

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y PUESTA EN MARCHA DE UN FOTOBIOREACTOR PILOTO PARA EL CRECIMIENTODE LA MICROALGA *Chlorella* sp EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ENERGÍAS RENOVABLES DE LA EMPRESA ELÉCTRICA QUITO

María Alexandra Sandoval Riofrío.¹

¹Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Sangolquí – Ecuador. E-mail: msandovaluio@hotmail.com

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación se diseñó, construyó y se puso en marcha un fotobio reactor piloto con un volumen funcional de 15 litros para el cultivo de *Chlorella* sp. El fotobio reactor estuvo compuesto de un sistema de iluminación con la capacidad de administrar 3000 luxes, un sistema de mezclado del cultivo a través de burbujeo con inyección de aire, además de un sistema de circulación de medio fresco y cosechado de biomasa mediante filtración. Se obtuvo densidades celulares superiores a los 70×10^6 células/mililitro posterior al día 12,5 de operación del fotobio reactor y un promedio de lípidos presentes en la biomasa del 4,11 %, lo cual coloca a esta esta cepa como una candidata potencial para el cultivo de la misma a escala industrial y como materia prima para la extracción de lípidos con mira a la producción de biocombustibles.

PALABRAS CLAVE: Fotobio reactor, *Chlorella* sp, densidad celular, lípidos.

ABSTRACT

In this project a pilot photobio reactor was designed, built and launched with a working volume of 15 liters for the cultivation of *Chlorella* sp. The photobio reactor was comprised with lighting system to manage 3000 lux, a mixing system to the crop through bubbling with air injection, a circulation system to add fresh medium and a biomass harvesting model using filtration. Cell densities obtained were above 70×10^6 cells /milliliter after 12,5days during operation of the photobio reactor and the average of lipids present in the biomass was 4,11%, which set this strain as a potential candidate for being cultivated on an industrial scale and as raw material to get lipids for biofuel production.

KEYWORDS: photobio reactor, *Chlorella* sp, cell density, lipids.

INTRODUCCIÓN

Son organismos fotosintéticos que poseen pigmentos que les permiten convertir energía lumínica del sol en energía química, destinada para su propia subsistencia. El género *Chlorella* al ser un género clorófito, produce pigmentos para realizar fotosíntesis, entre ellos están la clorofila-a y b, lo cual da un característico color verde amarillento (Andersen, 2005).

En la actualidad, el estudio de estas microalgas ha despertado el interés para usarlas como organismos productores de lípidos poli-insaturados para la obtención de biocombustibles de buenas cualidades (Chisti, 2007).

Un fotobioreactor es un contenedor biológico artificial cerrado en el cual se pretende obtener las condiciones ambientales internas capaces de permitir que los microorganismos puedan desarrollarse y realizar sus funciones metabólicas en presencia de luz, por lo que el diseño de estos sistemas está enfocado para se evite el contacto del cultivo con el medio ambiente externo impidiendo la contaminación y cambios bruscos en las condiciones internas del contenedor que podrían afectar al crecimiento de la biomasa (Acuña, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa fue obtenida de laboratorio de DISERLAB de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) ubicado en el sector de Nayón. Los 500 mL de inóculo obtenidos fueron divididos en dos botellas de 500 mL, cada una con 250 mL de inóculo. Se determinó la densidad celular a través del recuento en cámara Neubauer, conjuntamente con la observación directa en un microscopio óptico binocular marca Aus Jena a un aumento de 40 X. El escalamiento del cultivo se realizó en frascos de vidrio y de plástico de diferentes dimensiones. Se buscó la similitud geométrica cilíndrica, en la que la escala de proporcionalidad n_L , fue calculada entre las longitudes verticales de los recipientes a ser usados como modelo y prototipo del fotobioreactor, a través de la Ecuación 1, presentada por Galmés (2006):

$$n_L = \frac{L_m}{L_p} \text{ Ecuación 1}$$

Donde:

L = Longitud (horizontal o vertical)

L_m = Longitud del modelo

L_p = Longitud del prototipo

Se realizó el escalamiento desde el volumen de cultivo de 300 mL en botellas de vidrio de 500 mL hasta llegar a un volumen de 12 L que fue colocado en el recipiente de botellón de plástico al que se lo llamo tanque reservorio. El escalamiento estuvo compuesto de 3 etapas: la primera con un volumen de cultivo de 300 mL a 800 mL, la segunda de los 800 mL de cultivo a los 2,5 L y la tercera de los 2,5 L a los 12 L, tal como se muestra a continuación en la Figura 1:

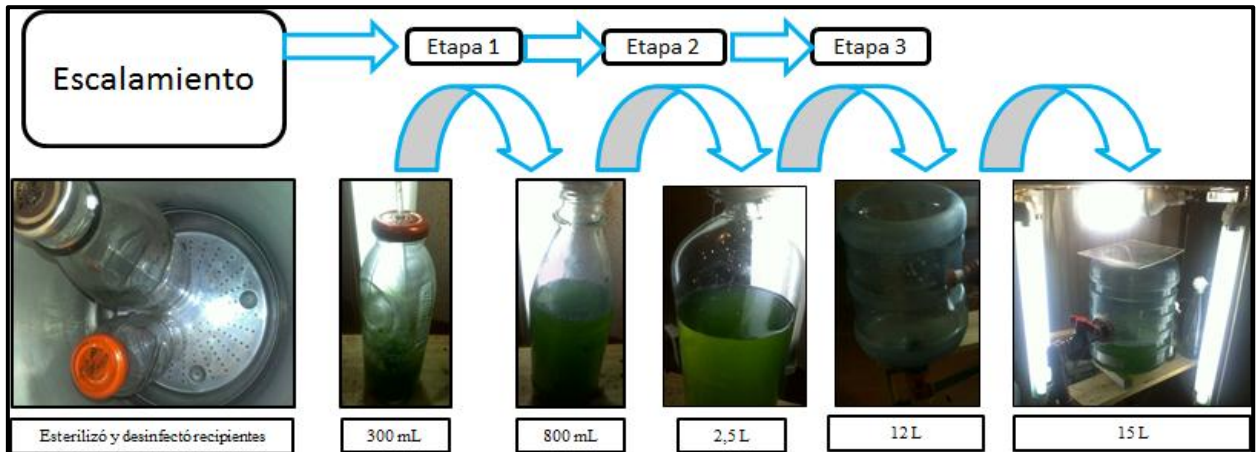


Figura 1 Diagrama de flujo del escalamiento de la cepa *Chlorella* sp.

Fuente: Sandoval (2012)

Se establecieron las variables cinéticas de la microalga durante la fase exponencial del cultivo, estos son: la velocidad de formación de biomasa (r_x), tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (Tg). Los gramos por litro de biomasa producido (X) se consiguieron mediante la filtración de la biomasa, 3 días después de que el cultivo entró en la fase estacionaria; esta biomasa adquirida posteriormente fue secada y pesada. Para la operación del fotobioreactor se tuvo que alcanzar un volumen funcional de 15 L para lo que se tomó un inóculo extraído de la tercera etapa de escalamiento previamente realizado (12 L). El cálculo se describe a continuación:

$$C_i * V_i = C_f * V_f \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

C_i = Concentración inicial de microorganismos en el cultivo (células / mL)

V_i = Volumen de inóculo puro a colocar en cultivo (mL)

C_f = Concentración final de microorganismos en el cultivo a obtener (células /mL)

V_f = Volumen funcional de medio cultivo a alcanzar (mL)

Previo al inicio de la operación del fotobioreactor, se hizo necesario calcular el caudal (F), la concentración de sustrato limitante mínima S_{rmin} y la variación de la concentración de biomasa teórica (X_f) para empezar la alimentación y mantener esa

velocidad de formación de biomasa con un régimen de cultivo semicontinuo. Todo ello fue calculado con las ecuaciones de diseño mostradas a continuación (Bailey & Ollis, 1986).

$$F \cdot S_0 = \frac{r_x V}{Y_{x/s}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$S_{rmin} = \frac{X_f V_f - X_0 V_0}{Y_{x/s} (V_f - V_0)} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$X_f = \frac{X_0 V_0}{Ft + V_0} + \frac{Y_{x/s} F S_0}{Ft + V_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

F = Caudal volumétrico del fotobioreactor (L/d)

S_0 = Concentración de sustrato (limitante) de la alimentación (g/L)

r_x = Velocidad de formación de biomasa (g/L.d)

V = Volumen del fotobioreactor (L)

$Y_{x/s}$ = Rendimiento teórico biomasa –sustrato

t = tiempo teórico de operación del fotobioreactor (d)

S_{rmin} = Concentración de sustrato limitante en el reservorio (g/L)

V_0 = Volumen al inicio de la alimentación (L)

V_f = Volumen funcional después de la alimentación (L)

X_f = Concentración de biomasa esperada después de la alimentación (g/L)

X_0 = Concentración de biomasa al inicio de la alimentación (g/L)

Se realizaron 3 repeticiones para la muestra en marcha del fotobioreactor, el diagrama de flujo del proceso se expone a continuación:

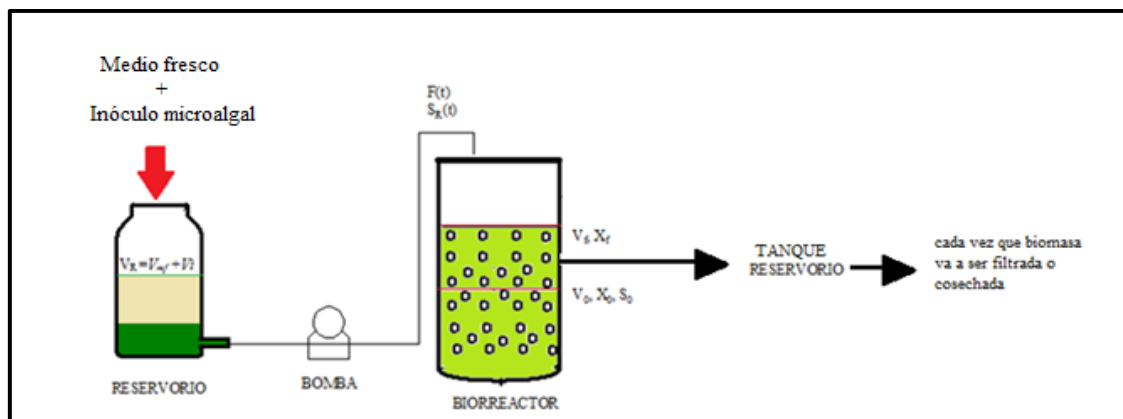


Figura 2 Diagrama de flujo del proceso.

Fuente: Sandoval (2012)

El diseño del fotobioreactor contempló un recipiente cilíndrico escogido según la similitud geométrica que fue conservada durante el escalamiento manteniendo las

razones de proporcionalidad a las que el cultivo fue expuesto (Galmés, 2006); y por ende a condiciones hidrodinámicas similares para el burbujeo de aire y la exposición a la luz administrada artificialmente, las piezas y el conjunto del fotobioreactor plasmadas en los planos fueron modelados a través del software de diseño en 3D SolidWorks versión 2009.

El sistema de aireación fue diseñado a través de burbujeo, se usó un tubo de plástico de 1 cm de diámetro. Al cual se lo dobló formando una circunferencia y se le hizo orificios de 1 mm de diámetro sobre la superficie superior del tubo, este fue colocado sobre el fondo del tanque destinado para el fotobioreactor.

La cantidad de CO₂ administrada a través del flujo de aire fue estimada a partir del porcentaje presente en el aire atmosférico y mediante la Ecuación 6 se obtuvo el coeficiente de transferencia de masa del gas a líquido k'_L (Geakoplis, 1998):

$$k'_L = \frac{2D_{AB}}{D_p} + 0.31N_{sc}^{-\frac{2}{3}} \left(\frac{\Delta\rho u_c g}{\rho_c^2} \right) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

D_{AB} = Difusividad de soluto A en solución B (m²/s)

D_p = Diámetro de la burbuja de gas (m)

u_c = Viscosidad de la solución B (kg/m.s)

g = Gravedad (m/s²)

ρ_c = La densidad de la fase continua (agua kg/m³)

ρ_p = La densidad del gas (Kg/m³)

$\Delta\rho = (\rho_c - \rho_p)$

N_{sc} = Número de Schmidt ($u_c/\rho_c D_{AB}$)

Bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se tomó en consideración que el medio de cultivo es una la solución diluida con las células microalgales suspendidas, se estableció que $k_L = k'_L C_{O_2}$; además la concentración inicial del gas en la solución (C_0) se la tomó como 0, debido a que recién estaba por comenzar la aireación (Doran, 1995).

Por lo que la tasa de transferencia de CO₂ en el líquido (N_a) para las condiciones de operación del fotobioreactor diseñado la siguiente ecuación 7 (Doran, 1995):

$$N_a = k_L a (C_s - C_0) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

N_a = Tasa másica de transferencia del gas difusión en el líquido (g/s)

k_L = Coeficiente de transferencia de masa de CO₂ (m/s)

C_s = Concentración de saturación del gas en solución (g/m³)

C_0 =Concentración inicial (g/m^3)

A = Área a través de la cual se difunde el gas (mm^2)

V = Volumen a través del cual se difunde el gas (L)

Teniendo en cuenta la tasa de transferencia de CO_2 atmosférico en el líquido ($N_{a=}$ $1,882 \times 10^{-3} \text{ g CO}_2/\text{m}^3.\text{h}$) y la cantidad de aire requerido ($4,705 \text{ g aire}/\text{m}^3.\text{h}$) se obtuvo la capacidad nominal (N) del equipo de aireación (flujo másico), que se iba a airear para un volumen 15 L como se describe a continuación

$$N = N_a * V$$

Ecuación 8

Se estableció la potencia requerida del compresor para suministrar aire comprimido por difusión para un flujo másico de $1,9604 \times 10^{-4} \text{ kg/s}$, la potencia fue estimada a través de la ecuación 10 descrita por Romero (2009):

$$P = \frac{WRT_1}{8,41 E} \left[\left(\frac{P_2}{P_1} \right)^{0,283} - 1 \right]$$

Ecuación 9

Donde:

P =Potencia del compresor (kW)

W = Caudal másico de aire (kg/s)

T =Temperatura absoluta de entrada (K)

R =Constante de gases para aire (KJ/K mol K)

P_1 =Presión absoluta de entrada (atm)

P_2 =Presión absoluta de salida (atm)

E = Eficiencia fraccional del compresor

Se diseñó una estructura en la que se empotró 5 luces frías fluorescentes con el fin de obtener una iluminancia de 3000 lux ($\approx 58 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2.\text{s}$). Para lo que se diseñó la ubicación de las lámparas a 15 cm del borde de tanque del fotobioreactor empotradas en un pedestal para que sean capaces de administrar la mayor cantidad de luz y que esta sea absorbida por el cultivo.

El encendido de luces fue controlado por un timer que estuvo sincronizado para encenderse cada 12 horas, conservando el fotoperíodo establecido para el cultivo (12:12 L/O) durante la etapa de escalamiento.

El caudal (F) esperado a circular entre el tanque reservorio y el fotobioreactor fue de 1,026 L/d y con una altura de 1 metro a recorrer (desde la bomba hidráulica hasta la abertura superior del fotobioreactor). La altura no fue representativa para el cálculo de pérdida de cargas. La potencia requerida para el motor de la bomba hidráulica fue calculada a través de la siguiente ecuación (Mott, 2005):

$$P_{real} = \frac{\rho * Q * Ha}{(3,6 * 10^6)} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

P_{real} =Potencia de la bomba hidráulica (kW)

ρ =Densidad agua (kg/m³)

Q =Caudal de liquido (m³/s)

Ha =Altura de bombeo(m)

La cuantificación de la biomasa se llevó a cabo a través del recuento celular en la que la densidad celular de cada conteo fue obtenida a través de la siguiente ecuación (Arredondo, 2007):

$$DC = N * 10^4 * f_d \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

DC =Densidad celular (células/mililitro)

N =Promedio de células presentes en un 1 mm²

f_d =Factor de dilución

10^4 =Factor de conversión de 0,1 µl a 1 mL

Se anexó un tanque de similares dimensiones llamado tanque reservorio al tanque del fotobioreactor. Esta conexión permitió el paso del medio de cultivo con el inóculo de microalgas en suspensión al inicio de la operación del fotobioreactor. Este tanque de volumen (V_R) sirvió de reservorio para el volumen de medio fresco que fue bombeado por la bomba hidráulica hacia el tanque del fotobioreactor. Las microalgas fueron filtradas en una malla sintética con un tamaño de poro de 0,04 mm (Jourdan, 2000). La malla fue retirada del tanque de reservorio (tanque que también sirvió como tanque de cosecha) y el líquido filtrado fue desechado.

Las microalgas cosechadas fueron secadas sobre una malla de mosquitero después de ser filtradas, posteriormente estuvieron expuestas a la luz directa del sol durante 24 horas, con el fin de mantenerlas secas para cualquier tratamiento químico o mecánico para la posterior extracción de lípidos (Ramírez & Vásquez, 2011).

Se realizaron los análisis para la extracción y cuantificación de lípidos con 4 volúmenes de biomasa cosechados: volumen 0,5 L el día 0; 0,7 L en el día 7; un volumen 1,5 en el día 11 y un volumen 3 L en el día 14,5. Estos tratamientos fueron realizados posterior a la tercera etapa del escalamiento del cultivo. Se obtuvieron 4 muestras con las que se

cuantificó el porcentaje de lípidos totales presentes en la biomasa. Las muestras fueron de 10, 500, 1300, 3000 mg de masa seca respectivamente. El porcentaje de lípidos obtenidos de esta biomasa fueron estimados mediante el método químico de extracción y cuantificación de grasas con solventes codificado como MAL-03/AOAC 991.36, realizado en el laboratorio de Química de Alimentos de la Universidad Central del Ecuador ubicado en el campus principal en el sector de la Gasca-Quito.

Se realizó un análisis teórico basado en las ecuaciones de diseño, en la que se obtuvo una cantidad de biomasa de 1,173 g/L, mientras que la cantidad experimental alcanzada del fotobioreactor diseñado fue de 1g/L. El porcentaje de rendimiento se pudo obtener con la Ecuación 12 puntualizada por Alarcón & Sánchez (2012):

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100$$

Ecuación 12

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con 28 datos totales de la densidad celular provenientes de las tres repeticiones de la puesta en marcha del fotobioreactor a las mismas condiciones. Estos datos fueron procesados estadísticamente a través de un modelo de regresión polinómico y sometido a una prueba de hipótesis con la distribución t-student para un nivel de confianza del 95%. Conjuntamente, se realizó otra prueba de hipótesis de igual manera con la distribución de t-student para el análisis de los datos obtenidos de la densidad celular variantes en el tiempo con el fin de validar la hipótesis científica del proyecto. Se estableció para este análisis una distribución de una cola con un nivel de confianza del 95%.

Para la cuantificación de lípidos se estableció un Diseño Completamente Aleatorio (DCA), de esta manera se evaluó el porcentaje de lípidos producidos por cada miligramo de microalga cosechado en diferentes volúmenes. El procesamiento estadístico de todos los datos tabulados se realizó a través del software estadístico *InfoStat/Estudiantil* versión 2011 y Microsoft Excel versión 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microalga *Chlorella* sp se desarrolló exitosamente en medio Guillard (F/2), la cinética de crecimiento de la cepa se expone en la figura 3, los parámetros de crecimiento de la cepa escogida fueron:

Tabla 1 Parámetros cinéticos de cepa escogida “*Chlorella* sp”.

Parámetros cinéticos	Valor
Tasa de crecimiento máximo (μ_{max})	0,339 d ⁻¹
Tasa de crecimiento (μ)	0,262 d ⁻¹
Tiempo de generación (Tg)	2,63 d ⁻¹
Velocidad de formación de biomasa (r_x)	2,63 (g/L. d)

Fuente: Sandoval (2012)

La cepa de *Chlorella* sp escogida, presentó parámetros muy similares a condiciones autotróficas tal como describe Anitha & Sriman (2012) en su estudio. La cepa de *Chlorella* sp con la que estos investigadores cultivaron, posee un tiempo de generación de 2,3 d⁻¹, un valor muy similar al obtenido en esta investigación (2,63 d⁻¹), estos parámetros son importantes ya que se podría mejorar los métodos de masificación de los cultivos de esta cepa y además de que no existen estudios más profundos acerca de esta cepa que según el laboratorio de microbiología de la PUCE, fue aislada de agua residual del sector de Nayón.

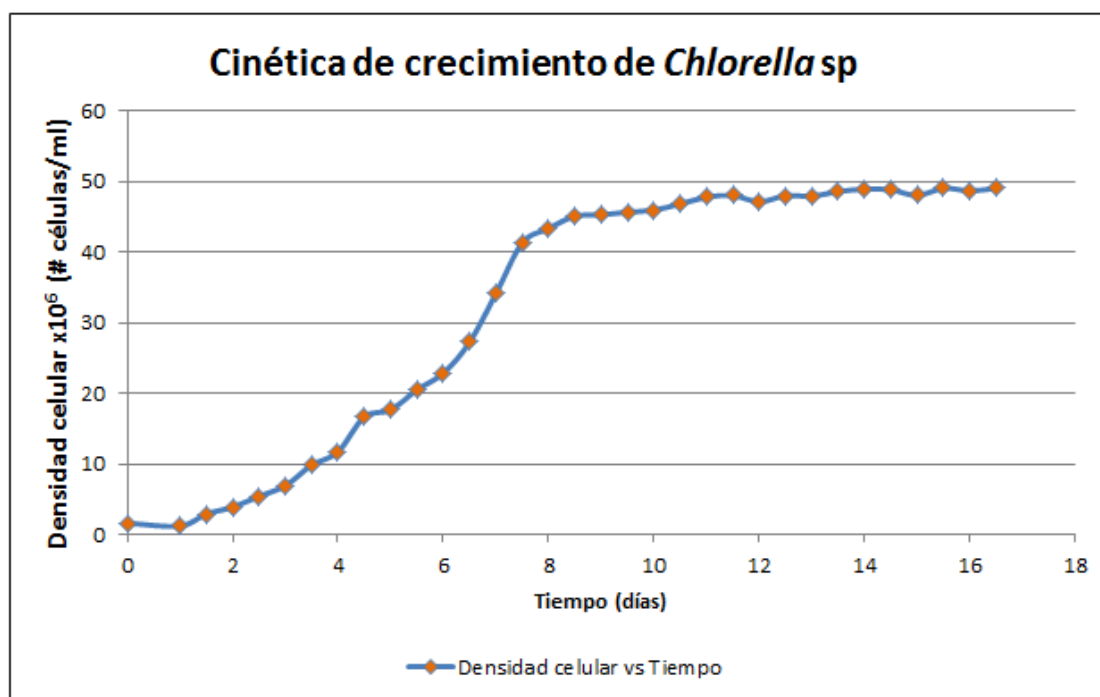


Figura 3 Curva de crecimiento de la cepa *Chlorella* sp cultivada.

Fuente: Sandoval (2012)

La cinética de crecimiento perteneciente a la cepa *Chlorella* sp cumple con todas las fase de crecimiento de los microorganismos llegando hasta la fase estacionaria antes del día 12. En esta fase la concentración de microalgas se estabilizó, ya que la tasa de muerte de las microalgas se compensa con la tasa de crecimiento de las mismas (Barsanti, 2006), No se observó una fase de senescencia debido a que el cultivo fue

alimentado con medio fresco lo que evitó que se incremente la tasa de muerte por agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo (Andersen, 2005).

El diseño mecánico del fotobioreactor se esquematizó a través de un plano en 3D (Figura 4).

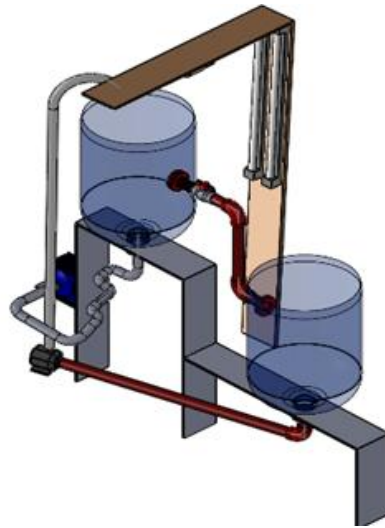


Figura 4 Plano del diseño del fotobioreactor en 3D.

Fuente: Sandoval (2012)

Las proporciones n_L de semejanza geométrica entre los modelos a escala de laboratorio y el prototipo fueron:

Tabla 2 Razones n_L de proporcionalidad geométrica.

Dimensiones de los recipientes usados durante el escalamiento		$n_L = \frac{Lm}{Lp}$
Recipiente 500 mL	L = 11,5 D = 7,3	$n_{L=0,68}$
Recipiente 1L	L = 18 D = 8,3	$n_{L=0,62}$
Recipiente 4 L	L = 29 D = 13	$n_{L=0,63}$
Dimensiones del tanque del fotobioreactor	L = 46 D = 23	

*Lm= longitud del recipiente modelo (cm), D= diámetro del recipiente (cm)

Lp = longitud del recipiente del prototipo (cm).

Fuente: Sandoval (2012)

Se usaron 4 lámparas fluorescentes de 20 W marca Philips y un foco de luz fluorescente blanco fría de 60 W de marca Osram (Figura 5), estas fueron instaladas perpendicularmente a los bordes del tanque del fotobioreactor de tal manera que la luz entre en el medio líquido e ingrese en dirección del ángulo de incidencia normal (perpendicular a la superficie); minimizando los efectos de la reflexión y refracción de la luz (Andersen, 2005) . Además la luz blanca fue escogida con el propósito de que la luz absorbida por las clorofilas presentes en los fotosistemas I y II, fuera aprovechada al máximo ya que esta se emite en todo el espectro visible en un rango de 400-700 nm (Barsanti, 2006).

Las lámparas colocadas poseen una eficiencia luminosa que oscila entre los 8-11,5 % (Bulbs Gluehbirne: Philips Standard Lamps, 2012); de bajo consumo energético y larga duración las cuales fueron una alternativa poco costosa de administrar los 3000 lux de iluminancia apta para el cultivo.



Figura 5 Sistema de iluminación encendido.

Fuente: Sandoval (2012)

Los criterios tomados en cuenta para la selección del compresor se encuentran descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3 Parámetros para la construcción del sistema de aireación.

Parámetros para la aireación (tipo airlift)	Valores
<i>Caudal másico (W)</i>	$1,9604 \times 10^{-4}$ kg/s
<i>Potencia teórica requerida (P)</i>	19,96 W

Fuente: Sandoval (2012)

En base a los datos obtenidos teóricamente, se escogió como el más apto un compresor de acuario de 20 W marca Hidrofarm, con capacidad de caudal de bombeo de 2700 L/h; con este diseño tipo “ airlift se indujo un esfuerzo cortante pequeño con una distribución hidrodinámica homogénea se consigue con la generación de burbujas ascensionales uniformes de diámetro pequeños (en este caso fue de 1 mm), que no cause daño mecánico a las células y además de que evitan el autoensombrecimiento de las células por el mezclado (Andersen, 2005).

No se administró CO₂ adicional a través de la aireación, ya que como concluyen Hernández *et al.* (2009), no existe una diferencia significativa sobre la tasa de crecimiento de *Chlorella kessieri* usando el tratamiento solo con aire, comparado con la inyección de CO₂ en una proporción de 25 % v/v en el aire. Esto refleja que este género de microalga no consume más carbono del estrictamente necesario para cubrir la demanda metabólica de este gas a pesar de que las microalgas poseen aproximadamente un 50% de carbono de base seca en su estructura celular (Sánchez Mirón *et al.*, 1999).

Se usó la filtración convencional aunque la técnica aplicada en este estudio no fue la óptima ya que se perdió biomasa en el medio líquido que fue desechado. Como menciona Petruskevskiet *al.* (1995), la microfiltración de membrana y la ultrafiltración son técnicas que podrían ser factibles de ser usadas para la cosecha de células del género *Chlorella*, ya que son capaces de retener microorganismos aún más pequeños (bacterias) debido a que las membranas usadas para este fin poseen tamaños de poro entre 0,001 y 0,1 µm.

Para la construcción del sistema de circulación del medio de cultivo fresco, se establecieron los siguientes parámetros:

Tabla 4 Parámetros para la construcción del sistema de circulación del medio de cultivo fresco.

Parámetros obtenidos según ecuaciones de diseño para un cultivo semicontinuo	Valor
<i>Caudal (F)</i>	1,026 L/d
<i>Concentración sustrato limitante (S_{rmin})</i>	1,358 g N/L
<i>Variación de la concentración de biomasa en el fotobioreactor en función del tiempo (X_f)</i>	1,173 g/L.d

Fuente: Sandoval (2012)

Como la potencia requerida es mínima (0,00327 W), y la altura que el líquido debe recorrer es de 1 m, se seleccionó una bomba centrífuga de acuario con una potencia de 5 W, con capacidad de bombeo de 20 L/h y altura máxima de 1,5 m. No se realizaron cálculos de pérdidas de carga por frotamiento del líquido al atravesar la manguera de alimentación debido a que fue considerado como un fluido de una solución diluida con propiedades similares al agua, con una viscosidad de 0,01 poises a 25 °C (Castellan, 1987).

El rendimiento del prototipo fue evaluado a través de la concentración en gramos por litro (g/L) de biomasa. Se relacionó la biomasa teórica calculada y la biomasa real obtenida. El porcentaje de rendimiento del prototipo fue obtenido con la Ecuación 12:

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{1}{1,173} * 100 = 85,25 \%$$

La curva de crecimiento fue establecida a volumen de 15 L (volumen útil), se elaboró análisis de regresión con ajuste polinómico de grado 2, el cual reveló una alta correlación entre las variables (coeficiente de determinación R^2 de 0,981), se evaluaron 28 datos totales, 26 grados de libertad y un nivel de significación α del 0,05. Estos resultados fueron significativos a un nivel $p < 1,716 \times 10^{-23}$, corroborando la alta correlación entre las variables analizadas.

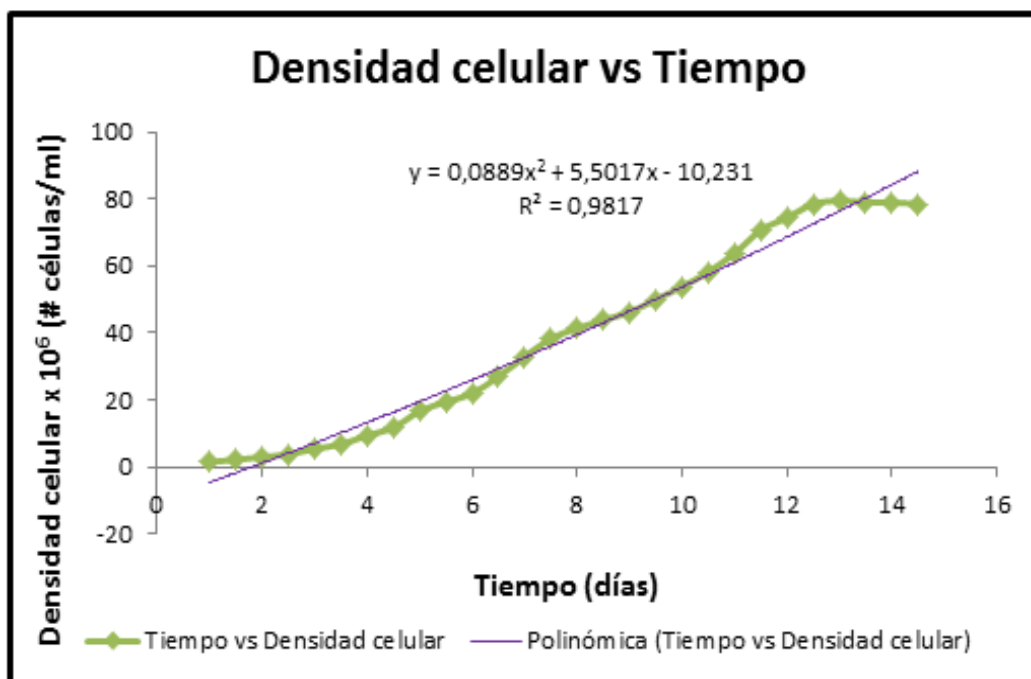


Figura 6 Regresión con ajuste polinómico de la media durante operación del fotobioreactor.

Fuente: Sandoval (2012)

A pesar de que el volumen funcional de 15 L, fue inoculado con una misma densidad celular (día 0 con densidad celular de 1×10^6) en las 3 repeticiones de la puesta en marcha, los conteos celulares tomados el día 1, variaron en las repeticiones 2 y 3 a pesar de que se conservaron las mismas condiciones durante el cultivo que en la repetición 1. Esto se debe a que existió la presencia de parásitos en el cultivo (3 por cada $1'450000$ en la repetición 2 y de 5 por cada $1'375000$ en la repetición 3). Sin embargo como menciona Sánchez Varo (2000), la contaminación con parásitos no representa serios problemas para el comportamiento del microalga, ni se ve afectado en gran medida, aún más si se tiene volúmenes representativos a concentraciones altas del microorganismo en el cultivo (escala intermedia-industrial).

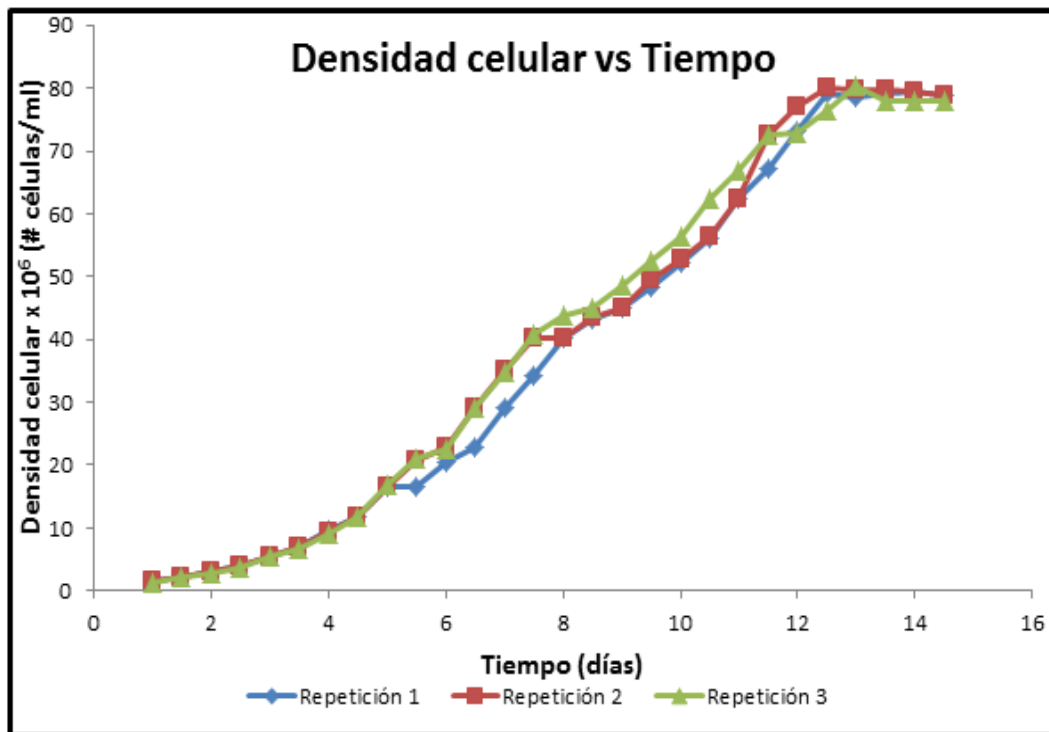


Figura 7 Curvas de crecimiento de las repeticiones durante la puesta en marcha del fotobioreactor.

Fuente: Sandoval (2012)

La hipótesis planteada para el proyecto, fue establecida inicialmente para que el recuento celular sea de al menos $70'000.000$ de células por mililitro de medio cultivado durante la operación con el cultivo ya estabilizado en el fotobioreactor.

Tabla 5 Prueba de hipótesis aplicando la distribución t-student para la validación de la hipótesis científica del proyecto.

Media poblacional Hipotética (μ_0)	Grado de libertad (gl)	Valor de t tabla	Tamaño Muestral (observaciones)	Número de Datos(n)	Nivel de confianza (95%)
70×10^6	2	4,303	3	3	$\alpha = 0,05$
Días		NO cumple hipótesis	Días	SI cumple hipótesis	
		Valor de t calculado		Valor de t calculado	
1		-834,716			
1,5		-1302,803			
2		-3041,480			
2,5		-1732,214			
3		-2237,810			
3,5		-726,320			
4		-528,960			
4,5		-3493,000			
5		-388,772	12	3,449	
5,5		-36,393	12,5	7,962	
6		-64,745	13	18,403	
6,5		-20,940	13,5	17,035	
7		-19,809	14	16,536	
7,5		-14,937	14,5	35,753	
8		-23,157			
8,5		-54,272			
9		-19,748			
9,5		-15,366			
10		-11,960			
10,5		-5,644			
11		-4,258			
11,5		0,405			

Fuente: Sandoval (2012)

Los valores de t calculados hasta el día 12, no cumplieron con la hipótesis debido a que son menores que el t calculado por tabla (4,303). Los valores de t calculados desde el día 12,5 son superiores al valor t por tabla, cumpliendo con la hipótesis. De esta manera se demuestra que el fotobioreactor es eficiente para mantener un cultivo semicontinuo a concentraciones iguales y/o superiores a 70×10^6 de células por mililitro de medio cultivado, manteniendo al cultivo en fase estacionaria, donde la tasa de muerte de las células microalgales se compensa con la tasa de crecimiento de nuevos individuos manteniendo la concentración celular constante en esta fase (Andersen, 2005).

Tabla 6 Resultados de la cuantificación de lípidos por miligramo de volumen cosechado.

Tiempo (días)	Volumen (L)	Tratamientos mg de biomasa por volumen cosechado (mg peso seco)	Repetición 1 % de lípidos por volumen cosechado (mg lípidos/100 mg de biomasa)	Repetición 2 % de lípidos por volumen cosechado (mg lípidos/100 mg de biomasa)	Repetición 3 % de lípidos por volumen cosechado (mg lípidos/100 mg de biomasa)	Promedio de lípidos totales <i>Chlorella</i> sp (%)
0	0,5	10	4,11	4,11	4,11	4,11
7	0,7	500	4,12	4,11	4,12	
11	1,5	1300	4,11	4,11	4,11	
14,5	3	3000	4,12	4,12	4,12	

Fuente: Sandoval (2012)

Esta microalga podría llegar a producir de 5-58 % (p/p) de lípidos siempre que la biomasa sea bioquímicamente inducida) como menciona Jaramillo (2011). Esta cepa de *Chlorella* sp posee una cantidad promedio de 4,11 % de lípidos, siendo una cepa potencialmente útil para ser cultivada a gran escala para la producción de biodiesel.

En el análisis estadístico de la cuantificación de lípidos, se procesaron los datos de las distintas muestras que se obtuvieron de varios volúmenes cosechados. Se pudo observar un valor de $p < 0,005$, por lo que se aceptó la hipótesis alternativa ya que existe una diferencia significativa entre las medias de los 4 tratamientos aplicados. Al mismo tiempo, y como se manifiesta a simple vista mientras más cantidad de biomasa es cosechada, mayor es la cantidad de lípidos que se pueden obtener como materia prima para la producción de biodiesel (Dufour, 2007).

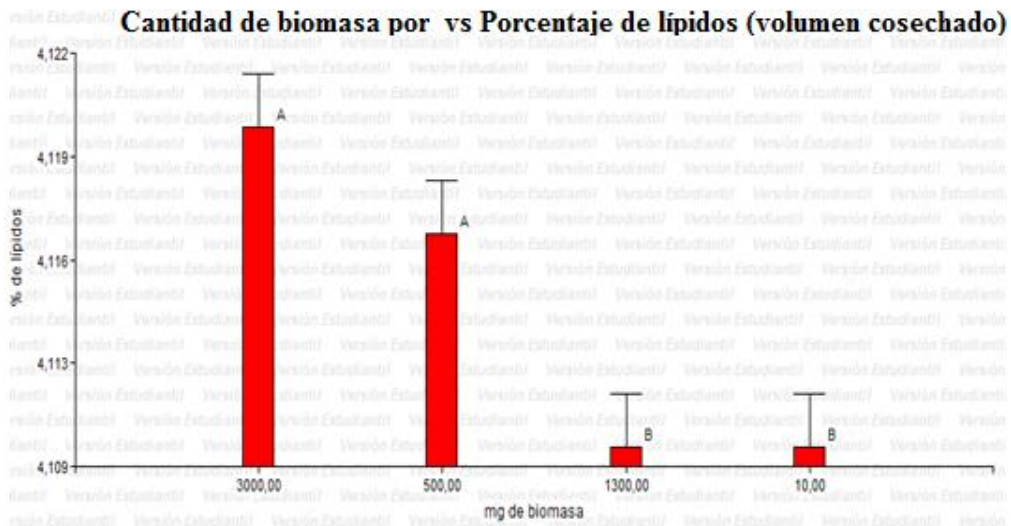


Figura 8 Diferencia de medias de los tratamientos aplicados.

Fuente: Sandoval (2012)

Las desigualdades entre los tratamientos simbolizados con letras A y B pudieron ser ocasionadas debido a que las muestras fueron tomadas en diferentes estadios del cultivo (A en fase estacionaria y B en fase exponencial), además de otros factores fisiológicos de lamicroalga. Tal caso pudo haberse suscitado entre los tratamientos B; ya que el estado del cultivo en el que fue cosechada la biomasa (fase exponencial) no contuvo una alta concentración de células ni tampoco cantidades representativas de lípidos que normalmente son acumuladas como sustancias de reserva en las estructuras celulares (Barsanti, 2006).

Además se pudo haber originado un cosechado no homogéneo a pesar de que el volumen filtrado fue el mismo, las células de tamaño menores a las 12 μm según menciona Hoek *et al* (1995), pudieron atravesar los poros del papel filtro utilizado (tamaño de poro de 8 μm), influyendo en la cuantificación total de los lípidos presentes en la biomasa tomada como muestra. Sin embargo, la mayor variación pudo haber sido causada por la poca sensibilidad del método químico utilizado debido a que pudo existir volatilización de lípidos o los solventes utilizados pudieron no haber sido los adecuados (Villasana, 2011).

Ya que las muestras fueron manipuladas como muestras alimentarias, el método MAL-03/AOAC 991.36 emplea solventes como el éter de petróleo el cual es apolar (Lolos *et al.*, 1999), mientras que existen métodos más precisos para la extracción y cuantificación de lípidos como el método de Bligh y Dyer (1959), que emplea mezclas de solventes con mayor polaridad como cloroformo/metanol (Keijbets *et al.*, 1985). Este método fue adaptado para la extracción de lípidos en microalgas (Arredondo & Voltolina, 2007), el cual no pudo ser aplicado debido a la carencia de material y disponibilidad reactivos.

CONCLUSIONES

El fotobioreactor semicontinuo fue eficiente para el crecimiento de *Chlorella* sp manteniendo estable el cultivo durante operación del prototipo, el rendimiento del prototipo fue del 85,25 % , pudiéndose incrementar este porcentaje al modificar los nutrientes en el medio de cultivo para satisfacer al máximo los requerimientos de la microalga. La cepa de *Chlorella* sp escogida posee un tiempo de generación (2,63 d-1), posee un corto tiempo de generación, capacidad de adaptación y parámetros de cultivo no exigentes, es susceptible de ser cultivada a escala industrial.

El análisis estadístico corroboró la alta correlación existente entre la densidad celular y el tiempo de operación del fotobioreactor (R² de 98,1) aplicado en la cinética de crecimiento de la *Chlorella* sp. El porcentaje de lípidos presente en la biomasa fue en promedio del 4,11 %; haciéndola una candidata potencial para ser materia prima en la producción de biodiesel.

BIBLIOGRAFÍA

Andersen, R. (2005). Algal culturing techniques. 1°(Ed.). Elsevier Academic Press. (pp. 33-55,323).

Anitha, S. & Sriman, J. (2012). Isolation and Identification of Microalgal Strains and Evaluation of Their Fatty Acid Profiles for Biodiesel Production. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Extraído el 31 de julio, del 2012, del sitio Web de la Universidad de Annamalai Nagar : www.ijpba.info

Arredondo, B. O. & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR, USA. (pp. 47-51).

Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2°(Ed.). McGraw-Hill. New York. (pp. 298-320).

Barsanti, L. (2006). Algae, Anatomy ,biochemistry & Biotechnology. 2°(Ed). CRC Press. (pp. 15-23, 56-72).

Bulbs Gluehbirne (2012). Philips Standard Lamps. Extraído el 23 de septiembre del 2012, del enlace web: http://www.lighting.philips.com/de_de/tools_downloads/pricelist_lamps/downloads/prei_sliste_dede_20081023.pdf

Castellan, G. W. (1987). Fisicoquímica.Ed. Addison- Wesley Iberoamericana. (pp. 992).

Castellan, G. W. (1987). Fisicoquímica.Ed. Addison- Wesley Iberoamericana. (pp. 992).

Chisti Y. (2007). Biodiesel form Microalgae. Biotech Adv. 25:(pp.294-306).

Dufour, J. (2007). Las algas: un biocombustible de gran potencial. Energía y sostenibilidad. [Versión Electrónica], Disponible en enlace web: <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2007/10/01/74977>

Doran, P. (1995). Principios de Ingeniería de los bioprocesos. 1º(Ed). Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. (pp. 211-220,254-258).

Galmés, J. (2006). Ensayo de INHA en modelo físico reducido para un dique a base de cilindros verticales. Propuestas para la extrapolación de datos. Diseño innovador de diques

Geankoplis, C.J. (2005). Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. 3º(Ed). Compañía Editorial Continental CECSA. (pp 63-73, 135).

Hoek, V.C. (1994). Algae: An Introduction to Phycology. USA Cambridge university press. (pp.365). [Versión Electrónica], Disponible en el enlace web: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S02.htm>.

Jaramillo, J. (2011). Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de micro algas. Extraído el 10 de septiembre, 2012, del sitio Web de la Universidad Nacional de Colombia: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6751/1/8110005.2012.pdf>

Jaramillo, J. (2011). Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de micro algas. Extraído el 10 de septiembre, 2012, del sitio Web de la Universidad Nacional de Colombia: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6751/1/8110005.2012.pdf>

Keijbets, M.J.H., Ebbenhorst-seller, G. & Ruisch, J. (1985). Suitability of hydrogenated Soybean oils for prefrying of deep-frozen french fries. *J. Am. Oil.Chem. Soc.* 62 4: (pp.720-725).

Lolos, M., Orepolulou, V. & Tzia, C. (1999). Oxidative stability of potato chips: effect of frying oil type, temperature and antioxidants. *J. S. Food and Agri.* 79(11): (pp.1524-1528).

Mott, R. (1995). Diseño De Elementos De Máquinas. Segunda Edición. Dayton. (pp 235)

Ohse S., Bianchini R., Ávila R., Villela M., Cunha P., Pavan C & Estevão, M. (2008). Crecimiento de microalgas en sistema autotrófico estacionario. [Versión Electrónica], Disponible en el enlace web: www.biotemas.ufsc.br/volumes/pdf/.../p7a18.pdf

Ohse S., Bianchini R., Ávila R., Villela M., Cunha P., Pavan C & Estevão, M. (2008). Crecimiento de microalgas en sistema autotrófico estacionario. [Versión Electrónica], Disponible en el enlace web: www.biotemas.ufsc.br/volumes/pdf/.../p7a18.pdf

Sánchez Miron A., Contreras A., Garcia,F., Molina E., Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. Journal of Biotechnology. 70: (pp. 249-270).

Sánchez Miron A., Contreras A., Garcia,F., Molina E., Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. Journal of Biotechnology. 70: (pp. 249-270).

Sánchez-Varo, R.M. (2000). Producción de carotenos por *Dunaliella salina*. Biología de microalgas. (pp. 1-36).

Sánchez-Varo, R.M. (2000). Producción de carotenos por *Dunaliella salina*. Biotecnología de microalgas. (pp. 1-36).

Villasana. C. (2011). Filtración en el laboratorio. RYE. [Versión Electrónica], Disponible en el enlace web: <http://www.reactivosyequipos.com.mx/blog/2011/06/filtracion-en-el-laboratorio/>