJO

Para mantener en condición estéril el cultivo de microalgas, durante la ejecución del proyecto se utilizó la siguiente indumentaria dentro de los laboratorios:

- Guardapolvo (bata de laboratorio)
- Guantes de quirúrgicos descartables
- Mascarilla descartable
- Toca descartable
- Botas de jebe

3.6.6. OTROS

- Fotobioreactores metálicos
- Andamio metálico
- Tacho de 250 Litros

3.7. MÉTODOS Y ANÁLISIS DE DATOS

3.7.1. METODOLOGÍA

La metodología a seguir para la ejecución del presente proyecto se muestra en la **Figura N° 03** y en el **Anexo N° 03** y **Anexo N° 04.**

3.7.1.1. CULTIVO DE MICROALGA Chlorella vulgaris EN LABORATORIO, EN CONDICIONES SEMI CONTROLADAS

3.7.1.1.1. FASE CEPARIO

Las cepas de microalga *Chlorella vulgaris* fueron obtenidas del Laboratorio Costero del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en un tubo de ensayo de 10 ml, fue envuelta en papel aluminio y trasladado en cooler con ice pack para refrigeración, hasta llegar al Laboratorio de Cultivo de Microalgas en la UNAM – Filial Ilo. Ver **Figura N° 04**.

En el laboratorio se colocó en una gradilla en el andamio con iluminación artificial continua de tubos de fluorescente de 36 watts como se observa en **FIGURA N° 04**, con la finalidad de adaptar la microalga a una nueva condición de hábitat.

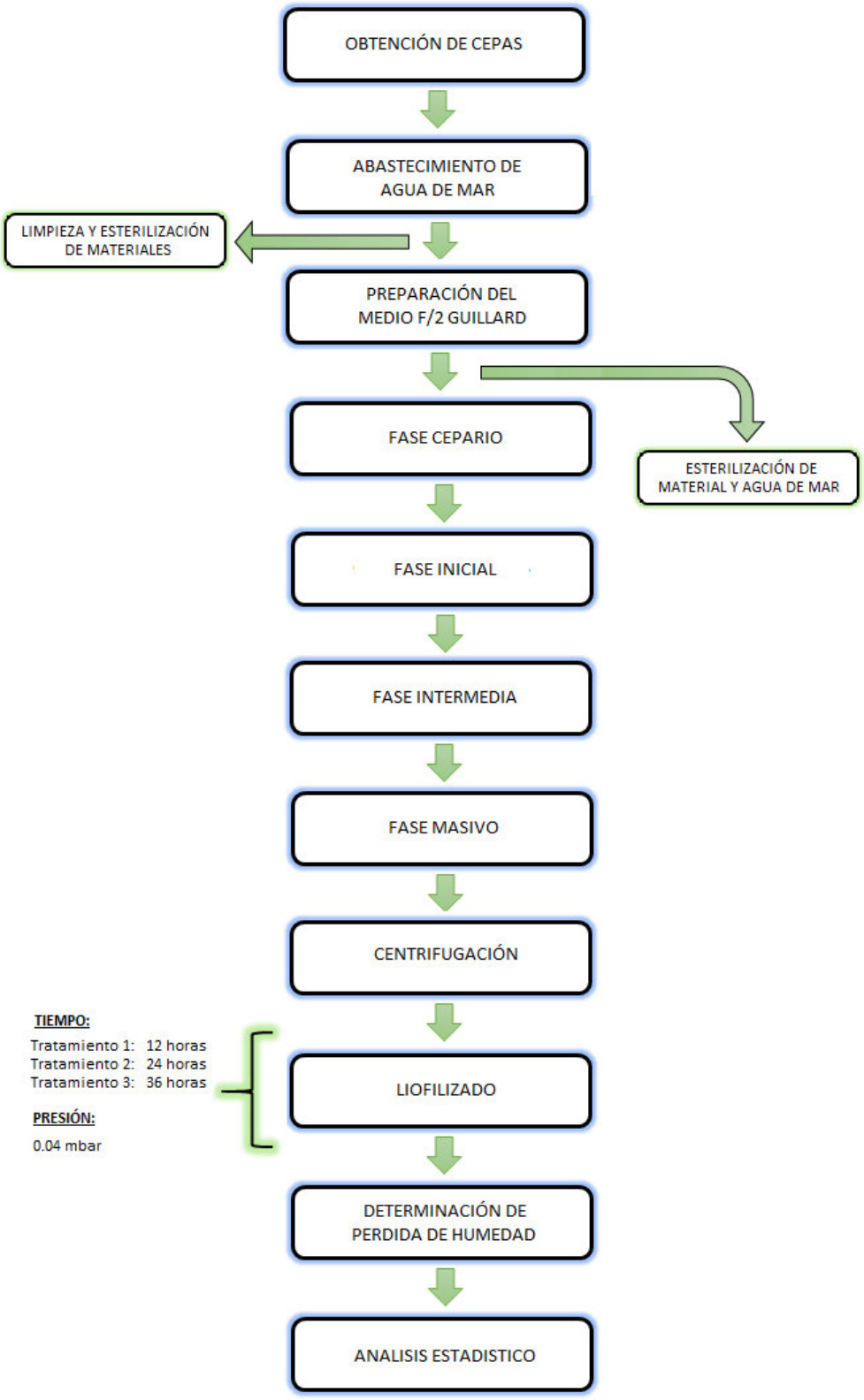


Figura N° 03: Diagrama de flujo de la metodología a seguir para obtener harina de microalgas en tres diferentes tiempos de liofilización

Fuente: Elaboración Propia (2019)



Figura N° 04: Traslado de cepa de microalga *Chlorella vulgaris* y acondicionamiento de microalga

Izquierda: cepa en tubo de ensayo. Derecha: acondicionamiento en Laboratorio de cultivo de microalgas – Filial Ilo.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

El tiempo de esta fase del cultivo fue de 2 semanas, hasta que se note que el cultivo está cargado. Ver **Figura N° 05.**

Al término de este tiempo se puede realizar el repique y escalamiento del cultivo.

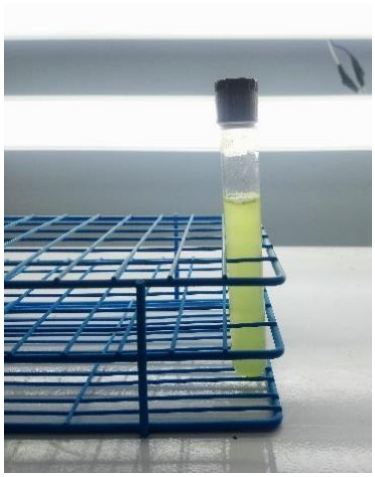


Figura N° 05: Microalga *Chlorella vulgaris* después de 10 días de acondicionamiento

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.2. FASE INICIAL

Se realiza en matraces enlermeyer de 250 y 500 ml de capacidad inoculados con el cultivo anterior (tubo de ensayo). Los datos de cantidades de agua e inoculo se muestran en **Tabla N° 01.**

3.7.1.1.2.1. Matraz de 250 ml

Para el escalamiento en matraz de 250 ml, se inocula con el cultivo anterior de la Fase Cepario. Primero flameando en el mechero encendido la boca del matraz (en el momento del escalamiento) y la boca del tubo de ensayo (en el repique), luego se añade el agua de mar filtrada y esterilizada, para enriquecerla con medio F/2 modificado Guillard (1 ml por cada 1 Litro de agua de mar) y se añade el inoculo, inmediatamente se procede a tapar la boca del matraz con papel Kraft y luego con papel aluminio asegurándolo con una liga; para el caso del tubo de ensayo colocarle la tapa y cerrarlo con el parafilm. Al término del escalamiento y repique se hace la rotulación colocando el nombre de la especie y la fecha en el que se realizó dicho proceso. Por último, el matraz es colocado en la estantería (estructura metálica) bajo temperatura ambiente e iluminación constante, por un lapso de 5 días (**Figura N° 06)**. Durante ese tiempo debe ser agitado de forma manual, en forma diaria para evitar la sedimentación. Pasado el tiempo de los 5 días, se realiza un repique a 4 matraces de 250 ml bajo las mismas condiciones del procedimiento que se explicó anteriormente, pero con aireación (**Figura N° 06)**, colocando así un pali globo unido a una válvula y manguera conectado al blower. Para cantidades de inóculo, agua de mar y medio F/2 Guillar ver la **Tabla N° 01.**

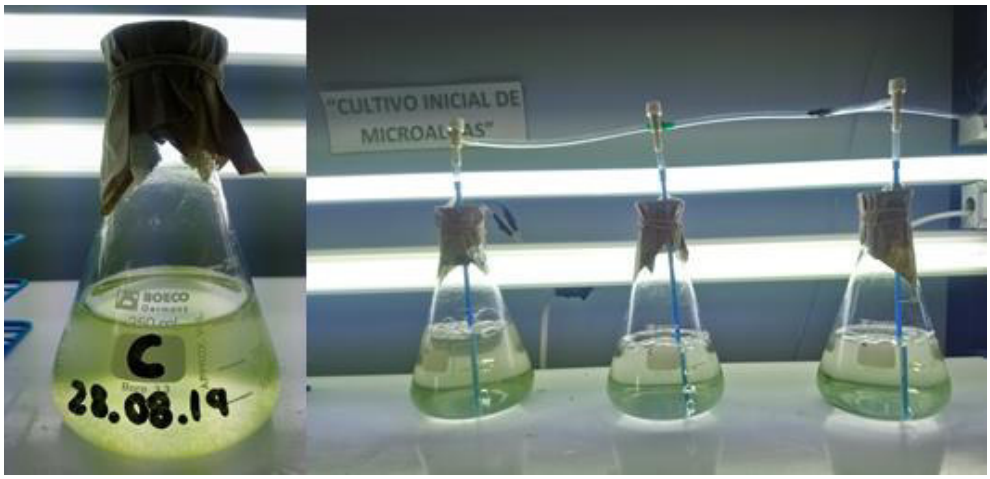


Figura N° 06: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en matraz de 250 ml
Izquierda: Matraz de 250 ml con cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. Derecha: Matraz de 250 ml con cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* con aireación.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.2.2. Matraz de 500 ml

Para el escalamiento en matraz de 500 ml (**Figura N° 07)** también se desarrolla de la misma manera que para el segundo escalamiento en matraz de 250 ml (con aireación).

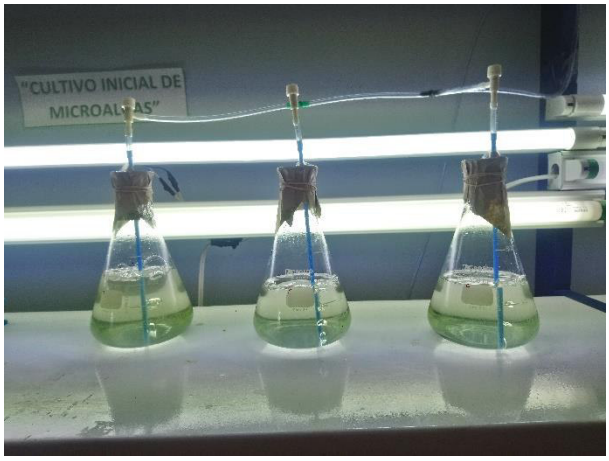


Figura N° 07: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en matraz de 500 ml
Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.3. FASE INTERMEDIA

Se realiza en matraz enlermeyer de 1 Litro y botellas de 7 y 20 Litros capacidad inoculados con el cultivo anterior (tubo de ensayo). Los datos de cantidades de agua y de inóculo se muestran en **Tabla N° 01.**

3.7.1.1.3.1. Matraz de 1 Litro

Se utiliza como inóculo el 90% del cultivo del matraz de 500 ml, con agua de mar filtrada, esterilizada y enriquecida. Colocando también un pali globo para la aireación y tapando la boca del matraz con papel kraft y papel aluminio alrededor del paliglobo y asegurando con ligas. Se colocó en el estante (temperatura ambiente de 19 ±1 ºC e iluminación artificial y aireación permanente para evitar la sedimentación de las células). (**Figura N° 08)**

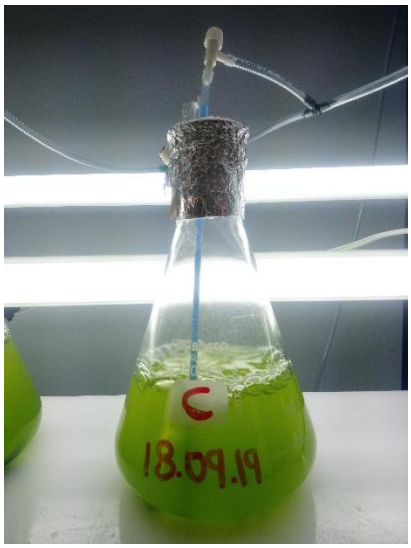


Figura N° 08: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en matraz de 1 Litro

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.3.2. Bidón de 7 Litros

En el caso de las botellas de 7 Litros se realiza primero un cebado del recipiente con agua de mar filtrada, este proceso se realiza tres veces, y se procede con el escalamiento. (igual que con los anteriores escalamientos). (**FIGURA N° 09)**



Figura N° 09: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en botellas de 7 Litros

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.3.3. Bidón de 20 Litros

al igual que en las botellas de 7 Litros, las botellas de 20 Litros también son cebadas con agua de mar filtrada, este proceso también se realiza tres veces, y se procede con el escalamiento. (igual que con los anteriores escalamientos en matraz). (**Figura N° 10)**



Figura N° 10: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en botellas de 20 Litros

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.1.4. FASE MASIVO

El cultivo masivo se realizó en el Laboratorio de Cultivo Masivo de microalgas de la Universidad Nacional de Moquegua – Filial Ilo, bajo condiciones semi controladas, en fotobioreactores verticales (compuestos por una estructura metálica). En cada Fotobiorreactor se pueden colocar 8 bolsas de polietileno (128 L de capacidad, 16 Litros por cada bolsa) (**Figura N° 11)**, selladas por la parte inferior utilizando una selladora manual.

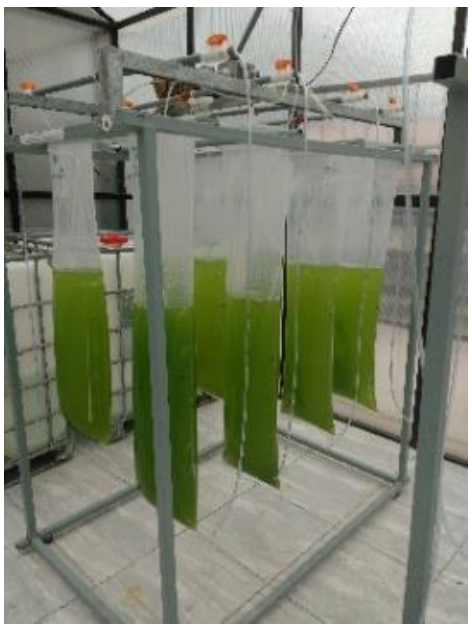


Figura N° 11: Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en fotobioreactores

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Tabla N° 01: Datos de cantidad de agua de mar e inóculo para el cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*

ENVASE	CAPACIDAD (mL)	UNA SOLA LINEA DE CULTIVO			TOTAL	CANTIDAD PARA EJECUCION DEL PROYECTO				TOTAL	OBSERVACIONES
		AGUA DE MAR (mL)	INÓCULO (mL)	MEDIO F/2 GUILLARD (mL)		N° DE REPICAS	AGUA DE MAR TOTAL (mL)	INÓCULO TOTAL (mL)	MEDIO F/2 GUILLARD TOTAL (mL)		
TUBO DE ENSAYO	10	9	1	-	10.00	1	9	1	-	10	Sin aireación
MAATRAZ ENLERMEYER	250	150	10	0.15	160.15	1	150	10	0.15	160.15	Sin aireación
	250	150	40	0.15	190.15	4	600	160	0.6	760.60	Con aireación
	500	300	150	0.30	450.30	4	1200	600	1.2	1801.2	Con aireación
	1000	800	200	0.80	1000.80	4	3200	800	3.2	4003.2	Con aireación
BOTELLAS DE PLASTICO	7000	5000	800	5.00	5805.00	4	20000	3200	20	23220	Con aireación
	20000	10000	4500	10.00	14510.00	4	40000	18000	40	58040	Con aireación
FOTOBIOREACTOR (8 bolsas por Fotobiorreactor)	128000	112000	12000	112.00	124112.00	4	448000	48000	448	496448	Con aireación - se utilizó con 14 L. de agua de mar y 2 L de inóculo para cada bolsa.
TOTAL		128409	17701	128.4	146238.4		513159	70771	513.15	584443	

Para cada escalamiento se utilizó pipetas de 1, 2 y 10 ml de capacidad para el Medio F/2 Guillard, en cuanto al inóculo se utilizó también pipetas de 1, 2 y 10 ml de capacidad y jarras de plástico de 1 y 2 Litros.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Primero se llenaron las bolsas con agua de mar filtrada y esterilizo y se procedió a enriquecer el agua. El inóculo fue provisto del cultivo de las botellas de 20 Litros, antes de verter el inoculo se debe quitar la aireación a la botella y esperar a que las microalgas muertas se sedimenten. Marca con plumón el nombre de la microalga y la fecha en la que se realizó el escalamiento. Los datos de cantidades de agua y de inóculo se muestran en **Tabla N° 01.**

3.7.1.2. ABASTECIMIENTO DE AGUA DE MAR

El agua de mar filtrada fue obtenida de IMARPE, trasladando el agua en un tanque de 1000 Litros de capacidad a través de la camioneta de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera (EPIP).

El agua de mar fue bombeada hacia uno de los tanques de almacenamiento ubicado en la parte posterior del Laboratorio de Cultivo Masivo de Microalgas (**Figura N° 12).**



Figura N° 12: Bombeo de agua de mar a tanque de almacenamiento

Izquierda: Bombeo de agua. Derecha: Tanque de almacenamiento de agua de mar dentro de Laboratorio de Cultivo Masivo de Microalgas.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.3. PREPARACIÓN DE MEDIO F/2 GUILLARD

Para el cultivo de microalgas, el agua de mar fue enriquecido con medio F/2 modificado Guillard que presenta en su formulación diversos compuestos como sales, vitaminas, entre otros; para formar Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (Guillard, 1975).

Para la preparación del medio de cultivo se esterilizo las botellas transparentes (02) y ámbar (01) de 1000 ml de capacidad (c/u antes mencionada). Ver el **Anexo N° 02**.

Se procedió a pesar cada insumo en láminas de aluminio con una balanza analítica, y agregándolo a las botellas según que se esté preparando. Enrasar con agua destilada y esterilizada, y agitar (**Figura N° 13).**



Figura N° 13: Medio F/2 modificado Guillard

Izquierda: Reactivo 1 (Macronutrientes), Centro: Micronutrientes) y Derecha (Vitaminas)

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.4. LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y ESERILIZACIÓN DE MATERIALES

3.7.1.4.1. Para material de vidrio

Todo el material de vidrio como: tubos de ensayo, pipeta, matraces, botellas transparentes y ámbar, entre otros; fueron primero enjuagados con agua potable y posterior a eso dejados en reposo en una disolución de jabón neutro y agua potable (en relación 1 ml: 1 Litro) por una noche, luego con la escobilla se remueve la suciedad y son enjuagados con abundante agua potable para luego un último enjuague con agua destilada.

Al secar, son cubiertas con papel aluminio y asegurados con una liga, para rápidamente ser esterilizados en autoclave (a 121 °C por 1 hora), e deja enfriar y luego guardados envueltos en papel Kraft en un estante limpio para su posterior uso.

En el caso de los frascos (para liofilizar) estos fueron previamente enjuagados con agua potable, luego lavados con detergente, enjuagados con abundante agua para quitar los residuos de lavado y finalmente enjuagados con agua destilada. Se dejó secar y después fueron envueltos en papel kraft siendo asegurados con liga para evitar contaminación dentro del frasco; por ultimo fueron guardados en gavetas para su posterior uso.

3.7.1.4.2. Para material de plástico y manguera

Para el caso de válvulas, uniones “T” y uniones simples, son lavados con una mezcla de jabón neutro y agua potable, y luego enjuagados con abundante agua potable.

Para las mangueras, espátulas de silicona, jarra de 1 Litro, se enjuaga con agua potable, se lava con detergente y se enjuagó con abundante agua potable.

3.7.1.5. OBTENCION DE BIOMASA HÚMEDA

La centrifugación consiste en concentrar solo la microalga del cultivo líquido a través de una centrífuga separadora. Es decir, separar del cultivo: el agua de mar de las microalgas, con la mínima destrucción celular posible, con el fin de obtener un alto contenido de biomasa microalgal acumulada durante la etapa de cultivo.

El cultivo es puesto en tachos de 250 L. (se vacían las bolsas y se colocan en dichos tachos), para ser succionados por la bomba de agua de la centrifuga.

La centrifugación se realizó luego de 60 días de haber iniciado la primera fase del cultivo (desde la fase cepario a la fase masiva), empleando una centrífuga separadora manual, la cual va conectada a una bomba de agua (**Figura N° 14)**; colocando la manguera de entrada al tanque de cosecha, empleando un tacho de 250 Litros (**Anexo N° 05**).



Figura N° 14: Centrifugación de cultivo en fotobioreactores

Fuente: Elaboración Propia (2019)

La velocidad con que trabajo el equipo fue de 160 L/h. Culminado el proceso de centrifugación se procede a retirar la biomasa húmeda del tambor de la centrifuga (**Figura N° 15)** con una espátula de plástico, colocando la biomasa microalgal en papel aluminio (previamente pesada) sobre una bandeja



Figura N° 15: Biomasa húmeda de microalgas obtenida
Izquierda: Biomasa húmeda de microalgas en tambor de centrifuga. Derecha: Biomasa húmeda colocada en papel aluminio para pesar cosecha final.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.6. ULTRACONGELACION DE BIOMASA

La ultra congelación se dio conforme al **ANEXO N° 05**.

La biomasa es colocada en frascos (diseñados para liofilizar, son resistentes a temperaturas de hasta - 85°C) previamente pesados y tarados; se colocó hasta un tercio de la capacidad de los frascos (entre 41 a 42 gramos de muestra) que se puede ver en **Tabla N° 02**.

Inmediatamente después de haber pesado las tres replicas por tratamiento se procedió a colocar los frascos dentro del ultracongelador (**Figura N° 16)**



Figura N° 16: Frascos para liofilizar con muestra de microalga dentro de ultracongelador

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Tabla N° 02: Peso de Muestras de Microalga en Frascos para liofilizar

TRATAMIENTOS		PESO INICIAL	PESO BH
T1	R1	168.1543	41.3070
	R2	166.0282	42.3297
	R3	107.8976	41.9135
T2	R1	167.3163	41.7117
	R2	166.3915	41.9062
	R3	108.2020	42.1178
T3	R1	168.1620	41.1692
	R2	166.0353	41.8878
	R3	109.8379	42.3119

Donde:

T1: Tratamiento 1
T2: Tratamiento 2
T3: Tratamiento 3

PESO INICIAL: Es el peso del vaso para liofilizar
R1: Repetición 1

R2: Repetición 2	PESO BH: Peso de Biomasa
R3: Repetición 3	Húmeda de microalga

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Se realizó un seguimiento por hora del decrecimiento de la Temperatura de las muestras de microalga (**GRÁFICO N° 01**) con termocupla (**Figura N° 17)** después de haberse colocado dentro del ultracongelador, hasta que la temperatura estuviera en –50 a – 55 °C debido a que el tambor del liofilizador trabaja a – 50 °C.



Figura N° 17: Seguimiento de temperatura durante ultracongelación

1 – Medición de temperatura con termocupla

2 – Vista lateral de la medición de temperatura

3 – Vista superior de microalga ultracongelada dentro del vaso para liofilizar

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Cada tratamiento fue ultracongelado un día antes de su liofilización, como se detalla en la **Tabla N° 03**

Tabla N° 03: Fecha de colocación de Frascos para liofilizar en ultracongelador por tratamiento

TRATAMIENTOS		FECHA INICIO	FECHA FIN
T1	R1	22.10.2019	22.10.2019
	R2	22.10.2019	22.10.2019
	R3	22.10.2019	22.10.2019
T2	R1	22.10.2019	23.10.2019
	R2	22.10.2019	23.10.2019
	R3	22.10.2019	23.10.2019
T3	R1	28.10.2019	28.10.2019
	R2	28.10.2019	28.10.2019
	R3	28.10.2019	28.10.2019

Donde:

T1: Tratamiento 1	R1: Repetición 1
T2: Tratamiento 2	R2: Repetición 2
T3: Tratamiento 3	R3: Repetición 3

Fecha inicio y fin del proceso de ultracongelación por tratamiento de la biomasa microalgal de Chlorella vulgaris.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.1.7. LIOFILIZACIÓN DE BIOMASA

Luego de 12 horas de que las muestras fueron ultracongeladas son colocadas en el liofilizador (**Anexo N° 06**), que previamente ya fue

encendido y se le dio inicio a la carga y baja temperatura del colector. Llegado a los -50°C ya se puede dar inicio a la presión a la que se desea trabajar (en este caso 0.04 mbar).

Se debe colocar las muestras solo si la presión a la que vamos a trabajar se denota en pantalla, porque si no el lapso de tiempo entre colocar las muestras no será el mismo y podría variar los resultados finales.

Se coloca un tubo de acero inoxidable (que también es pieza del liofilizador) que funciona como unión del liofilizador y el frasco, se gira la perilla que se encuentra donde se hizo la unión con el liofilizador, el lado liso va frente al vaso para que dentro del frasco se ejerza la presión con que se programó a trabajar. Esperar a que vuelva a bajar la presión y colocar de la misma manera la siguiente muestra. Terminado la colocación de las muestras (**Figura N° 18**) cuando llegue a la presión que se desea para trabajar recién se contara el Tiempo a realizar el secado.



Figura N° 18: Muestras de microalga en el equipo liofilizador
Equipo liofilizador Freezone trabajando con tres muestras.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.2. ANÁLISIS DE DATOS

3.7.2.1. ULTRACONGELACIÓN

Durante el proceso de ultracongelación de las muestras se tomó datos de Temperatura por hora, hasta un máximo de 12 horas que es el tiempo estipulado para este proyecto de tesis. Los datos se pueden ver en el **Tabla N° 04** y en el **Gráfico N° 01.**

3.7.2.2. LIOFILIZACIÓN

Durante el proceso de liofilización se guardaron datos cada 5 min. para ver el comportamiento de la presión que ejerce el equipo sobre las muestras.

3.7.2.3. OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA

Los datos obtenidos de peso en gramos por repetición de cada tratamiento (tres distintos tiempos de liofilización) fueron hallados mediante fórmula:

Formula N° 01: Fórmula para determinar cantidad de biomasa seca (BS)

$$BS = P_F - P_I$$

Donde:

P_I: Peso inicial (frasco para liofilizar vacío)

P_F: Peso final (frasco con muestra seca)

Fuente: Elaboración Propia (2019)

3.7.2.4. OBTENCION DE PORCENTAJE DE HUMEDAD PERDIDA

Para determinar el porcentaje de humedad perdida (%H) fueron hallados mediante la siguiente fórmula:

Formula N° 02: Fórmula para determinar Porcentaje de Humedad (%H)

$$\%H = \frac{(P_I + P_M) - P_F}{P_M} \; x \; 100$$

Donde:

%H: Porcentaje de Humedad

P_I: Peso inicial (frasco para liofilizar vacío)

P_M: Peso de la muestra (Biomasa Húmeda)

P_F: Peso final (frasco con muestra seca)

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Para determinar el porcentaje pedido de humedad después del proceso de liofilización y ver si alguno de estos tiempos afecta significativamente en la obtención de biomasa seca.

3.7.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos obtenidos fueron primero registrados en hojas de cálculo de Excel, para evaluar la cantidad de harina de microalga *Chlorella vulgaris* después de la liofilización. Así mismo se evaluó la perdida de humedad de las muestras de biomasa seca (%Humedad) y el porcentaje de la cantidad total de la biomasa seca.

La Biomasa Húmeda obtenida fue liofilizada en tres repeticiones por tratamiento y con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor al 95% de, y si el análisis lo requiere se realiza la prueba de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento.

Las muestras liofilizadas procedentes del proyecto fueron finalmente evaluadas proximalmente con equipos validados en Austral Group S.A.A. para contrastar el resultado de %Humedad perdido por la biomasa húmeda.

CAPÍTULO IV: RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. DECRECIMIENTO DE LA TEMPERATURA DE LA MUESTRA DE MICROALGA

Después de colocar los frascos con muestra de microalga dentro del ultracongelador se realizó un seguimiento por cada hora que estos estuvieran dentro, hasta alcanzar los – 50 °C a – 55°C con una termocupla. Los resultados obtenidos del Decrecimiento de la Temperatura de las muestras de microalga por Tratamiento se muestran en la **Tabla N° 04** y en el **Gráfico N° 01** a continuación:

Tabla N° 04: Decrecimiento de la Temperatura de las muestras de microalga por Tratamiento

HORAS DURANTE LA ULTRACONGELACIÓN	TRATAMIENTO		PROMEDIO	
	1	3		
	22.10.2019	28.10.2019		
08:00:00	15	14	14.5	TEMPERA
09:00:00	1	3	2	
10:00:00	-10	-9	-9.5	
11:00:00	-16	-17	-16.5	
12:00:00	-25	-26	-25.5	
13:00:00	-30	-33	-31.5	

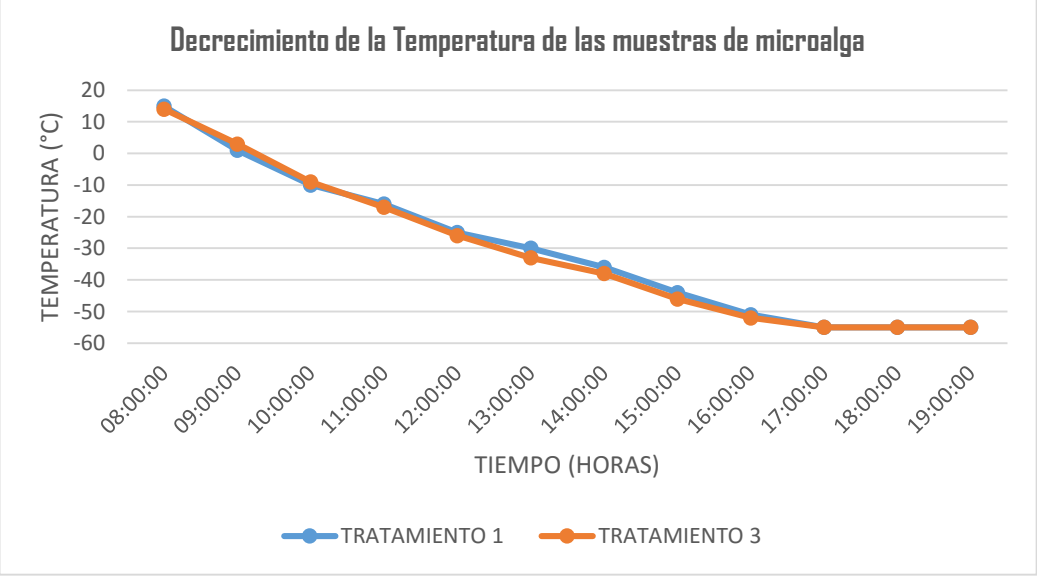
14:00:00	-36	-38	-37	TURA (°C)
15:00:00	-44	-46	-45	
16:00:00	-51	-52	-51.5	
17:00:00	-55	-55	-55	
18:00:00	-55	-55	-55	
19:00:00	-55	-55	-55	

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Tener en cuenta que la biomasa microalgal fue obtenida por centrifugación el día viernes 18 de octubre de 2019 inmediatamente fue preservada en refrigeración de 10 a 15° C en un refrigerador y recién fue utilizada para ultracongelarse el 22 de octubre de 2019 (en la mañana y en la noche) y el 28 de octubre de 2019. La temperatura de la microalga es de 16 a 17.5 °C después de ser centrifugada.

No se realizó seguimiento al Tratamiento 2 debido a que la muestra fue puesta el 22.10.2019 de 20:00 horas a 08:00 horas del día siguiente.

Gráfico N° 01: Decrecimiento de la Temperatura de las muestras de microalga



Fuente: Elaboración Propia (2019)

Se puede observar en el **GRÁFICO N° 01** que el decrecimiento de temperatura cercano a "0 °C "se da muy rápido en la primera hora, mientras que para llegar a – 50 °C demora 08 (ocho) horas. Para tener en cuenta que de la hora 8 a la hora 12 no se tiene dato exacto de Temperatura, debido a que la termocupla solo mide hasta -55 °C.

4.1.2. OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA

Se tomó datos cada 5 min. (por parte del equipo) desde que se prendió el equipo (liofilizador) hasta que culmino el tiempo establecido para los tres tratamientos.

La presión usada para todos los tratamientos es de 0.04 mbar, debido a que esta es la presión con que trabaja el equipo liofilizador.

4.1.2.1. Tratamiento 1: 12 horas de liofilización

En el tratamiento 1 de 12 horas de liofilización se pueden ver los datos brindados por el equipo liofilizador en la **Tabla N° 05.**

Tabla N° 05: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 1

FECHA	TIEMPO (horas)	COLECTOR (°C)	VACÍO (mbar)
22/10/2019	19:50:00	25.7	Alto*
22/10/2019	19:55:00	-29.8	Alto*
22/10/2019	20:00:00	-51.8	Alto*
22/10/2019	20:05:00	-52.6	0.067
22/10/2019	20:10:00	-52.4	0.059

22/10/2019	20:15:00	-52.1	0.051
22/10/2019	20:20:00	-51.9	0.048
22/10/2019	20:25:00	-51.6	0.044
22/10/2019	20:30:00	-51.2	0.040
22/10/2019	20:35:00	-50.8	0.040
22/10/2019	20:40:00	-51.1	0.039
22/10/2019	20:45:00	-51.4	0.037
22/10/2019	20:50:00	-51.7	0.038
22/10/2019	20:55:00	-51.4	0.036
22/10/2019	21:00:00	-51.1	0.034
22/10/2019	21:30:00	-51.4	0.032
22/10/2019	22:00:00	-51.3	0.032
22/10/2019	22:30:00	-51.5	0.033
22/10/2019	23:00:00	-51.3	0.032
22/10/2019	23:30:00	-51.5	0.031
23/10/2019	00:00:00	-51.7	0.031
23/10/2019	00:30:00	-51.7	0.033
23/10/2019	01:30:00	-51.4	0.030
23/10/2019	02:00:00	-51.7	0.028
23/10/2019	02:30:00	-51.9	0.030
23/10/2019	03:00:00	-51.4	0.028
23/10/2019	03:30:00	-51.8	0.025
23/10/2019	04:00:00	-52.0	0.027
23/10/2019	04:30:00	-51.8	0.029
23/10/2019	05:00:00	-51.7	0.026
23/10/2019	05:30:00	-52.0	0.027
23/10/2019	06:00:00	-52.2	0.028
23/10/2019	06:30:00	-52.0	0.028
23/10/2019	07:00:00	-51.8	0.025
23/10/2019	07:30:00	-51.7	0.028
23/10/2019	08:00:00	-52.0	0.027
23/10/2019	08:10:00	-52.2	0.029

23/10/2019	08:20:00	-51.9	0.033
23/10/2019	08:30:00	-52.0	0.035
23/10/2019	08:40:00	-12.3	Alto*
23/10/2019	08:50:00	23.9	Alto*

*Alto: no hay presión en el equipo.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

De la **Tabla N° 05** se contó como inicio de Tratamiento 1 (liofilizado de 12 horas) a las 20:30 horas que la presión llego a 0.040 mbar. Se observa que durante todo el Tratamiento 1 la presión estuvo en un promedio 0.008 mbar más bajo de lo estipulado. En la **Figura N° 19** se observa la biomasa seca del Tratamiento 1. Y en la **Figura N° 20** una de las repeticiones.



Figura N° 20: Biomasa seca Tratamiento 1 Repetición 2

Fuente: Elaboración Propia (2019)



Figura N° 19: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 1

Arriba: Tratamiento 1 Repetición 1 (T1R1). Centro: Tratamiento 1 Repetición 2 (T1R2). Abajo: Tratamiento 1 Repetición 3 (T1R3).

Fuente: Elaboración Propia (2019)

4.1.2.2. Tratamiento 2: 24 horas de liofilización

En el tratamiento 2 de 24 horas de liofilización se presentan los datos del equipo liofilizador en la **Tabla N° 06.**

Tabla N° 06: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 2

FECHA	TIEMPO (horas)	COLECTOR (°C)	VACÍO (mbar)
23/10/2019	08:50:00	23.9	Alto*
23/10/2019	08:55:00	-30.3	Alto*
23/10/2019	09:00:00	-51.7	Alto*
23/10/2019	09:05:00	-52.5	0.064
23/10/2019	09:10:00	-52.9	0.055
23/10/2019	09:15:00	-52.6	0.051
23/10/2019	09:20:00	-51.7	0.049
23/10/2019	09:25:00	-51.4	0.048
23/10/2019	09:30:00	-51.0	0.046
23/10/2019	09:35:00	-50.9	0.040
23/10/2019	09:40:00	-51.3	0.037
23/10/2019	09:45:00	-51.4	0.038
23/10/2019	09:50:00	-51.8	0.037
23/10/2019	09:55:00	-51.5	0.034
23/10/2019	10:00:00	-51.1	0.032
23/10/2019	10:30:00	-51.2	0.032
23/10/2019	11:00:00	-51.4	0.034
23/10/2019	11:30:00	-51.3	0.034
23/10/2019	00:00:00	-51.4	0.031
23/10/2019	00:30:00	-51.5	0.033
23/10/2019	13:00:00	-51.3	0.032
23/10/2019	13:30:00	-51.5	0.030
23/10/2019	14:00:00	-51.8	0.031
23/10/2019	14:30:00	-51.7	0.033
23/10/2019	15:00:00	-51.7	0.031
23/10/2019	15:30:00	-51.8	0.029
23/10/2019	16:00:00	-51.9	0.031
23/10/2019	16:30:00	-51.6	0.030
23/10/2019	17:00:00	-51.8	0.026

23/10/2019	17:30:00	-51.8	0.027
23/10/2019	18:00:00	-52.0	0.029
23/10/2019	18:30:00	-52.0	0.028
23/10/2019	19:00:00	-51.7	0.026
23/10/2019	19:30:00	-51.9	0.026
23/10/2019	20:00:00	-52.0	0.028
23/10/2019	20:30:00	-52.0	0.027
23/10/2019	21:00:00	-51.9	0.022
23/10/2019	21:30:00	-51.7	0.023
23/10/2019	22:00:00	-52.9	0.025
23/10/2019	22:30:00	-51.6	0.022
23/10/2019	23:00:00	-51.6	0.020
23/10/2019	23:30:00	-51.7	0.020
23/10/2019	00:00:00	-51.9	0.021
23/10/2019	00:30:00	-51.6	0.017
23/10/2019	01:00:00	-50.9	0.020
23/10/2019	01:30:00	-50.9	0.024
24/10/2019	02:00:00	-50.9	0.025
24/10/2019	02:30:00	-49.9	0.024
24/10/2019	03:00:00	-49.5	0.024
24/10/2019	04:00:00	-49.4	0.020
24/10/2019	05:00:00	-50.0	0.026
24/10/2019	06:00:00	-51.1	0.027
24/10/2019	07:00:00	-51.5	0.025
24/10/2019	08:00:00	-51.8	0.020
24/10/2019	09:00:00	-52.3	0.023
24/10/2019	09:00:00	-52.3	0.025
24/10/2019	09:05:00	-52.3	0.023
24/10/2019	09:15:00	-52.3	0.022
24/10/2019	09:25:00	-52.3	0.020
24/10/2019	09:35:00	-52.3	0.020
24/10/2019	09:40:00	-35.0	Alto*

24/10/2019	09:50:00	0.9	Alto*

*Alto: no hay presión en el equipo.

Fuente: Elaboración Propia (2019)



Figura N° 21: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 2

Arriba: Tratamiento 2 Repetición 1 (T2R1). Centro: Tratamiento 2 Repetición 2 (T2R2). Abajo: Tratamiento 2 Repetición 3 (T2R3).

Fuente: Elaboración Propia (2019)

De la **Tabla N° 06** se contó como inicio de Tratamiento 2 (liofilizado de 24 horas) a las 09:35 horas que la presión llego a 0.040 mbar. Se observa que durante todo el Tratamiento 2 la presión estuvo -0.023 mbar de lo estipulado. La harina obtenida de este tratamiento a simpe vista se vio que en su totalidad estaba seca **(Figura N° 21).**

4.1.2.3. Tratamiento 3: 36 horas de liofilización

En el tratamiento 3 de 36 horas de liofilización los datos brindados por el equipo liofilizador se muestran en la **Tabla N° 07.**

Tabla N° 07: Datos de equipo liofilizador en Tratamiento 3

FECHA	TIEMPO (horas)	COLECTOR (°C)	VACÍO (mbar)
28/10/2019	19:50:00	23.9	Alto*
28/10/2019	19:55:00	-30.3	Alto*
28/10/2019	20:00:00	-52.1	Alto*
28/10/2019	20:05:00	-52.9	0.064
28/10/2019	20:10:00	-52.7	0.055
28/10/2019	20:15:00	-52.1	0.051
28/10/2019	20:20:00	-51.7	0.049
28/10/2019	20:25:00	-51.6	0.046
28/10/2019	20:30:00	-51.2	0.043
28/10/2019	20:35:00	-50.9	0.040
28/10/2019	20:40:00	-51.1	0.038
28/10/2019	20:45:00	-51.4	0.038
28/10/2019	20:50:00	-51.6	0.037
28/10/2019	20:55:00	-51.4	0.034
28/10/2019	21:00:00	-51.1	0.032

28/10/2019	21:00:00	-51.1	0.034
28/10/2019	21:30:00	-51.3	0.034
28/10/2019	22:00:00	-51.3	0.031
28/10/2019	22:30:00	-51.5	0.033
28/10/2019	23:00:00	-51.3	0.032
28/10/2019	23:30:00	-51.5	0.037
29/10/2019	00:00:00	-51.7	0.041
29/10/2019	00:30:00	-51.7	0.039
29/10/2019	01:30:00	-51.4	0.040
29/10/2019	02:00:00	-51.9	0.038
29/10/2019	02:30:00	-51.9	0.041
29/10/2019	03:00:00	-51.4	0.039
29/10/2019	03:30:00	-51.8	0.042
29/10/2019	04:00:00	-52.0	0.040
29/10/2019	04:30:00	-51.8	0.040
29/10/2019	05:00:00	-51.7	0.036
29/10/2019	05:30:00	-52.0	0.029
29/10/2019	06:00:00	-52.2	0.031
29/10/2019	06:30:00	-52.0	0.027
29/10/2019	07:00:00	-51.8	0.025
29/10/2019	07:30:00	-51.9	0.023
29/10/2019	08:00:00	-52.0	0.025
29/10/2019	08:30:00	-51.6	0.022
29/10/2019	08:35:00	-51.5	0.020
29/10/2019	08:40:00	-51.8	0.020
29/10/2019	08:45:00	-51.9	0.021
29/10/2019	09:00:00	-51.5	0.017
29/10/2019	10:00:00	-50.5	0.020
29/10/2019	11:00:00	-48.8	0.020
29/10/2019	12:00:00	-49.4	0.020
29/10/2019	13:00:00	-48.9	0.020
29/10/2019	14:00:00	-48.1	0.020

29/10/2019	15:00:00	-49.4	0.020
29/10/2019	16:00:00	-50.4	0.020
29/10/2019	17:00:00	-51.3	0.017
29/10/2019	18:00:00	-51.9	0.019
29/10/2019	19:00:00	-51.8	0.019
29/10/2019	20:00:00	-52.1	0.019
29/10/2019	21:00:00	-52.1	0.017
29/10/2019	22:00:00	-52.2	0.018
29/10/2019	23:00:00	-52.0	0.020
30/10/2019	00:00:00	-52.3	0.020
30/10/2019	01:00:00	-52.2	0.021
30/10/2019	02:00:00	-52.4	0.022
30/10/2019	03:00:00	-52.3	0.022
30/10/2019	04:00:00	-52.7	0.022
30/10/2019	05:00:00	-52.6	0.023
30/10/2019	06:00:00	-52.4	0.023
30/10/2019	07:00:00	-52.1	0.020
30/10/2019	08:00:00	-51.9	0.012
30/10/2019	08:10:00	-52.0	0.015
30/10/2019	08:20:00	-52.2	0.016
30/10/2019	08:30:00	-51.9	0.020
30/10/2019	08:35:00	-52.0	0.024
30/10/2019	08:05:00	-35.0	Alto*
30/10/2019	08:10:00	3.8	Alto*

*Alto: no hay presión en el equipo.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

De la **Tabla N° 07** se contó como inicio de Tratamiento 3 (liofilizado de 36 horas) a las 20:35 horas que la presión llego a 0.040 mbar. Se observa que durante todo el Tratamiento 3 la presión estuvo -0.028 mbar de lo estipulado. La harina obtenida de este tratamiento a simpe vista se vio que en su totalidad estaba seca (**Figura N° 22)**

En los 3 tratamientos se puede observar que el equipo liofilizador demoro entre 30 a 35 min. Después de colocado las muestras en llegar a la presión establecida para este proyecto. Y durante todo el proceso se mantuvo cerca a lo programado 0.04 mbar manteniendo un promedio de ± 0.008 mbar. (+ 0.002 mbar solo durante los primeros 35 min).



FIGURA N° 22: Biomasa seca obtenida del Tratamiento 3

Arriba: Tratamiento 3 Repetición 1 (T3R1). Centro: Tratamiento 3 Repetición 2 (T3R2). Abajo: Tratamiento 3 Repetición 3 (T3R3).

Fuente: Elaboración Propia (2019)

4.1.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE PRESION Y TIEMPO PARA LA OBTENCION DE BIOMASA SECA

Después del proceso de liofilización los resultados de la biomasa seca por tratamiento se muestran en la **Tabla N° 08.**

Tabla N° 08: Datos obtenidos de equipo liofilizador

TRATAMIENTOS		PESO INICIAL	PESO BH	PESO FINAL	PESO BS	%H PERD.	% BS
T1	R1	168.1543	41.3070	182.4339	14.2796	65.43	34.57
	R2	166.0282	42.3297	181.7344	15.7062	62.90	39.47
	R3	107.8976	41.9135	122.4020	14.5044	65.39	34.61
T2	R1	168.1620	41.1692	181.6582	13.4962	67.22	32.78
	R2	166.0353	41.8878	179.7486	13.7133	67.26	32.74
	R3	109.8379	42.3119	123.7459	13.9080	67.13	32.87
T3	R1	167.3163	41.7117	180.4867	13.1704	68.43	31.57
	R2	166.3915	41.9062	179.5664	13.1749	68.56	31.44
	R3	108.2020	42.1178	121.5301	13.3281	68.36	31.64
PROMEDIO			41.8505		13.9201	66.74	33.26

T1 : Tratamiento 1
T2 : Tratamiento 2
T3 : Tratamiento 3
Peso Inicial : Frasco de liofilizador vacío
Peso BH : Peso de biomasa húmeda
Peso Final : Frasco de liofilizador con biomasa seca
Peso BS : Peso de biomasa seca
%H PERD. : Porcentaje de humedad perdida durante el proceso de liofilización
%BS : Porcentaje de biomasa seca

Fuente: Elaboración Propia (2019)

En el Peso de la biomasa seca (Peso BS) se observa que el tratamiento 1 tiene mayor peso en gramos con un Promedio de 14.83 g. a diferencia de los tratamientos 2 y 3 con 13.7058 g. y 13.2245 g. respectivamente, pero en cuanto a %Humedad perdida (%H perdido) en los promedios se denota que hubo una mayor pérdida de peso en el tratamiento 3 en comparación con los otros dos tratamientos (1 y 2), pero se denota una gran diferencia del tratamiento 1 que presento un %H perdido promedio de 64.5735 teniendo en cuenta que el tratamiento 1 repetición 2 (T1R2) como se muestra en la **Tabla N° 09** tiene un %H Perd. de 62.90 que diferencia de las otras dos repeticiones siendo así R1 y R3, 65.43% y 65.39% respectivamente; se deba tal vez a la cantidad diferente de muestra colocada para el proceso de liofilización.

Se observa una diferencia de 1.243% entre los tratamientos 2 y 3, la diferencia es mínima, pero denota que la biomasa podía perder aun humedad.

Tabla N° 09: Datos obtenidos de equipo liofilizador y promedios

TRATAMIENTOS		PESO BS (g.)	PROMEDIO PESO BS (g.)	%H PERD. (%)	PROMEDIO %H PERD. (%)	% BS (%)	PROMEDIO % BS (%)
T1	R1	14.2796	14.8301	65.43	63.5735	34.57	**35.43**
	R2	15.7062		62.90		37.10	
	R3	14.5044		65.39		34.61	
T2	R1	13.4962	13.7058	67.22	67.2031	32.78	**32.80**
	R2	13.7133		67.26		32.74	
	R3	13.9080		67.13		32.87	
T3	R1	13.1704	13.2245	68.43	68.4471	31.57	**31.55**
	R2	13.1749		68.56		31.44	
	R3	13.3281		68.36		31.64	

Fuente: Elaboración Propia (2019)

El porcentaje de rendimiento promedio de biomasa seca (promedio %BS) es de 35.43%, 32.89% y 31.55% para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente.

En cuanto a las pérdidas de humedad reflejadas en la **Tabla N°10** a un nivel de significancia de 0.05 (**Tabla N°11**) vemos que existe diferencia significativa en cuanto al porcentaje de perdida de humedad por tratamiento, dicha diferencia se observa entre los tratamientos 1 y 2 (**Tabla N°12**), siendo el primero a simple vista el que perdió menos %Humedad y el tercero el que llegó a perder mayor humedad.

4.1.3.1. ANALISIS PARA %HUMEDAD PERDIDO POR TRATAMIENTO

Tabla N° 10: Promedios de %Humedad Perdido por Tratamiento

	T1	T2	T3
%HUMEDAD PERDIDO	65.43	67.22	68.43
	62.90	67.26	68.56
	65.39	67.13	68.36
PROMEDIO	64.57	67.20	68.45

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Tabla N° 11: Análisis de varianza de %Humedad perdido por tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Tratamientos	23.4670256	2	11.7335128	16.5457959	0.00361579	5.14325285
% humedad	4.2549223	6	0.70915372			
Total	50.8530045	8				

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Después del análisis de varianza se observó que existe diferencia significativa en cuanto a los resultados de %Humedad perdida a una confianza de 95%.

Tabla N° 12: Comparación de medias para determinación de %Humedad perdida

	T1	T2	T3
T1		-2.63	-3.87
T2	2.63		-1.24
T3	3.87	1.24	

HSD	2.11008182
Multiplicador	4.34
MSe	0.70915372
n	3

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Habiendo diferencia significativa en los tratamientos, notamos que según Tukey entre el tratamiento 1 y 2; además de también tratamiento 1 y 3. Así decimos que los tratamientos 2 y 3 son guales estadísticamente, mientras que el tratamiento 1 es diferente a comparación del 2 y 3, que se puede notar a simple vista en los resultados dados a través de cálculos plasmados en la **TABLA N° 08**.

4.1.3.2. ANALISIS PARA BIOMASA SECA (EN GRAMOS) POR TRATAMIENTO

Tabla N° 13: Promedios de biomasa seca (en gramos) por Tratamiento

	T1	T2	T3
Biomasa Seca (g.)	14.28	13.50	13.17
	15.71	13.71	13.17
	14.50	13.91	13.33
Promedio	14.83	13.71	13.22

Fuente: Elaboración Propia (2019)

En cuanto a la obtención de biomasa seca observamos en la **Tabla N°13** a un nivel de significancia de 0.05 (**Tabla N°14**) que si existe diferencia significativa en cuanto a la cantidad de biomasa seca final obtenida por tratamiento; aunque cuantitativamente se puede apreciar en la **Tabla N°13** lo mismo.

Tabla N° 14: Análisis de varianza de biomasa seca (en gramos) por tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Tratamientos	4.07356582	2	2.036782908	9.56479253	0.013611243	5.14325285
Dentro de los grupos	1.27767512	6	0.212945853			
Total	9.81228538	8				

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Tabla N° 15: Comparación de medias para determinación de %Humedad perdida

HSD	1.16
Multiplicador	4.34
MSe	0.213
N	3

	T1	T2	T3
T1		1.12	1.61
T2	-1.12		0.48
T3	-1.61	-0.48	

Fuente: Elaboración Propia (2019)

Con el análisis de varianza se observa una diferencia significativa en los tres tratamientos, notamos que según Tukey el grupo tratamiento 1 y 3 son diferentes estadísticamente, mientras que el tratamiento 1 es igual estadísticamente con los tratamientos 2 y 3, que se puede notar a simple vista en los resultados dados a través de cálculos plasmados en la **TABLA N° 08**.

4.1.4. ANALISIS PROXIMAL DE LA BIOMASA SECA OBTENIDA

Tabla N° 16: Resultados en porcentaje (%) de Análisis de Proximales de biomasa seca obtenida por Tratamiento y biomasa húmeda

TRATAMIENTO		ANALISIS DE PROXIMALES							
		PROTEINA		GRASA		HUMEDAD		CENIZA	
		DUPLICADO	PROMEDIO	DUPLICADO	PROMEDIO	DUPLICADO	PROMEDIO	DUPLICADO	PROMEDIO
T1	R1	18.77	18.82	0.13	0.16	10.53	10.34	21.94	21.93
		18.87		0.19		10.15		21.91	
	R2	18.92	19.29	0.83	0.95	18.79	19.45	25.11	25.14
		19.65		1.07		20.10		25.16	
	R3	19.78	19.75	0.96	0.82	9.58	9.70	31.08	28.36
		19.71		0.68		9.82		25.64	
T2	R1	20.04	20.07	1.24	1.28	2.09	2.28	22.43	22.45
		20.10		1.32		2.46		22.47	
	R2	20.09	20.11	1.37	1.39	2.38	2.17	22.46	22.45
		20.13		1.40		1.96		22.43	
	R3	20.11	20.13	1.46	1.41	1.36	1.70	22.99	22.98
		20.14		1.35		2.04		22.96	
T3	R1	20.22	20.23	1.48	1.46	2.34	2.42	22.79	22.76
		20.24		1.44		2.50		22.72	
	R2	20.18	20.16	1.54	1.43	2.14	2.23	24.61	24.65
		20.14		1.32		2.31		24.68	
	R3	20.20	20.23	1.44	1.46	1.38	1.62	24.55	24.56
		20.25		1.47		1.85		24.56	
BIOMASA HÚMEDA		23.53	23.41	0.24	0.46	67.27	67.32	8.96	8.83
		23.28		0.67		67.36		8.69	

De la **Tabla N°15** vemos que el porcentaje de humedad (%H) máximo que se puede obtener de la biomasa húmeda es de 67.32% en promedio (se realizó análisis %H por duplicado). Este dato concuerda con porcentaje de perdida de humedad (%H Perd.) de los resultados dados en la Tabla N°10 de los tratamientos 2 y 3, cuyos datos son 67.20% y 68.45% respectivamente.

En cuanto a la proteína vemos que los datos también son similares en los T2 y T3.

Fuente: Tabla Elaboración Propia con resultados de Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad de la Empresa Pesquera AUSTRAL GROUP S.A.A.(2019)

4.2. DISCUSIÓN

El tratamiento que es el mejor para liofilizar biomasa de *microalga Chlorella vulgaris* según este proyecto se opta por el de 24 horas, al igual que Cabrera & Pulla (2014) que realizaron la liofilización de *Chlorella y Scenedesmus* (y otras 3 especies no identificadas) a un tiempo de 24 h, pero no denotaron porcentaje de perdida de humedad. Ellas añadieron CO2 para estresar a las microalgas y así obtener mayor contenido de lípidos. Según Cabrera & Pulla (2014) obtuvieron 2.6 $^{gramos}/_{ml}$ partir de microalga liofilizada, mientras que con el mismo tiempo de liofilizado obtuve hasta 1.41 $^{gramos}/_{ml}$.

En el caso de Obeid; *et al.* (2018) sus muestras congeladas de microalga *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* fueron sometidas a una presión de 0,01 bar, durante 48 h para supuestamente obtener una biomasa completamente seca en un Dispositivo Fisher Bioblock Scientific Alpha 2–4 LD Plus; mientras que en para la obtención de la harina de este proyecto se utilizó un Liofilizador LABCONCO Freezone cuya temperatura llega a -50 °C, en cambio el de Obeid, *et al.* (2018) llego a -80 °C.

Según Robles y Granados (2014) sometieron a su biomasa de *Porphyridium cruentum* a un vacío de 4.34x10-5 atm (0.44 mbar), y por un tiempo de 72 h obteniendo solo un 3.67% de biomasa seca, mientras que con microalga *Chlorella vulgaris* a 0.04 mbar a 24 horas se obtuvo 32.80% de harina de microalga.

Medina, A. R., Grima, E. M., Giménez, A. G., & González, M. J. I. (1998) después de una centrifugación de la biomasa húmeda de *Phaeodactylum tricornutum,* esta es sometida (al mismo procedimiento que se utiliza para determinar ácidos grasos en la harina de pescado) directamente a etanol (al 96% de pureza) para obtener ácidos grasos y produjo un rendimiento de 90%, que a diferencia de una muestra de la misma microalga en biomasa liofilizada se obtiene un 96% de ácidos grasos; para este

proyecto se logró un 315% de rendimiento de lípidos totales con hexano como insumo para su destilado, dando como resultado que la liofilización es un proceso adecuado para conservar la calidad de la microalga y al deshidratar más que otros procesos de obtención de biomasa seca si observamos un valor agregado del 1200% según menciona Ramírez en su definición de liofilización (2006).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se estableció como presión constante 0.04 mbar para liofilizar microalga *Chlorella vulgaris*, debido a que el proceso de liofilización se da a través de un vacío en el equipo liofilizador y una presión atmosférica baja; por ende, lo más bajo con que trabaja el equipo liofilizador presente en este proyecto de investigación es de 0.04 mbar.

- Se ha visto en varios autores citados en los antecedentes del estudio que utilizaron para liofilizar sus biomasas húmedas, dejando de lado la presión utilizada por ellos, pero si el %Biomasa seca obtenida, tome un tiempo de 24 horas como tratamiento medio; por tal motivo en el presente proyecto se usó así ± 12 horas, obteniendo los tres tiempos a liofilizar (12, 24 y 36 horas).

- Se realizó el proceso de liofilizado de la biomasa húmeda de la microalga *Chlorella vulgaris* a una presión constante de 0.04 mbar para los tres tratamientos, obteniendo que a 12 horas de liofilización se produjo 14.83 g. de biomasa seca teniendo así un rendimiento de 35.43% de biomasa seca en base biomasa húmeda a diferencia de lo logrado con el tratamiento 2 (24 horas) que fue de 13.71 g. con un

rendimiento de 32.80% de Biomasa seca y finalmente con el liofilizado a 36 horas obtuvimos 13.22 g. que equivale a un 31.55% de rendimiento de biomasa seca. Así concluimos que de acuerdo a los resultados adquiridos para obtener mayor cantidad de biomasa seca debemos liofilizar a un tiempo de 12 horas.

- En cuanto a la mayor pérdida de humedad en la obtención de biomasa seca de microalga *Chlorella vulgaris*, se demostró que se debe optar por liofilizar a 24 horas teniendo como resultado un 67.20% de humedad perdida, similar resultado que con el liofilizado a 36 horas que se logró un %Humedad perdida de 68.45; a su vez estos dos tiempos de liofilización resultaron tener una gran diferencia con el liofilizado a 12 horas que dio finalmente un %Humedad perdido de 63.79. Por tanto, luego del análisis de varianza se concluye que el mejor tratamiento o tiempo para el proceso de liofilización en el equipo LABCONCO Freezone 2.5L es de 12 horas, debido a que en 12 horas la biomasa húmeda es liofilizada por completo y se obtiene un buen rendimiento en cuanto a cantidad de biomasa seca, además también podría ser utilizado, debido a que nos vemos afectados por el factor tiempo, gasto de energía eléctrica, aceite para bomba de vacío (costo), entre otros factores. Y así mismo muestra una relación directa con el objetivo específico 3.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un proyecto de investigación teniendo en cuenta enjuagar la biomasa húmeda con agua potable, para diluir las sales del cultivo

con agua de mar, a fin de tal ves aminorar la ceniza y aumentar algún otro valor proximal.

- Realizar un proyecto de investigación aplicando la harina de microalgas como materia prima siendo utilizada como fuente de proteína en la elaboración de dietas para peces.

- Realizar un proyecto de investigación similar, pero teniendo en cuenta utilizar rangos de hora de entre 12 a 24 horas de liofilización, con el fin de establecer un procedimiento establecido para liofilización de Biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* para el equipo LABCONCO Freezone 2.5 L.; o tal vez usando también otras microalgas para determinar si existe alguna diferencia en cuanto a metodología (tiempo a liofilizar).

- Desarrollar el cultivo de microalgas en temporada de inicios de invierno, para trabajar en condiciones semi controladas adecuadas, esto en cuanto a la temperatura; debido a que este proyecto de tesis se realizó en temporada invierno – primavera; y en el mes de octubre que se realizó el escalamiento masivo en fotobioreactores el sol jugo una mala pasada, debiendo durante en las mañanas y tarde abrir las puertas del laboratorio para que el ambiente se encuentre algo fresco y no el cultivo de microalgas no perezca.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu, A., Fernández, B., Vicente, A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source. Bioresource technology, 118, 61-66. Recuperado de: https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/22392/1/Artigo8.12_JAT.pdf.

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, *19*(3), 257-275. Recuperado de: https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005

Aguilar, C., Chang, I., Tenorio, L., Ynga, G., Oscanoa, A., & Flores, L. (2011). Compendio metodológico para la extracción de lípidos totales a partir de Biomasa Microalgal. Recuperado de: http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/proc_culti_microalgas.pdf

Alvarado, J. (1996). Principios de ingeniería aplicados a alimentos. Editorial OEA. Ambato, EC, 420-453. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Juan_Alvarado18/publication/302119863_Principios_de_Ingenieria_Aplicados_en_Alimentos_2da_ed/links/572e46ef08aeb1c73d129575/Principios-de-Ingenieria-Aplicados-en-Alimentos-2da-ed.pdf

Alzate, C. (2008). Congelación y liofilización de alimentos. Gobernación de Caldas. Recuperado de: https://core.ac.uk/download/pdf/11057208.pdf

Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. Energy conversion and management, 50(7), 1834-1840. Recuperado de: https://es.scribd.com/document/328198600/Review-on-biofuel-oil-and-gas-production-processes-from-microalgae

Andrade, R., Torres, R., Montes, E., & Fernández, A. (2007). Obtención de harina a partir del cultivo de Chlorella vulgaris y su análisis proteico. Temas agrarios, 12(1). Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46775137/OBTENCIN_DE_HARINA_A_PARTIR_DEL_CULTIVO_20160625-28064-842mbp.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511800990&Signature=z9UwJMedcOrHDcVX5%2B6sRUeboSc%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DOBTENCION_DE_HARINA_A_PARTIR_DEL_CULTIVO.pdf

Avagyan, A. (2008). A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles. Clean Technologies and Environmental Policy, 10(4), 313-317. Recuperado de: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10098-008-0180-5.pdf

Barbosa G., Cánovas H. (2000). Deshidratación de alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.

Barreto, R. (2018). Evaluación de microalgas para su uso en la elaboración de piensos para acuicultura. Recuperado de: http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/7027/TFM_BARRETO%20PEREZ,%20RAUL.pdf?sequence=1

Bermúdez, L. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad

Nacional de Colombia. Recuperado de: http://www.bdigital.unal.edu.co/7825/1/299883.2012.pdf

Bermeo, L. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado (Master's thesis, Universidad de Cádiz/2011). Recuperado de: http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/342/1/T-SENESCYT-0112.pdf

Beyerinck, M. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Botanische Zeitung 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785. Recuperado de: https://img.algaebase.org/pdf/AC100CF003338161AAoHt43C4207/35049.pdf

Brennan, L., & Owende, P. (2009). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews, 14(2), 557-577. Recuperado de: https://pdfs.semanticscholar.org/ce69/980068751d551204776abaa99c5e0cf8d535.pdf*

Catalá, L. (2013). *Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas Nannochloropsis gaditana y Nannochlorpsis oculata. Recuperado de: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/36415/1/tesis_catala_esteve.pdf*

Cabrera, M. & Pulla, M. (2014). Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual (Bachelor's thesis). Recuperado de: http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/20739/1/TESIS.pdf

Chen, C., Yeh, K., Aisyah, R., Lee, D., & Chang, J. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, *102*(1), 71-81.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R., & Das, K. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresource technology, 101(9), 3097-3105.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances, 25(3), 294-306. Recuperado de: https://pdfs.semanticscholar.org/bd75/3033ff5bae79552fb5e4652f7856262c70a6.pdf

Corrales, A. (2009). Influencia de Azotobacter Chroococcum, Vermicompost y Bayfolan Forte® en el rendimiento del cultivo del tomate L. esculentum, MILL), en un suelo del municipio Amancio Rodríguez. Recuperado de: http://roa.ult.edu.cu/bitstream/123456789/892/1/Alexy%20Corrales.pdf

De Assis, F. (1998). Fundamentos de limnologia. Interciência. Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34568317/Fundamentos_de_Limnologia_-_Francisco_de_Assis_Esteves_1_.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510685819&Signature=dVozGVg6PMX7roEpPalXVEAzyl4%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DFundamentos_de_Limnologia_-_Francisco_de.pdf

Derner, R., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S., & Fett, R. (2006). Microalgae, products and applications. Ciência Rural, 36(6), 1959-1967. Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000600050

Doucha, J., & Lívanský, K. (2011). Production of high-density Chlorella culture grown in fermenters. Journal of applied phycology, 24(1), 35-43. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Jiri_Doucha/publication/226902313_Production_of_high-density_Chlorella_culture_grown_in_fermenters/links/00b495236bd3e3c71d000000.pdf

Fernández, D., Chica, C., & Parra, M. (2013). Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. *Elementos*, *3*(3). Recuperado de: https://sci-hub.tw/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001

Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 29-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. Recuperado de: https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Greenwell, H., Laurens, L., Shields, R., Lovitt, R., & Flynn, K. (2009). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. Journal of the royal society interface, 7(46), 703-726. Recuperado de: https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsif.2009.0322

Hakeem, K., Jawaid, M., & Rashid, U. (2014). Biomass and bioenergy: processing and properties. Springer. Recuperado de: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=t1hbBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=+Biomass+and+bioenergy:+processing+and+properties.+Springer&ots=mFnK3hCpNg&sig=os5fz1M5O1TROXRbJBAMmoxlqgM#v=onepage&q=Biomass%20and%20bioenergy%3A%20processing%20and%20properties.%20Springer&f=false

Heidelmann, G., Giese, E., & Egler, S. (2017). Uso de biomassa de microalgas para biossorção de elementos terras-raras. Recuperado de:

http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/2008/1/Gisele%20Petronilho%20Heidelmann.pdf

Heidelmann, G., Roldão, T., Egler, S., Nascimento, M., & Giese, E. (2017). Uso de biomassa de microalga para biossorção de lantanídeos. HOLOS, 6, 170-179. Recuperado de: https://www.redalyc.org/pdf/4815/481554851019.pdf

Hernández, A. (2002). Investigando con la realidad en psicosociología del deporte: El Uso de Diseños Cuasi-experimentales. Recuperado de: https://www.efdeportes.com/efd46/invest.htm.

Hernández, L. (2009). Efectividad de la ultracongelación para el control de la melanosis en cola de langosta Panulirus argus. La Habana, Cuba. Recuperado de: https://www.academia.edu/6682481/Efectividad_de_la_ultracongelaci%C3%B3n_para_el_control_de_la_melanosis_en_cola_de_langosta_Panulirus_argus._Selecci%C3%B3n_de_tesinas_en_opci%C3%B3n_al_t%C3%ADtulo_Lic._en_Ciencias_Alimentarias

Ho, S., Chen, C., Lee, D., & Chang, J. (2011). Perspectives on microalgal CO2-emission mitigation systems—a review. *Biotechnology advances*, *29*(2), 189-198. Recuperado de: https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001

Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. (1995). Algae: an introduction to phycology. Cambridge university press. 623 pp

Huss, V., Frank, C., Hartmann, E., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. & Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus Chlorella sensu lato (Chlorophyta). Journal of Phycology, 35(3), 587-598. Recuperado de: http://www.bashanfoundation.org/huss/hussphylogenia.pdf

Knauer, J., & Southgate, P. (1996). Nutritional value of a spray-dried freshwater alga, Spongiococcum excentricum, for Pacific oyster (Crassostrea gigas) spat. Aquaculture, 146(1), 135-146.

Kim, M., Park, J., Park, C., Kim, S., Jeune, K., Chang, M., & Acreman, J. (2007). Enhanced production of Scenedesmus spp.(green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresource technology, 98(11), 2220-2228. Recuperado de: https://pdfs.semanticscholar.org/6a39/b5666f4166c7b9c9d6561fb8a15b31ed2d99.pdf

Lardon, L., Helias, A., Sialve, B., Steyer, J., & Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. Recuperado de: http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es900705j

Legido, J., Mourelle, L., & Gómez, C. (2015). Influencia de las microalgas en las propiedades de los peloides termales. IV CIBAP BOÍ 2015. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Maraver/publication/280039405_IV_CIBAP_BOI_2015/links/55a4f44c08ae00cf99c9365e/IV-CIBAP-BOI-2015.pdf#page=221

Lourenço S. (2006). Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações (Vol. 606). São Carlos: RiMa.

Makareviciene, V., Skorupskaite, V., & Andruleviciute, V. (2013). Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 12(2), 119-130.

Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and sustainable energy reviews, 14(1), 217-232. Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/42793628/MataMartinsCaetano_MicroalgaeForBiodieselProductionOtherApplications_Review.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511219776&Signature=DQk6%2FNLKcknMboMfwnhHUM1AtbU%3D&response-content-

disposition=inline%3B%20filename%3DMicroalgae_for_biodiesel_production_and.pdf

Medina, A., Grima, E., Giménez, A., & González, M. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. Biotechnology Advances, 16(3), 517–580. Recuperado de: sci-hub.tw/10.1016/S0734-9750(97)00083-9

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable energy, 34(1), 1-5. Recuperado de: http://124.16.151.184/bitstream/337004/442

Mitra, D., van Leeuwen, J., & Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-products. Algal Research, 1(1), 40-48.

Molina, E., Acien, F., Garcia F., & Yusuf C. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. Journal of biotechnology, 70(1), 231-247. Recuperado de: http://tur-www1.massey.ac.nz/~ychisti/Asterio.pdf

Morris, H & Moran, L. (2002). Determinación del contenido de triptófano en suplementos nutricionales de microalgas mediante espectrofotometría derivativa. Revista Cubana de Química. 16 (1): 65-70.

Morris, H., Quintana, M., Almares, A., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de la Chlorella vulgaris. Rev. Cub. Alim. Nutr, 13, 123-128. Recuperado de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.pdf

Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T. & Shoyama, Y. (1996). A water-soluble antitumor glycoprotein from Chlorella vulgaris. Planta medica, 62(05), 423-426.

Obeid, S., Beaufils, N., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P.-Y. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris. Algal Research, 34, 49–56. Recuprada de: https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.003

Orrego, C. (2008). Congelación y liofilización de alimentos. Gobernación de Caldas. Recuperado de: https://core.ac.uk/download/pdf/11057208.pdf

Pacheco, F. (2013). Efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento em biomassa de Tetrastrum heteracanthum (NORDSTEDT) CHODAT como subsídio para a produção de biodiesel. Tesis licenciatura, Faculdade Católica do Espírito Santo, Espírito Santo - Brasil. Recuperado de: http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/12938/1/T-ESPE-053816.pdf

Packer, M. (2009). Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. Energy Policy, 37(9), 3428-3437. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Michael_Packer/publication/223518750_Algal_Capture_of_Carbon_Dioxide_Biomass_Generation_as_a_Tool_for_Greenhouse_Gas_Mitigation_with_Reference_to_New_Zealand_Energy_Strategy_and_Policy/links/5732792408aea45ee8364540.pdf

Palomino, A., Estrada, C., & Lopez, J. (2010). Microalgas: potencial para la produccion de biodiesel. In Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. Inclusão social e energia: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. Recuperado de: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/855024/1/BID07.pdf

Parra, J. (2013). Determinación de la cinética de liofilización en floretes de brócoli (Brassica oleracea L, var. Legacy) y evaluación del contenido de ácido L-ascórbico (L-AA) y actividad peroxidasa (POD). Recuperado de: https://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1530/1/TESIS%20CINETICA%20DE%20LIOFILIZACION%20Y%20L-AA%20Y%20POD.pdf

Perez-Garcia, O., Escalante, F., de-Bashan, L. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water research, 45(1), 11-36. Recuperado de: http://bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/heterotrophicmetabol.pdf

Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—a process view. Journal of biotechnology, 142(1), 64-69.Montero-Sánchez, Y., Gallo, A., Gómez, L. M., Álvarez, I., Sabina, L. C., Támbara, Y., ... & Ramírez, L. R. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. Investigación y Saberes, 1(2), 37-43.

Rawat, I., Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Applied Energy, 88(10), 3411-3424 recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46266101/j.apenergy.2010.11.02520160605-21173-5vdrrz.pliofilizacidf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511475648&Signature=lEvbDvzMVJSqyaoe%2Fb59ddi%2FuOg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DDual_role_of_microalgae_Phycoremediation.pdf

Ramírez, J. (2006). Liofilización de alimentos. Revista ReCiTeIA. Recuperado de: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hNCkTLfmPl4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Liofilizaci%C3%B3n+de+alimentos.+Revista+ReCi

TeIA&ots=pnUc2AyfJa&sig=LkEx7m4fTjpe2VrL2VP0WSxJgbw#v=onepage&q=Liofilizaci%C3%B3n%20de%20alimentos.%20Revista%20ReCiTeIA&f=false

Reynolds, C. (2006). The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press. Recuperado de: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=gDz5jGsPWZYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+ecology+of+phytoplankton+reynolds&ots=tTAO2bnElP&sig=96MITCjiRxu9nMu5yCsiBt6l1Es

Robles, L., & Granados, C. (20014) Determinación de los parámetros de citotoxicidad y capacidad antioxidante de biomasa purificada de la microalga Porphyridium cruentum. Recuperado de: http://www.laccei.org/LACCEI2014-Guayaquil/RefereedPapers/RP278.pdf

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and bioengineering, 102(1), 100-112. Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50245285/Microalgae_for_oil_Strain_selection_indu20161110-11940-1bpwlgy.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511244541&Signature=spf46jRI2bCVCrzhmeiL8mb5S7E%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DMicroalgae_for_oil_Strain_selection_indu.pdf

Sydney, E., Sturm, W., de Carvalho, J., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., & Soccol, C. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource technology, 101(15), 5892-5896. Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46196246/Potential_carbon_dioxide_fixation_by_ind20160603-26206-1v066xc.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expi

res=1511229735&Signature=%2BxpfSdkHW7d772fLEDQVfJ35EK4%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DPotential_carbon_dioxide_fixation_by_ind.pdf

Uribe, E. (1994). “Cultivo de peces marinos” - Cultivo de Microalgas, material docente. Departamento de Acuicultura. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Coquimbo. Chile: 50-73.Muller-Feuga, A., Moal, J. & Kaas, R. 2003 The aquaculture of microalgae. In Live feeds in marine aquaculture (eds. L. A. McEvoy & J. G. Stottrup), pp. 206 –252. London, UK: Wiley-Blackwell.

Vyas, A., Verma, J., & Subrahmanyam, N. (2010). A review on FAME production processes. Fuel, 89(1), 1-9. Recuperado de: https://es.scribd.com/document/337665775/A-Review-on-FAME-Production-Processes

Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. (2008). CO2 bio-mitigation using microalgae. Applied microbiology and biotechnology, 79(5), 707-718.

Xue, F., Zhang, X., Luo, H., & Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochemistry, 41(7), 1699-1702.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. Ecological Engineering, 36(4), 379-381.

Xin, L., Hong-Ying, H., & Jia, Y. (2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, Scenedesmus sp. LX1, growing in secondary effluent. New biotechnology, 27(1), 59-63.

Yánez, P. (2016). Caracterización y análisis del ciclo de vida de biodiesel, producido a partir del cultivo mixto de microalgas durante el tratamiento de aguas negras y grises (Master's thesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Maestría en Energías Renovables.). recuperad de: http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/12938/1/T-ESPE-053816.pdf

Ynga, G. (2011). Cultivo masivo de microalgas en Biorreactores verticales. Recuperado de: http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/bitstream/handle/123456789/2110/Ynga%20Huam%C3%A1n,%20G..pdf?sequence=1

Yuan-Kun, L. & Hui, S. (2004). Basic culturing techniques. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 40.Zamalloa, C., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). Anaerobic digestibility of Scenedesmus obliquus and Phaeodactylum tricornutum under mesophilic and thermophilic conditions. Applied Energy, 92, 733-738.

ANEXOS

ANEXO N° 01:

MATRIZ DE CONSISTENCIA

<table>
<tr><th>PROBLEMA</th><th>HIPOTÉSIS</th><th>OBJETIVO</th><th>VARIABLES</th><th>INDICADORES</th><th>MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA PRESENTACIÓN DE DATOS</th></tr>
<tr><td rowspan="5">¿Cuál es el efecto de la presión y tiempo sobre la obtención de biomasa seca de Chlorella vulgaris?</td><td rowspan="5">Ho = La presión y el tiempo no afectan significativamente en la obtención de biomasa seca de Chlorella vulgaris.

Hi = La presión y el tiempo afectan significativamente en la obtención de biomasa seca de Chlorella vulgaris.</td><td>GENERAL</td><td>DEPENDIENTE</td><td>DEPENDIENTE</td><td rowspan="5">Los datos obtenidos fueron primero registrados en hojas de cálculo de Excel, para evaluar la cantidad de harina de Chlorella vulgaris después de la liofilización. Así mismo se evaluó la perdida de humedad de las muestras de biomasa seca (%Humedad) y el porcentaje de la cantidad total de la biomasa seca.

La Biomasa Húmeda obtenida fue liofilizada en tres repeticiones por tratamiento y con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor al 95% de confianza, y si el análisis lo requiere se realiza la prueba de Tukey para seleccionar el mejor tratamiento.</td></tr>
<tr><td>Evaluar el efecto de la presión y el tiempo sobre la obtención de biomasa seca de microalga Chlorella vulgaris</td><td>Biomasa seca de Chlorella vulgaris.</td><td>Gramos
% de humedad perdido</td></tr>
<tr><td>ESPECÍFICO</td><td>INDEPENDIENTE</td><td>INDEPENDIENTE</td></tr>
<tr><td>1. Establecer una presión constante para liofilizar microalga Chlorella vulgaris

2. Establecer tres tiempos de liofilización adecuado para liofilizar microalga Chlorella vulgaris.

3. Evaluar el efecto de tiempo y una presión constante en la obtención de mayor cantidad de biomasa seca de microalga Chlorella vulgaris.

4. Evaluar el efecto de tiempo y una presión constante para la mayor pérdida de humedad en la obtención de biomasa seca de microalga Chlorella vulgaris</td><td>Presión y tiempo.</td><td>MBar y horas.</td></tr>
</table>

Fuente: Elaboración propia (2019)

ANEXO N° 02:

TABLA DE COMPOSICIÓN DE MEDIO GUILLARD

MEDIO F/2 MODIFICADO (GUILLARD 1975)

Macronutrientes	g/L
KNO_3	75.00
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	5.65
Micronutrientes	**g/L**
EDTA Na_2	4.360
$FeCl_3 . 6 H_2O$	3.150
$CuSO_4 . 5 H_2O$	0.010
$ZnSO_4 . 7 H_2O$	0.022
$CoCl_2 . 6 H_2O$	0.010
$MnCl_2 . 4 H_2O$	0.180
$Na_2MoO_4 . 2 H_2O$	0.006
Vitaminas	**g/L**
Cyanocobalamina	0.002
Tamina HCl	0.100
Biotina	0.001
Reactivo 4	**mL/L**
$Na_2SiO_3 . 5 H_2O$	10.00
H_3ClO_4	5.00
ajustar a pH 8.0 con 1 M Na OH or HCl	
Preparación del Medio	**En 1 Litro**
Reactivo 1	1.00 mL
Reactivo 2	1.00 mL
Reactivo 3	1.00 mL

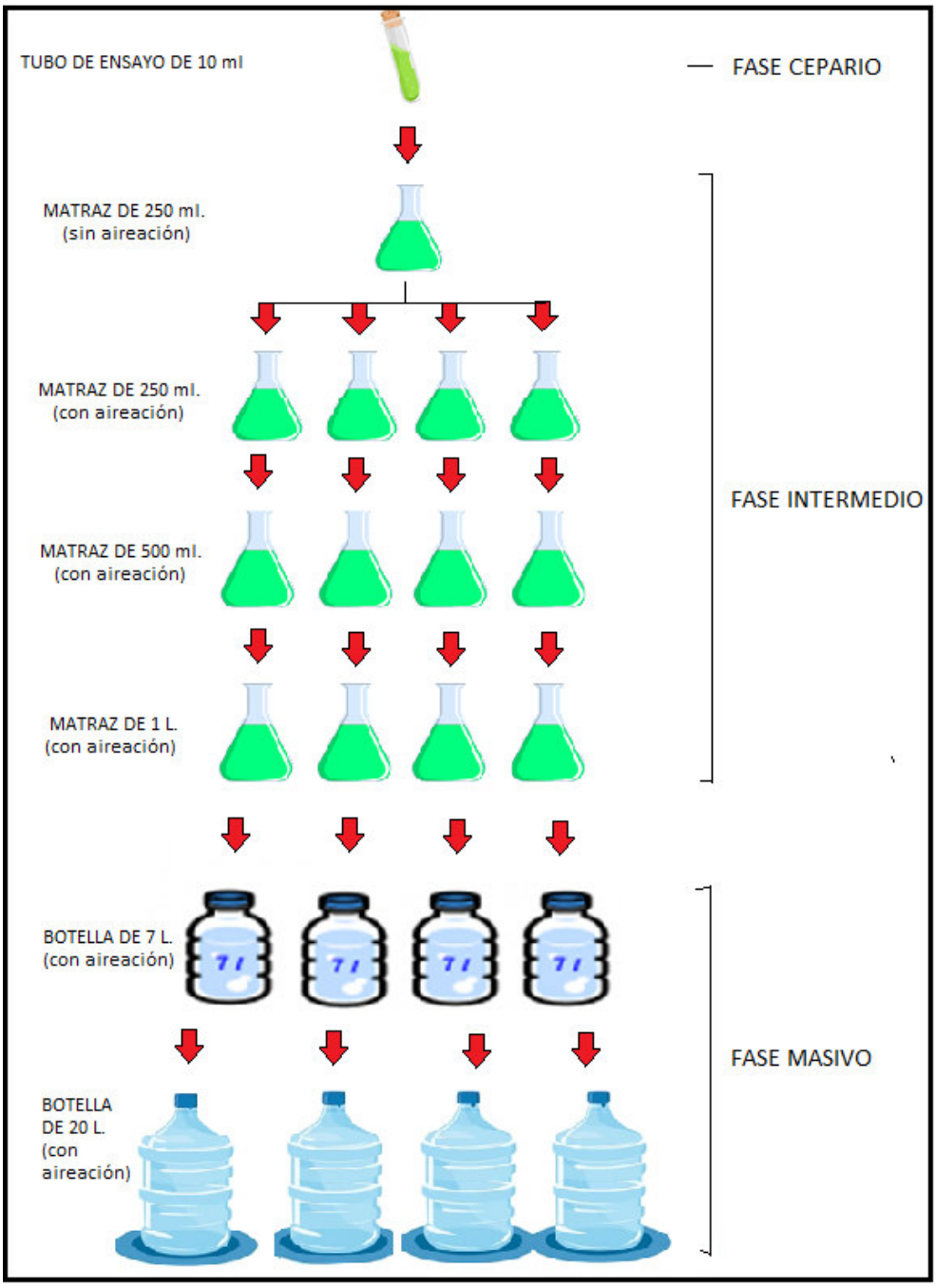
Fuente: Aguilar, Chang, Ynga, Oscanoa & Flores (2011)

Procedimiento de preparación:

1. Trabajar en condiciones asépticas para evitar la contaminación del medio Guillar F/2.
2. Usar una balanza analítica de error 1.0 mg, asegurarse que la balanza este tarada correctamente.
3. Usar láminas de aluminio para pesar los insumos.
4. Pesar los insumos a medida que se va preparando el medio Guillard F/2.
5. Adicionar los insumos poco a poco en la botella que contiene el agua destilada estéril, y agitar hasta notar su dilución completa. Para el reactivo 3 (vitaminas) colocar en una botella de vidrio color ámbar.
6. Tapar herméticamente los envases y almacenarlos en refrigeración.

ANEXO N° 03:

ESCALAMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS

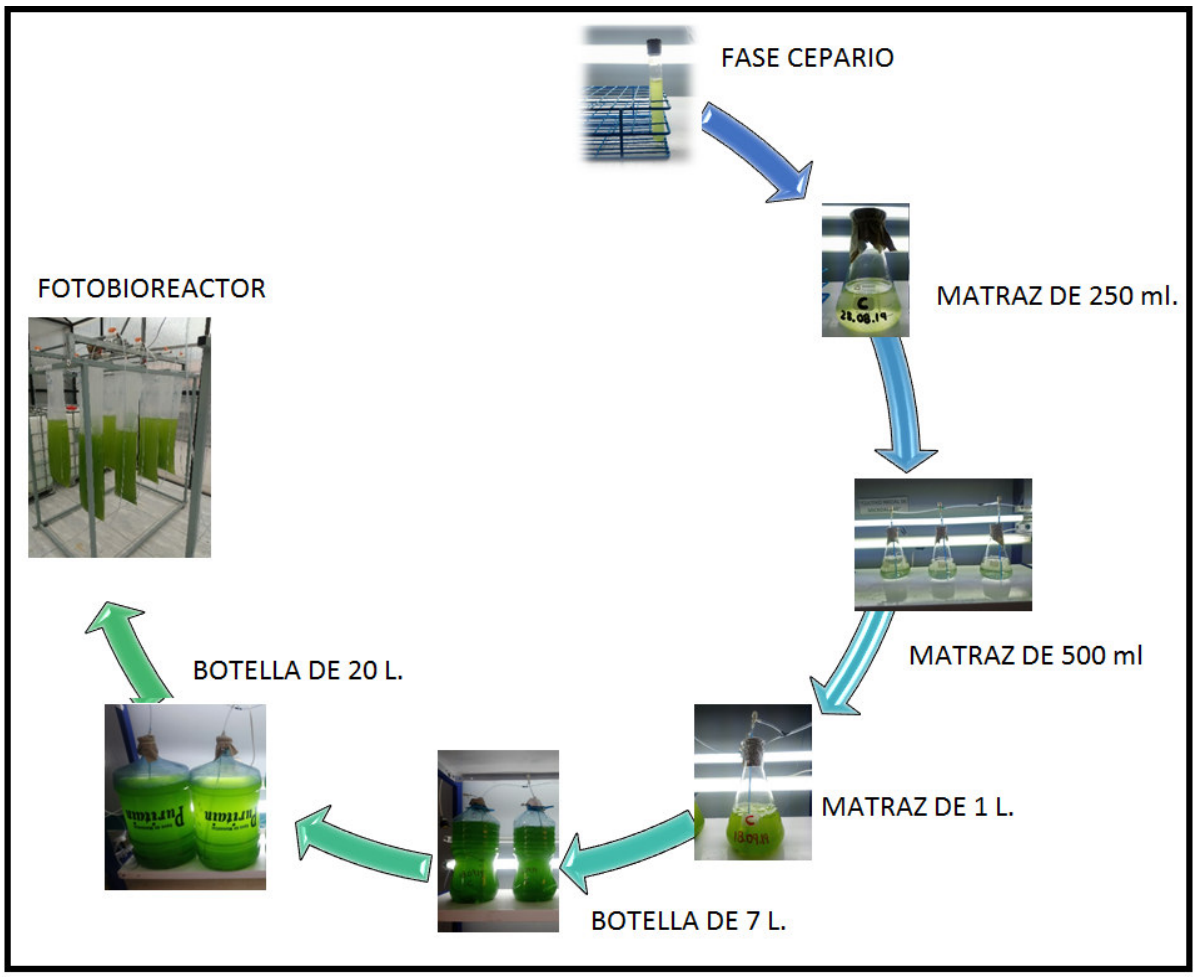


Para la fase masivo, después de las botellas de 20 Litros el cultivo es transferido a fotobioreactores.

Fuente: Elaboración Propia (2019)

ANEXO N° 04:

METODOLOGÍA DE CULTIVO DE MICROALGAS



Fuente: Elaboracón Propia (2019)

ANEXO N° 05:

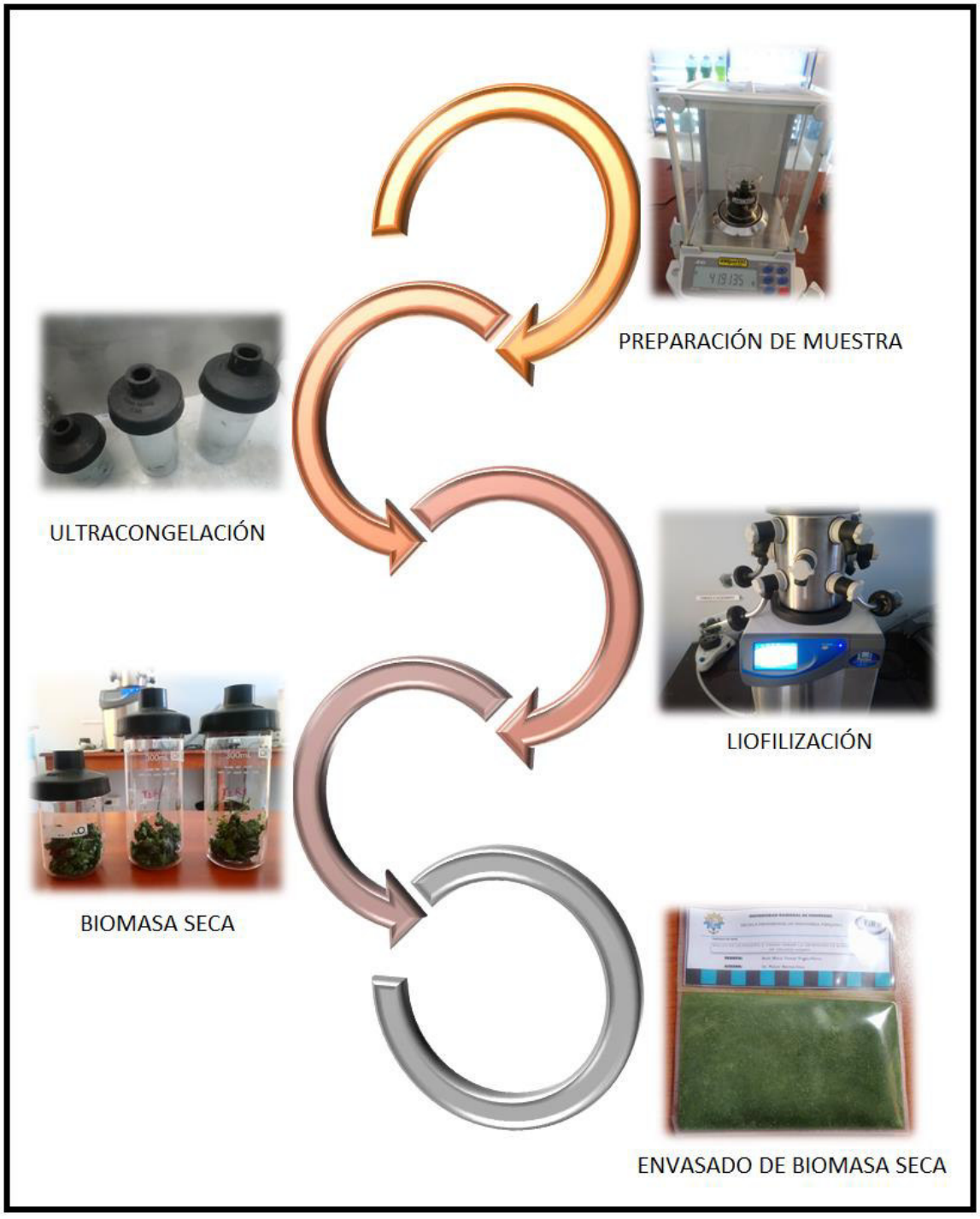
METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE BIOMASA HÚMEDA



Fuente: Elaboración Propia (2019)

ANEXO N° 06:

METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA



Fuente: Elaboración Propia (2019)