

*UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA*



***PRODUCCION DE ACEITE PARA USOS INDUSTRIALES A
PARTIR DE LA MICROALGA "Scenedesmus Obliquus"***

PRESENTADO POR:

RAÚL ERNESTO OLIVARES

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

CIUDAD UNIVERSITARIA, ENERO DE 2010

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR :

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL :

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO :

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIO :

ING. OSCAR EDUARDO MARROQUÍN HERNÁNDEZ

ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA

DIRECTOR :

ING. FERNANDO TEODORO RAMIREZ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA

Trabajo de Graduación previo a la opción al Grado de:

INGENIERO QUÍMICO

Título :

**PRODUCCION DE ACEITE PARA USOS INDUSTRIALES A PARTIR
DE LA MICROALGA “*Scenedesmus Obliquus*”**

Presentado por

RAÚL ERNESTO OLIVARES

Trabajo de Graduación Aprobado por :

Docentes Directoras :

MSc. TANIA TORRES RIVERA

MSc. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

San Salvador, Enero de 2010

Trabajo de graduación Aprobado por:

Docentes Directoras:

MSc. TANIA TORRES RIVERA

MSc. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios**, en primer lugar, porque sin su misericordia el feliz término del presente trabajo no habría sido posible, ha guiado paso a paso durante todo el proceso, permitiendo la conclusión satisfactoria del mismo.

Agradezco además, a todos los miembros de mi familia, que mostraron su apoyo en todo momento, especialmente en aquellos más complicados.

A todos los profesores con los que hemos compartido tiempo y conocimientos a lo largo de la carrera, en especial a las Inga. Tania Torres e Inga. Delmy Rico, por ser mis asesoras y haber aguantado mis escapadas de clases en los años de estudio.

Finalmente, a los amigos de reír y llorar, que aún hoy en día están ahí.

RESUMEN

En esta investigación se presenta una opción que poco a poco va tomando fuerza a nivel mundial y que puede representar una respuesta más adecuada a la demanda de aceites para diversos usos a través del cultivo de microalgas. En este caso específico se enfoca el estudio a la especie *Scenedesmus obliquus*.

Se exploró la posibilidad de obtener aceite a partir de una microalga de agua dulce *Scenedesmus obliquus* traída desde las costas de México, la cual tiene la cualidad de acumular grandes cantidades de lípidos en su interior y proviene de una región con condiciones ambientales parecidas a las existentes en El Salvador.

Se cultivo la microalga durante varios ciclos de vida, alimentada con medio F de Guillard, posteriormente se extrajo la biomasa utilizando un floculante comercial y una bomba mecánica.

Después de secar la biomasa de microalgas, se procedió a exprimirlas haciendo uso de una prensa de ochenta toneladas y al aceite crudo obtenido, se le realizaron distintos análisis para caracterizarlo adecuadamente, y en base a los resultados presentados en la sección respectiva, recomendar los usos industriales, haciendo énfasis en el área de biocombustibles y alimentación humana.

A partir de esta experiencia se presenta un método sistemático de cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* de la cual, cada 36 horas, se dispuso de un lote de biomasa lista para pasar a la fase de extracción, la que se realiza a través del uso de una prensa extrusora, obteniéndose un rendimiento de extracción de 25.34 Lt de aceite crudo/m².año.

Se presenta además, la caracterización fisicoquímica de los lípidos obtenidos, y en base parámetros como el número ácido (1.367), densidad (0.9228 g/ml), contenido de ácidos grasos (68.72%), es posible recomendar el aceite de microalgas para su uso en biocombustibles (para recomendarlo como alimento es necesario realizar análisis extras), tomando en cuenta que los valores reportados se encuentran en el rango normal de los aceites vegetales utilizados para tal fin.

INDICE

1.0 LAS MICROALGAS	3
1.1 PANORAMA HISTORICO MUNDIAL DEL CULTIVO DE MICROALGAS	4
1.2 PANORAMA A NIVEL REGIONAL DEL CULTIVO DE MICROALGAS.....	6
1.3 PANORAMA A NIVEL NACIONAL DE USO DE MICROALGAS.....	8
2.0 LA MICROALGA <i>Scenedesmus obliquus</i>	9
2.1 CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGIA DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	9
2.2 CICLO CELULAR DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	11
2.3 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA.....	13
2.4 MEDIOS DE CULTIVO	16
2.5 REQUERIMIENTOS ESPECÍFICOS DE LOS CULTIVOS.....	18
3.0 BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE <i>Scenedesmus obliquus</i>	26
3.1 SISTEMAS DE CULTIVO	26
3.2 ESCALADO DE CULTIVOS DE MICROALGAS.....	31
3.3 METODOS DE EXTRACCION DEL ACEITE DE MICROALGAS.....	35
3.4 COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE MICROALGAS.....	39
4.0 USOS INDUSTRIALES DEL ACEITE EXTRAIDO A PARTIR DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus obliquus</i>	42
4.1 ACEITES VEGETALES	42
4.2 USOS DE LOS ACEITES VEGETALES	44

5.0 PRODUCCIÓN DE ACEITE A PARTIR DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus</i>	
<i>obliquus</i>	46
5.1 ELECCION Y OBTENCION DE LA CEPA.....	46
5.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	49
5.3 SIEMBRA DE CEPAS Y ESCALAMIENTO DE CULTIVOS.....	51
5.4 COSECHA DE MICROALGAS.....	59
5.5 EXTRACCION DE LÍPIDOS.....	65
6.0 CARACTERIZACION DEL ACEITE OBTENIDO A PARTIR DE LA MICROALGA	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	74
6.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL ACEITE.....	74
6.2 CONTENIDO DE HUMEDAD DEL ACEITE CRUDO DE MICROALGAS.....	75
6.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENID DE SOLIDOS.....	76
6.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES.....	78
6.5 ANALISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS.....	80
7.0 USOS INDUSTRIALES RECOMENDADOS PARA EL ACEITE DE	
MICROALGAS.....	82
7.1 UTILIZACION DE ACEITE PARA ALIMENTACION HUMANA.....	82
7.2 UTILIZACION DEL ACEITE PARA BIOCOMBUSTIBLES.....	83
OBSERVACIONES.....	86
CONCLUSIONES.....	88
RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS.....	92
ANEXO A: CLASIFICACION DE LAS MICROALGAS	93

ANEXO B: PROYECCIONES SOBRE LA PRODUCCION DE ACEITE	99
ANEXO C: FICHA TECNICA DE <i>Scenedesmus obliquus</i>	102
ANEXO D: EXTRACTO DEL CODEX ALIMENTARIUS.....	103
ANEXO E: CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Scenedesmus obliquus</i>	104

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
Figura 2.1: Ciclo celular de <i>Scenedesmus obliquus</i>	12
Figura 2.2: Cistos de <i>Scenedesmus</i>	13
Figura 3.1: Prensa de tornillo sin fin.....	36
Figura 3.2: Extracción de arrastre con vapor.....	39
Figura 5.1: Piscina de acondicionamiento de agua.....	52
Figura 5.2: Stock de cepas de microalgas <i>Scenedesmus Obliquus</i>	54
Figura 5.3: Cultivos de microalgas <i>Scenedesmus Obliquus</i>	55
Figura 5.4: Cultivos medios de microalgas <i>Scenedesmus Obliquus</i>	57
Figura 5.5: Tanques de 1,200 litros luego de 36 horas.....	58
Figura 5.6: Efecto floculante del sulfato de aluminio en la microalgas.....	60
Figura 5.7: Solución extremadamente concentrada de microalgas del fondo del Tanque tres horas después de agregar el floculante.....	61
Figura 5.8: Piscina improvisada para el secado de la biomasa algal.....	62
Figura 5.9: Medición de la productividad de biomasa algal.....	63
Figura 5.10: Muestra de biomasa para extracción	66
Figura 5.11: Limpieza de la celda de extracción de lípidos.....	66
Figura 5.12: Torno utilizado para el lijado de la camisa del pistón.....	67
Figura 5.13: Partes de la celda de extracción de aceite de microalgas.....	67
Figura 5.14: Agujeros de la camisa del pistón.....	68
Figura 5.15: Equipo de prensado de microalgas.....	68
Figura 5.16: Prensado de microalgas en acción.....	69

Figura 5.17: Lípidos obtenidos luego de la extracción.....	69
Figura 5.18: Aceite crudo de microalgas.....	70
Figura 5.19: Beaker conteniendo el aceite extraído de la muestra de microalgas.....	70
Figura 5.20: Restos de microalgas calcinadas.....	71
Figura 6.1: Aceite crudo de microalgas sometido a fuerzas centrifugas.....	76
Figura 6.2: Determinación de los ácidos grasos libres del aceite de microalgas.....	80
Figura E.1: Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i>	105

INDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PAGINA
Cuadro 2.1: <i>Composición de Scenedesmus obliquus</i>	24
Cuadro 3.1: Comparación de la composición de los distintos tipos de aceites.....	40
Cuadro 3.2: Comparación de la productividad de distintas especies oleaginosas.....	41
Cuadro 5.1: Contenido de lípidos en las microalgas comúnmente utilizadas.....	48
Cuadro 5.2: Composición proximal de la microalgas <i>Scenedesmus Obliquus</i>	49
Cuadro 5.3: Soluciones de nutrientes mayores para el cultivo de <i>Scenedesmus Obliquus</i>	50
Cuadro 5.4: Condiciones recomendadas para el mantenimiento de los cultivos de microalgas.....	51
Cuadro 5.5: Medición de la productividad de biomasa microalgal.....	64
Cuadro 5.6. Medición de la humedad de la biomasa que se utilizara en la extracción de lípidos.....	64
Cuadro 5.7: Parámetros de las muestras de biomasa utilizadas para las extracciones	72
Cuadro 5.8: Datos recolectados luego de la extracción de aceite.....	73
Cuadro 5.9: Reporte final de datos de la extracción de aceite.....	73
Cuadro 6.1: Reporte final de la determinación de la densidad de aceite.....	75
Cuadro 6.2: Valor reportado de la humedad del aceite de microalgas.....	76
Cuadro 6.3: Contenido de sólidos del aceite crudo de microalgas.....	77
Cuadro 6.4: Determinación de los ácidos grasos libres del aceite crudo de microalgas.....	79
Cuadro 6.5: Propiedades físico-químicas del aceite crudo de microalgas.....	80

Cuadro 7.1: Cuadro comparativo de propiedades del aceite de microalgas.....	83
Cuadro 7.2. Rendimiento de diversos aceites vrs numero ácido.....	84
Cuadro 7.3. Comparación de propiedades fisicoquímicas del aceite crudo.....	85

INTRODUCCION

Históricamente los aceites vegetales han jugado un importantísimo papel en el desarrollo de la humanidad, debido a los diversos usos que se le han atribuido, que van desde medicinales como el aceite de oliva en el oriente medio, sus reconocidos usos alimenticios y en los últimos tiempos como materia prima para biocombustibles líquidos.

Es precisamente ésta última aplicación que ha venido a complicar el panorama mundial de la producción de aceite, puesto que compiten con su uso para alimentación humana y de ganado.

Por ésta razón, se han buscado fuentes alternativas a los aceites vírgenes vegetales tradicionales para utilizarlas como materia prima para biocombustibles, entre éstas se tienen grasas animales y vegetales de desperdicio, cultivos no tradicionales como *Jatropha Curcas* (tempate), *Elaeis guineensis* (palma africana), entre otros. .

Sin embargo, éstas fuentes alternativas se encuentran en fase de implantación en la mayoría de países, y la siembra de cultivos no tradicionales presenta las mismas dificultades que los tradicionales: escasez de tierras, como en el caso de El Salvador.

La presente investigación responde a las necesidades de alternativas a las fuentes tradicionales de aceite vegetal para usos industriales, puesto que en los últimos años, ha existido un pronunciado descenso de la disponibilidad de éstos, así como de superficies adecuadas para el cultivo de las especies vegetales productoras.

Los altos precios de los combustibles y el uso de aceite para la producción de biodiesel, el cual es uno de los biocombustibles de mayor uso a nivel mundial, ha disparado la demanda de oleaginosas hasta niveles insospechados, los cuales han obligado a desplazar cultivos alimenticios para satisfacer las demandas energéticas de la creciente población (FAO, 2009).

Por todo lo anterior, la extracción de aceite de microalgas es una alternativa que puede ser viable en El Salvador y que no compite por recursos tales como extensiones de tierra con las fuentes tradicionales de aceite para uso alimenticio, además de contribuir a la disminución de los niveles de CO₂ en la atmosfera.

OBJETIVOS

El objetivo principal de ésta investigación es la extracción experimental de aceite a partir de microalgas de rápido crecimiento de la especie *Scenedesmus obliquus* y enmarca sus posibles usos a nivel industrial.

Los objetivos específicos comprenden en primer lugar la reproducción a escala de laboratorio y a escala de planta piloto de la microalga *Scenedesmus obliquus*, finalizando con la investigación de la composición química del extracto oleaginoso obtenido a partir del prensado de la misma.

ALCANCES

Se llevará a cabo la reproducción la reproducción de la microalga *Scenedesmus obliquus* a partir de una cepa traída desde la costa Atlántica de México, logrando durante el proceso elaborar la curva de crecimiento de la microalga en un ciclo de vida.

En base a ésta experiencia, se establecerá un procedimiento para el cultivo y cosecha de la microalga seleccionada, mientras que de la teoría existente se obtendrá el análisis de la composición proximal y el análisis de micronutrientes de las microalgas utilizadas, poniendo en práctica un método adecuado para la extracción de los lípidos presentes en la biomasa de *Scenedesmus obliquus*.

Finalmente se caracterizara el extracto oleaginoso obtenido después del proceso de extracción, y se elaborará una propuésta de los usos para el aceite obtenido de las microalgas y basados en su composición, haciendo énfasis en la producción de biocombustibles y alimentación humana.

1.0 LAS MICROALGAS - PANORAMA HISTORICO

Las **Microalgas** son los organismos autótrofos que realizan la fotosíntesis oxigénica y, con la excepción de las plantas terrestres (Embriophyta), son en general acuáticas. Se trata de un grupo polifilético o artificial (no es un grupo de parentesco), y no tiene por lo tanto ya uso en la clasificación científica moderna, aunque sigue teniendo utilidad en la descripción de los ecosistemas acuáticos.

El estudio científico de las algas se llama **Ficología**. Se usa también pero menos **Algología**, un término ilegítimamente construido con una raíz latina (*alga*) y otra griega (*logos*); se presta además a confusión con la ciencia homónima del dolor, que es una especialidad médica.

Muchas “algas” son unicelulares microscópicas (protofitas), otras son coloniales y algunas han desarrollado anatomías complejas, incluso con tejidos diferenciados, como ocurre en las algas pardas. Las más grandes, miembros del grupo anterior, forman cuerpos laminares de decenas de metros de longitud (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

Las microalgas son organismos con estructura eucariota, fotoautótrofos, capaces de transformar la luz solar en energía química mediante fotosíntesis oxigénica con una elevada eficiencia y además capaces de asimilar carbono en forma de CO₂. Presentan altas tasas de producción, adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y están presentes en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura (Sánchez Varo, 1996)

La función ecológica más conocida de las algas es la producción primaria, son los principales productores de materia orgánica a partir de la inorgánica en el agua, de ésta manera la materia orgánica ingresa a las cadenas tróficas. Este paso puede producirse por el consumo de algas, la absorción de nutrientes disueltos de origen vegetal por otros organismos, o por la descomposición de éstas. Hay algas en todos los ambientes acuáticos donde existe luz, unas veces en el plancton otras en el bentos, pero algunas se

encuentran en ambientes terrestres húmedos, como es el caso del verdín que crece en muros y cortezas.

Son notables las algas que forman asociaciones simbióticas con organismos heterótrofos. Éste es el caso de las que forman líquenes en asociación con hongos. También de los simbioses unicelulares que se encuentran en muchos animales marinos. Existen formas unicelulares hipertérmofilas, creciendo en fuentes termales, entre las algas rojas. Son de gran interés biológico, porque ésta condición es única entre los organismos eucariontes. Algunas algas eucariontes unicelulares protagonizan a veces mareas tóxicas.

Las algas pueden ser utilizadas para producir biocombustibles (bioetanol, biobutanol y biodiesel) además como alimento en algunas partes del mundo.

Las **microalgas** son protistas fotosintéticos. En general son los más eficientes conversores de energía solar debido a su sencilla estructura celular. Además al estar suspendidas en agua, tienen un mejor acceso al CO₂ y otros nutrientes. Se encuentran ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones.

Las microalgas y cianobacterias cultivadas comercialmente son: *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Scenedesmus*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Skeletonema*, *Isochrysis* y *Chaetoceros*.

Entre los compuestos de más interés estudiados destacan los carotenoides, ficobiliproteínas, lípidos y polisacáridos y compuestos con actividad biológica provenientes de las microalgas más consideradas tales como *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Spirulina* y *Porphyridium*. (Sánchez Varo, 1996)

1.1 PANORAMA HISTORICO MUNDIAL DEL CULTIVO DE MICROALGAS

El cultivo de microalgas y el uso práctico de su biomasa como fuente de algunos compuestos tiene su origen en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial. La industria de las microalgas comenzó en los años 60 con el desarrollo de los procesos de *Chlorella*, siguiendo en los años 70 con *Spirulina* (una cianobacteria) y en los años 80 con *Dunaliella salina*. En las últimas décadas ha ocurrido un extraordinario avance en la investigación básica sobre la producción y utilización de algas pero el escepticismo ante la utilización de fuentes de proteínas distintas a las convencionales, el alto coste de producción del cultivo

de algas y los criterios de salubridad han dificultado su implantación como complemento alimenticio en la nutrición humana, por lo que las investigaciones se han dirigido a la utilización de la biomasa de microalgas para otras aplicaciones como pienso para animales, biofertilizantes, piensos para acuicultura, etc, además de ayudar a solventar problemas de salud pública mediante la purificación biológica de aguas residuales (Sánchez Varo, 1996).

En los años 90, el departamento de energía de los Estados Unidos realizó un estudio sobre la factibilidad del uso de distintas especies de microalgas para la producción de biodiesel, dejándose a un lado debido a los bajos costos del petróleo.

Otras iniciativas privadas surgieron en Europa, principalmente en Holanda y España, llegando a comercializar con éxito tanto aceite como biomasa de microalgas, además de vender la tecnología de cultivo a diversas empresas (Sánchez Varo, 1996).

Los estudios más recientes han demostrado la potencialidad de las algas para producir una amplia gama de compuestos polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, esteroides, enzimas, antibióticos, productos químicos y farmacéuticos, biocombustibles (metano, etanol), etc. La mayor parte de la biomasa de estas algas se comercializa como alimentos medicinales, también algunas algas y sus extractos, se incluyen como suplemento en algunas pastas, vino, refrescos, cereales y cosméticos. Se usan en sistemas de tratamiento de aguas pudiendo retirar metales pesados, macronutrientes, etc del medio acuático. Las microalgas a su vez son esenciales en acuicultura para el cultivo integral de moluscos y de Estados larvarios de algunos crustáceos y peces. Se usan también para el cultivo de especies intermedias (rotíferos, artemia y copépodos), formando parte de la cadena alimentaria que tiene lugar en cualquier criadero convencional. Parte de la producción se emplea asimismo en la alimentación de peces tropicales y en avicultura para incrementar la pigmentación. Aunque teóricamente existen alternativas como microcápsulas, piensos a base de proteína vegetal o animal, etc, la utilización de ciertas microalgas o de sus derivados (pigmentos carotenoides añadidos a los piensos) para aumentar la calidad comercial (color, sabor) de algunos productos acuícolas (salmónidos y langostinos) se encuentra en expansión. Con los métodos convencionales de cultivo de microalgas se puede producir fitoplancton de una especie determinada (cultivos monoalgales) o bien de unas mezclas de especies (cultivos mixtos), conocidas y controladas, que ofrecen la posibilidad de un mayor control microbiológico sobre el sistema de producción. Muchos conceptos relacionados con los cultivos a gran

escala de microalgas han evolucionado como es el caso de las técnicas de ingeniería genética que permiten la manipulación de genes específicos para producir masivamente estos compuestos (Sánchez Varo, 1996).

Existen varios problemas para la implantación de éstos sistemas de producción con microalgas basados en ingeniería genética, como son la necesidad de un conocimiento profundo de la fisiología y bioquímica de las microalgas, la verificación de los resultados de laboratorio a plantas de gran superficie y capacidad que demuestren su operatividad, la escasa pero necesaria cooperación con otras disciplinas científicas como ingeniería, economía, medicina, etc, y la presencia en el mercado de productos similares obtenidos por vía sintética con menores costos (www.wikipedia.com, 2009).

1.2 PANORAMA A NIVEL REGIONAL DEL CULTIVO DE MICROALGAS

América Latina tiene ventajas en el cultivo de microalgas para la obtención de aceite, entre ellas, el suelo, el clima, la disponibilidad de tierras y los costos de mano de obra más bajos. Sin embargo, a pesar de éstas ventajas, la región a excepción de Brasil, no ha tomado suficientes medidas para explorar este potencial. Existen varios programas para la producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas en América Latina. Uno de ellos es llevado a cabo por Brasil, el cual es uno de los países líderes en el desarrollo de productos a partir de microalgas, especialmente en la rama de biocombustibles. Inicialmente los programas se basaron en la producción de biodiésel a partir de soja. En Argentina se está produciendo biodiésel a partir de la soja. El problema es que para producir este tipo de biodiésel se llevan a cabo monocultivos, los que tienen consecuencias tales como erosión, pérdida de materia orgánica, balance negativo de nutrientes, desertificación y reducción de la biodiversidad. Algunos expertos argentinos, opinan que la producción de biodiésel a partir de maíz puede no tener un buen rendimiento y por otro lado se necesita un alto costo energético para la producción de biodiésel a partir de maíz. Según el presidente del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial de Argentina) puede alterar los precios del maíz y la soja, lo que los haría menos accesibles a los consumidores. Por ésta razón existen empresas latinoamericanas que están experimentando con la producción de biodiésel a partir de algas. A continuación se presentan algunos de los avances más importantes (www.wikipedia.com, 2009).

- En Costa Rica un grupo de estudiantes universitarios presento una investigación sobre una microalga marina que es mucho más productiva para la fabricación de biodiésel que el que se produce a partir de palma africana. Se trata de una microalga marina del género chlorella, de la cual se puede obtener hasta un 168 por ciento más de aceite utilizado en la fabricación de biocombustibles, que de la palma. Según los resultados de ésta investigación una hectárea de palma produce por año 5.950 litros de aceite, mientras que de una hectárea de microalgas se puede extraer 100.000 litros en el mismo periodo (www.wikipedia.com, 2009).

- Un equipo científico chileno de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Católica de Temuco inició investigaciones y contactos con grupos empresariales para producir biodiésel a partir de microalgas mientras el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción ésta en fase de investigación de extracción de aceites de algas para la producción de biocombustibles, entre ellos biodiesel. La iniciativa que están desarrollando los investigadores cuenta con un biorreactor para producción masiva de microalgas construido especialmente para dicha labor. Ésta opción es particularmente relevante para Chile, país que no dispone de reservas estratégicas de hidrocarburos, pero sí de 5.000 kilómetros de costa frente al Océano Pacífico (www.wikipedia.com, 2009).

- En Argentina, la empresa Oilfox tiene como proyecto cultivar cuatro especies de algas en piletones en Chubut. Se invertirán cerca de 19 millones de dólares en el desarrollo de este proyecto y se supone que se obtendrán cerca de 240 mil toneladas de biodiésel por año. Ésta iniciativa se realiza en el contexto de la ley argentina de promoción de los biocombustibles, aprobada en 2006. La empresa destinaría la “pasta de algas”, que es un subproducto de la siembra y la cosecha de las mismas, a la alimentación, ya que las algas contienen un 67% de proteínas que es un valor muy superior a cualquier oleaginosa. La empresa incursionó en el desarrollo de un alga que creciera en aguas dulces y en aguas muy saladas. Del mismo sur Argentino (concretamente de la provincia de La Pampa), en el medio de un desierto, se obtuvieron en forma natural, las algas tanto dulces como saladas. También están desarrollando métodos no solo para extraer el aceite para hacer biodiesel, si no también otros para la extracción de etanol (bioetanol) por fermentación y además, mediante una digestión anaeróbica, obtener CO₂ (necesario para alimentar las mismas algas) y metano (biogás) (www.wikipedia.com, 2009)

1.3 PANORAMA A NIVEL NACIONAL DE USO DE MICROALGAS

En El Salvador, los cultivos de microalgas se limitan principalmente a su uso como alimento de camarón de agua salada.

Se tiene conocimiento de dos empresas privadas que trabajan con microalgas, una realiza cultivos para alimentación de camarones (Formosa Fishing S.A. de C. V.) y una más que las investiga para la producción de biodiesel a partir del aceite de éstas (Dimarca S.A. de C.V.) a como proyecto para el BID (Banco Interamericano de Desarrollo).

Además de éstas empresas, existen pequeños cultivos en el organismo gubernamental CENDEPESCA (Centro Nacional de Desarrollo Pesquero), adscrito al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) el cual, como la primera empresa, se limita a conservar especies útiles para la piscicultura.

2.0 CARACTERIZACION DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*

Éstas algas crecen en medios ligeramente ácidos y, por consiguiente, tiene que utilizarse dióxido de carbono disuelto en un medio de cultivo. Junto con otras especies de *Scenedesmus*, se ha cultivado artificialmente para piensos. Crece naturalmente en algunos lagos de México y los indios aztecas la han empleado para alimento del hombre. La producción es, aproximadamente, de 0.5 g por litro en los estanques poco profundos. Las células tienen que separarse por centrifugación. La digestibilidad de la materia seca de las células sin tratar es muy baja generalmente menor del 30% en los animales monogástricos (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

2.1 CLASIFICACION Y MORFOLOGIA DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*

Según Hoek, Mann y Jahns (1995), la microalga *Scenedesmus obliquus* puede clasificarse de la siguiente forma:

Scenedesmus obliquus

Clasificación científica:

Reino: *Plantae*

División: *Chlorophyta*

Clase: *Chlorophyceae*

Orden: *Chlorococcales*

Familia: *Scenedesmaceae*

Especie: *Scenedesmus Obliquus*

Scenedesmus obliquus es una alga perteneciente a la clase Chlorophyceae, que es pequeña e inmóvil célula formadora de colonias en la que se alinean en forma de plato. Las células contienen un único núcleo, que consiste en un cloroplasto en la parte central. Las estructuras de este tipo de microalgas solo pueden ser observadas con un microscopio electrónico.

El género *Scenedesmus* Fue descrito por primera vez por Teodoresco en 1905, y su nombre fue otorgado por M. F. Dunal, que fue el primero en reconocer que el color rojo de ciertos reservorios hipersalinos era producido por ésta alga. Este género (figura 1) posee 29 especies y una gran cantidad de variedades aún no muy bien definidas.

Todas las algas de este género son unicelulares pero se diferencian enormemente en tamaño y forma. Sus dimensiones varían entre 8 y 25 μm de largo y 5-15 μm de ancho.

Pueden ser ovoides, periformes, alargadas o esféricas con una papila apical bien definida cuando se trata de individuos pequeños, y ovoides o elípticas con un estrechamiento en la parte central y una papila apical muy pequeña o ausente cuando las células son grandes.

El volumen celular del ejemplar más grande de este género, mayor que el de las demás estirpes de *Scenedesmus*, es del orden de 300-1000 μm^3 . En condiciones ambientales desfavorables se transforma en una esfera rojiza de 2000 μm^3 .

Scenedesmus tiene los orgánulos celulares típicos: núcleo rodeado de membrana, mitocondrias, pequeñas vacuolas, Golgi y una mancha ocular. Además, presenta un cloroplasto de gran tamaño en forma de copa con un pirenoide simple embebido en la parte basal. Este pirenoide está rodeado de gránulos de polisacárido que son el producto de reserva.

Su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacárido. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y envuelta mucídica. Esto le permite responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Por otro lado, ésta falta de pared celular rígida aumenta su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos (Hoek, Mann y Jahns , 1995).

2.2 CICLO CELULAR DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*

A continuación se presentan las formas de reproducción de la microalga *Scenedesmus obliquus*, las cuales son la clave para entender el proceso de crecimiento de la concentración celular en los cultivos.

Reproducción asexual:

Las microalgas del tipo *Scenedesmus* se reproducen por división longitudinal independientemente de su tamaño, por lo que parece más correcto hablar de individuos grandes e individuos pequeños, en vez de jóvenes y adultos como se designan comúnmente, y mantienen la actividad celular durante la división (Sánchez – Varo, 1996).

Reproducción sexual:

Las células hijas originadas de este modo mantienen la morfología típica y la ultraestructura de sus células parentales, como puede apreciarse en la figura 1. Cuando se exponen a condiciones que inducen la reproducción sexual (bajo pH, baja temperatura o ausencia de nutrientes), ambos tipos de células responden de distinto modo:

- Los individuos grandes son capaces de conjugarse directamente.
- Los individuos pequeños atraviesan un estado previo de maduración: la etapa “palmeloide”. En este estado la mancha ocular se desorganiza y todos sus orgánulos quedan embebidos en una capa mucilaginosa.

Algunos autores consideran a este estado como una estrategia para facilitar la supervivencia en condiciones desfavorables de crecimiento.

Cuando se añade medio fresco, las nuevas células son capaces de actuar como gametos. Éstos son morfológicamente similares a las células vegetativas pero su cloroplasto no está tan desarrollado.

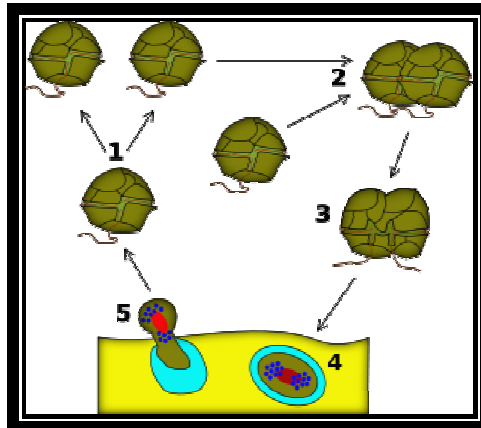


Figura 2.1. Ciclo celular de *Scenedesmus obliquus* (Sánchez-Varo, 1995)

La conjugación lateral y la germinación del cigoto originan de 4 a 8 individuos nuevos.

Algunos datos indican que los individuos grandes derivan de los pequeños: en la replicación donde se parte exclusivamente de individuos pequeños, al cabo de 4-5 días de cultivo parecen los dos tipos de células. Además, el número de células grandes aumenta gradualmente durante la fase logarítmica de crecimiento y se hace máximo en la fase estacionaria.

Los cistos (figura 2.2) son células redondas, de color rojo y gran tamaño que pierden los flagelos, y por tanto, su movilidad. Están rodeados de una doble pared con una superficie de aspecto rugoso.

La formación de éstas células tiene lugar en cultivos en fase estacionaria, con ausencia de N_2 y presencia de sulfatos. La intensidad luminosa no parece ejercer ningún efecto, sin embargo, la baja temperatura aumenta su formación. También se ha descrito la formación de aplanosporas cuando se produce la desecación de su hábitat natural lo que ha llevado a pensar que se trata de una estrategia de resistencia a condiciones adversas. La característica más notable de ésta forma celular es su diferente composición en pigmentos respecto a las células vegetativas, siendo la cantaxantina el carotenoide mayoritario en lugar del β -caroteno (Sánchez – Varo, 1996).



Figura 2.2. Cistos de Scenedesmus (Sánchez-Varo, 1995)

2.3 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA SCENEDESMUS OBLIQUUS

Scenedesmus se desarrolla bien en un medio estrictamente inorgánico sin necesidad de ningún factor orgánico. Los nutrientes inciden en la velocidad de crecimiento y en la composición bioquímica de las células en cultivo. A veces se requieren bajas concentraciones de vitaminas, sobre todo tiamina, biotina y B₁₂.

Los principales nutrientes requeridos para su crecimiento son:

a) Carbono

Es el macronutriente más importante, constituye el 50 % de la biomasa microalgal.

Todas las especies de *Scenedesmus* son fotoautótrofos estrictos y requieren carbono inorgánico para vivir, pudiendo utilizar como fuente tanto CO₂ como bicarbonato.

El aporte de carbono inorgánico es el más limitante de los nutrientes, ya que cuanto mayor es la salinidad del medio de cultivo y mayor es la temperatura, menor es la solubilidad del C inorgánico.

El CO₂ se suministra generalmente mezclado con aire, produciendo un burbujeo que sirve también de agitación. Se producen pérdidas a la atmósfera difíciles de controlar, sobre todo en piscinas donde, debido a la poca profundidad de los recipientes las burbujas no permanecen en fase líquida el tiempo suficiente para que el CO₂ se disuelva.

En las condiciones de temperatura y pH en las que se encuentra *Scenedesmus* en las lagunas, la mayor parte del carbono inorgánico aparece como carbonato. El alga se adapta a estas bajas concentraciones de CO₂ con una gran afinidad por el gas, gracias a la anhidrasa carbónica, que le permite acumular en la célula hasta 20 veces más de C inorgánico del que se encuentra en el medio.

La adición de C inorgánico, en cualquiera de las dos formas (CO₂ y NaHCO₃) estimula el crecimiento mientras no se produzca precipitación de carbonatos. El efecto es mayor cuando se burbujea el medio de cultivo con aire enriquecido en CO₂, ya que baja el pH y aumenta la concentración de CO₂ (Sánchez-Varo, 1995).

b) Nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente básico en el cultivo de *Scenedesmus*, por dos razones: Es esencial para su crecimiento y tiene una estrecha relación con la capacidad de sintetizar lípidos.

Scenedesmus puede utilizar nitrato, nitrito, amonio o urea como fuente de nitrógeno para su crecimiento siendo la preferente para los cultivos masivos el nitrato ya que el amonio es tóxico a concentraciones superiores a 5µMolar y pH superior a 8, y la urea es un suministro adicional de carbono inorgánico que estimula el crecimiento de organismos heterótrofos y aumenta el contenido de amonio en el medio. El NO₃Na es el más eficientemente usado por el alga para su desarrollo, con tasas máximas de crecimiento a concentraciones cercanas a 5 µMolar. Sin embargo, con 2 µMolar se observa una alta tasa de crecimiento.

Distintos resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en concentración de nitrógeno. Cuando el nitrógeno se agota o deja de suministrarse, el crecimiento cesa, ya que no se almacena en el interior celular (Sánchez-Varo, 1995).

c) Fósforo

Crecimiento óptimo a concentraciones de fosfato inorgánico inferiores a 0.1 µMolar. *Scenedesmus* puede acumularlo intracelularmente hasta concentraciones de 0.5 Molar, así en un medio sin fósforo puede utilizar reservas durante varios ciclos de división.

Hay que mantener baja la concentración de este elemento ya que la presencia conjunta de Calcio y Fosfato en el cultivo provoca la precipitación de fosfato cálcico a pH > 8 y la floculación de las algas, disminuyendo su crecimiento (Sánchez-Varo, 1995).

d) Sulfatos

Máximo crecimiento a 2 μ Molar Cuando es limitante la división celular se detiene, aumenta el tamaño de las células y se estimula la acumulación de lípidos.

Está en el agua dulce natural a una concentración de 30 μ Molar y en el agua corriente por lo que no es necesario añadirlo. A muy altas concentraciones y en presencia de Calcio puede precipitar y reducir el crecimiento del alga (Sánchez-Varo, 1995).

e) Magnesio

Crecimiento óptimo requiere una concentración de 1 μ Molar. *Scenedesmus* puede acumularlo en su interior hasta 300 μ Molar.

Está presente en el agua corriente a una concentración próxima a 50 μ Molar. A pH > 9 precipita como hidróxido de Mg o carbonato de Mg (Sánchez-Varo, 1995).

f) Otros nutrientes

- Potasio (1 μ Molar para crecimiento óptimo.) No hay que añadirlo si se usa agua natural (10 μ Molar).
- Calcio (concentración óptima es 0.1 μ Molar); a pH superiores a 8 puede precipitar en forma de distintas sales.
- FeCl₃ en forma de complejo quelado con EDTA a 1 μ Molar. Los micronutrientes son requeridos a bajas concentraciones y en exceso resultan tóxicos: Mn,
- Zn, Co y Cu a concentración μ Molar (5, 1, 0.1 y 0.01 respectivamente). No hay que añadirlos en medio de cultivo con agua natural.

g) pH y Temperatura

Scenedesmus tolera entre 5.5 - 8, siendo 6.8 el pH óptimo su crecimiento. Respecto a la temperatura, presenta amplia tolerancia, siendo la óptima de 20 a 30° C.

Scenedesmus obliquus es viable a -3°C y su movilidad cesa a -18°C , permaneciendo fotosintéticamente activa por debajo de -8°C (Sánchez-Varo, 1995).

h) Incidencia del Oxígeno y luz

Las microalgas son sensibles a la concentración de oxígeno en el medio, y los niveles de O_2 en los fotobiorreactores pueden dar lugar a efectos inhibitorios en el crecimiento del alga.

La intensidad de luz es importante para el crecimiento de alga. Una luz de baja o media intensidad da lugar a tasas de crecimiento menores que aquella de intensidad alta. Sin embargo, existe un nivel de luz saturante para el crecimiento de *Scenedesmus Obliquus*, que probablemente se encuentra en el rango de 200 a 400 $\mu\text{W}/\text{m}^2$ según estudios recientes.

Además parece existir una relación entre el efecto inhibitorio del oxígeno y intensidad de la luz, de manera que concentraciones altas de oxígeno se vuelven más inhibitorias a medida que la intensidad de luz aumenta (Sánchez-Varo, 1995).

2.4 MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de microalgas a gran escala se han diseñado distintos sistemas dependiendo de las materias primas utilizadas y el destino final de la biomasa obtenida. Existen sistemas en los cuales el alga se cultiva en un proceso denominado "limpio" usando agua pura, nutrientes minerales y fuente de carbono adicionales. Estas algas se utilizan como suplemento dietético. Otros sistemas usan agua corriente o agua de desecho industrial, sin adición de nutrientes minerales o carbono externo, estando la población de algas constituida por varias especies, coexistiendo cantidades notables de bacterias. Un tercer grupo es el formado por sistemas cerrados bajo iluminación solar o artificial con estirpes puras cultivadas en un medio mineral controlado.

Un medio nutritivo que contuviese todas las sales puras y en las concentraciones exactas para el crecimiento óptimo del alga aseguraría productividades máximas, pero hay que tener en cuenta su elevado coste, por lo que tiende a usarse agua enriquecida con fertilizantes agrícolas, de muy bajo costo. Sin embargo, muchos de éstos fertilizantes contienen metales pesados y otros productos tóxicos en concentraciones que afectan al

crecimiento del alga y a la calidad del producto, así son imprescindibles ensayos previos y un seguimiento continuo de la calidad del medio de cultivo, para asegurar que se encuentra libre de productos tóxicos para el alga y el consumo humano (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

El control continuo del medio asegura que ninguno de los nutrientes esté por debajo de los mínimos necesarios, especialmente cuando se trata de cultivos continuos, donde a la vez que se retira biomasa se están eliminando elementos nutritivos. Además algunos minerales precipitan con el tiempo. Este control es muy importante para N, C y P, nutrientes principales.

Teniendo en cuenta los criterios económicos se sugiere que la concentración de nutrientes debe mantenerse en sus valores mínimos, disminuyendo así las pérdidas por precipitación y volatilización, además de reducirse el precio del medio. Esto requiere una gran atención para evitar que sus niveles disminuyan por debajo de las concentraciones limitantes.

La correcta selección del medio de cultivo es clave en la producción a gran escala de cualquier microalga, ya que su coste puede ser uno de los factores determinantes de la viabilidad económica de éstas plantas de producción.

El mantenimiento de las estirpes debe realizarse en medio sólido constituido por medio mineral básico. Para el mantenimiento de estirpes a largo plazo se emplean técnicas de criopreservación.

Los resultados obtenidos ensayando distintos medios tanto en cultivos en el laboratorio como en el exterior demuestran que el medio mineral básico (con sales comerciales) rinde mayores acumulaciones de biomasa que un medio preparado con fertilizantes. Sin embargo, en cultivos al exterior es mejor optar por el medio preparado a partir de fertilizantes ya que el medio mineral básico resulta económicamente inviable, aunque sí puede utilizarse para trabajos a nivel de laboratorio.

Existe la posibilidad de utilizar *medio reciclado*, (procedente de un cultivo anterior, tras la retirada de las células), obteniéndose una tasa de crecimiento y contenido en pigmentos similares a los conseguidos con medio fresco. Esto implica un gran ahorro de agua y sales minerales por lo que disminuiría una de las principales limitaciones económicas para este cultivo. De hecho, la utilización de medios salinos reciclados es una práctica bastante

común en las plantas de producción, donde el medio se somete a un tratamiento oxidativo de posibles restos orgánicos y posteriormente se filtra. Se precisa de un control rutinario de la calidad del agua y un estricto mantenimiento del pH para evitar precipitaciones (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

Incluso cuando se utiliza medio reciclado se necesitan grandes cantidades de agua de una cierta calidad para compensar las pérdidas por evaporación (en verano, 1 cm al día) y otros usos. Es mejor utilizar agua subterránea, tanto por calidad como por precio, ya que contiene menos contaminantes que las aguas superficiales en contacto con áreas agrícolas.

Es aconsejable disponer de tanques de almacenamiento del agua para asegurar su suministro continuo y permitir ensayos rutinarios de calidad del agua antes de su utilización en los estanques (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

2.5 REQUERIMIENTOS ESPECÍFICOS DE LOS CULTIVOS

Además de los nutrientes, las microalgas presentan requerimientos ambientales, los cuales consisten en condiciones ambientales específicas que deben ser cumplidas para alcanzar una tasa de reproducción adecuada. Es importante también elegir el tipo de microorganismo a cultivar tomando en cuenta su resistencia a las condiciones ambientales que no pueden ser controladas por el cultivador. Dichas condiciones se presentan a continuación:

a) SELECCIÓN DE ESTIRPES

Se han establecido distintos criterios para este punto, normalmente dirigidos a la obtención de una alta tasa de producción en cultivos exteriores, ya que éstos sistemas son los más rentables, aprovechando la luz solar. Estos criterios son:

- ***Estirpes con un alto rango de temperatura óptima:***, para asegurar una alta productividad en casi cualquier época del año.

- ***Estirpes con tasa respiratoria baja:*** Durante la noche se puede perder más del 35% de la biomasa total producida durante el día. Así, las estirpes con una tasa de respiración en la oscuridad baja, es decir con una relación Producción de CO₂ en luz/ consumo de O₂ en oscuridad baja serán buenas candidatas (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

- **Resistencia a la fotoinhibición:** Intensidades de luz muy elevadas con frecuencia provocan una inhibición del crecimiento del microalga, produciéndose una fotoinhibición (disminución de la capacidad fotosintética, como consecuencia de un aumento de la intensidad de luz superior a las requeridas para obtener la máxima tasa de fotosíntesis, implica la fotodestrucción de los pigmentos fotosintéticos.)

- **Elevadas concentraciones de oxígeno** inhiben la tasa de incorporación fotosintética del carbono, provocando en algunas ocasiones la pérdida total del cultivo. Es necesario un buen mecanismo de agitación y una distribución homogénea de las células en el medio para eliminar este exceso de oxígeno producido por la fotosíntesis y seleccionar *estirpes que puedan tolerar altas concentraciones de oxígeno* (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

- **Resistencia a depredadores.**

- **Los cultivos de microalgas en el exterior** tienen grandes problemas de evaporación, y la adición de medio fresco puede provocar alta concentración de sales en el medio, por lo que se seleccionan *estirpes que toleren una alta presión osmótica* sin elevar la tasa de respiración.

La metodología para la obtención de éstas especies a partir de medios naturales implica varios pasos:

- Recogida de muestras.

- Verificación al microscopio óptico para evidenciar la presencia del alga.

- Crecimiento en medio mineral básico con elevada concentración de nutrientes.

- Aislamiento de la especie de interés.

- Crecimiento en tubo de ensayo con el mismo medio que en el paso anterior e iluminado por la parte superior a alta intensidad. Después de 3-4 días, la especie requerida puede recogerse fácilmente con una pipeta Pasteur. Este paso se repite hasta conseguir una muestra pura.

b) AGITACION

La agitación de la suspensión celular es uno de los requerimientos más importantes en el cultivo masivo de algas, ya que incide fuertemente sobre la tasa de productividad. La agitación produce el movimiento del agua lo cual implica una serie de efectos positivos:

- Distribución homogénea de los nutrientes dentro del cultivo, evitándose la formación de gradientes nutricionales alrededor de las células durante periodos metabólicos activos, que afectarían a su crecimiento y por tanto a la productividad del proceso.
 - Prevención de la estratificación térmica: en estanques con mala agitación puede existir hasta 8°C de diferencia entre la temperatura de la superficie del tanque y el fondo.
 - Evita que las células sedimenten o precipiten en el fondo del estanque. Si la velocidad de mezclado es demasiado lenta las algas muertas y otros restos celulares se depositan en el fondo, creando zonas de estancamiento que llevarán a la formación de regiones anaerobias que tendrán un efecto nocivo sobre las células y además reducirán la cantidad y calidad de la biomasa producida. En ocasiones se pueden formar compuestos tóxicos a partir de la descomposición del material orgánico causando la pérdida de todo el cultivo. Además ésta biomasa deteriorada en el fondo fomentará la aparición de microorganismos heterótrofos como bacterias, es decir, contaminación.
- Eliminación del exceso de O₂ disuelto, producido como resultado de la fotosíntesis.
- Mejora la utilización del CO₂.
- Dispersión uniforme del microalga, asegurando una frecuente exposición a la luz, lo que asegura que la célula permanezca fotosintéticamente activa. Esto puede llevar a un aumento de la productividad de la biomasa ya que se evita el efecto de ensombrecimiento mutuo entre células.

Además se evitan los efectos fotoinhibidores que se producirían en un cultivo no agitado, sobre aquella parte de la población que estuviera continuamente expuesta a una intensa radiación lumínica.

Un buen diseño del mecanismo de agitación es muy importante ya que está directamente relacionado con el consumo de energía y los costes de instalación y funcionamiento de la

planta. La selección del sistema de agitación depende de diversos factores tales como la localización de la planta de producción, el tipo de tanque de cultivo, la disponibilidad de energía, tipo de alga a cultivar y consideraciones de tipo económico. De todos los modelos de agitación disponibles, uno de los más adecuados es la rueda de paletas, ya que *Scenedesmus* al no tener pared celular rígida es un organismo frágil a las fuerzas mecánicas (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

c) PROFUNDIDAD

En el cultivo de microalgas al exterior son muy importantes por su incidencia sobre la biodisponibilidad de luz para cada célula de cultivo, y por tanto por su influencia sobre la productividad, dos factores: la profundidad de la suspensión y la densidad celular.

El haz de luz que incide sobre el cultivo es absorbido completamente en la Zona Fótica (2-5 primeros cm), mientras que el resto de las zonas más profundas del estanque quedan en oscuridad (Zona afótica), de modo que las células que se encuentran en la superficie están expuestas a alta radiación lumínica, mientras que las células que están en el fondo se encuentran en oscuridad (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

d) DENSIDAD CELULAR ÓPTIMA

Para unas condiciones dadas de profundidad, agitación e irradiancia en los cultivos, existe una densidad de población óptima que nos genera la máxima tasa de producción de biomasa o de producto deseado por unidad de área. Sin embargo, bajo condiciones de densidad celular óptima las células no crecen a la velocidad máxima, sino aproximadamente a la mitad de la misma, ya que el crecimiento se encuentra limitado por la luz debido al ensombrecimiento entre células. Una densidad celular menor que la óptima minimiza este problema, pero por procesos de fotoinhibición se obtiene una productividad menor de la máxima posible, por lo que hay que alejarse de los extremos y buscar una densidad celular óptima.

La concentración celular óptima no es constante a lo largo del año, siendo su valor más elevado en condiciones de alta irradiancia y disminuye conforme lo hace ésta, con valores mínimos en invierno. En el caso de *Scenedesmus obliquus* suelen emplearse sistemas de cultivo semicontinuo, en los que la retirada de células y adición de medio fresco se realiza cada cierto periodo de tiempo, para intentar mantener esa densidad celular adecuada (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

e) TAMAÑO DEL INOCULO

Este es un factor importante pues una concentración de células inoculadas demasiado baja se puede perder por fotooxidación u otras causas, mientras que si es demasiado alta se producen pérdidas por la respiración o por una ineficiente utilización de energía lumínica por el ensombrecimiento.

El inoculo inicial debe estar constituido por células de una sola especie y la composición del medio y las condiciones ambientales que encontrará el microalga durante el proceso de generación del inoculo deben ser lo más parecida posible a lo que encontrará en los estanques, para evitar un alargamiento de la fase de latencia.

Un procedimiento muy habitual es la obtención de inoculos a partir de cultivos de microalgas que se encuentran en fase exponencial, ya que así reducimos los tiempos de fase de latencia, cosa que no ocurre cuando usamos inoculos provenientes de fase estacionaria (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

f) CONTROL DE PH

El pH del medio de cultivo es un parámetro muy importante ya que determina la solubilidad del dióxido de carbono, de los minerales del medio, la proporción de las distintas especies inorgánicas del carbono en disolución (H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) e influye directamente en el metabolismo de las microalgas.

El crecimiento óptimo de *Scenedesmus* se consigue con un rango de pH que oscila entre 6.5-8. Ésta alga es capaz de crecer fuera de este intervalo de pH, aunque suele soportar mejor los descensos de pH que los incrementos, que por lo general son letales.

El pH se verá afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de CO_2 y actividad metabólica de las microalgas (la asimilación de nitrato y amonio está estrechamente relacionada con este parámetro).

Una cuestión muy importante en la biotecnología de microalgas es la adición de CO_2 a los cultivos masivos. Así, los tres factores a considerar en cuanto a la transferencia de CO_2 desde el aire al estanque de cultivo son:

- El régimen de agitación.
- La concentración de CO_2 en el estanque.

- Los equilibrios en el sistema dióxido de carbono/bicarbonato/carbonato.

Los métodos más eficientes para aportar dióxido de carbono al medio de cultivo son:

- Transferencia activa mediante difusión del gas en pequeñas burbujas dentro del medio (burbujeo de gas para introducirlo en líquido). El gas puede ser dióxido de carbono o una mezcla de aire enriquecido en dicha especie. El diseño de éstos sistemas ha evolucionado para aumentar el tiempo de retención de las burbujas de este gas en el medio líquido.

- Transferencia pasiva creando una gran superficie de contacto entre una atmósfera de CO₂ y la superficie del medio de cultivo (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

g) CONTAMINACION

Es necesario monitorizar y controlar las contaminaciones con el fin de obtener una biomasa sin impurezas perjudiciales y para mantener los contaminantes dentro de unos límites tolerables.

El mejor método para combatir la contaminación es mantener el cultivo de microalgas en óptimo crecimiento, llevar una limpieza periódica de los estanques, se pueden usar antibióticos, pesticidas, etc.

Entre los posibles contaminantes que podemos encontrar tenemos:

- Algas indeseables; este es uno de los mayores problemas de los cultivos masivos en el exterior y no pueden evitarse totalmente porque las condiciones del cultivo en éstos sistemas no son exclusivas de una especie en particular. Reduce el rendimiento y en casos extremos puede desplazar el cultivo original. Es imposible prevenir ésta contaminación pero se puede mantener en niveles aceptables.
- Mohos, levaduras y hongos; ésta contaminación no presenta serios problemas para el comportamiento del alga ni para el consumidor, pero esto no quiere decir que el cultivo nunca pueda ser destruido por la contaminación de un parásito de este tipo, por lo que se aconseja un crecimiento exponencial del cultivo, donde la población de microalgas se multiplique a una tasa mayor que el parásito, para eliminar la infección mediante repetidas diluciones.

- Zooplancton; ocasionalmente, se puede controlar mediante un aumento en la concentración de sales del medio o por el pH.
- Insectos, y otros como pájaros y roedores cuando las aguas están estancadas.
- Uno de los principales problemas pueden ser los protozoos, como por ejemplo de la subclase *Holotrichia* e *Hypotrichia* que soportan alta salinidad y depredan al alga del tipo *Dunaliella*, siendo la estrategia de eliminación más efectiva el uso de ácidos fuertes añadidos al medio, limitando el crecimiento y viabilidad de éstos sin afectar el cultivo (Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

h) COMPOSICIÓN CELULAR

El valor nutricional de una especie microalgal es función de su composición bioquímica, y ésta depende del medio y de las condiciones de cultivo.

El contenido en proteínas es mayor en los primeros estadios de crecimiento, pero las células maduras, ricas en carotenoides (pigmentos), tienen otra composición:

Cuadro 2.1. Composición de Scenedesmus obliquus (Correa – Reyes, 1996)

COMPONENTE	PORCENTAJE
Proteínas	24.93
Carbohidratos	6.99
Lípidos	17.35
Total	49.27

La fracción de ácidos nucleicos puede variar del 1 al 10 %, siendo el rango usual de 4 - 6 %. En cuanto a los lípidos, su fracción aumenta cuando el nitrógeno es limitante. La fracción lipídica se divide en lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) y lípidos neutros (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos). Las cantidades relativas de cada clase cambian considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo.

Glicerol: Componente muy importante (4% - 5% de biomasa) que permite sobrevivir a ésta alga en ambientes extremos, y del que se ha propuesto la extracción y comercialización.

Esteroles: Son componentes mínimos de la fracción lipídica (0.2% - 5.5%). Su composición es similar a la de otras algas y varía con el ciclo de crecimiento, la intensidad y la calidad de la luz.

3.0 BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO DE LA MICROALGA ***Scenedesmus obliquus***

Se entiende por biotecnología de un cultivo al método por medio del cual se proveerá a la microalga del espacio, condiciones ambientales y nutrientes. Puede concebirse también de manera análoga al diseño de un reactor para llevar a cabo una reacción química. Dentro de este diseño deben tomarse en cuenta las diferentes variables que afectaran al cultivo.

3.1 SISTEMAS DE CULTIVO

Es Posible clasificar los sistemas de cultivo según el diseño. Se Distinguen dos tipos: Abiertos y cerrados al aire.

Los cultivos de 400 litros o más suelen realizarse en instalaciones exteriores, en las que la temperatura, la luz y el fotoperiodo no están controladas y por tanto la productividad y calidad de la biomasa producida es menor, pero por otra lado se pueden producir grandes volúmenes de cultivo con un bajo coste económico. Los cultivos exteriores usan generalmente diseños horizontales en sus unidades de producción (estanques), mientras que los cultivos interiores utilizan preferentemente sistemas de diseño vertical (cilindros, bolsas, etc) que aprovechan mejor el espacio. Aunque el uso de estanques exteriores es atractivo debido a su gran capacidad, el rendimiento de células microalgales puede ser mejor en sistemas intensivos interiores, debido a la mayor eficiencia de la unidad, y por tanto, se lograrán mayores densidades celulares (DOE, 1996). A continuación se describen los tipos de sistemas existentes para el cultivo de microalgas.

3.1.1 SISTEMAS ABIERTOS

Son estanques horizontales de varios tamaños y tipos, así como unidades de cultivo inclinadas.

El cultivo de microalgas en sistemas abiertos combina características típicas de cultivos agrícolas (uso extensivo del terreno, agua y nutrientes, así como dependencia del clima y

de la radiación solar) con otras propias de procesos industriales para el cultivo de microorganismos, como la operación continua, suministro de nutrientes a concentración óptima y control del proceso.

Dentro de este tipo de sistemas encontramos:

i) Cultivo extensivo:

Utiliza grandes extensiones de terreno, sin agitación mecánica, con una orientación tal que la turbulencia ocasionada por los vientos predominantes en la zona permitan cierta homogeneización y movimiento de la masa líquida. El control del ambiente es mínimo. Para disminuir el ataque de depredadores se usan concentraciones de sal muy elevadas. El alga crece muy lentamente. La productividad es baja y se necesitan amplias extensiones para su explotación comercial, pero los costes de operación son muy bajos.

Este tipo de cultivo en la actualidad sólo se da en Australia, que posee salinas de grandes extensiones (50 Ha), y en China (DOE, 1996).

ii) Cultivo intensivo:

Es el sistema más empleado. Se intentan controlar todos los factores de crecimiento celular.

Consiste en un estanque horizontal de poca profundidad. Los estanques suelen ser rectangulares, alineados formando canales de tamaño variable dispuestos de manera contigua y separados por tabiques, con el piso y las paredes recubiertos de una capa de polietileno o cloruro de polivinilo.

Son de amplitudes menores que el anterior, alrededor de 1 Ha, como es el caso de plantas industriales de Israel y EEUU y por ello utilizan mayores concentraciones de células. El área de las unidades de cultivo con carácter comercial oscila entre 1000 y 5000 m².

Para la agitación se usa una rueda de paletas girando a baja velocidad, hélices o bombas, para que la suspensión celular fluya a lo largo de los canales a una velocidad adecuada. Para disminuir la pérdida de carga y la deposición de sólidos, se sitúan tabiques deflectores en las esquinas de los canales para dirigir la corriente de la suspensión celular.

Éstos sistemas de cultivo pueden funcionar de manera continua o semicontinua. El suministro de CO₂ puede regularse mediante un controlador de pH y una válvula solenoide, de manera que cuando el pH sobrepase un determinado valor crítico, se insufla CO₂ hasta que se restablezca el valor óptimo para el crecimiento celular del alga (DOE, 1996).

iii) Cultivo semi-intensivo:

En éstos se incrementa la longitud del estanque en 10 veces, no hay sistema de agitación y el control sobre el sistema es sólo parcial.

Scenedesmus es uno de los organismos más adecuados para el cultivo masivo en estanques abiertos al exterior. Los primeros experimentos en tanques abiertos se realizaron en un invernadero en Sydney, en una instalación constituida por estanques de fibra plástica de 200 litros calentados a 25-30° C, que usaba medio de cultivo mineral y cultivos axénicos procedentes de laboratorio, aislados originalmente de lagos de Australia (DOE, 1996).

iv) Tipos de estanques

Los estanques, tanques o piscinas son unidades abiertas de cultivo, y los tipos básicos son: Estanques circulares, oblongos (tipo "raceway") o inclinados.

Las piscinas *circulares* suelen tener un sistema de agitación mediante un brazo rotatorio el cual consume mucha energía. Actualmente apenas se usan, ya que además son caras y con una ineficiente utilización del terreno.

Las piscinas "raceway" son las más utilizadas, tanto en unidades aisladas como en varias unidas formando meandros. La agitación suele ser por palas, propulsores o bombas de aire.

Las piscinas *inclinadas* suelen disponerse formando meandros, y la agitación se consigue mediante flujo por gravedad y bombeo.

Los estanques abiertos tienen una serie de inconvenientes, destacando la dificultad de controlar la temperatura de la suspensión celular. La profundidad del cultivo no puede ser menor de 12-15 cm para evitar reducciones drásticas en el flujo y la turbulencia, esto implica usar grandes volúmenes por unidad de superficie (120-150 L/m²). Esto hace que

la concentración de biomasa en el cultivo sea baja, con el consiguiente impacto en los costes de recolección de las células y en la posibilidad de contaminación externa. Sin embargo, el sistema de tipo intensivo, con agitación e inyección de CO₂, es el mayoritariamente usado en plantas de producción de microalgas por las distintas compañías establecidas comercialmente (DOE, 1996).

3.1.2 SISTEMAS CERRADOS

Se desarrolla en fotobiorreactores cerrados, en los que la posibilidad de controlar las condiciones de cultivo permite mejorar la cantidad y calidad de los productos obtenidos.

Los sistemas de cultivo cerrado consisten en uno o varios módulos de captación de luz solar, acoplados a un sistema de carbonatación y recolección de células. Predominan los sistemas tubulares, que consisten en ensamblajes de tubos de material plástico por los que circula la suspensión de microalgas, dispuestos sobre el suelo o sumergidos en agua, que actúa regulando la temperatura del cultivo.

Es importante estudiar cual es el diámetro más adecuado de los tubos ya que un diámetro pequeño supone un volumen de cultivo pequeño, lo que disminuiría la producción, pero uno demasiado grande puede dar lugar a problemas de limitación de irradiancia, al no poder llegar la luz a las capas más internas del tubo (Sánchez - Varo, 1996).

La forma de conseguir la recirculación de la suspensión por el fotobiorreactor es muy importante, ya que influye de forma notable en la productividad del cultivo. Hay que tener en cuenta el efecto negativo que pueden producir los sistemas de impulsión de la suspensión celular, ya que el estrés hidrodinámico y las fuerzas de rozamiento pueden dañar a las células, al pasar por los sistemas de bombeo. De los distintos sistemas el "airlift", es éste el que menor estrés hidrodinámico provoca en las células, y por lo tanto, origina mayor productividad.

Este sistema se aplica para obtención de productos de alto valor comercial, ya que supone mayores costes que los sistemas abiertos. Permiten mantener densidades celulares y la axenia del cultivo, además de un control más estricto y automatizado de las condiciones de crecimiento y del proceso de producción.

Los sistemas de cultivos además se clasifican en tres tipos, dependiendo del sistema de operación:

a) Cultivos discontinuos

En estos cultivos la población va pasando por las distintas fases de crecimiento ajuntándose generalmente a una función logarítmica. Esto produce cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo.

Los cultivos discontinuos se utilizan generalmente en estudios fotoautotróficos, pero su población celular es muy difícil de definir. Estos tipos de cultivo tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular.

Este tipo de cultivo supone la recogida completa del recipiente de cultivo y es la forma más simple de operar, aunque supone mayor trabajo que otros sistemas. Todas las aplicaciones comerciales, excepto aquellas diseñadas para producir “blooms” de especies naturales de microalgas en tanques exteriores, generalmente necesitan utilizar este tipo de sistema aunque sea sólo como iniciador de un cultivo continuo o semicontinuo (DOE, 1996).

b) Cultivo semicontinuo

Se pueden mantener sistemas interiores para la producción de microalgas durante varias semanas usando métodos semicontinuos, en los que las condiciones de cultivo pueden ser cuidadosamente controladas.

Generalmente al cuarto día el alga ha alcanzado la fase exponencial, entonces se retira el 50% del cultivo y se repone medio fresco. Esto es así porque la tasa de división de *Scenedesmus* es lenta, lo que no permite el uso de cultivo continuo, ya que esto daría lugar a una dilución del cultivo al estar entrando medio continuamente (DOE, 1996).

c) Cultivo continuo

Es aquel en el que se mantiene la población en fase exponencial de crecimiento (“steady-state”) durante largos periodos de tiempo. La ventaja de estos cultivos es que muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ello hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y la población celular a nivel constante.

La ventaja del cultivo continuo es que se pueden mantener unas condiciones óptimas de steady-state en el cultivo, con un mayor grado de control de calidad sobre el producto algal. El cultivo semicontinuo es el tipo más utilizado. El cultivo continuo suele tener menor productividad y es complejo y caro. En el cultivo semicontinuo al final de la fase exponencial se retira la mitad de la biomasa y se incorpora la mitad de medio nuevo, manteniéndose el cultivo en fase exponencial (DOE, 1996).

3.2 ESCALADO DE CULTIVOS DE MICROALGAS

En las instalaciones de cultivo de microalgas se necesita disponer de cultivos que presentan distintos volúmenes y condiciones de cultivo. En general, se dispone de instalaciones con temperatura controlada y con luz artificial en los que se puede disponer de distintos sistemas de cultivo hasta un volumen máximo de 400 litros por recipiente. Éstas instalaciones interiores permiten mantener constante la temperatura, luz incidente y duración de los ciclos luz-oscuridad, pero tienen el inconveniente de su coste, debido al mayor consumo energético.

Aun cuando la producción se realice totalmente en el exterior, es necesario disponer de instalaciones interiores para el mantenimiento de los cultivos stock y la escalación de los cultivos que servirán de inóculo a los sistemas de producción. El proceso de cultivo se inicia a partir de colonias algales axénicas mantenidas sobre medio sólido con las que se siembran cultivos líquidos de poco volumen (generalmente hasta 250 ml). Éstos cultivos se mantienen como cultivos “stock” de reserva, para disponer de inóculos siempre que se necesiten.

Éstos a su vez sirven para inocular en botellas de un litro y así sucesivamente de una forma escalonada se obtienen volúmenes de cultivo cada vez mayores, en recipientes de 10 litros y tubos de metacrilato o bolsas de polietileno de 40 a 400 litros. En las bolsas de plástico debe tenerse en cuenta el material que las constituye, pues puede incidir en la intensidad o longitud de onda de la luz que reciba el cultivo. Los cultivos en bolsas pueden ser interiores o exteriores. Estas fases de cultivo se realizan normalmente en cámaras cerradas con luz y temperatura controladas y se consiguen producciones fijas de microalgas en un estado fisiológico óptimo. A partir de volúmenes de 1-2 litros, los cultivos se mantienen agitados continuamente para mantenerlos homogéneos, favoreciendo el contacto entre las células y el medio y que toda la población algal reciba la misma

irradiación. Normalmente la agitación se realiza mediante burbujeo de aire desde el fondo de recipiente de cultivo, que puede ir enriquecido con CO₂ para mantener el pH óptimo y aumentar la disponibilidad de la fuente de carbono para el alga. Para volúmenes superiores se realizan los cultivos en tanques, piscinas o sistemas de reactores tubulares de distinto diseño.

En la mayor parte de los casos el rendimiento en bolsas es mayor que en tanques ya que en aquellas los cultivos se hacen en condiciones de mayor asepsia, se consigue mejor irradiación y se aprovecha mejor el espacio.

El siguiente salto de escala implica cultivos exteriores a gran escala. La selección del lugar para una unidad de producción algal es uno de los principales factores a considerar. Es necesario clima apropiado, topografía adecuada, buen suministro de agua (calidad y cantidad) y fuente de energía disponible. En nuestro caso, el puede ser natural o tratada, aunque se obtienen mejores resultados con agua natural (Sánchez – Varo, 1996).

3.2.1 SISTEMAS DE RECOLECCION DE MICROALGAS

En producción de microalgas la economía depende en gran medida de la tecnología empleada para la recogida, concentración y procesamiento de la suspensión de algas.

La separación de las algas del medio de cultivo presenta grandes dificultades debido a su baja concentración en el mismo, siendo su densidad sólo ligeramente superior a la del agua. En la práctica en proceso implica convertir un cultivo muy diluido (0.02 a 0.06% de residuo sólido en una pasta escurrida que contenga entre 5 y 20 % o más de sólido.

En la recogida hay que tener en cuenta si el sistema de recogida va a operar de manera continua o discontinua, si es necesario algún paso previo de concentración, cuál es el porcentaje de materia seca a obtener y cuáles son los costes de inversión y de consumo energético por unidad de volumen de suspensión de alga.

Con *Scenedesmus obliquus* existen distintos sistemas que se pueden emplear:

a) Filtración por gravedad:

Es el método más simple y económico. Los filtros más usados son arena fina, tierra de diatomeas y fibras de celulosa. El medio obtenido tras la filtración puede ser reutilizado de nuevo. Debido a que las algas colapsan rápidamente el filtro, es necesario lavar este con frecuencia. Todos los métodos basados en el principio de sedimentación tienen una eficiencia baja, y a pesar de que consumen una décima parte de la energía empleadas en un sistema de centrifugación, el coste relativo de este sistema de recogida de células es de un orden de magnitud mayor que el de la centrifugación.

Otro posible procedimiento es la filtración de flujo tangencial que utiliza como fuerza directriz una diferencia de presión generada por una bomba. La solución se hace pasar tangencialmente por una membrana que es permeable al solvente y no al soluto. La separación se produce en la superficie de la membrana casi únicamente por un mecanismo físico de separación. Seleccionando adecuadamente el tamaño de poro de la membrana y la presión a través de ella, se pueden obtener altos caudales de filtrado y buenos rendimientos. Se han hecho estudios piloto para algunas microalgas que apuntan a este sistema como una alternativa viable para la recogida. Supone un alto coste de inversión inicial pero con bajos gastos energéticos posteriores y escaso mantenimiento, pudiendo llegar a ser una buena opción (Sánchez – Varo, 1996).

b) Floculación

La separación de la masa de microalgas del medio de cultivo puede hacerse aprovechando la capacidad que tienen algunas células de unirse unas a otras formando grumos visibles que sedimentan o flotan. Ésta floculación puede ser espontánea, debida a factores asociados al medio de cultivo tales como un cambio brusco en el pH. En general, las condiciones que impiden el crecimiento de un cultivo facilitan la autofloculación. También se pueden formar agregados de algas por la interacción entre éstas y bacterias o entre algas y polímeros orgánicos excretados. La autofloculación puede ser inducida en los tanques de cultivo mediante distintas manipulaciones, como añadiendo productos químicos (sulfato de aluminio, sulfato ferroso, etc).

La principal desventaja de este sistema, además del coste de estos productos, es su presencia en la biomasa recogida y la contaminación del medio que impide su reutilización. Los alumbres (sulfatos de distintos metales) son muy eficientes para el caso

de *Scenedesmus obliquus*, y no son un problema cuando el alga se cultiva para producir lípidos, ya que éstos son extraídos con un solvente orgánico dejando los restos del alga contaminados con el floculante (Sánchez – Varo, 1996).

c) Separación fototáctica

Se basa en la capacidad que tienen algunas microalgas móviles de desplazarse hacia una fuente de luz de una determinada longitud de onda o intensidad. Se ha diseñado un método de concentración de *S. obliquus* basado en la capacidad de fototaxismo y quimiotaxismo de ésta alga. En este sistema se emplea un difusor circular que deposita una fina capa de agua pura sobre la superficie del cultivo, donde las células de *Scenedesmus* tienden a concentrarse debido a la menor densidad y mejor iluminación, aumentando su concentración en esa zona. Este mismo difusor, usado como bomba de succión permite drenar las células concentradas. Este sistema puede concentrar el cultivo 8 veces con una recuperación de biomasa del 75% en un ciclo de estratificación, y realizando dos ciclos consecutivos puede concentrar la biomasa 6 veces con una recuperación del 90%. Este procedimiento representa una alternativa a la centrifugación por su bajo coste en equipos y consumo energético así como por la capacidad de reutilización del medio de cultivo. Este sistema sólo se ha ensayado en tanques de pequeña superficie y algunos autores consideran que no es aplicable a gran escala por la alta viscosidad del material a filtrar y a la presencia de otras partículas en el cultivo que contaminan la biomasa recogida (Sánchez – Varo, 1996).

d) Centrifugación

Es el método más directo y aplicable a todo tipo de microalgas tanto filamentosas como unicelulares. Su principal ventaja es su simplicidad y que el producto obtenido no contiene ningún compuesto químico.

Implica elevados costes de inversión y alto consumo energético (1 kwh m⁻³) lo que desaconseja su uso cuando la biomasa a recoger no alcanza un precio elevado en el mercado. De los muchos tipos de centrifugas existentes en el mercado, sólo cuatro se han ensayado para la recogida de microalgas:

- Centrifuga de cámara, para cultivos poco concentrados.

- Separador de plato que eliminan por si mismas los lodos. Se emplean cuando se trata de separar fases líquidas con pequeñas diferencias de densidad. La descarga del concentrado es discontinua.
- Centrífuga de tobera, semejante a la anterior, pero la descarga es continua a través de una tobera instalada en la periferia originando un producto más homogéneo. Necesita la instalación de algún tamiz previo a la centrífuga para eliminar partículas contaminantes de tamaño considerable y evitar la obstrucción de la salida. La concentración de sólidos es sólo un factor entre 10 a 20 veces menor pero supone un costo de inversión menor que en la centrífuga de platos para una misma capacidad.
- Decantador, que permite obtener las fracciones de sólido más concentradas. Se emplean fundamentalmente en las plantas de aguas residuales.

Actualmente se usan centrífugas de decantación, más baratas y fáciles de mantener.

En la actualidad, los productores industriales de tipo extensivo usan como sistema de recogida la floculación. En las plantas intensivas, el método empleado para la recogida de *Scenedesmus* es la centrifugación (Sánchez – Varo, 1996).

3.3 METODOS DE EXTRACCION DEL ACEITE DEL CRUDO DE LA

MICROALGA *Scenedesmus obliquus*.

Con el objetivo de romper el tejido celular para liberar las moléculas de aceite, es necesario aplicar uno de los siguientes métodos, los cuales son los más utilizados en la actualidad a nivel industrial. Cada uno de éstos métodos tienen especial aplicación en la extracción de aceite a partir de oleaginosas tradicionales. A continuación se detallan cada uno de ellos.

a) Extracción por prensado

También se le conoce como “expresión” (figura 3.1). El material oleaginoso es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa.

Cuando las algas se secan, retienen el aceite, que puede ser exprimido con una prensa de aceite como las mencionadas anteriormente. Muchas empresas de aceite vegetal utilizan una combinación mecánica y solventes químicos para la extracción del aceite. Mientras procesos más eficientes surgen, un proceso simple es usar una prensa para extraer un porcentaje grande (el 70-75 %) del aceite de algas (www.algae.es, 2009).

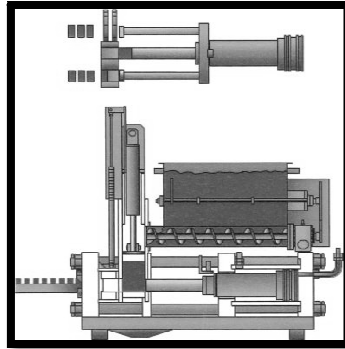


Figura 3.1. Prensa de tornillo sin fin (fuente: www.wikipedia.com, 2008)

b) Extracción con solventes

Se puede extraer aceite de las algas usando productos químicos. El benceno y el éter han sido usados, pero una sustancia química popular para la extracción con solvente es el hexano, que es relativamente barato. La desventaja de la utilización de solventes para la extracción de aceite es el peligro inherente al trabajar con productos químicos. El benceno es clasificado como cancerígeno. Los solventes químicos también presentan riesgos de explosión. La extracción por medio del hexano puede usarse solo o combinado con el método de expeler/exprimir. Después de que el aceite haya sido extraído por el método de expeler, la pulpa restante puede ser mezclada con ciclo-hexano para extraer el aceite restante. El aceite se disuelve en el ciclohexano, y la pulpa es eliminada de la solución. El aceite y el ciclohexano son separados por medio de la destilación. Éstas dos etapas (extracción en frío y solvente hexano) juntos serán capaces de sacar más del 95 % del aceite total presente en las algas (www.algae.es, 2009).

El material previamente debe de ser molido, macerado ó picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido, ó el líquido, ó ambos, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. El proceso

puede ejecutarse por batch (por lotes) ó en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son: Etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno (como se mencionó anteriormente) por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados.

El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, carbohidratos. En la etapa de recuperación de los solventes (atmosférica ó al vacío), después de los condensadores ha de disponerse de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente (www.algae.es).

c) Extracción con fluidos supercríticos

Esto puede extraer casi el 100 % del aceite absolutamente solo. Este método sin embargo necesita un equipo especial para contención y presión en la extracción supercrítica fluida, el gas es licuado bajo presión y calentado hasta el punto en que tiene las propiedades tanto de un líquido como de un gas. Este fluido licuado entonces actúa como solvente en la extracción del aceite.

Punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión, para un gas ó un vapor, por encima de las cuales la sustancia ya no puede ser "licuada" por incremento de presión. Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido (www.algae.es, 2009).

Se habla así de P_c , T_c , V_c , D_c . La sustancia más empleada es el CO_2 , que en éstas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, que disminuye la pérdida de sustancias volátiles.

También presenta un H_{vap} y un C_p bajos, lo que disminuye notoriamente el consumo de energía del proceso, en intensidad y en tiempo.

El CO₂ no es tóxico, ni explosivo, ni incendiario, es bacteriostático y es clasificado por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe).

La presión y temperatura críticas para el CO₂ son 73 bar y 31°C respectivamente. La inversión inicial para estos procesos es alta, aún para equipos en pequeña escala, debido a la tecnología involucrada, a los costos de materiales y de construcción.

Los equipos se construyen en acero inoxidable tipo 316, deben soportar altas presiones en su operación y deben de ofrecer un manejo seguro. Por efecto mismo de la escala, para equipos más grandes, mayor debe de ser la capacidad de la bomba de compresión; mayor el espesor de las paredes, de las bridas en los mismos, de los cierres y sellamientos muy herméticos (Shelef y Soeder, 1980).

d) Hidrodestilación

En este proceso en la parte inferior del tanque extractor, el cual es normalmente basculante, se coloca agua, luego viene encima una parrilla que soporta el material que va a ser extraído. La salida de vapores, puede ser lateral al tanque o ubicarse en la tapa, pasa a un serpentín ó espiral enfriado por agua y posteriormente el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases ó florentino, el cual debe de tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y además permita la recolección fácil del mismo. El tanque extractor es calentado con fuego directo en su parte inferior (el fondo y hasta 1/3 de la parte inferior del tanque se construye en alfajor de 1/8 in, material que resiste bien el calor y la oxidación), el vapor producido allí causa el arrastre del aceite.

Cuando se emplea hidrodestilación no se requiere de un calderín generador de vapor. Estos sistemas son muy utilizados en el campo, son fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro, “transhumantes”, son baratos, seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo (Shelef y Soeder, 1980).

e) Arrastre con vapor

Por efecto de la temperatura del vapor (100 °C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite, el cual presenta a éstas condiciones una presión de vapor:

$$P_T = P_v + P_a.$$

La fracción de aceite esencial en la mezcla de vapor será:

$$Y_a = P_a / P_T$$

Adicionalmente el aceite esencial debe de ser insoluble en agua, ya que después del condensador, en el separador (Florentino) debe de formarse dos fases: una de aceite y otra de agua. Si el aceite presenta componentes solubles en agua éstos quedarán en la fase acuosa (Shelef y Soeder, 1980).

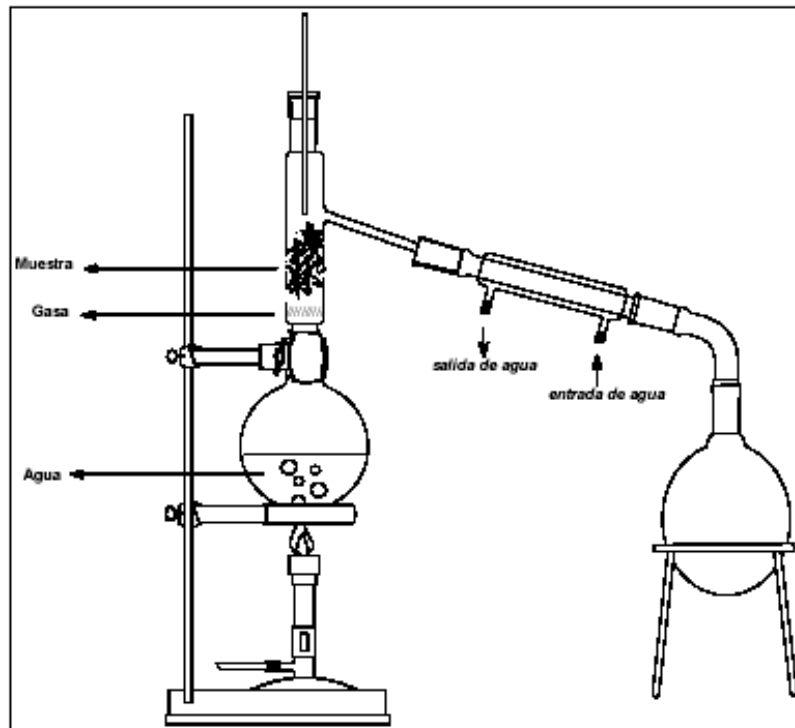


Figura 3.2. Extracción de arrastre con vapor (Shelef y Soeder, 1980)

3.4 COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE MICROALGAS

Las distintas clases de lípidos contenidos en varias especies de microalgas, fueron analizadas por el equipo del Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE, 1996), en un medio de gel de silicio, a través de cromatografía en capa fina (ambas una y dos dimensiones), en el que los lípidos se han detectado a través del uso de los vapores de yodo (y autorradiografía en el caso de los lípidos etiquetados con 14 carbonos en su estructura). Además, los lípidos que contienen grupos amino se detectaron a través de la ninhydrin (reactivo), y los fosfolípidos se detectaron por el uso de molbidoato/H₂SO₄. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases utilizando cualquiera de las

técnicas, ionización de llama o espectroscopia de masas después de haber sido convertido a sus esteres metílicos derivados en presencia de HCl metalonico. Los principales grupos de lípidos polares se identificaron a través de la cromatografía gaseosa. Estos análisis indican que los lípidos pueden representar hasta un 45%-55% de la masa orgánica total de las células. La composición de éstos se detalla a continuación en el cuadro 3.1 y el cuadro 3.2.

Cuadro 3.1. Comparación de la composición de ácidos grasos de cadena corta de distintos tipos de aceites de origen vegetal con aceite de la microalga *Scenedesmus obliquus* (www.wikipedia.com, 2009)

Fuente del Aceite	Ácidos Grasos (%)					
	Linoléico	Linolénico	Palmitoléico	Palmítico	Oleico	Otros (saponificables)
Scenedesmus Obliquus	10.7 %	12.5 %	7.8 %	20.6 %	-	48.4 %
Palma Africana	-	-	-	50 %	40 %	10 %
Soja	54.0 %	7.5 %	-	11.0 %	22.0 %	5.5 %
Oliva	7.5 %	-	-	11.5 %	75.5 %	5.5 %
Girasol	50 %	-	-	-	15 %	35 %
Maíz	23 %	-	-	-	60 %	17 %

Cuadro 3.2. Comparación de la productividad de aceite vegetal de distintas especies oleaginosas y el aceite de microalgas (DOE, 1996).

CULTIVO		PRODUCTIVIDAD (LITROS/HECTAREA)
NOBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	
Maíz	Zea mays	172
Soja	Glycine max	446
Tempate	Jatrophas Curcas	1,892
Girasol	Helianthus annuus	2,689
Palma Africana	Elaeis guineensis	5,950
Microalgas (60 % lípidos en promedio)	–	136,900
Microalgas (20 % lípidos en promedio)	–	58,700

4.0 USOS INDUSTRIALES RECOMENDADOS PARA EL ACEITE OBTENIDO PARTIR DE LA MICROALGA *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

A partir de los resultados obtenidos en la sección correspondiente a la caracterización de los ácidos grasos, además, considerando la composición típica del aceite crudo de microalgas presentado en la Cuadro 3.1 de la sección 3.4, se presentaran a continuación los usos recomendados para este.

En la actualidad, el aceite de microalgas es utilizado en una amplia gama de aplicaciones, que van desde su uso como alimento, cosmético e incluso es utilizado como materia prima fundamental para la producción de biocombustibles.

Sin embargo, antes de recomendar los usos específicos, es necesario revisar la teoría disponible sobre aceites, con el fin de comprobar si el aceite obtenido a partir de microalgas se ajusta a estas definiciones.

4.1 ACEITES VEGETALES

Los conceptos generales sobre los aceites vegetales, definición, características y sus principales usos se detallan en las secciones 4.1.1 y 4.1.2.

4.1.1 DEFINICION.

Se denomina lípidos al complejo de productos naturales constituidos por los ésteres de los ácidos grasos superiores, parafínicos y monocarboxílicos, con los alcoholes como la glicerina u otro tipo de aceite (www.wikipedia.com, 2009).

Los lípidos se clasifican en tres grupos: simples, compuestos y derivados. Los lípidos simples están compuestos por grasas y ceras.

Los diferentes ácidos grasos que intervienen en la composición de los glicéridos son los que confieren las características particulares de cada aceite y determinan su comportamiento como nutriente.

Cuando predominan los ácidos grasos saturados, se mantienen sólidos o semisólidos a temperatura ordinaria (20 °C), constituyendo las grasas (predominantemente de origen animal y en algún caso de origen vegetal).

Mientras que si predominan los ácidos grasos no saturados son líquidos a dicha temperatura componiendo los aceites que se denominan fijos

En contraposición existen los aceites volátiles o esenciales que se extraen del grupo de las especies aromáticas. El grupo de las Oleaginosas comprenden solo las que se utilizan para extraer aceites fijos.

Los ácidos grasos más comunes son el palmítico, esteárico, butírico, etc. Entre los insaturados se destacan como monoinsaturados el oleico y como poliinsaturados el linolénico, linoléico, etc. De todos los ácidos grasos el más difundido en los vegetales es el oleico.

Las sustancias grasas naturales o lípidos son constituyentes normales de todos los organismos, jugando un papel insustituible en la nutrición.

En el reino vegetal las grasas se encuentran en mayor o menor proporción en todas las partes de la planta.

En las semillas terrestres generalmente los lípidos se encuentran en cantidades menores a los glúcidos, si existen en proporción superior se las llama semillas oleaginosas (soja, girasol, maní, algodón).

También pueden extraerse el aceite de especies vegetales marinas como las microalgas, poseyendo porcentajes en ocasiones muy superiores a las especies oleaginosas terrestres.

4.1.2 CALIDAD DE LOS ACEITES VEGETALES

La calidad de los aceites fijos es de gran importancia para justificar el cultivo de la especie que lo provee en forma rentable.

Existen una gran serie de propiedades e índices que en su conjunto revelan el grado de calidad y conservación del aceite. Ellos son: punto de fusión y de solidificación, densidad,

índice de refracción, índice de acidez, índice de yodo, índice de secantabilidad, índice de enranciamiento.

El grado de insaturación que presenten los ácidos que constituyen los glicéridos de un aceite, o sea cantidad de dobles ligaduras, determinará el grado de secantabilidad o poder secante de un aceite.

Los que poseen mayor cantidad de dobles ligaduras al ser expuestos al aire se oxidan (absorben O₂) espesándose y endureciéndose rápidamente. Los que poseen ésta propiedad se denominan **secantes** y generalmente son de uso industrial. El más representativo es el aceite de lino, luego le sigue el tung. Uno de los usos de estos aceites es en la industria de las pinturas.

Los aceites que bajo la acción del oxígeno del aire se oxidan, es decir que se espesan y endurecen más lentamente y no por completo, se llaman **semisecantes**. Aquí se encuentra la mayoría de los aceites comestibles. Por ejemplo soja, girasol, algodón, aceite de microalgas etc. Por último las **no secantes** no solidifican en absoluto, ni siquiera después de largo tiempo. Ej. Aceite de oliva, maní.

4.2 USOS DE LOS ACEITES VEGETALES

Hay que tener en cuenta que existen especies oleaginosas cuyo aceite no tiene un único uso, por lo cual hay que considerar ésta división en forma taxativa. Los usos principales de los aceites vegetales son:

1. Industriales
2. Comestibles
3. Fines diversos

a) Industriales: Dentro de este grupo el principal representante tanto a nivel mundial como nacional, es el aceite de lino.

Éstos aceites por su poder secante poseen valor industrial por ser aptos para producir capas protectoras, debido a la posibilidad de secarse después de su aplicación como películas bien adheridas y resistentes. Cada aceite tiene usos específicos. El aceite de

lino se emplea preferentemente en la elaboración de pinturas y tintas de imprenta, impermeabilización de telas, fabricación de hule, etc. También se destinan a la fabricación de lubricantes, en este caso interesa el bajo poder secante.

b) Comestibles: Los aceites vegetales tienen una importancia cada vez mayor en la alimentación. Juegan un papel importante en la fijación del calcio, caroteno, tiamina, lactosa y con sus vitaminas A, D, y K, contribuyendo a proveer parcialmente a las necesidades de la alimentación humana.

Entre las especies que proporcionan aceite comestible podemos citar: aceite de girasol, soja, maní, colza, algodón, cártamo, y en los últimos tiempos el aceite de microalgas.

Es importante considerar la calidad de los aceites comestibles. Ésta se mide por distintos parámetros:

- Grado de estabilidad: es la capacidad de mantener el sabor en el transcurso del tiempo, como también la resistencia a experimentar cambios frente a variaciones de temperaturas, altas o bajas.
- Características organolépticas: sabor, olor color, etc., inciden en la calidad de los aceites, pero las preferencias están asociadas a factores subjetivos del consumidor
- Nivel nutricional: Los distintos ácidos grasos que componen el aceite le otorgan características diferenciales, existiendo una relación directa entre dicha composición y el comportamiento en cuanto a la salud humana, especialmente en los problemas cardiovasculares y tasa de colesterol.

Dentro de los aceites comestibles comunes se destaca el de girasol con un 68% de linoléico, siendo Argentina un fuerte productor, aunque en los últimos dos o tres años cayó la superficie sembrada debido a cuestiones económicas, suplantándose esa superficie por soja.

c) Fines diversos: se utilizan aceites como por ejemplo de coco, jojoba, palma, etc. Se los utiliza en preparación de cosméticos, jabones, detergentes, etc.

En este caso existe un alto grado de sustitución con las grasas de origen animal. También compiten con ellos los productos sintéticos.

5.0 PRODUCCIÓN DE ACEITE A PARTIR DE LA MICROALGA *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

La presente investigación del tipo experimental, puede dividirse en cuatro etapas básicas para la obtención del aceite para usos industriales:

- a) Elección y obtención de la cepa de microalga.
- b) Crecimiento del cultivo.
- c) Cosecha de las microalgas.
- d) Extracción del aceite.

Debe tenerse presente en todo momento que se está trabajando con organismos unicelulares, lo que requiere consideraciones especiales detalladas en ésta sección.

5.1 ELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LA CEPA

Para la elección de la microalga a utilizar, se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- a) Tipo de microalga:** Según un estudio realizado departamento de energía de los Estados Unidos (DOE, 1996), existen tipos de microalgas que tienen tendencia a acumular más fácil y abundantemente lípidos en su estructura celular, por ésta razón, ellos recomiendan la utilización de microalgas verdes o verde-azules para este tipo de investigaciones.

- b) Disponibilidad de la cepa:** Aunque en la literatura se pueden encontrar microalgas con capacidad de acumular hasta el 85% de su peso en lípidos, posiblemente éstas no estén disponibles en las colecciones de cepas de las instituciones proveedoras cercanas o su transporte desde sus lugares de origen donde existen condiciones climáticas muy diferentes a las nuestras puedan dañar seriamente el microorganismo, por lo que, aunque sean más adecuadas para nuestros fines, no resulta conveniente, posible o viable trabajar con ellas. Lo que nos obliga a escoger entre las especies existentes en dichas condiciones y que puedan adaptarse a nuestro entorno climatológico.

c) Capacidad de acumulación de lípidos: Dentro de un determinado tipo de microalgas, algunas variedades pueden acumular mayores cantidades de lípidos que otras, por ésta razón, el contenido natural de éstos debe ser uno de los factores más determinantes a la hora de hacer nuestra elección.

d) Resistencia a cultivo masivo en nuestro medio ambiente: Como es natural, casi cualquier cepa de microalga podría crecer satisfactoriamente en un medio artificial con clima controlado como es un laboratorio de cultivo, sin embargo, el mantenimiento de éstas condiciones es económicamente inviable para cultivos grandes, por lo que el alga a escoger debe poseer la capacidad de aclimatarse a nuestras condiciones ambientales predominantes para que pueda crecer en cultivos masivos al aire libre, los cuales son de muy bajo costo económico.

e) Facilidad de cosecha y de extracción de los lípidos internos: Mientras más pequeña es una alga, más difícil será separarla del agua en que ha crecido. Los procesos de separación mecánicos como la centrifugación requerirán de mayor tiempo de trabajo y por ende gasto de energía. En el caso de la extracción, la posibilidad de utilizar medios mecánicos se vuelve más difícil a medida que el tamaño celular disminuye.

Tomando en consideración todos los factores anteriormente descritos, se procedió a la selección de la cepa a utilizar en ésta investigación (cuadro 5.1).

Para ello se recurrió la siguiente lista de microalgas sugerida por diversos sitios especializados (Internet) y se escogió una especie que se adecua a las condiciones esperadas (Nota: Los valores de las especies cuyo nombre terminan en sp, son promedios de todos los tipos de microalgas de esa especie).

Cuadro 5.1. Contenido de lípidos en las microalgas comúnmente utilizadas (Morton-Satin, 2004)

CONTENIDO DE LÍPIDOS DE DIVERSOS TIPOS DE MICROALGAS	
Alga	% Lípidos (materia seca)
Scenedesmus sp.	12-40
Chlamydomonas sp.	21
Clorella sp.	14-22
Spirogyra sp	11-21
Dunaliella sp.	6-8
Euglena so.	14-20
Prymnesium sp.	22-38
Porphyridium sp.	9-14
Synechococcus sp.	11

En base a ésta información y a otros datos sobre la ecología y fisiología de las microalgas, se seleccionó la microalga *Scenedesmus obliquus*, incluida en el cuadro 5.2. Posteriormente, se adquirió la cepa, tardándose aproximadamente dos semanas en llegar al laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos.

Cuadro 5.2. Composición proximal de la microalga *Scenedesmus obliquus*

Componente	Porcentaje
Proteínas	24.93
Carbohidratos	6.99
Lípidos	17.35

Fuente: Correa-Reyes, 1996 (Ver anexo C)

5.2 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Scenedesmus Obliquus*

El primer paso para llevar a cabo satisfactoriamente un cultivo de microalgas es contar con un medio de cultivo que permita el desarrollo adecuado de éstas, debe ser preparado de tal forma que favorezca las especies, para lo cual se necesitan las siguientes herramientas

- 1 Beaker de 500 ml
- Balanza analítica.
- 1 Espátula
- 1 Agitador

El procedimiento para preparar las soluciones se describe de la sección 5.2.1 a la sección 5.2.4.

5.2.1 SOLUCION DE NUTRIENTES MAYORES

Rotular 3 recipientes de plástico donde se colocarán las soluciones de nutrientes mayores. Las soluciones de NaNO_3 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (obtenidos de fertilizantes agrícolas comerciales) se pueden mezclar y todas se deben almacenar a temperaturas no mayores a 20°C (cuadro 5.3).

Cuadro 5.3. Soluciones de nutrientes mayores para el cultivo de *Scenedesmus Obliquus*

NUTRIENTES MAYORES	CONCENTRACION (g/ 100 mL de agua destilada)
NaNO ₃	7.5
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.5
NH ₄ Cl	2.65
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	3

Fuente: Correa-Reyes, 1996

5.2.2 SOLUCION FINAL DE NUTRIENTES TRAZA

Disolver 3.15 g de FeCl₆.6H₂O o 4.36 g de EDTA (Na₂) en 900 mL de agua destilada, agregar 1 mL de cada una de las soluciones stock primarias de nutrientes traza y aforar a 1 L.

5.2.3 SOLUCION FINAL DE VITAMINAS

Solución de biotina

Disolver 10 mg de biotina en 96 mL de agua destilada. Ésta solución debe hacerse ligeramente ácida (pH = 6 con ácido clorhídrico) antes de esterilizarse en el autoclave. Una vez fría manténgase en un congelador.

Solución de vitamina B12

A partir de cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/mL solución inyectable. Tomar 1 mL y aforarlo en 100 mL de agua destilada, acidificar a pH = 6 con ácido clorhídrico. Esterilizar en autoclave, enfriar y congelar.

Solución de vitaminas

Tomar 1 mL de la solución primaria de biotina y 0.1 mL de la solución stock primaria de vitamina B12, aforar a 100 mL con agua destilada y añadir 20 mg de tiamina HCl.

Se pueden preparar ampollas de 2, 5 ó 10 mL y almacenarlas estériles (acidificadas) en el congelador.

5.2.4 MEDIO F/2 DE GUILLARD

Para preparar el medio F/2 agregar 1 mL de cada una de las soluciones de nutrientes mayores, 1 mL de la solución final de nutrientes traza y 0.5 mL de la solución de vitaminas, por cada litro de agua de filtrada y de ser posible irradiada con UV como muestra el cuadro 5.4 (Stein, 1973).

Cuadro 5.4. Condiciones recomendadas para el mantenimiento de los cultivos de microalgas

Intensidad de la luz	2,000 – 4,000 lux
Fotoperiodo	Iluminación continua
Temperatura	15 – 22 °C
Salinidad	36 a 37%
pH	7 - 9

Fuente: Correa-Reyes, 1996

5.3 SIEMBRA DE CEPA Y ESCALAMIENTO DE CULTIVOS

Las cepas se pueden obtener por compra o intercambio con instituciones que cuenten con ceparios de especies marinas (tales como el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por ejemplo). Una vez liberadas de su empaque de viaje, deben ser sometidas a luz artificial durante 5 días para garantizar la recuperación de los organismos viables. En las secciones desde 5.3.1 hasta 5.3.6 se detallan los pasos para cultivar las microalgas por el método de escalamiento de cultivos. Los materiales y equipo necesario se lista a continuación:

- 2 Erlenmeyer 800 ml
- 10 Tubos de ensayo de 10 ml
- 2 Pipetas volumétricas de 5 ml
- 3 Beaker de 100 ml
- 1 Beaker de 500 ml
- 1 Bomba hidráulica de ½ HP
- 1 Compresor de aire de 5 HP
- 5 Metros de manguera plástica de ¼ In.

- 10 Lámparas fluorescentes de 4 vatios
- 10 recipientes de vidrio de 5 galones
- 1 tanque para agua de 1200 lt de capacidad
- 1 tanque para agua de 25,000 litros de capacidad

5. 3. 1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación del agua que se utilizara para los cultivos, debe tratarse ésta con 5 ppm de tiosulfato de sodio comercial para eliminar el cloro que contiene (en el caso del agua potable).

Si el agua que se va a utilizar es extraída directamente de un pozo, debe filtrarse y tratarse con 2 ppm de EDTA para eliminar iones metálicos indeseables.

Finalmente se trato el agua con las cantidades indicadas de tiosulfato de sodio (figura 5.1), pues fue tomada del sistema público de agua potable, siendo depositada en una piscina destinada a la adecuación de ésta.

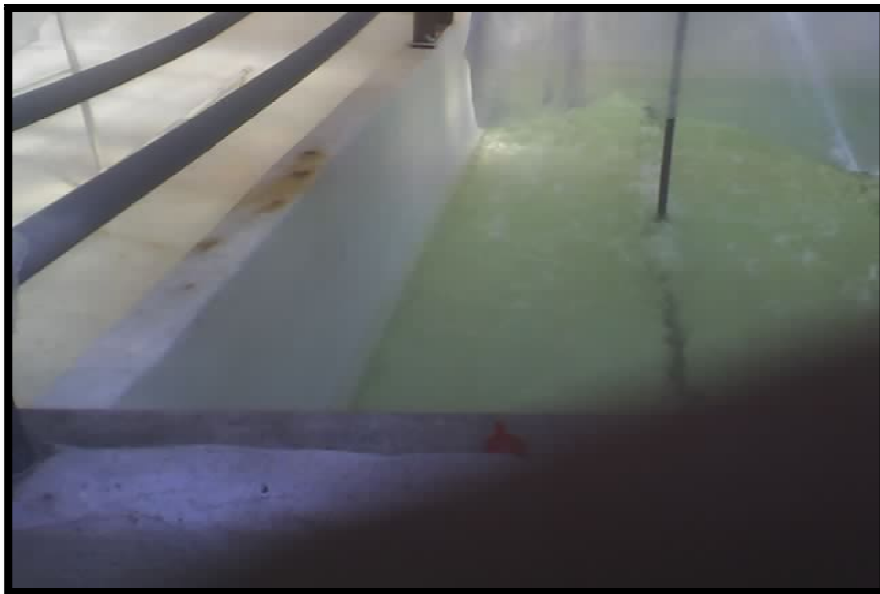


Figura 5.1. Piscina de acondicionamiento de agua para el cultivo de *Scenedesmus obliquus* (Preparada durante la realización de ésta investigación, 2009)

5. 3. 2 MANTENIMIENTO DE CEPAS.

En términos generales se puede decir que en ésta etapa las cepas (stocks) de algas se mantienen en fiolas o matraces de 250 cc con 100 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo se prepara según el procedimiento descrito para cada caso y según la especie, sea ésta de mar o de agua dulce (en nuestro caso, el procedimiento descrito anteriormente). Ésta etapa tiene carácter de cultivo axénico por lo que un máximo de cuidado se debe tener para no contaminar las cepas. La intensidad de luz debe estar entre 500 y 1000 lux y la temperatura de 15 a 22 grados centígrados constante. Las cepas también se mantienen en tubos de ensayo con tapa rosca o de algodón de 10 cc.

Para este caso específico, se utiliza el siguiente procedimiento:

- Depositar 6 ml de agua dulce tratada en cada tubo de ensayo.
- Agregar 2 ml de medio de cultivo "f" de Guillard.
- Colocar 2 ml de cepa en cada tubo de ensayo.
- Tapar los tubos y agitar.
- Colocar los tubos frente a una lámpara de tubo de 40 watts
- Mantener el stock de tubos a 22°C
- Debe observarse crecimiento apreciable en un día máximo.

Luego de mantener los tubos de ensayo a una temperatura de 22 °C e iluminados todo el tiempo (figura 5.2), se logro observar en cada uno de ellos un crecimiento adecuado hasta llegar a un punto donde la cantidad de biomasa permaneció constante por espacio de un mes.

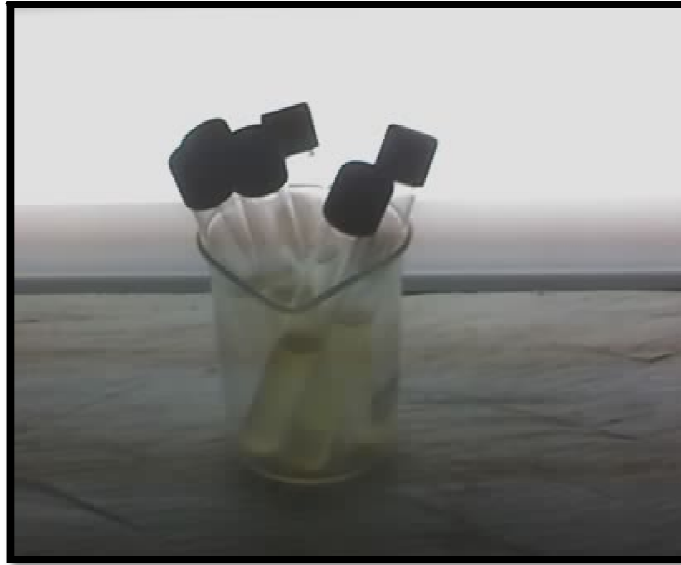


Figura 5.2. Reserva de cepas de microalgas *Scenedesmus obliquus*, luego de 12 horas de exposición a la luz desde el momento de la primera inoculación (Preparada durante la realización de ésta investigación)

5.3.3 CULTIVO INICIAL

El cultivo inicial se desarrolla en fiolas o erlenmeyer de 800 cc con 250 ml de medio. La inoculación de las algas se realiza cuando los erlenmeyer esterilizados han alcanzado la temperatura ambiente, transfiriendo asépticamente bajo una campana de luz, un volumen de 1 a 5 ml de cepa al medio fresco. La boca de éstos recipientes se debe flamear para “quemar” microorganismos que pueden ingresar al interior. Luego de la inoculación los matraces son puestos en la estantería iluminada junto a uno de los matraces viejos para observar luego de uno a dos días el crecimiento rápido del nuevo cultivo. Éstos cultivos deben agitarse manualmente en forma periódica y suavemente, a fin de variar la posición de las células. La intensidad de luz debe estar entre 1500 y 2000 lux. Basados en el procedimiento anterior, se deben llevar a cabo los siguientes pasos:

- Esterilizar los matraces agregándoles agua en su punto de ebullición.
- Sellar los erlenmeyer con papel aluminio hasta que alcancen su temperatura ambiente.
- Una vez enfriados, debe colocarse 600 ml de agua tratada según el procedimiento descrito en la sección anterior.
- Agregar 100 ml de medio f de Guillard a cada erlenmeyer.

- Agregar el contenido un tubo de ensayo a cada erlenmeyer.
- Sellar con papel aluminio.
- Colocar los cultivos frente a una fuente luminosa y a una temperatura de 22°C.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3.3, se escalaron los cultivos de un volumen inicial de 10 ml hasta 700 ml, observando un crecimiento adecuado en todos los erlemeyer al cabo de 24 horas (figura 5.3).



Figura 5.3. Cultivos de microalgas *Scenedesmus obliquus*, 36 horas después de comenzar el proceso de cultivo (Preparada durante la realización de ésta investigación)

5.3.4 CULTIVO INTERMEDIO

Ésta etapa se desarrolla en fiolas o matraces de 1000 a 2000 cc, con medios del 60 al 65% de la capacidad total. Se transfieren los antiguos cultivos que hacen de stock (cultivo inicial) de 4 a 7 días.

Ésta inoculación se hace bajo el mismo esquema del caso anterior evitando que las algas sedimentadas pasen al nuevo medio. Se transfieren aproximadamente del 80 al 90% del volumen total. Los nuevos recipientes son agitados con aire filtrado a máximo 1µm. La temperatura se puede mantener a alrededor de 20 grados centígrados, igual que para la etapa anterior. La intensidad de luz puede ajustarse entre 2000 y 2500 lux.

Aunque el proceso de escalamiento recomienda la utilización de los volúmenes intermedios, la microalga *Scenedesmus obliquus* no requiere una adecuación tan minuciosa a los nuevos volúmenes, por lo que a pesar de contar con los recipientes

adecuados, se obvió este paso, sin embargo, se incluye debido a su importancia para otras especies.

5.3.5 CULTIVO RECIPIENTES CON CAPACIDAD DE 10 A 20 LITROS

Los cultivos intermedios son empleados como inóculo para los recipientes de 10 a 20 litros. El agua, antes de ser enriquecida con los nutrientes es bien filtrada a $1\mu\text{m}$ y esterilizada con UV (de ser posible). Dejar en reposo el agua por una hora para reducir los peróxidos generados, fertilizar e inocular. Estos peróxidos afectan los pigmentos fotosintéticos de las algas. Flamear la boca de cada recipiente y tomar las precauciones del caso para prevenir la contaminación, evitando además transferir las algas sedimentadas de los cultivos intermedios. La intensidad luminosa se ajusta entre 2000 y 5000 lux. La temperatura se mantiene entre 20 y 22 grados centígrados. En cultivos batch las poblaciones algales alcanzan densidades mayores a los 4 millones de células por ml. Filtrar el aire como en el caso anterior.

De la teoría anterior se infieren los siguientes pasos:

- Lavar 10 recipientes de vidrio de 5 galones de capacidad con una solución al 40 % de ácido muriático para piscinas.
- Enjuagarlos hasta eliminar cualquier resto de ácido.
- Llenar cada uno de ellos con agua previamente tratada con tiosulfato de sodio.
- Agregar 300 ml de medio f de Guillard.
- Verter el contenido un erlenmeyer luego de 24 horas de haber sido inoculado.
- Sellar el recipiente con un tapón bihoradado, introduciendo la manguera del aire (previamente filtrado) en uno de los agujeros del tapón.
- Colocar el recipiente frente a una fuente luminosa a una temperatura de aproximadamente 22 °C.
- El cultivo debe estar en su punto óptimo para pasar a la siguiente etapa luego de entre 24 a 30 horas.

Luego de 29 horas de la inoculación de los recipientes de 5 galones (figura 5.4), se pudo observar pronunciados cambios al pasar el agua de una tonalidad ligeramente verde a una muy intensa, debido al gran aumento en las células de microalgas. En este punto, un factor muy importante es la agitación de las células, en nuestro caso, aprovechamos el

flujo de aire insertado, el cual mantiene las microalgas en suspensión evitando la formación de gradientes.

El tiempo de crecimiento puede variar debido a que al principio las microalgas sufren una fase de acostumbramiento a su nuevo medio (temperatura, composición del agua, etc), diferente al de su lugar o país de origen. A medida que las células se van reproduciendo en las nuevas condiciones, su velocidad de crecimiento puede experimentar un importante incremento.



Figura 5.4. Cultivos de microalgas *Scenedesmus obliquus*, luego de 60 horas de iniciado el proceso de cultivo (Preparada durante la realización de ésta investigación)

5.3.6 CULTIVOS MASIVOS

El grado de contaminación bacteriana es mayor en ésta etapa. La iluminación por lo general se coloca en la parte superior de los recipientes y la intensidad puede estar entre 4000 y 5000 lux. Los recipientes para estos cultivos son blancos en su parte interior o son transparentes en su totalidad. Los inóculos son obtenidos de la etapa anterior que presentan un crecimiento rápido y carecen de sedimento. En los cultivos masivos la aireación no se filtra y generalmente se desarrolla externamente, aprovechando la iluminación del sol

Es posible descomponer la teoría anterior en los siguientes pasos:

- Lavar un tanque de 1,200 o 25,000 litros con una solución 20% de ácido muriático.
- Enjuagar el tanque hasta eliminar por completo el ácido.
- Colocar el sistema de aireación de tubo de pvc en el fondo del tanque.
- Llenar el tanque hasta casi el total de su capacidad con agua tratada con tiosulfato de sodio.
- Inocular con el contenido de 5 recipientes de 5 galones los tanques de 25,000 litros.
- Para los tanques de 1,200 litros inocular con el contenido de un recipiente de 5 litros (figura 5.5).
- Permitir un tiempo de crecimiento de aproximadamente 36 horas antes de proceder a cosechar las microalgas.
- Los cultivos masivos pueden realizarse a temperatura ambiente y al aire libre.
- Aunque en ésta etapa no es rigurosamente necesaria la fertilización del medio, puede agregarse de un 0.5% a 1% de de una solución de nutrientes mayores, cuya composición fue descrita en la sección 5.2.1.



Figura 5.5 Tanques de 1,200 litros luego de 96 horas de iniciado el proceso de inoculación (Preparada durante la realización de ésta investigación)

5.4 COSECHA DE MICROALGAS

Para la cosecha de las microalgas es posible utilizar tres métodos: filtración, floculación y centrifugación.

El método elegido dependerá de forma en que se planea realizar la extracción de lípidos del interior de la célula. Por ejemplo, si el objetivo es utilizar presión para obtener el aceite, será necesario secar lo mejor posible la biomasa de microalgas y por ende, utilizar filtración o centrifugación (y posteriormente una deshidratación solar o artificial), en cambio, si se elige un método basado en arrastre por vapor, aprovechando su contenido de agua, solo será necesario concentrar al máximo la biomasa sin extraerla de las aguas madres, sin embargo, el gasto en energía será considerablemente más alto.

En la presente investigación se practicará una metodología basada en la extracción a través de la aplicación de presión, lo que nos permitirá comprobar la viabilidad y factibilidad de la obtención de aceites a partir de microalgas. Es necesario destacar que uno de los motivos más importantes para elegir dicho método es debido a que técnicamente es más plausible con los recursos con que se cuentan para la realización de este trabajo.

Por lo anteriormente expuesto, se aprovechó la capacidad de autofloculación de la microalga *Scenedesmus obliquus*, que forma micelios de 3 o 4 células, las que debido a su peso, tienden a sedimentar en el fondo de los recipientes que la contiene al cabo un día. Para que esto suceda basta con cesar la aireación del cultivo. Al sedimentarse la biomasa algal, adquiere la densidad necesaria para pasar a la fase de extracción de aceites.

5.4.1 OBTENCION DE BIOMASA PARA EXTRACCION DE LIPIDOS

Con el objetivo de procesar las microalgas para la posterior extracción de lípidos, es necesario disminuir la cantidad de agua en la que están inmersas. Por ésta razón, se someterán a un proceso de secado que permitirá alcanzar niveles de humedad más adecuados para el uso de una prensa extractora (figura 5.8).

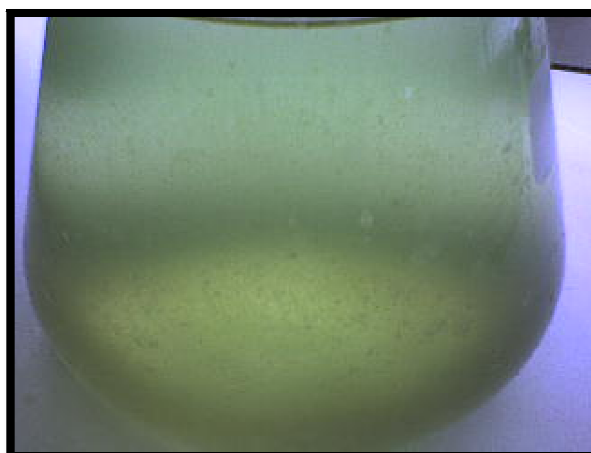


Figura 5.6. Efecto floculante luego de la adición de sulfato de aluminio en la biomasa de microalgas (Preparada durante la realización de ésta investigación)

a) MATERIAL Y EQUIPO

- 1 Bomba hidráulica de ½ HP.
- 1 barril plástico de 55 galones.
- 10 yardas de plástico de cualquier color.
- 20 ladrillos.
- 1 Beaker de 1 litro.
- 1 Agitador.
- 1 Balanza analítica

b) REACTIVOS

- Sulfato de aluminio (Al_2SO_3)

c) PROCEDIMIENTO

- Disolver 50 gramos de sulfato de aluminio (floculante) en un litro de agua.
- Agregar 100 ml de la solución de floculante para un tanque de 1,200 litros.
- Agregar 500 ml de la solución floculante para los tanques de 25,000 litros.
- Luego de media hora, cortar el flujo de aire del tanque.
- Permitir la sedimentación de las microalgas por espacio de dos a tres horas, hasta que las aguas superficiales se vean transparentes.

- Conectar la bomba hidráulica y succionar las microalgas sedimentadas en el fondo del tanque.
- Depositar la suspensión altamente concentrada de microalgas en el barril de 50 galones (figura 5.7).
- Con el plástico y los ladrillos, improvisar una piscina para el secado de las microalgas (figura 5.8).
- Secar al sol para remover la máxima humedad posible.
- Recolectar la biomasa.



Figura 5.7. Solución extremadamente concentrada de microalgas succionada del fondo del tanque tres horas después de agregar el floculante (Preparada durante la realización de ésta investigación)



Figura 5.8. Piscina improvisada para el secado de la biomasa algal (Preparada durante la realización de ésta investigación)

5.4.2 DETERMINACION DE LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA DEL CULTIVO Y HUMEDAD DE LA MUESTRA CONCENTRADA DE MICROALGAS PARA EXTRACCION.

El objetivo de ésta sección es determinar la cantidad de biomasa seca que se puede cultivar en un determinado volumen de agua cuando el cultivo ha alcanzado densidad máxima, es decir, aproximadamente 36 horas después de ser inoculado en el tanque de crecimiento. Para esto, se filtrara un volumen conocido de líquido de cultivo, el cual posteriormente se someterá a una temperatura de 85 °C durante 2 horas y treinta minutos para luego enfriar en un desecador de silica gel (A.O.A.C, 1990).

En la segunda parte, se determinara la humedad del concentrado de microalgas que se colocara en la celda de extracción, cabe mencionar que ésta humedad es externa, pues no toma en cuenta el agua que existe en el interior de la celular. Para este fin, se repetirán los mismos pasos que se utilizaron para determinar la productividad.

a) MATERIAL Y EQUIPO

- 1 Beaker de 100 ml o un crisol de porcelana.
- 1 Estufa.

- Papel filtro número 16.
- 1 Embudo de vidrio.
- 1 Balanza analítica.
- 1 Sistema desecador en base a silica gel.

b) PROCEDIMIENTO

- Tomar 10 ml de cultivo del microalgas antes de cosechar (36 horas después de la inoculación al tanque).
- Pesar una porción de papel filtro con la que se separaran las microalgas del agua.
- Proceder a la filtración para obtener la biomasa húmeda de células algales.
- Calentar la muestra a 85°C durante dos horas y media, colocando el papel filtro en un crisol o Beaker y depositándolo en una estufa.
- Retirar el crisol o Beaker e introducirlo en un desecador en base a silica gel hasta que la muestra llegue a temperatura ambiente. Retirar el papel filtro y pesar en una balanza analítica.
- Calcular la productividad de biomasa por litro y repetir este proceso para la determinación de la humedad de la muestra para extracción, utilizando un volumen conocido de microalga floculada como objeto de análisis (resultados presentados en el cuadro 5.6):

$$\text{Productividad (gr/Litro)} = ((M_{\text{Tara + muestra}}) - M_{\text{Tara}}) \times 100$$

Relación válida para el cálculo de Humedad y Productividad

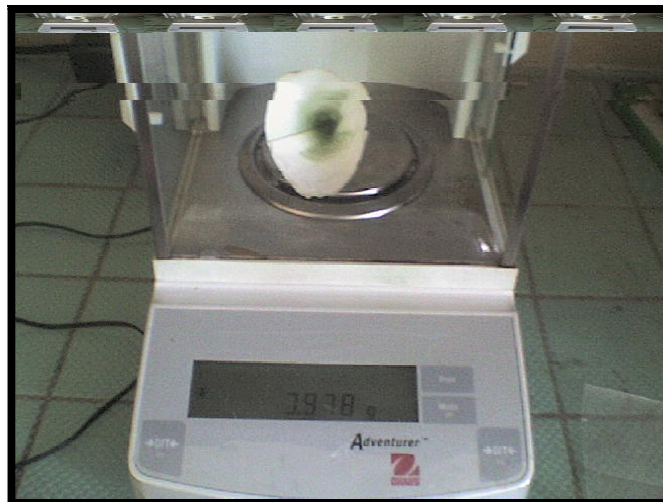


Figura 5.9. Medición de la productividad de biomasa de *Scenedesmus obliquus* (Preparada durante la realización de ésta investigación)

c) CALCULOS Y RESULTADOS

Luego de realizar el procedimiento anterior, y practicando por triplicado cada proceso de medición, se llegó a los mostrados en el cuadro 5.5:

Cuadro 5.5. Medición de la productividad de biomasa de *Scenedesmus obliquus*.

MEDICIÓN	PRUEBA 1	PRUEBA 1	PRUEBA 3
TARA	0.938 g	0.921 g	0.932 g
TARA + MUESTRA	0.978 g	0.967 g	0.981 g
PESO DE BIOMASA	0.04 g	0.046 g	0.047 g
PRODUCTIVIDAD DE <i>Scenedesmus obliquus</i>	4 g/L	4.6 g/L	4.7 g/L

En promedio, el valor de la productividad reportada de la biomasa es de 4.43 gramos de microalga por litro de agua de cultivo (0.443 % expresado en relación de masa/volumen).

Cuadro 5.6. Medición de la humedad de la biomasa que se utilizó en la extracción de los lípidos de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

MEDICIÓN	PRUEBA 1	PRUEBA 1	PRUEBA 3
VOLUMEN	200 ml	200 ml	200 ml
MASA DE MICROALGA SECA	98.256 g	97.306 g	95.167 g
% HUMEDAD EXTERNA	50.872 %	51.347 %	52.417 %

En promedio, el valor de la humedad externa reportada de la biomasa que se depositó en la celda de extracción fue de 51.545%. Se determinó según la relación:

$$\% \text{ Humedad} = (1 - \text{Masa de microalga seca} / \text{Volumen de muestra}) \times 100$$

5.5 EXTRACCION DE LIPIDOS

Una vez concentrada el alga en el fondo del tanque, se procedió a extraerla por medio de un sifón, del cual pasará a un erlenmeyer en donde se llevará a cabo el proceso de recuperación de los lípidos.

Para esto se utilizó el método de la prensa, que también se le conoce como “expresión”. El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo discontinuo ó en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa.

Se colocaron 200 ml de biomasa concentrada con 51.545% de humedad en un cilindro hueco a manera de camisa metálica, el cual procedió a ser sellado con un cilindro sólido que funcionó como un pistón. La camisa fue previamente perforada por medio de un taladro que utilizaba brocas de 0.5 mm de diámetro.

Posteriormente se le colocó en el fondo del cilindro hueco dos pedazos de papel filtro con forma circular, que permitieron detener las células y evitar que sean expulsadas en los orificios de la camisa debido a la alta presión a la que fueron sometidos.

Se colocó la celda (camisa metálica más pistón) en una prensa hidráulica con capacidad de generar 80 toneladas de presión, la cual se encargó de exprimir las células, permitiéndonos obtener los lípidos contenidos en éstas, además de otros líquidos orgánicos como la clorofila y algunas células que lograran pasar a través del papel filtro. El fluido producto de la compresión se dejó decantar a baja temperatura, solidificando los lípidos y permitiendo recuperarlos de forma fácil. En la sección 5.5 se presentan los pasos a seguir para llevar a cabo la extracción de lípidos.

a) MATERIAL Y EQUIPO

- 1 Beaker de 200 ml.
- 1 Balanza semianalítica.
- Papel filtro número 16.
- 1 Celda de extracción.
- 1 Prensa hidráulica de 80 toneladas.
- 1 Soplete de acetileno.
- 1 Torno.
- Papel lija.

b) PROCEDIMIENTO

- Tomar un volumen conocido de biomasa concentrada de microalgas.
- Cortar una porción circular de papel filtro con las mismas dimensiones de la camisa del pistón (base de papel filtro #36).
- Determinar la masa de microalgas libre de humedad según el procedimiento de la sección 5.4.2.

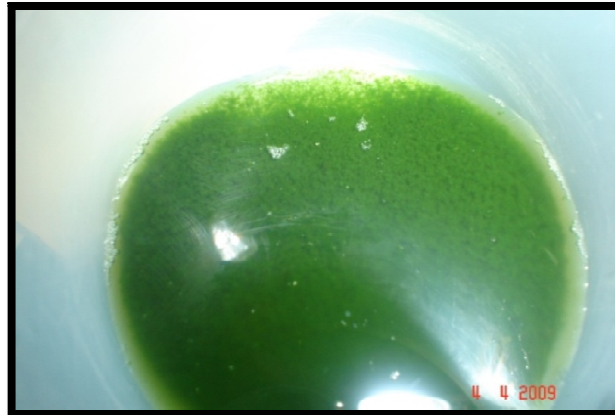


Figura 5.10. Muestra de biomasa de *Scenedesmus obliquus* a exprimir, aun con alto contenido de humedad (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Pulir la celda de extracción en el torno, utilizando papel lija con el fin de remover restos de oxido e impurezas que podrían interferir el en proceso de compresión.



Figura 5.11. Limpieza de la celda de extracción de lípidos, ésta debe realizarse periódicamente para asegurar que no existan fugas de líquidos. (Preparada durante la realización de ésta investigación)

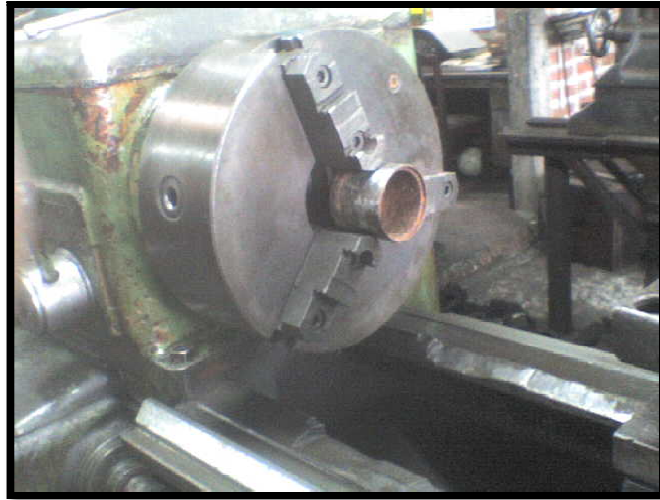


Figura 5.12. Torno utilizado para el lijado de la camisa del pistón, lo cual asegura un desplazamiento adecuado de este (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Desarmar la celda de extracción, diferenciando sus componentes: El pistón, la camisa y el depósito de recepción de aceite.



Figura 5.13. Partes de la celda de extracción de aceite de microalgas: El sistema de pistón y el recipiente para recibir el fluido rico en lípidos (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Colocar el volumen de microalgas en la camisa de la celda de acero (previamente provista de una base de papel filtro), hasta llenar aproximadamente la mitad de ésta.
- Tapar la camisa con el pistón, asegurándose que quede bien ajustado a la abertura.

- Complementar la celda de acero colocando el depósito para el aceite en la parte inferior de ésta.



Figura 5.14. Agujeros de la camisa del pistón, cuyo diámetro es inferior al de un alfiler (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Colocar la celda en la prensa hidráulica de 80 toneladas para proceder a la extracción, asegurándose que la barra de acero de ésta se acople a la parte superior de la celda de extracción.



Figura 5.15. Equipo de prensado de microalgas (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Someter la celda con la muestra a la máxima presión de la prensa durante 5 minutos.



Figura 5.16. Prensado de microalgas en acción (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Retirar la celda de la prensa.

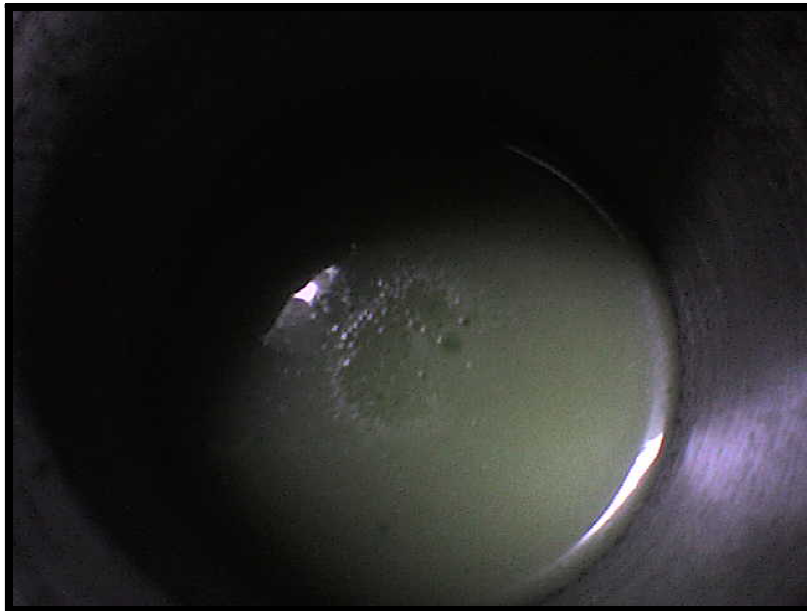


Figura 5.17. Lípidos obtenidos luego de la extracción (Preparada durante la realización de ésta investigación)



Figura 5.18. Aceite crudo de microalgas (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Remover el recipiente del aceite y recolectar este en el beaker de 200 ml.



Figura 5.19. Beaker conteniendo el aceite extraído de la muestra de microalgas (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Retirar el pistón calentando la camisa metálica con el soplete de acetileno, logrando de ésta forma la dilatación de ésta.
- Dejar enfriar y recolectar el bagazo quemado de microalgas.



Figura 5.20. Restos de microalgas calcinadas luego de separar el pistón calentando la camisa con un soplete de acetileno (Preparada durante la realización de ésta investigación)

- Pesar el aceite y los restos de la biomasa.

c) CALCULOS Y RESULTADOS DEL PROCESO DE EXTRACCION DE ACEITE CRUDO.

Los cálculos se dividieron en dos partes, en el cuadro 5.7 se presentan los datos referidos a la caracterización de la materia prima, en el cuadro 5.8, se resumen los resultados de la extracción de aceite crudo de microalgas.

a) CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA

Una vez llevado a cabo el proceso de extracción del aceite crudo de microalgas, se determinaron los diferentes rendimientos de cada etapa del proceso. En principio, se presentan los valores y tamaños de las muestras utilizadas para dichas mediciones (cuadro 5.7). Para el cálculo de de la masa de microalgas seca, se utilizaron los datos del contenido de humedad presentados en la sección 5.4.2 y según la relación:

Cuadro 5.7. Parámetros de las muestras de biomasa utilizadas para las extracciones

MEDICIÓN	PRUEBA 1	PRUEBA 2	PRUEBA 3
Volumen de muestra	200 ml	200 ml	200 ml
Masa de Microalga seca (sin considerar el 51.545 % de humedad externa)	96.910 g	96.910 g	96.910 g

b) PRODUCTOS OBTENIDOS DEL PROCESO DE EXTRACCION

Una vez concluido el proceso de extracción de lípidos, se procedió a la medición de los siguientes parámetros, entre los que destaca el rendimiento de extracción, calculada según la relación que se escribe a continuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa obtenida de aceite crudo}}{m^2 \text{ área de cultivo} \times m^3 \text{ de volumen cultivado}}$$

El rendimiento se refiere a un ciclo de crecimiento de 96 horas. Para el cálculo del rendimiento de extracción, se utilizaran los datos de del cuadro 5.5, ya que conociendo la masa de microalgas de donde se extrajo el aceite (cuadro 5.7), se puede extrapolar el volumen de agua de cultivo luego de 96 horas, según la fórmula de rendimiento antes planteada y para muestras de 200 ml (con 51.545 % de humedad externa). Se extrapolan los datos de la muestra al volumen total del tanque.

Cuadro 5.8. Datos recolectados luego de la extracción de aceite

MEDICIÓN	PRUEBA 1	PRUEBA 2	PRUEBA 3
Volumen de aceite crudo	9.023 ml	8.756 ml	9.236 ml
Peso de la biomasa residual	83.326 g	84.255 g	83.651 g
Peso del aceite crudo	8.326 g	8.080 g	8.523 g
Rendimiento	0.4484 kg/m ² .m ³	0.4480 kg/m ² .m ³	0.4822 kg/m ² .m ³

Cuadro 5.9. Reporte final de datos de la extracción de aceite

VALOR PROMEDIO	Volumen del aceite	Peso de la biomasa residual	Peso del aceite crudo	Rendimiento (para ciclo de 96 horas)	Área cultivada (por tanque)
Volumen de aceite crudo	9.061 ml	83.872 g	8.361 g	0.4842 kg/m ² .m ³	0.9235 m ²

6.0 CARACTERIZACION PARA EL USO ACEITE OBTENIDO PARTIR DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*

Una vez realizado el proceso de extracción y obtenido el aceite a partir de la biomasa microalgal, el siguiente paso es caracterizar los lípidos con el fin de recomendar usos adecuados para éstos.

Se realizaron diversos análisis, entre los cuales tenemos:

- Densidad del aceite
- Contenido de humedad
- Contenido de sólidos
- Contenido de ácidos grasos

En las secciones 6.1 a 6.4, se detallará el procedimiento y resultados obtenidos de cada uno de los mencionados análisis.

6.1 DETERMINACION DE LA DENSIDAD DEL ACEITE DE MICROALGAS

Se determinó la densidad del aceite crudo de microalgas a la temperatura ambiente utilizando un método gravimétrico indirecto de relación de propiedades. El procedimiento gravimétrico para la determinación de la densidad es el siguiente:

a) MATERIAL Y EQUIPO

- 1 Matraz de 40 ml.
- 1 Balanza analítica.
- 1 Termómetro.

b) PROCEDIMIENTO

- Homogenizar la muestra.
- Pesar el matraz de 40 ml vacío en la balanza analítica y calibrar a cero.
- Aforar el matraz de 40 ml con el aceite de microalgas.
- Pesar la muestra y determinar la densidad según la relación siguiente.

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Donde:

ρ = Densidad del aceite crudo de microalgas.

m = Masa del aceite determinada en la balanza analítica.

v = Volumen del matraz aforado con aceite.

c) CALCULOS Y RESULTADOS

Solo se realizo una medición debido a la precisión y exactitud del equipo utilizado, el resultado se presenta en el cuadro 6.1, acompañado de la densidad calculada.

Cuadro 6.1. Reporte final de la determinación de la densidad de aceite de la microalga *Scenedesmus obliquus*

MEDICIÓN REALIZADA	VALOR OBTENIDO
Volumen de aceite	50 ml
Masa de aceite	46.1405 g
Densidad (25°)	0.9228 g/ml

6.2 CONTENIDO DE AGUA DEL ACEITE CRUDO DE MICROALGAS

Para determinar el contenido de humedad del aceite crudo extraído de la biomasa procesada en la celda de extracción, se recurrió a los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad de El Salvador, donde se practicaron diferentes métodos de separación a la muestra de lípidos.

Los métodos utilizados para la determinación de la humedad fueron la evaporación, separación por medio de solventes orgánicos y separación natural de la muestra. Los resultados reportados se presentan en el cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Valor reportado de humedad del aceite de la microalga *Scenedesmus obliquus*

PORCENTAJE DE HUMEDAD	PORCENTAJE DE ACEITE CRUDO
0.94 %	99.06 %

6.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE SOLIDOS DEL ACEITE CRUDO DE MICROALGAS

Para la determinación del contenido de sólidos en el aceite crudo de microalgas, se siguió el procedimiento indicado por la norma ASTM D-2709 en las instalaciones de la Planta Piloto de la Escuela de Ingeniería Química, la cual se describe a continuación.

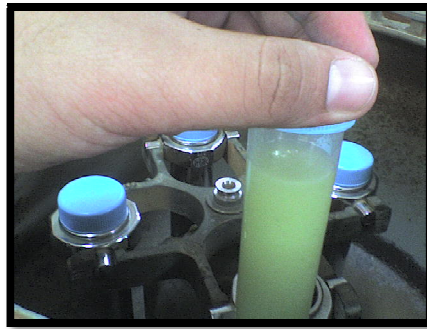


Figura 6.1. Aceite crudo de microalgas sometido a fuerzas centrifugas (fuente: Obtenida durante la realización de ésta investigación)

a) MATERIAL Y EQUIPO

- Tubos de centrifuga de marca de 50 – 100 ml.
- 1 Gradilla.
- Maquina Centrifuga.
- 1 Pipeta graduada de 25 ml.
- 1 Probeta graduada de 250 ml.
- 1 Frasco lavador

b) PROCEDIMIENTO

- Colocar 10 ml del aceite crudo de microalgas en cada uno de los 4 tubos de la centrifuga, tapándolos cuidadosamente para evitar fugas.

- Una vez depositado el aceite en los tubos, agitar con el fin de homogenizar el contenido antes de colocarlos en la centrifuga.
- Calcular la velocidad de rotación con el diámetro del swing a un rango de 500 – 800 revoluciones por minuto, dado por la Cuadro 2 de la norma ASTM D-1796 Vol. 05.01.
- Mantener la velocidad durante 10 minutos.
- Repetir hasta distinguir el volumen separado de sólidos.
- Una vez lograda la separación de las fases, calcular el porcentaje de sólidos según la relación:

$$\% \frac{V}{V} = \frac{\text{Volumen de sólidos}}{\text{Volumen Total}} \times 100\%$$

Donde:

%V/V = Porcentaje del volumen total que corresponde al volumen de los sólidos.

- Reportar el valor promedio de los cuatro tubos de la centrifuga.

c) CALCULOS Y RESULTADOS

Luego de diez minutos de someter las muestras a la acción de la fuerza centrifuga y determinando el volumen de sólidos por diferencia al decantar el aceite, se presentan en el cuadro 6.3 los resultados estimados.

Cuadro 6.3. Contenido de sólidos del aceite crudo de *Scenedesmus obliquus*

TUBO	VOLUMEN DE MUESTRA	VOLUMEN DE SOLIDOS
1	10 ml	0.8 ml
2	10 ml	0.9 ml
3	10 ml	No detectado
4	10 ml	0.5 ml
% DE SÓLIDOS (V/V)		0.73 %

6.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN ACEITE CRUDO DE MICROALGAS

Para cuantificar el contenido de ácidos grasos libres en el aceite de microalgas, fue necesario recurrir al procedimiento descrito en la norma ASTM – 5555, en el cual indica una neutralización de éstos con una sustancia básica de concentración conocida, comúnmente se utilizan el hidróxido de sodio o de potasio.

El método requiere la neutralización de una cantidad determinada de muestra, y como ésta es inmisible con la fenolftaleína (indicador del punto de vire), se agregar alcohol etílico para lograr el contacto del indicador con el analito (procedimiento realizado en la Planta Piloto de la Escuela de Ingeniería Química).

a) MATERIAL Y EQUIPO

- 1 Erlenmeyer de 250 ml
- 1 Beaker de 250 ml
- 1 Bureta de 500 ml
- 1 Balón volumétrico de 1.5 Lits.
- 1 Agitador
- 1 Vidrio de reloj
- 1 Balanza semianalítica
- 1 Probeta de 150 ml
- Alcohol etílico
- Fenolftaleína
- Solución 0.1 N de hidróxido de sodio.

b) PROCEDIMIENTO

- Colocar 2 muestras 35.00 gr de aceite en Beakers de 250 ml por separado.
- Agregar 2 ml de solución de fenolftaleína (indicador) y 100 ml de etanol a cada una de las muestras.
- Homogenizar las mezclas anteriores y proceder con la titulación, agregando lentamente la solución de hidróxido de sodio hasta observar una coloración rosada en éstas.

- Una vez la coloración alcance una duración de al menos 30 segundos, medir la cantidad de titulante adicionado y calcular el porcentaje de ácidos grasos con la fórmula presentada a continuación.

$$\% \text{ Ácidos grasos libres} = \frac{V_{\text{Hidroxido}} \times N \times 28.2}{W_{\text{muestra}}} \times 100$$

Donde:

V = Volumen de hidróxido de sodio expresado en mililitros.

N = Normalidad del titulante.

W = Peso de la muestra expresado en gramos.

Cabe mencionar que el factor con valor de 28.2 se refiere a los equivalentes gramo de la reacción, el cual fue calculado en base a los electrones transferidos en la neutralización.

Es posible además convertir los valores medidos de fracción de ácidos grasos libres a número ácido multiplicando este valor por 1.99.

c) CALCULOS Y RESULTADOS

En el cuadro 6.4 se presentan los resultados de la titulación llevada a cabo con una solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Las mediciones fueron tomadas al aparecer una coloración rosada durante al menos 30 segundos en la muestra.

Cuadro 6.4. Determinación de los ácidos grasos libres del aceite crudo de *Scenedesmus obliquus*

MUESTRA	MASA DE MUESTRA	VOLUMEN DE TITULANTE	% ÁCIDOS GRASOS LIBRES	NÚMERO ÁCIDO
1	35.03 g	8.6 ml	68.72 %	1.367
2	35.06 g	8.4 ml	67.36 %	1.340

Por lo tanto, se reporta el valor medio para el porcentaje de ácidos grasos libres como:

$$\% \text{ Ácidos Grasos Libres} = 68.04 \%$$

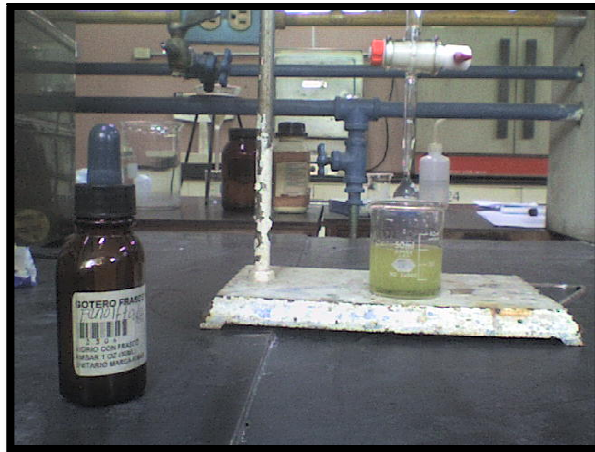


Figura 6.2. Determinación de los ácidos grasos libres del aceite de microalgas (Preparada durante la realización de ésta investigación)

6.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA CARACTERIZACION DEL ACEITE DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*.

En el cuadro 6.5 se presenta una Cuadro resumen de los valores obtenidos durante las pruebas de caracterización del aceite crudo de microalgas. En dicho cuadro se presentan los valores promedio de cada una de las propiedades determinadas.

Cuadro 6.5. Propiedades físico-químicas del aceite crudo de *Scenedesmus obliquus* (obtenido experimentalmente)

MUESTRA	DENSIDAD	% HUMEDAD	% SOLIDOS	% ÁCIDOS GRASOS LIBRES	NÚMERO ÁCIDO
Aceite crudo de la microalga <i>Scenedesmus Obliquus</i>	0.9228 g/ml	0.94 %	0.73 %	68.72 %	1.367

Como se observa en lo referente a la densidad, ésta presenta un valor ligeramente superior al promedio de la mayoría de aceites comestibles obtenidos de plantas terrestres

(cuadro 3.2), esto debido en su mayoría a la cantidad de agua con que el aceite de microalgas sale luego del proceso de extracción, el cual no se separó antes de realizar la medición con el fin de cuantificarlo como aceite crudo.

Respecto al porcentaje de humedad, se cuantificó la humedad absorbida por el aceite que no puede ser separada por decantación natural.

El porcentaje de sólidos presenta valores lo suficientemente bajos como para considerar que éstos no representan un problema para su uso, sin embargo, cuando se encuentran esparcidos en todo el volumen de este, pueden causar un efecto de coloración y turbulencia.

Finalmente, el nivel de ácidos grasos libres presenta valores un poco superiores respecto a los aceites comestibles, sin embargo aun se puede clasificar el aceite de microalgas dentro de ésta categoría.

7.0 USOS INDUSTRIALES RECOMENDADOS PARA EL ACEITE OBTENIDO A PARTIR DE LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*

Las posibles aplicaciones para el aceite de microalgas son innumerables, por ésta razón, se abordara en ésta sección el caso de dos aplicaciones específicas.

En primer lugar se considerara la aplicación del aceite de microalgas en el área alimenticia, dado sus características fisicoquímicas y conociendo los estándares requeridos por las normativas internaciones, podemos establecer una comparación que permita determinar la viabilidad del uso del aceite de microalgas como alimento ya sea para el género humano o para el animal.

Luego se explorara la posibilidad de utilizar el aceite de microalgas para la producción de biocombustibles, específicamente para su conversión a biodiesel. Comparando los parámetros recomendados por las normas ASTM para los aceites transesterificables con los datos obtenidos durante la realización de ésta investigación, será posible recomendar el uso de este aceite para la producción de biodiesel

7.1 UTILIZACION DEL ACEITE DE MICROALGAS PARA ALIMENTACION HUMANA

Según la Norma Codex Stan-19-1981, existen diversos factores a tomar en cuenta a la hora de evaluar si un aceite es apto para el consumo humano, a continuación se citan las especificaciones la norma:

“El aceite vegetal comestible en su único tipo y grado de calidad debe cumplir con las siguientes especificaciones:”

- Olor: Característico, ligero no desagradable y peculiar a las especies oleosas de las cuales proceda el aceite, exento de olores extraños o rancios.
- Sabor: Característico, ligero no desagradable y peculiar a las especies oleosas de las cuales proceda el aceite, exento de sabores extraños o rancios.
- Apariencia: Líquido transparente y libre de cuerpos extraños a 293 K (20°C).

En el cuadro 7.1 se presenta un resumen comparativo de las características de la norma que fueron determinadas para el aceite de microalgas.

Cuadro 7.1. Cuadro comparativo de propiedades del aceite de microalgas

PROPIEDAD	NORMA CODEX STAN 19-1981	ACEITE DE MICROALGAS
Olor	Característico de su fuente de origen, no extraño	Posee un olor suave característico de la microalga
Sabor	No desagradable, característico de su fuente de origen	Ligeramente amargo
Apariencia	Tranparente y limpio	Ligeramente opaco
% Humedad	0.05 %	0.94 %
Impurezas insolubles	0.00 %	0.7 %
% Ácidos grasos libres*	70 %	68.72 %

* Según American Oil Chemist's Society

El cuadro 7.1 demuestra la similitud entre el aceite de *Scenedesmus obliquus* y los aceites vegetales. Entre los parámetros que faltan por analizar para complementar la comparación están el índice de yodo, índice de peróxido, contenido de jabón y rancidez.

7.2 UTILIZACION DEL ACEITE DE MICROALGAS PARA PRODUCCION DE BIODIESEL

Para evaluar la calidad de un aceite como materia prima para la producción de biodiesel, es necesario llevar a cabo el proceso de transesterificación y luego determinar los parámetros del metil éster resultante, comparándolos con los establecidos en la norma ASTM D 6751 – 02.

Sin embargo, la transesterificación del aceite obtenido a partir de la microalga *Scenedesmus Obliquus* está fuera de los alcances de la presente investigación, razón por la cual es necesario utilizar otro método de comparación.

Con el fin de establecer el valor del aceite de microalgas como materia prima, se compararan sus características fisicoquímicas con las de otros aceites que se usan comúnmente para la producción de biodiesel, además de utilizar otras correlaciones como la que se presenta a continuación.

a) Características de los aceites en relación con los rendimientos de producción de biodiesel.

En la investigación “Opciones para la producción de biodiesel en el Perú” (Calle y Cohello, 2005), establecen una correlación entre el número ácido de un aceite vegetal y su rendimiento a biodiesel para las especies más comunes de oleaginosas. En base éstos datos, es posible cualificar el desempeño esperado del aceite obtenido a partir de microalgas.

Cuadro 7.2. Rendimiento de diversos aceites vrs numero ácido (Calle y Coello, 2005)

ESPECIE	NUMERO ÁCIDO	RENDIMIENTO VRS BODIESEL
Mauritia flexuosa (aguaje)	10.0	81.02 %
Poraqueiba serícea (umari)	2.0	90.58 %
Jatropha Curcas (tempate)	8.0	77.86 %
Sacha Inchi (maní)	0.6	96.50 %
Roystonea regia (palma)	6.5	88.80 %
Castanea sativa (castaño)	0.6	97.50 %
Glycine max (soya)	1.3	95.25 %
Phoenix dactylifera (palma real)	5.0	87.16 %
Elaeis guineensis (palma africana)	14.4	72.64 %
<i>Scenedesmus Obliquus</i>	1.37	No determinado

Como se puede apreciar en el cuadro 7.2, el aceite obtenido a partir de la microalga *Scenedesmus Obliquus* posee un número ácido con valor bastante cercano al del aceite de soya y al de girasol, por lo que es razonable esperar rendimientos de conversión mayores al 90 % tomando como referencia este parámetro.

b) Otros parámetros fisicoquímicos de comparación

Finalmente, es posible comparar las características el aceite obtenido de *Scenedesmus Obliquus* con las de los aceites vegetales en general, para establecer las similitudes que nos permitan afirmar que este es apto para la producción de biodiesel.

Cuadro 7.3. Comparación de las propiedades fisicoquímicas del aceite crudo de microalgas vrs el aceite obtenido de oleaginosas terrestres

MUESTRA	DENSIDAD	% HUMEDAD	% SOLIDOS	% ÁCIDOS GRASOS LIBRES	NÚMERO ÁCIDO
Aceite de <i>Scenedesmus obliquus</i>	0.9228 g/ml	0.94 %	0.73 %	68.72 %	1.367
Promedio de aceites vegetales	0.9100 g/ml	No definido	No definido	70 %	5.01

Fuente: (Ballesteros, 2002)

Como se aprecia en el cuadro 7.3, las características del aceite de *Scenedesmus obliquus* no se desvían excesivamente del promedio del resto de aceites de origen vegetal usualmente utilizado, y existe una relación aparente entre las características antes mencionadas, sin embargo, es necesario un mayor tratamiento matemático, pero la tendencia indica que a menor número ácido, mayor es el rendimiento de biodiesel.

OBSERVACIONES

1. Los mercados de semillas oleaginosas y aceites vegetales enfrentan una situación de escasez, al sufrir un déficit en su producción (FAO, 2009). La demanda adicional derivada de la industria de la bioenergía, apoyada por programas gubernamentales en todo el mundo, es la principal causa del exceso de demanda en relación con la oferta de granos y oleaginosas y sus productos. Ahora bien, los déficit de la producción mundial de oleaginosas y aceites vegetales son consecuencia, además, de las poco favorables condiciones meteorológicas y de las pérdidas en las cosechas en varios países y regiones del mundo.
2. La competencia por tierras agrícolas cultivables entre granos y oleaginosas ya empezó. Por ejemplo, el gran incremento en la superficie sembrada con maíz en Estados Unidos, durante las siembras de primavera de 2008, es una de las principales razones que explican el descenso en las siembras de soya y de la superficie total sembrada con oleaginosas en la propia Unión Americana, pero también en naciones como China. Para las siembras del 2009, es ahora el trigo el principal competidor de las oleaginosas; y ya ha ganado una importante porción de las hectáreas que correspondían a la cosecha de invierno de semilla de nabo en Europa y podría provocar la reducción de las siembras de canola en Canadá en 2009 (FAO, 2009). Ésta situación, extensiva al resto del mundo, obliga a buscar fuentes alternativas al aceite vegetal, como la presentada en ésta investigación.
3. En teoría, existe una amplia superficie libre disponible para ser cultivada. No obstante, los rezagos de tiempo que hay entre el momento en que se presenta el incentivo de precios y el momento en que concreta un volumen de producción es de 1 a 3 años para los cultivos anuales y de entre 4 y 5 años para aceite de palma. Lleva tiempo encontrar la tierra adecuada, prepararla, empezar la siembra y recoger la cosecha; en el caso de la palma de aceite tienen que pasar 3 años desde que se siembra hasta la primera cosecha de racimos de fruta fresca, mientras que una microalga puede cosecharse en un lapso de 4 días.

4. Las alzas en los precios del petróleo a máximo históricos han sido una variable determinante de la fuerte tendencia ascendente en las cotizaciones de los aceites vegetales; El consumo mundial de aceites vegetales se ha incrementado en un promedio de alrededor de 7 millones de toneladas por año en 2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007, volumen inusualmente elevado. Cerca del 42% de ese incremento fue debido exclusivamente a la demanda de aceites vegetales para elaborar biodiesel (FAO, 2009).
5. Una superficie de una hectárea cultivada con microalgas, puede producir el equivalente a 136,900 litros de aceite con microalgas cuya biomasa seca contenga un 70% de aceite. En cambio una hectárea de suelo fértil para cultivo de soja produciría 446 litros, para cultivo de maíz 172 litros y para el cultivo de palma 5,950 litros (FAO, 2009).
6. Durante la realización de la presente investigación, el método de extracción de lípidos puede ser mejorado utilizando una prensa del tipo tornillo sin fin (el cual es el tipo recomendado por la literatura), o una prensa hidráulica de mayor capacidad de presión.
7. Tanto por la calidad de los aceites obtenidos como por la facilidad del cultivo de microalgas, éstas prometen ser una fuente valiosa de aceite vegetal a futuro. En la actualidad se necesita una mayor investigación de las especies cultivables en el clima de El Salvador y de todas las variables asociadas a su reproducción.

CONCLUSIONES

1. El método de cultivo a partir de soluciones de medio fe de Guillard demostró ser muy efectivo, pues se obtuvo una concentración de microalgas de 4 gramos/litro, para la cosecha en tiempos de alrededor de 36 horas después de la inoculación.
2. El método de extracción reportó un rendimiento de 0.4842 kg de aceite/m².m³ de superficie cultivada por volumen cultivado, lo cual permite demostrar la factibilidad de la obtención de aceite a partir de microalgas.
3. El aceite obtenido reportó una densidad de 0.9228 gr/ml, mientras que la de los aceites vegetales comúnmente utilizados oscila en un rango de 0.8 – 0.92 g/ml. El valor obtenido se encuentra dentro de los valores esperados, aunque es necesario destacar la presencia de humedad en la muestra de aceite, lo que aumenta la densidad de este.
4. Respecto a la humedad absorbida por el aceite, la cual no es posible separar por simple decantación, presento un valor de 0.94 % al cuantificarla por diversos métodos, entre ellos el método de trampa de tolueno.
5. Uno de los parámetros importantes según el CODEX ALIMENTARIUS para los aceites vegetales es el contenido de sólidos insolubles. Para determinar este parámetro en el aceite de microalgas se utilizó el método de centrifugación según la norma ASTM D-2709, resultando un valor de 0.73 %, lo cual excede el valor recomendado por el codex.
6. Un parámetro importante para la producción de biodiesel es el número ácido y el contenido de ácidos grasos. Respecto a éstos valores, se obtuvieron los resultados siguientes: Ácidos grasos libres = 68.40 % y Numero Ácido = 1.367, los cuales son valores típicos para los aceites vegetales comunes.
7. Al comparar los valores obtenidos en las diferentes mediciones realizadas con los parámetros pertinentes para el aceite vegetal comestible y el aceite para biodiesel, se determinó que el aceite de microalgas es adecuado para ambos usos, puesto

que se encuentra dentro de los límites establecidos por las normas que rigen tales aplicaciones (tabla 6.5).

8. No contribuir al calentamiento global, ser una alternativa como alimento y presentar una opción más para aliviar a la necesidad de combustible destinado al transporte, constituyen incentivos más que suficientes para que la comunidad científica, económica y política se orienten definitivamente a la producción de aceite a partir de microalgas.

RECOMENDACIONES

1. En todos los países que consumen tanto de aceites vegetales como de combustibles líquidos, es necesario investigar todas aquellas fuentes alternativas de éstos recursos, que permitan depender en menor medida de las importaciones y por ende, de las crisis internacionales.
2. Las microalgas resultan una opción atractiva para países con poca extensión territorial y clima tropical como El Salvador, por lo que los esfuerzos deben concentrarse en este tipo de opciones en lugar de otras que de manera directa o indirecta, restaran tierras para la producción de alimentos.
3. En lo que respecta al procedimiento de cultivo presentado, debe de aplicarse un método adecuado para determinar la densidad celular de los cultivos in situ, pues es un parámetro importante a la hora de implementar y cuantificar el efecto de cualquier intento de mejora en el proceso.
4. Es necesario buscar alternativas de extracción del aceite de microalgas que permitan obtener eficiencias más elevadas y como consecuencia, mayores cantidades de aceite.
5. Debe buscarse constantemente nuevas especies de microalgas nativas puedan acumular mayores cantidades de lípidos y crecer en menores tiempos, mejorando la producción de aceite por unidad de área de cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ballesteros (2002): "Situación actual y futuro de la Biomasa"
Universidad de Sevilla. España.
- Calle y Cohelo (2005): "Opciones para la producción de biodiesel en el Perú"
Universidad Autónoma de Perú. Perú.
- Correa - Reyes (1996): "Alimentación de Artemia franciscana con *microalgas* cultivadas bajo diferentes tipos de luz", Centro de Estudios Superiores de Ensenada. México.
- FAO (2009): "*Food and Agriculture Organization.*", Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estados Unidos
- DOE (1996): "Biodiesel From Algae – Aquatic Species Program".
U.S. Department of Energy's, Forrestal Building.
- Fidalgo, Torres y Herrero (1995): "Microalgas: Cultivo y aplicaciones".
1º Edición, Editorial Coruña.
- Sánchez – Varo (1996): "Biotecnología de las microalgas".
Universidad de California, Estados Unidos.
- Shelef y Soeder (1980): "Extracción de aceites esenciales"
Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Wikipedia.com: Diversos temas
<http://es.wikipedia.org>, Fecha de consulta: Abril 2009.
- Morton - Satin (2004): Chief Agro-Industries and Post-Harvest Management Service
Universidad de Utah, Estados Unidos

ANEXOS

ANEXO A - CLASIFICACION DE LAS MICROALGAS

La definición formal de microalgas y su clasificación taxonómica es la siguiente:

MICROALGAS: Son individuos unicelulares o pluricelulares, cuyas células funcionan independientemente, realizando todas las funciones vitales. La alimentación, en general, es fotosintética.

CLASIFICACION

a) **CIANOFICEAS:** Conocidas vulgarmente como algas verde azuladas. Al igual que las bacterias, son organismos procariotas, cuyas células no presentan sistemas de membranas internas que aíslen los orgánulos del citoplasma.

- **Anabaena sp:** forma filamentosa solitaria, que a veces se encuentra inserta en masas gelatinosas. Los filamentos son rectos o ligeramente curvados. Las células son esféricas o en forma de tonel.
- **Lyngbya sp:** filamentos largos, curvados, agrupados en haces de color verdeazulado. Los filamentos pueden presentar vainas gruesas, incoloras, que se pegan entre sí, sin formar un mucílago.
- **Nostoc sp:** talos filamentosos con capa exterior gelatinosa. Las células son esféricas. Cuando los talos se desarrollan masivamente, dan aspecto de masas gelatinosas de color oscuro.
- **Oscillatoria limosa:** talos de coloración verde oscura, libres o sésiles. Filamentos rectos, no estrangulados en las paredes laterales, finamente granuladas. Las células son anchas, de forma discoidal.
- **Oscillatoria rubescens:** microalga filamentosa que presenta un tono ligeramente rosado. Las células terminales desarrollan extremos gradualmente apuntados, presentando una especie de caperuza.
- **Oscillatoria tenuis:** talo de color verdeazulado. Los filamentos son rectos, con extremos no apuntados. Las células son en general cuadradas, siendo las terminales ligeramente cónicas.
- **Tolypothrix lanata:** talo formado por filamentos de hasta dos centímetros de longitud, con frecuentes pseudoramificaciones. Las células son cuadradas de color verde azulado.

b) CLOROFICEAS: Son las conocidas como algas verdes, con cloroplastos de este color muy bien definidos, con formas y localizaciones celulares diferentes.

- ***Chaetophora elegans*:** los talos pueden alcanzar tamaños de cm., y son de color verde claro. A partir de una base de células laxamente unidas o de cortos filamentos surgen las ramificaciones.
- ***Chlamydomonas angulosa*:** células elípticas anchas. La membrana forma una ancha papila en la parte anterior celular. Cloroplasto con pirenoide cuadrangular. Mancha ocular grande en forma de bastón.
- ***Chlamydomonas ehrenbergi*:** células con formas de irregular a ovadas. Membrana delicada, que puede estar algo separada del borde del citoplasma. Los flagelos parten de una pequeña protuberancia cutánea. Mancha ocular en el centro de la célula.
- ***Chlamydomonas reinhardi*:** células casi esféricas. Membrana no engrosada en una papila anterior. Cloroplasto con un gran pirenoide. Mancha ocular grande.
- ***Closteriosis sp*:** células solitarias, libres, fusiformes y muy alargadas, puntiagudas en los dos extremos y desprovista de vaina gelatinosa. Presentan un plasto parietal con numerosos pirenoides.
- ***Coelastrum sp*:** microalga colonial, formada por colonias de 8 a 128 células, puede ser globosa, hueca o esférica. Las células se encuentran unidas por finas superficies gelatinosas.
- ***Cosmarium botrytis*:** Células solitarias con un profundo surco que las divide en dos hemicélulas. La superficie se encuentra cubierta de pequeñas verrugas que le dan un aspecto característico.
- ***Dictyosphaerium ehrenbergianum*:** Colonias insertas en una masa gelatinosa claramente delimitada. Las células son ovaladas en disposición periférica y están unidas entre sí mediante cordones gelatinosos.
- ***Eudorina elegans*:** Microalga colonial compuesta de células flageladas insertas en una vaina gelatinosa común.
- ***Pandorina morum*:** Colonia, aproximadamente esférica, compuesta de 16 células flageladas de forma triangular-abovada, insertas en una vaina gelatinosa común.
- ***Pediastrum duplex*:** microalga colonial con forma muy característica. Se diferencia de otras especies del mismo género en las amplias lagunas existentes entre las células centrales. Las células marginales son profundamente recortadas, sólo fusionadas en la base, y presentan dos lóbulos muy prolongados.

- ***Pediastrum clathratum***: especie de *Pediastrum* característica por presentar amplias lagunas entre las células centrales de la colonia. Las células marginales son triangulares, unidas por la base.
 - ***Pediastrum simplex***: los individuos de ésta especie presentan células marginales alargadas, con forma triangular y las células centrales se encuentran unidas de forma compacta.
 - ***Scenedesmus quadricauda***: individuo colonial, constituido por 4, 8 ó 12 células. Las células centrales son alargadas y sin apéndices, las terminales, se abomban en el centro y presentan dos espinas que se proyectan hacia el exterior.
 - ***Siderocelis sp***: especie que agrupa individuos con células elípticas que presentan numerosas verrugas pardas en su exterior. El color pardo se debe a la inclusión de sales de hierro.
 - ***Spirogyra sp***: Microalga filamentosa con cloroplastos espiralados en doble hélice que recorren todo el tricoma.
 - ***Staurastrum paradoxum***: Las células, trirradiadas o tetrarradiadas, presentan tamaño mediano y apéndices divergentes, provistos de pequeños dientes y terminados en pequeñas espinas.
 - ***Staurodesmus sp***: incluye células solitarias, presentan una profunda constricción y una membrana lisa. La vista apical tiene un contorno elíptico o estrellado de 3, 4 ó 5 brazos con una espina.
 - ***Volvox aureus***: colonia esférica, gelatinosa, con las células situadas en la periferia. Vistas por encima, las células son circulares y se comunican entre sí mediante filamentos plasmáticos muy finos.
- c) **CRIFTOFICEAS**: Las células son a menudo unicelulares y flageladas, con plastos generalmente de color marrón, aunque los hay verdes, amarillos o verde azulados. Las células presentan una forma particular, con frecuencia aplanada, y dos flagelos casi iguales.
- ***Cryptomonas sp***: células emarginadas en la parte anterior, más delgadas en la posterior, con la cara ventral plana y la dorsal abombada. Presentan dos cloroplastos y dos flagelos de igual longitud.
 - ***Cryptomonas erosa***: las células son fuertemente emarginadas en la parte anterior.

- d) **CRISOFICEAS:** Individuos unicelulares o coloniales, más raramente filamentosos. Presentan plastos de color amarillo o marrón, a menudo verdosos, por lo que se conocen vulgarmente como algas de color dorado. Existen multitud de formas diversas.
- ***Dinobryon divergens:*** individuo colonial de células sésiles con caparazones en forma de embudo. Las tecas se insertan unas a otras y se encuentran dilatadas en el centro, con la parte basal cónica.
- e) **DIATOMEAS:** Son microalgas unicelulares o coloniales, de plastos marrones o amarillos. Las células se encuentran impregnadas en sílice formando valvas que suelen situarse a modo de caja, y que pueden presentar una ornamentación característica de cada especie.
- ***Asterionella formosa:*** Diatomea que forma colonias estrelladas de unas 8 células. Cada célula presenta un lado pleural, más ancho en los extremos. Las valvas son muy estrechas con los extremos algo abultados.
 - ***Diatoma hiemale:*** diatomea colonial que forma cintas muy largas y densas. Las valvas son lanceoladas, lineales o elípticas. Presenta costillas robustas e irregulares.
 - ***Fragilaria crotonensis:*** diatomea de células dilatadas en el centro que se unen formando cintas curvadas y retorcidas. Las valvas son muy estrechas y presentan sutiles estrías transversales.
 - ***Gomphonema sp:*** género de diatomea que agrupa células cuyas caras pleurales son cuneiformes. Las células se pueden encontrar fijas a sustratos mediante pedúnculos gelatinosos simples.
 - ***Melosira sp:*** género de diatomea colonial que agrupa células con forma cilíndrica, un poco más largas que anchas, adheridas unas a otras por la superficie valvar.
 - ***Melosira granulata:*** diatomea colonial que forma cadenas largas y rígidas de células cilíndricas. Las superficies terminales de las valvas presentan un punteado irregular.
 - ***Melosira varians:*** diatomea colonial que forma cadenas largas de células en forma de tambor. Presentan cloroplastos en forma de plaquitas de color pardo amarillento.

- ***Navícula sp.*** incluye individuos con valvas lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos. Los extremos de la célula son redondeados.
 - ***Nitzschia sp.*** género que agrupa células, en general pequeñas, con valvas lanceoladas que presentan estrias transversales muy finas, apenas visibles y dispuestas densamente.
 - ***Pinnularia sp.*** Microalga diatomea característica, de rafe ligeramente ondulado, estrias transversales gruesas que a veces presentan poros.
 - ***Surirella sp.*** la célula en visión pleural es cuneiforme, vista por encima es ovada, con un polo anchamente redondeado y el otro más apuntado. Alas muy desarrolladas cuyos canales se encuentran separados por espacios anchos.
 - ***Tabellaria flocculosa***: constituida por células que forman cadenas en zig-zag. Vistas de lado las células son casi cuadradas, con numerosas bandas intercalares cuyos numerosos septos penetran profundamente. Las valvas se encuentran muy dilatadas en el centro.
- f) **EUGLENOFICEAS:** Incluye todas las formas unicelulares, solitarias, desnudas o lorizadas, que nadan libremente, provistas de 1, 2, 3 ó 7 flagelos dispuestos de forma variada.
- ***Euglena oxyuris***: microalga constituida por células alargadas, con punta terminal corta, casi siempre retorcidas en sentido longitudinal. La membrana presenta estriación espiralada. El flagelo es relativamente corto. Presenta numerosos cloroplastos en forma de placa.
 - ***Euglena viridis***: individuos de aspecto fusiforme y con un flagelo de igual longitud que el cuerpo. Los cloroplastos tienen forma de cinta y están orientados hacia un pirenoide central. Aunque son fotosintéticos pueden ingerir materia orgánica.
 - ***Phacus pyrum***: las células son abovadas, con el extremo posterior adelgazado en una espina larga y recta. Ocho estrias espiraladas confluyen en la desembocadura del sáculo del flagelo.
 - ***Phacus torta***: células intensamente retorcidas, con larga espina caudal y membrana con estriación longitudinal. Los cloroplastos tienen forma de placa.
- g) **XANTOFICEAS:** Grupo de microalgas conocido como algas verde-amarillentas, como consecuencia de la presencia de xantofilas. Existe una amplia variabilidad

morfológica, que va desde formas unicelulares, móviles e inmóviles, hasta formas filamentosas. Habita las aguas dulces y suelos, existiendo algunas especies marinas.

- ***Tribonema sp***: microalga que presenta numerosos cloroplastos. La membrana es fina y delicada presentando apéndices en forma de H bien visibles.
- h) **DINOFICEAS**: En general son células flageladas móviles, aunque hay especies cocoides inmóviles. Las células suelen presentar una hendidura ecuatorial en la que se insertan dos flagelos, uno transversal y otro longitudinalmente.
- ***Ceratium hirudinella***: especie de contorno asimétrico, que presenta un cuerno apical muy largo, con el extremo abierto. Cuernos basales en número de 3.
 - ***Gymnodinium paradoxum***: especie móvil, con células ovaladas, y surcos longitudinal y transversal poco profundos. Cloroplastos de color pardo oscuro dispuestos en manchas alrededor del núcleo central.
 - ***Peridinium cinctum***: especie móvil formada por células esféricas, de sección arriñonada. Un caparazón, dividido en placas características de cada especie, rodea la célula. El caparazón también puede presentar espinas. Los cloroplastos son de color pardo.

ANEXO B – SITUACION ACTUAL Y PROYECCIONES MUNDIALES SOBRE LA PRODUCCION DE ACEITE VEGETAL 2007 - 2016

Los precios de referencia mundiales para casi todos los productos básicos agrícolas que abarca este informe están en los niveles anteriores récord o arriba de éstos, al menos en términos nominales. Eso no durará y los precios bajarán paulatinamente por la naturaleza pasajera de algunos de los factores que están detrás de las subidas recientes. Pero existe un sólido motivo para creer que en la actualidad también existen factores permanentes apuntalando los precios que actuarán para mantenerlos en niveles promedio superiores al pasado y a la vez para reducir la caída a largo plazo en términos reales. Ya sean pasajeros o permanentes, el trabajo normativo adecuado para el desarrollo agrícola y para satisfacer las necesidades de los hambrientos y de los pobres debe tomar en cuenta ambas características (FAO, 2009).

El sorprendente aumento de los precios desde 2005/2006 se debe en parte a las condiciones climáticas desfavorables en las principales regiones productoras de cereales del mundo; con efectos indirectos en las cosechas y en la ganadería que compiten por la misma tierra. En un contexto de existencias mundiales bajas, esas tendencias solas habrían provocado fuertes reacciones de precios. Esas condiciones no son nuevas; han ocurrido en el pasado y los precios han bajado una vez que se imponen condiciones más normales y que la oferta reacciona con el transcurso del tiempo. *Perspectivas* no ve motivos para creer que eso no se repetirá de nuevo en los próximos años (FAO, 2009).

Sin embargo, una vez que bajen de sus actuales niveles máximos, durante el mediano plazo los precios permanecerán en niveles superiores a los vistos en el decenio pasado. Pero las fuerzas subyacentes que impulsan la oferta de productos agrícolas (en conjunto incrementos de productividad) tarde o temprano pesan más que las fuerzas que determinan una demanda más fuerte; tanto para comida y forraje como para demanda industrial, de manera muy particular, para la producción de biocombustibles. Por consiguiente, los precios reanudarán su caída en términos reales; aunque es posible que no exactamente por tanto como en el pasado (FAO, 2009).

En el lado de la oferta, *Perspectivas* espera que el crecimiento constante de la producción de cultivos sea más importante que las nuevas zonas dedicadas a la siembra para

determinar la oferta de cultivos. Las producciones de ganado y lácteos que suben lentamente también apoyan el aumento de la producción de cárnicos y de leche. Un supuesto clave de *Perspectivas* es que haya algún fortalecimiento del dólar norteamericano frente a la mayoría de las monedas. En los países afectados por ese cambio, eso reforzará los incentivos de los precios internos para aumentar la producción. Esos factores se combinan para preservar el crecimiento de la producción agrícola mundial; aunque algo de ese impulso se aplaca por el efecto reductor de la oferta de los altos precios del petróleo que aumentan los costos de producción (FAO, 2009).

En el lado de la demanda, la cambiante alimentación, la urbanización, el crecimiento económico y las poblaciones en expansión están impulsando la demanda de comida y de forraje en los países en desarrollo. A escala mundial, y en términos absolutos, la comida y el forraje siguen siendo las fuentes más grandes del crecimiento de la demanda en la agricultura. Pero apilada encima de eso ahora está la demanda de crecimiento rápido de materia prima para alimentar a un sector bioenergético cada vez mayor. Aunque menor que el aumento en el uso de comida y forraje, la demanda de biocombustibles es la fuente más grande de nueva demanda en decenios, y un enorme factor que apuntala al cambio alcista en los precios de los productos básicos agrícolas (FAO, 2009).

A causa de esas dinámicas en la oferta y la demanda, *Perspectivas* indica que los precios de los productos básicos, en términos nominales, durante el mediano plazo tendrán promedios considerablemente superiores a los niveles que predominaron en los últimos diez años. Cuando el promedio para 2008 a 2017 se compare con el de 1998 a 2007, los precios de la carne de cerdo y la carne de vaca pueden ser aproximadamente 20% más altos; el azúcar sin refinar y la refinada alrededor de 30%; el trigo, el maíz y la leche en polvo descremada de 40 a 60%; la mantequilla y las semillas oleaginosas más de 60%, y los aceites vegetales por arriba de 80%. Pero de ese nivel más alto, los precios reanudarán su caída en términos reales, si bien es cierto que a un ritmo más lento (FAO, 2009).

Además, los precios también pueden ser más volátiles que en el pasado: no se espera que los niveles de existencias se repongan sustancialmente durante el periodo de *Perspectivas*; la demanda se está volviendo menos sensible a los cambios de precios a nivel agrícola conforme cae la cuota de productos básicos en la cuenta final de alimentos y conforme crece la demanda industrial; las condiciones climáticas y la oferta de

productos agrícolas pueden volverse más variables con el cambio climático; y los fondos de inversión especulativos y no comerciales entran y salen de los mercados de futuros agrícolas según dicten las oportunidades lucrativas

ANEXO C – FICHA TECNICA LA MICROALGA *Scenedesmus obliquus*



Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C.

ORGANISMO DESCENTRALIZADO DE INTERES PUBLICO

Km. 107 CARRET. TIJUANA - ENSENADA * TELS. 4-45-01 AL 06 * 4-50-50-AL 53 * APDO. POSTAL 2732 * ENSENADA, BAJA CFA.
FAX NACIONAL (91-667) 4-48-80 * FAX U.S.A. 01152-667-4-48-80

Colección de Cepas de Microalgas Marinas y Dulceacuícolas del C.I.C.E.S.E.

Responsable: M. en C. María de Lourdes Trujillo Valle e-mail: ltrujill@cicese.mx

Tel: (646)175-0500 extensión 24478 (Cepario de Microalgas)

Fax: (646) 175-0534 página electrónica: <http://cicese.mx>

Clase: Chlorophyceae

Clave: SCO1

Nombre científico: *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kutzing

Características morfológicas: 3X11-13.5 micras. Cenobios de 3-4 células, mas frecuentemente puntiagudos, pocas células libres aisladas, con presencia de polimorfismo.

Aislamiento: González-Leonardo, 1992. (ambiente hiper-eutrófico). Ensenada, B.C., México

Procedencia de la cepa: CICESE

Medios y técnica de mantenimiento: “f/2” y “Chu-10” (en agua dulce), diluciones seriadas de orden 1:10⁻³ quincenalmente. Agar inclinado al 2%

Técnicas de cultivo recomendadas: esta cepa presenta buen crecimiento en medio “f/2” preparado con agua dulce. Mantenerla en cultivo con una fuente de aireación constante. Se mantiene para caracterizar su potencial en acuicultura, biotecnología y en el tratamiento de aguas residuales.

Composición proximal: Proteínas: 24.93%, Carbohidratos: 6.99%, Lípidos: 17.35% (fuente: Correa-Reyes, 1996).

ANEXO D – EXTRACTO DEL CODEX ALIMENTARIUS: FACTORES DE CALIDAD Y COMPOSICION DE LOS ACEITES VEGETALES COMESTIBLE

FACTORES DE CALIDAD Y COMPOSICIÓN

El presente texto está destinado a su aplicación voluntaria por los socios comerciales y no por los gobiernos.

1.1 El **color, olor y sabor** de cada producto deberán ser característicos del producto designado, que deberá estar exento de olores y sabores extraños o rancios.

		Dosis
		máxima
1.2	Materia volátil a 105°C	0,2% m/m
1.3	Impurezas insolubles	0,05% m/m
1.4	Contenido de jabón	0,005% m/m
1.5	Hierro (Fe):	
	Aceites vírgenes	1,5 mg/kg
	Aceites vírgenes	5,0 mg/kg
1.6	Cobre (Cu):	
	Aceites refinados	0,1 mg/kg
	Aceites vírgenes	0,4 mg/kg
1.7	Índice de ácido:	
	Aceites refinados	0,6 mg de KOH/g de aceite
	Aceites prensados en frío y vírgenes	4,0 mg de KOH/g de aceite
	Aceites de palma vírgenes	10,0 mg de KOH/g de aceite
1.8	Índice de peróxido:	
	Aceites refinados	hasta 10 miliequivalente de oxígeno activo/kg de aceite
	Aceites prensados en frío y vírgenes	hasta 15 miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite

ANEXO E – CURVA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA

Scenedesmus obliquus.

METODOLOGÍA

Cepa de *Scenedesmus obliquus*: La cepa con que se trabajó es *S. obliquus* que se mantiene bajo condiciones de laboratorio en medio F/2 preparado con agua dulce de acuerdo a la formulación de Guillard, (1972). Se manejó una población de 200 000 cél/mL, como inóculo que se verificó mediante conteo celular directo con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (López-Elías y col., 1995).

Curva de crecimiento de *S. obliquus*: Para establecer la curva de crecimiento de la microalga se realizaron cultivos por triplicado en unidades experimentales de 1250 mL de capacidad, conteniendo una razón agua del suministro público con enriquecida con nutrientes como medio de cultivo. Para cuestión de este estudio el monitoreo del crecimiento celular de la microalga tuvo una duración de 15 días y se partió de un inóculo inicial de 200, 000 células/mL.

El crecimiento celular se monitoreó cada 12 horas en un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad (López-Elías y col., *op. cit.*). Con los valores obtenidos de densidad celular se estableció su curva de crecimiento y cada una de las fases: logarítmica, lento crecimiento y estacionaria. A su vez se monitorearon cada 24 horas los valores de pH.

La figura siguiente muestra que la fase logarítmica alcanzó una densidad celular de 2.78×10^6 cél/mL, con una tasa de crecimiento de 1.5 divisiones por día y se logró al cuarto día de cultivo. En el quinto día se llegó a la fase de lento crecimiento donde alcanzó una densidad celular de 5.21×10^6 cel/ml, con una tasa de crecimiento de 0.9 divisiones por día, y en el sexto día se llegó a la fase estacionaria con una densidad celular de 5.22×10^6 cél/mL y tasa de crecimiento de 0.0 divisiones por día.

Se registró, al inicio del cultivo un pH con valor de 8.3 y registró un valor de 11.0 al final de la curva de crecimiento.

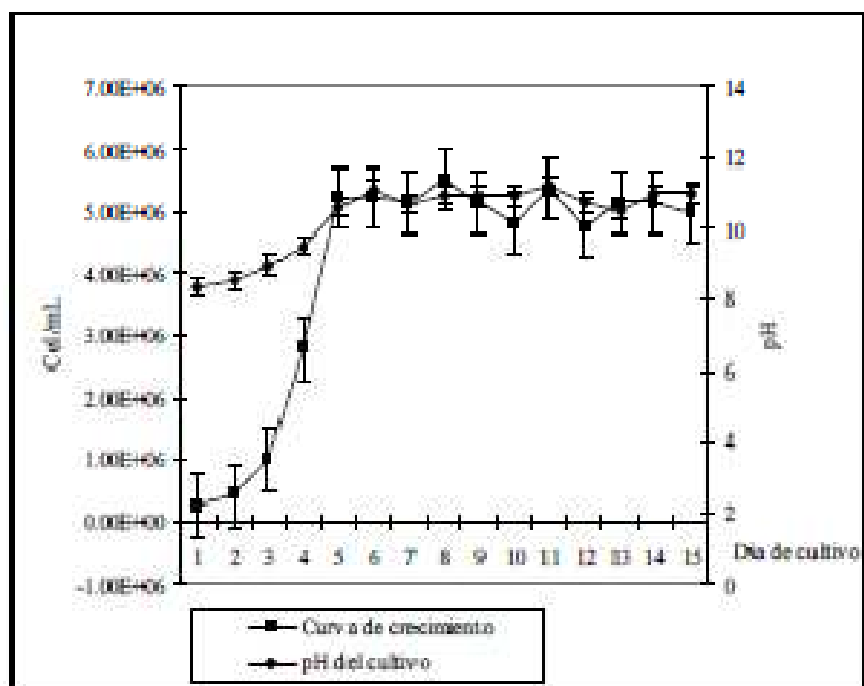


Figura E.1: Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus Obliquus* (Formosa fishing, 2008)