

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Arquitectura e Ingenierías Civil y
Ambiental
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



**ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DEL DESARROLLO DE LA CEPA
CHLORELLA SP. PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE LA
OBTENCIÓN DE FAME EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA
LABORATORIO - AREQUIPA**

Tesis presentada por el Bachiller:

Escalante Palacios, Allison Yolanda

Vizcarra Fuentes, Alvaro Jaroslov

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Ambiental

Asesora:

Dra. Bejarano Meza, María Elizabeth

Arequipa - Perú

2019

FACULTAD DE ARQUITECTURA E INGENIERÍAS CIVIL Y DEL AMBIENTE
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL
INFORME DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

VISTO

EL BORRADOR DE TESIS TITULADO:

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DEL DESARROLLO DE LA CEPA CHLORELLA SP. PARA LA PRODUCCIÓN
DE BIODIESEL A PARTIR DE LA OBTENCIÓN DE FAME EN UN FOTOBIOREACTOR A ESCALA LABORATORIO-AREQUIPA

Presentado por el (los) Bachiller (es):

ALISON YOLANDA ESCALANTE PALACIOS

ALVARO JAROSLOV VIZCARRA FUENTES

Nuestro DICTAMEN es:

APTO PARA SUSTENTACIÓN

OBSERVACIONES:

Arequipa, 28 de Noviembre 2019

Miguel Terán Diandrea
DICTAMINADOR
COD: 2478

Andreo Chaneles Yamague
DICTAMINADOR
Cod. 3146.

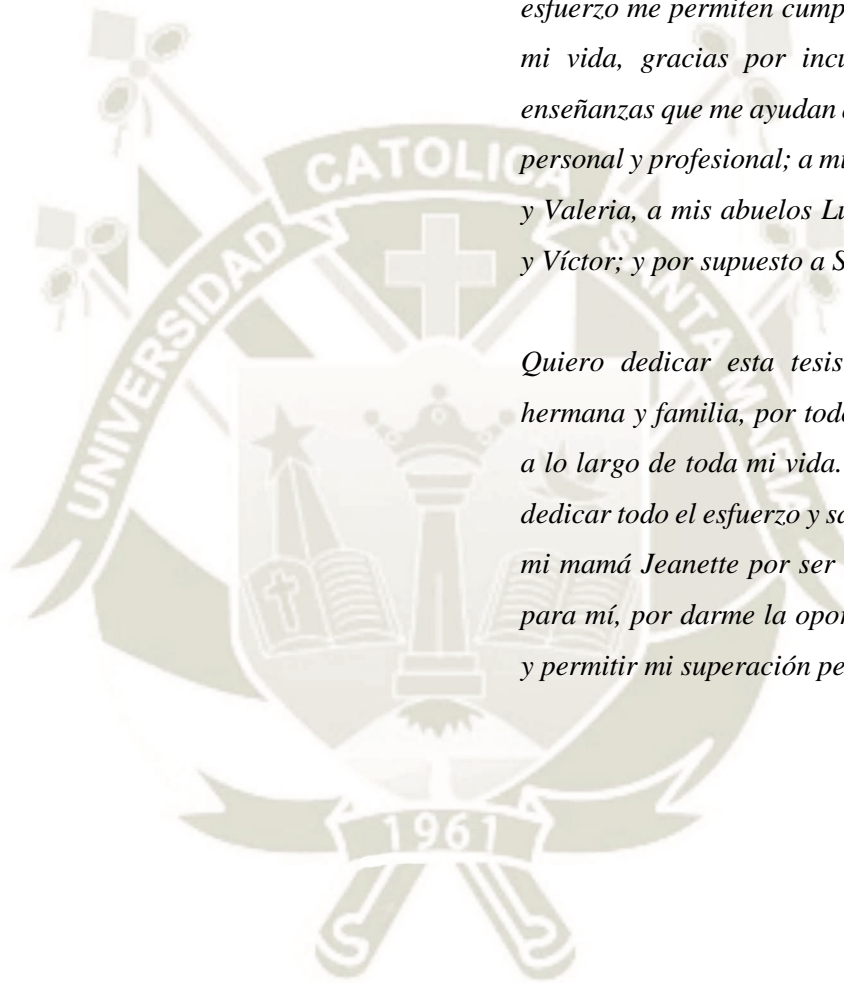
Maria Elizabeth Betarano Neza
DICTAMINADOR
Código 9205



DEDICATORIA

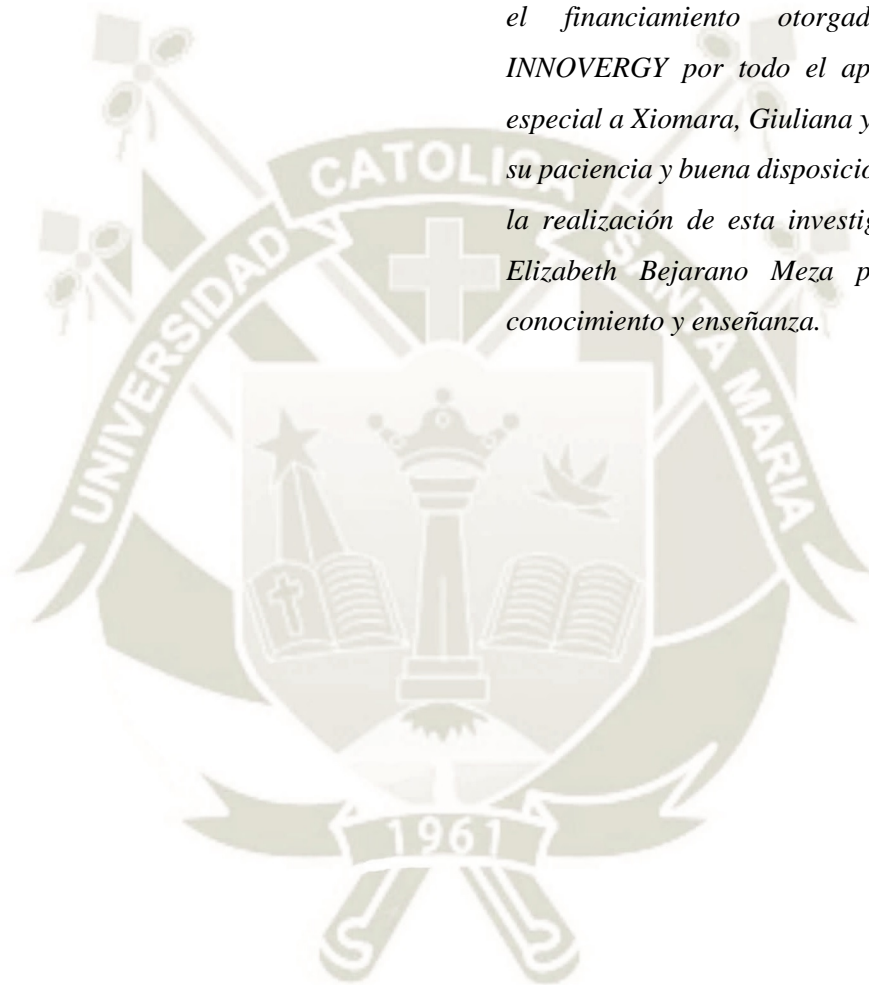
Esta tesis se encuentra dedicada a mis padres Kely y Arturo quienes con su apoyo, amor y esfuerzo me permiten cumplir una meta más en mi vida, gracias por inculcar los valores y enseñanzas que me ayudan a lo largo de mi vida personal y profesional; a mis hermanos Joaquín y Valeria, a mis abuelos Lucy, Victoria, Rubén y Víctor; y por supuesto a Sofía.

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, mi hermana y familia, por todo el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida. En especial, quiero dedicar todo el esfuerzo y sacrificio realizado, a mi mamá Jeanette por ser más que una madre para mí, por darme la oportunidad de estudiar y permitir mi superación personal y académica.



AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Dios, por su infinito amor y bondad, al Vicerrectorado de Investigación por el financiamiento otorgado, al instituto INNOVERGY por todo el apoyo brindado, en especial a Xiomara, Giuliana y Douglas, que con su paciencia y buena disposición hicieron posible la realización de esta investigación. A la Dra. Elizabeth Bejarano Meza por su dirección, conocimiento y enseñanza.



RESUMEN

El uso de microalgas es una de las mejores alternativas para la sustitución de combustibles fósiles, debido a sus ventajas de manejo y capacidad productiva. En esta investigación se estudió la microalga *Chlorella sp.* bajo diferentes condiciones de temperatura (22, 25 y 28°C), intensidad de luz (2000, 6000 y 10 000lx) y pH (5, 7 y 9). Luego de un análisis estadístico de los resultados, se determinó que a una temperatura de 24.74°C, intensidad de luz de 6599.51 lx y a un pH de 8.25, se obtuvo un máximo porcentaje lipídico alcanzable de 79.39%.

El perfil lipídico realizado a la biomasa cultivada en un fotobiorreactor a condiciones optimizadas de laboratorio y ambientales de Arequipa, presentó mayor proporción de ácidos grasos insaturados, siendo los más relevantes el ácido Palmitoleico y el Linolénico. El fotobiorreactor a condiciones controladas mostró 0.03% mayor contenido de FAME (Ácido graso metil éster), sin embargo, se considera que las condiciones ambientales de Arequipa son prometedoras para la producción industrial de biocombustibles a partir de la microalga *Chlorella sp.*, siendo una alternativa de energía sustentable y económica, ya que se adaptó con facilidad a la luz natural y presentó resultados similares a los optimizados.

Palabras clave: *Microalgas, biocombustible, Chlorella sp., medio BBM, ácidos grasos, condiciones óptimas, FAME.*

ABSTRACT

The use of microalgae is one of the best alternatives for fossil fuel replacement, due to its management advantages and productive capacity. In this investigation the microalgae *Chlorella sp.* under different conditions of temperature (22, 25 and 28 ° C), light intensity (2000, 6000 and 10 000lx) and pH (5, 7 and 9). After a statistical analysis of the results, it was determined that at a temperature of 24.74 ° C, light intensity of 6599.51 lx and at a pH of 8.25, a maximum attainable lipid percentage of 79.39% was obtained.

The lipid profile of the biomass grown in a photobioreactor at optimized laboratory and environmental conditions in Arequipa, presented a higher proportion of unsaturated fatty acids, the most relevant being Palmitoleic acid and Linolenic acid. The photobioreactor at controlled conditions showed 0.03% higher FAME (Fatty acid methyl ester) content, however, Arequipa's environmental conditions are considered promising for the industrial production of biofuels from the *Chlorella sp.* Microalgae, being a sustainable and economical energy alternative, since it adapted easily to natural light and presented results similar to those optimized.

Keywords: *Microalgae, biofuel, Chlorella sp., BBM medium, fatty acids, optimal conditions, FAME.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la investigación acerca de la producción de combustibles a partir de fuentes renovables, ha aumentado considerablemente. Los biocombustibles de tercera generación son llamados también biocombustibles avanzados, debido a las materias primas y a los procesos tecnológicos utilizados para su producción; la materia prima de los combustibles de tercera generación son las microalgas, éstas prometen una gran producción de biodiésel por unidad de área debido a su alto contenido de lípidos, el cual supera a todas las fuentes de biodiésel utilizadas en la actualidad. Adicionalmente, las microalgas son cultivadas en fotobiorreactores, los cuales solo necesitan un medio líquido de cultivo, algunos nutrientes y luz solar para estimular su crecimiento, esto hace factible la utilización de terrenos no aptos para cultivo de productos de alimentación humana y animal, para el montaje de los fotobiorreactores (González et al., 2009).

Las microalgas se pueden producir en tierras que no son adecuadas para otros cultivos y, por lo tanto, son complementarias de la agricultura tradicional. El cultivo comercial de microalgas comenzó hace unos 60 años. Aunque existe un rápido desarrollo de sistemas de cultivo cerrado (fotobiorreactores), en la mayoría de los sistemas comerciales a gran escala se siguen utilizando sistemas de estanque abierto o de canalización. Se cultivan diferentes especies de microalgas dependiendo de su contenido valioso como pigmentos y ácidos grasos o para su uso como peces, complementos alimenticios y colorantes (Enzing et al., 2014).

La radiación solar es uno de los factores más importantes en el crecimiento de microalgas, para alcanzar altos niveles de producción a lo largo del año es deseable que haya poca variación. Por lo tanto, las ubicaciones más adecuadas son los países cálidos cercanos al Ecuador, donde la insolación no es inferior a 3000 h/año (Slade & Bauen, 2013).

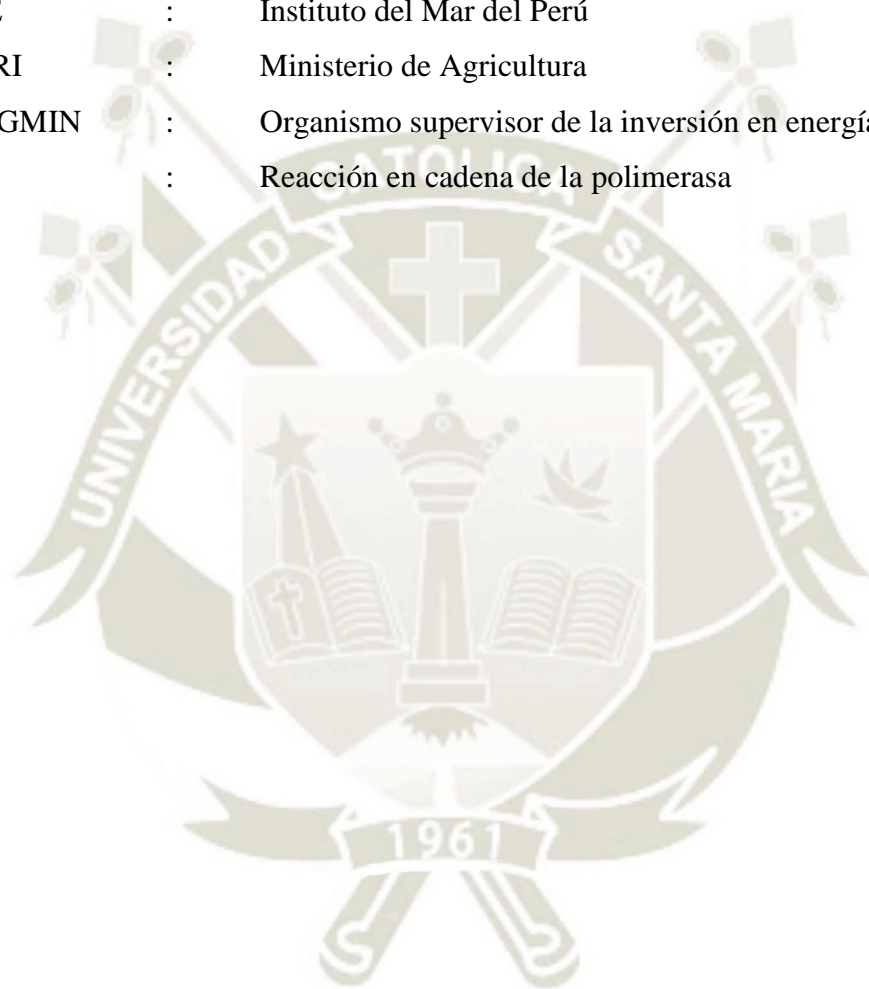
La legislación peruana promueve el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en energía renovable con el fin de diversificar el mercado de combustibles existente. Según la Ley 28054 “Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles”, en el Artículo 3: Políticas generales, se expone lo siguiente: “se debe de desarrollar y fortalecer la estructura científico-tecnológica destinada a generar la investigación necesaria para el aprovechamiento de los biocombustibles; promover la formación de recursos humanos de alta especialización en materia de biocombustibles comprendiendo la realización de programas de desarrollo y promoción de

emprendimientos de innovación tecnológica; incentivar la aplicación de tecnologías, el desarrollo de proyectos experimentales y la transferencia de tecnología adquirida; incentivar la participación privada para la producción de biocombustibles y la comercialización de los biocombustibles para utilizarlos en todos los ámbitos de la economía en su condición de puro o mezclado con otro combustible.



ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido Desoxirribonucleico
BBM	:	Bold's Basal Medium
FAME	:	Ésteres metílicos de ácidos grasos
GEI	:	Gases de Efecto Invernadero
IMARPE	:	Instituto del Mar del Perú
MINAGRI	:	Ministerio de Agricultura
OSINERGMIN	:	Organismo supervisor de la inversión en energía y minería
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa



ÍNDICE

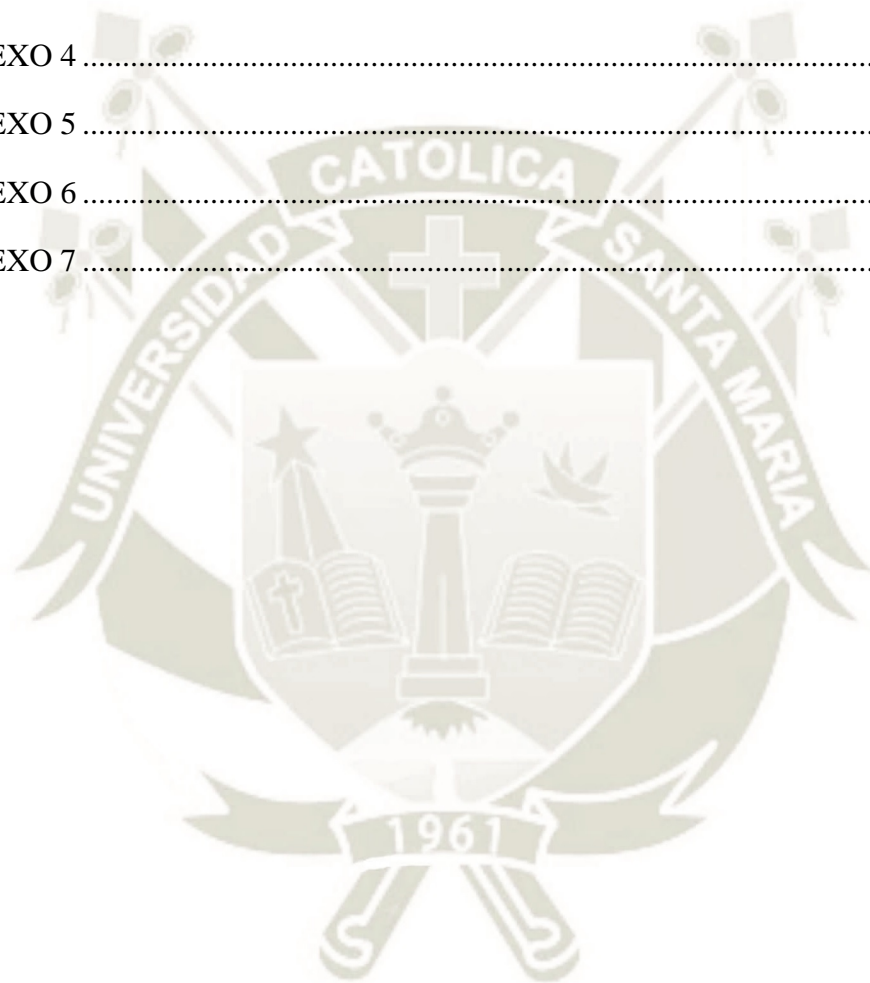
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 DIAGNÓSTICO SITUACIONAL.....	2
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.4 OBJETIVOS.....	3
1.4.1 Objetivo General	3
1.4.2 Objetivos Específicos	3
1.5 HIPÓTESIS	4
1.6 JUSTIFICACIÓN	4
1.6.1 Social.....	4
1.6.2 Económica.....	4
1.6.3 Ambiental.....	4
1.6.4 Científica	5
1.7 VARIABLES	5
1.7.1 Variable independiente.....	5
1.7.2 Variable dependiente.....	5
1.7.3 Operacionalización de variables.....	5
1.8 ALCANCE.....	6
1.9 LIMITACIONES	6
CAPÍTULO II FUNDAMENTO TEÓRICO	7
2.1 ANTECEDENTES	7
2.2 MARCO TEÓRICO	11
2.2.1 Microalgas	11
2.2.2 Biocombustible.....	22
2.2.3 Microalgas como fuente de biodiesel.....	23
2.3 MARCO CONCEPTUAL	24

2.3.1	Microalgas	24
2.3.2	Microalga <i>Chlorella sp.</i>	24
2.3.3	Biocombustibles	24
2.3.4	Fotobiorreactor	24
2.3.5	Biodiésel.....	25
2.3.6	Secuenciación.....	25
2.3.7	Medio de cultivo BBM.....	25
2.3.8	Inoculación	25
2.3.9	FAME.....	25
	CAPÍTULO III METODOLOGÍA	26
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	26
3.2	CAMPO DE VERIFICACIÓN.....	26
3.2.1	Ubicación espacial.....	26
3.2.2	Unidades de estudio.....	26
3.3	POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO.....	26
3.3.1	Población.....	26
3.3.2	Muestra.....	26
3.3.3	Muestreo.....	27
3.4	MATERIALES.....	27
3.4.1	Materiales	27
3.4.2	Reactivos	28
3.4.3	Equipos.....	29
3.5	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE LA MICROALGA <i>CHLORELLA SP.</i>.....	30
3.5.1	Recolección de muestra para la obtención de la microalga <i>Chlorella sp.</i>	30
3.5.2	Preparación de medio Bold Basal Medium (BBM)	30
3.5.3	Método de Aislamiento en placas agar.....	32

3.5.4	Escalamiento de la cepa	32
3.5.5	Purificación haciendo uso de antibiótico.....	32
3.5.6	Secuenciación de la microalga	32
3.5.7	Cultivo y mantenimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i>	33
3.6	EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LA CEPA <i>CHLORELLA SP.</i>	33
3.6.1	Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal	33
3.6.2	Elaboración del diseño experimental	37
3.6.3	Construcción del sistema para la evaluación de parámetros	37
3.6.4	Análisis estadístico	39
3.7	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO.....	40
3.7.1	Diseño del fotobiorreactor para el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	40
3.7.2	Montaje experimental del fotobiorreactor.....	40
3.7.3	Control de la variación de la temperatura	40
3.8	PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN EL FOTOBIORREACTOR A CONDICIONES AMBIENTALES LOCALES Y CONTROLADAS EN LABORATORIO.....	40
3.8.1	Instalación del fotobiorreactor en condiciones ambientales de Arequipa.....	40
3.8.2	Instalación del fotobiorreactor en condiciones controladas de laboratorio.....	41
3.8.3	Obtención de la biomasa microalgal	41
3.9	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL FAME OBTENIDO A PARTIR DE LA BIOMASA PRODUCIDA	41
3.9.1	Determinación de ácidos grasos	41
	CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE LA MICROALGA <i>CHLORELLA SP.</i>.....	43
4.1.1	Muestra para la obtención de la microalga <i>Chlorella sp.</i>	43

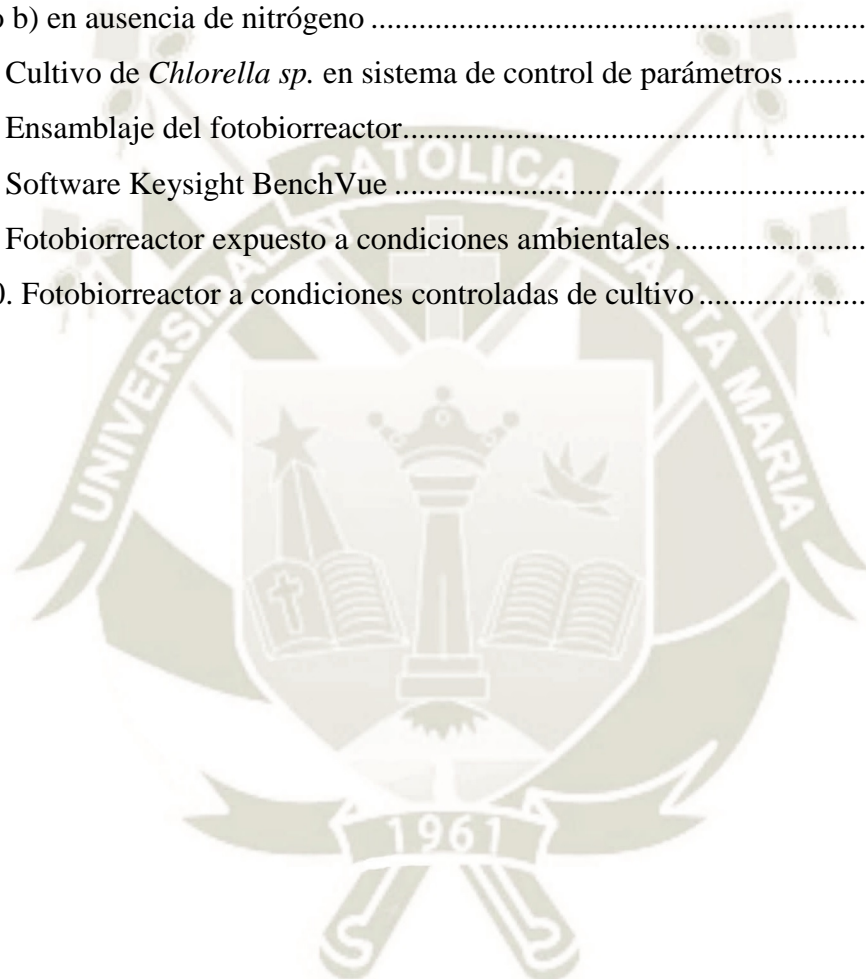
4.1.2	Aislamiento de la muestra	43
4.1.3	Escalamiento y purificación de la cepa	44
4.1.4	Secuenciación de la microalga <i>Chlorella sp.</i>	44
4.1.5	Cultivo y mantenimiento de la cepa <i>Chlorella sp.</i>	45
4.2	EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LA CEPA <i>CHLORELLA SP</i>	46
4.2.1	Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal	46
4.2.2	Diseño experimental.....	52
4.2.3	Sistema para la evaluación de parámetros.....	52
4.2.4	Análisis estadístico de los resultados	57
4.3	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FOTOBIOREACTOR PARA EL CULTIVO MICROALGAL	61
4.3.1	Diseño del fotobiorreactor para el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	61
4.3.2	Ensamblaje del fotobiorreactor	62
4.3.3	Control de la variación de la temperatura	62
4.4	PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN EL FOTOBIOREACTOR A CONDICIONES AMBIENTALES LOCALES Y CONTROLADAS EN LABORATORIO.....	63
4.4.1	Inoculación y cultivo de <i>Chlorella sp.</i> en condiciones ambientales de Arequipa...63	
4.4.2	Inoculación y cultivo de <i>Chlorella sp.</i> en condiciones controladas de laboratorio.65	
4.4.3	Obtención de la biomasa microalgal	66
4.5	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL FAME OBTENIDO A PARTIR DE LA BIOMASA PRODUCIDA	67
4.5.1	Determinación de ácidos grasos	67
4.5.2	Análisis de productividad.....	70
	CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
5.1	CONCLUSIONES.....	71
5.2	RECOMENDACIONES.....	72

CAPÍTULO VI.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	78
ANEXO 1	78
ANEXO 2	79
ANEXO 3	91
ANEXO 4	93
ANEXO 5	94
ANEXO 6	95
ANEXO 7	97



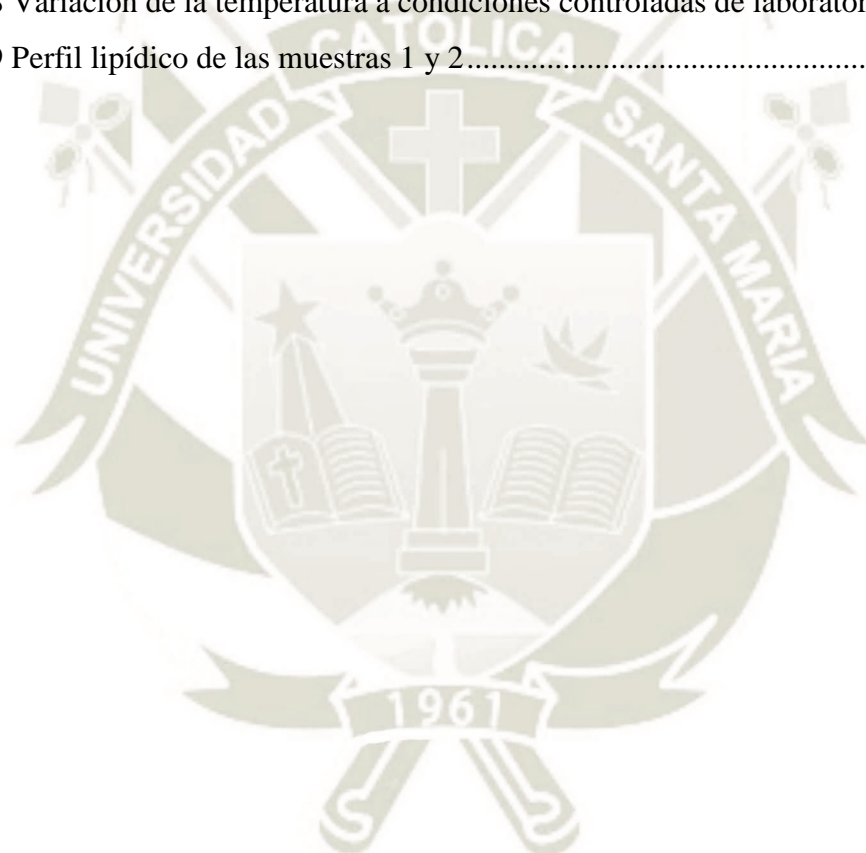
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los productos de la biomasa microalgal	12
Figura 2. Vista 40X de microalga <i>Chlorella sp</i>	43
Figura 3. Cultivo monoalgal de <i>Chlorella sp</i>	44
Figura 4. Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> en medio BBM con y sin nitrógeno	45
Figura 5. Fotobiorreactores con medio BBM a) a una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno b) en ausencia de nitrógeno	46
Figura 6. Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> en sistema de control de parámetros	53
Figura 7. Ensamblaje del fotobiorreactor.....	62
Figura 8. Software Keysight BenchVue	63
Figura 9. Fotobiorreactor expuesto a condiciones ambientales	64
Figura 10. Fotobiorreactor a condiciones controladas de cultivo	65



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal	48
Gráfico 2 Diagrama de Pareto Estandarizado para Contenido Lipídico	57
Gráfico 3 Efectos principales para contenido lipídico	58
Gráfico 4 Interacción de parámetros para Contenido lipídico	59
Gráfico 5 Superficie de Respuesta Estimada	60
Gráfico 6 Superficie de Respuesta Estimada tridimensional	60
Gráfico 7 Variación de la temperatura a condiciones ambientales de Arequipa	64
Gráfico 8 Variación de la temperatura a condiciones controladas de laboratorio	66
Gráfico 9 Perfil lipídico de las muestras 1 y 2	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Operacionalización de variables	5
Tabla 2 Productos alimenticios y no alimenticios a base de microalgas	13
Tabla 3 Taxonomía de <i>Chlorella sp.</i>	14
Tabla 4 Coordenadas UTM de la toma de muestra.....	26
Tabla 5 Listado de Materiales.....	27
Tabla 6 Listado de Reactivos	28
Tabla 7 Listado de equipos	29
Tabla 8 Soluciones stock del 1-6 del medio BBM	30
Tabla 9 Soluciones stock del 7-10 del medio BBM	31
Tabla 10 Niveles de variables para el diseño factorial	37
Tabla 11 Taxonomía de la microalga <i>Chlorella sp.</i>	44
Tabla 12 Conteo diario de la curva de crecimiento	47
Tabla 13 Resultados de la extracción de lípidos.....	49
Tabla 14 Contenido lipídico de <i>Chlorella sp.</i> Cultivada en medio BBM.....	49
Tabla 15 Optimización de pH e intensidad de luz a 22°C	53
Tabla 16 Optimización de pH e intensidad de luz a 25°C	54
Tabla 17 Optimización de pH e intensidad de luz a 28°C	54
Tabla 18 Máximo contenido lipídico.....	61
Tabla 19 Análisis de Ácidos grasos	67
Tabla 20 Contenido Porcentual de Ácidos Grasos	68

CAPÍTULO I. GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los combustibles fósiles son un recurso fundamental para la economía mundial, sin embargo, la naturaleza no renovable de sus reservas y el cambio climático han suscitado preocupaciones sobre la seguridad energética, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles (Castillo et al., 2017).

La demanda energética nacional se incrementó en un 29% en el 2017, la cual se abasteció principalmente por las importaciones, que representaron el 77% del total del combustible consumido. El incremento de la población y la mayor movilidad social en el Perú generan mayor demanda de medios de transporte, lo que a su vez implica un incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), afectando al ambiente (OSINERGMIN, 2017).

En 2012, las emisiones de CO₂ generadas solo por el consumo de combustibles líquidos representaron el 36% de las emisiones globales y esto ha sido una gran preocupación. Esto ha llevado a que la proyección general de emisiones de CO₂ se duplique para el año 2035 y se estima que para el año 2040 podría alcanzar hasta 45,000 mega toneladas (Adeniyi et al., 2018).

Los procesos de extracción y refinación de combustibles generan impactos ambientales en ecosistemas acuáticos y terrestres. Aproximadamente el 98% de las emisiones de carbono resultan de la combustión de fósiles (Fernández et al., 2012).

En el Perú se producen biocombustibles a partir de la biomasa de caña de azúcar y palma aceitera, sin embargo, estos cultivos requieren grandes extensiones de terreno y amenazan la seguridad alimentaria, ya que representan competencia directa sobre el uso de los recursos para la alimentación humana. Los extensos cultivos de palma aceitera emiten grandes volúmenes de dióxido de carbono a la atmósfera, debido al reemplazo de los bosques naturales y al cambio de la cubierta del suelo. Los bosques primarios y demás ecosistemas están siendo depredados, ocasionando graves impactos sobre el hábitat de especies silvestres y afectando los derechos territoriales de comunidades campesinas (Tierra y derechos, 2012).

El Ministerio de Agricultura (MINAGRI), reportó en 2012 que en la selva existen cinco empresas que operan seis plantas de producción de biodiésel con una capacidad de 118 TM/hora, y que en 2015 hubo más de 43 mil hectáreas cosechadas de palma aceitera, insumo para el biodiésel (OSINERGMIN, 2017).

La biomasa de las microalgas es considerada una fuente de energía renovable, debido a que genera un impacto ambiental favorable y a que no posee limitaciones en su producción. (Adeniyi et al., 2018) Son capaces de convertir de manera eficiente el CO₂ y la luz solar en biomasa y aceites intracelulares, y que al no ser usados como fuente primaria de alimentos para humanos evitan las preocupaciones por la seguridad alimentaria. Incluso en un escenario conservador, se estima que el uso de las microalgas producirá cerca de 10 veces más biodiésel por unidad de superficie de tierra que un típico oleaginosa terrestre (Tejeda et al., 2015).

1.2 DIAGNÓSTICO SITUACIONAL

Actualmente, el agotamiento de las fuentes de combustible fósil y el consecuente deterioro ambiental, han motivado la búsqueda de nuevas fuentes energéticas alternativas como los biocombustibles. No obstante, para producir cantidades considerables de éste, se necesita de gran cantidad de biomasa vegetal como materia prima que, a largo plazo, atentaría contra la seguridad alimentaria a nivel mundial. Una de las alternativas más factibles para la obtención de biomasa, es el cultivo de microalgas, ya que presentan productividades mayores que los cultivos agrícolas convencionales (Sandoval , 2013).

El biocombustible ha surgido como una alternativa viable para sustituir el diésel derivado del petróleo (Taher, Al-Zuhair, & Al-Marzouqi, 2014), puesto que presenta varias ventajas por su biodegradabilidad y mínima toxicidad, además, su combustión produce menores emisiones de sulfatos, compuestos aromáticos, dióxido de carbono, monóxido de carbono, humo; hay más oxígeno libre que conduce a una combustión completa y emisiones reducidas (Castillo et al., 2017).

En el Perú se producen biocombustibles a partir de la biomasa de caña de azúcar y palma aceitera, sin embargo, estos cultivos requieren grandes extensiones de terreno y amenazan la

seguridad alimentaria, ya que representan competencia directa sobre el uso de los recursos para la alimentación humana (Tierra y derechos, 2012).

Las expectativas sobre el desarrollo de la industria de los biocombustibles conducen al estudio de la viabilidad de nuevos tipos producidos a partir de insumos no relacionados a cultivos de alimentos y que se pueden desarrollar en tierras no ligadas a la agricultura. Entre los diferentes biocombustibles que se están estudiando, y algunos que ya han iniciado producción a pequeña escala, se encuentran aquellos a base de algas, el biodiésel hidrogenado, el éter de dimetilo y el gas natural biosintético (OSINERGMIN, 2017).

El biodiésel a partir microalgas parece ser un combustible realista para el futuro, ya que las microalgas tienen una alta tasa fotosintética, una mayor productividad de biomasa y requieren menos área de cultivo, alrededor del sólo 2% para producir la misma cantidad de biodiésel a partir de cultivos terrestres. La transesterificación es el paso clave y más importante para producir combustible más limpio y ecológico, desafortunadamente, todavía hay dificultades en el rendimiento del éster metílico de lípidos (FAME) debido al bajo rendimiento, ya que los métodos de transesterificación son inadecuados y el alto contenido de ácidos grasos libres no podrían competir con los convencionales (Mathimani et al., 2015).

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las mejores condiciones de desarrollo de la cepa *Chlorella sp.* para la obtención de FAME como principal componente del biodiesel en la ciudad de Arequipa?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Estudiar las condiciones de desarrollo de la cepa *Chlorella sp.* para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) como principal componente del biodiésel en un fotobiorreactor a escala laboratorio en la ciudad de Arequipa.

1.4.2 Objetivos Específicos

- a. Obtener, aislar, cultivar e identificar por secuenciación a la microalga *Chlorella sp.*
- b. Evaluar la influencia del nitrógeno y las condiciones óptimas de temperatura, intensidad de luz y pH para el desarrollo de la cepa *Chlorella sp.*

- c. Diseñar y construir un fotobiorreactor a escala laboratorio.
- d. Producir biomasa microalgal en el fotobiorreactor a condiciones ambientales locales y controladas en laboratorio.
- e. Determinar el contenido lipídico del FAME obtenido a partir de la biomasa producida.

1.5 HIPÓTESIS

Dado que *Chlorella sp.* presenta una alta productividad de biomasa y lipídica es considerada como la mejor opción la producción de biodiesel.

Es probable que las condiciones adecuadas de concentración de nitrógeno, intensidad de luz, temperatura y pH influyan en el desarrollo de la cepa *Chlorella sp.* para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) como principal componente del biodiésel en un fotobiorreactor a escala laboratorio en la ciudad de Arequipa.

1.6 JUSTIFICACIÓN

1.6.1 Social

Mejorar la calidad de vida de las personas, al contribuir a largo plazo con la generación de un biocombustible local que reduciría las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera e incrementaría la seguridad alimenticia al no depender de cultivos energéticos.

1.6.2 Económica

Proponer una alternativa sustentable para la producción a futuro de biocombustible, con el fin de contribuir a la disminución de la dependencia hacia los combustibles fósiles y diversificar el mercado actual. La propagación y crecimiento de las microalgas puede llegar a ser una alternativa rentable a futuro, dado que los combustibles fósiles día a día incrementan su precio y las reservas de combustible del mundo empiezan a agotarse.

1.6.3 Ambiental

El biodiésel a partir de microalgas es una alternativa al uso de combustibles fósiles, dado que su cultivo permitiría captar grandes cantidades de CO₂ de la atmósfera, así como también, disminuir la emisión de gases de efecto invernadero generados por el sector automotriz.

1.6.4 Científica

Establecer una base científica para incentivar el desarrollo de investigación en energías renovables respecto a la producción de biocombustibles a partir de la microalga *Chlorella sp.* en Arequipa.

1.7 VARIABLES

1.7.1 Variable independiente

Condiciones de desarrollo de la cepa *Chlorella sp.*

1.7.2 Variable dependiente

Obtención de FAME a partir de la microalga *Chlorella sp.*

1.7.3 Operacionalización de variables

Tabla 1 Operacionalización de variables

Tipo de variable	Variables	Indicadores	Escala	Instrumento
Independiente	Condiciones de desarrollo de la cepa <i>Chlorella sp.</i>	Concentración de nitrógeno	Gramos por litro (g/L)	Balanza analítica e instrumentos de medición volumétrica
		Temperatura	Grados centígrados (°C)	Termómetro
		Intensidad de luz	Lux (lx)	Luxómetro
		Potencial hidrógeno	pH	Potenciómetro
		Densidad celular	Células por Mililitro (cel/ml)	Cámara de Neubauer
Dependiente	Diseño de un fotobiorreactor	Diseño del fotobiorreactor	Volumen (V)	Fotobiorreactor
		Producción de biomasa	Gramos (g)	Fotobiorreactor y Balanza analítica
	Obtención de FAME	Contenido de FAME (Fattid Acid Methyl Ester)	Gramos por Mililitro (g/ml)	Cromatógrafo de gases
		Contenido lipídico	Porcentaje (%)	Cromatógrafo de gases

Fuente: Elaboración propia

1.8 ALCANCE

Se pretende obtener las mejores condiciones de desarrollo de la cepa *Chlorella sp* para la producción de biocombustibles en la ciudad de Arequipa.

1.9 LIMITACIONES

- a. El prolongado período de crecimiento, desarrollo y la adaptabilidad a escala laboratorio de la microalga *Chlorella sp*.
- b. Dificultad en la instalación de un sistema adecuado destinado al control de los parámetros de crecimiento y desarrollo de la microalga *Chlorella sp*.
- c. Dificultad en realizar la caracterización lipídica, debido a la poca disponibilidad de biomasa de la microalga *Chlorella sp*.

CAPÍTULO II FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La búsqueda de combustibles alternativos y de bajo impacto ambiental es cada vez más importante debido a factores económicos y medioambientales. La naturaleza no renovable de las reservas de combustibles fósiles y el cambio climático han suscitado preocupaciones sobre la seguridad energética, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles (Acosta et al., 2009). Estudios previos han demostrado la capacidad de algunos alimentos (aceite de soya y palma) para la producción de biodiésel, sin embargo, existe el debate sobre la factibilidad de utilizarlos para la obtención de energía, ya que podría ser una competencia directa con el uso recursos para alimentación humana y animal (Castillo et al., 2017).

Chen et al., determinó que las microalgas son las mejores candidatas como materia prima en la producción de biodiésel, dado que poseen un alto contenido de aceite y una tasa de crecimiento elevado. En el proceso de investigación del potencial de las microalgas para la producción de biodiésel, se debe tener en cuenta si es que el aceite de las microalgas está considerado para la alimentación (Chen et al., 2018).

En concordancia con lo anteriormente señalado, Dickinson et al. concluyó que el biodiésel a base de microalgas ha surgido como una alternativa sostenible, debido a que ésta utiliza una materia prima renovable (Dickinson et al., 2016). La biomasa de las microalgas puede contener una fracción de aceite muy alta y, por lo tanto, podría usarse para la producción de biocombustibles avanzados a través de diferentes procesos de conversión. Su principal ventaja es la capacidad de convertir casi toda la energía de la materia prima en diferentes variedades de productos útiles (Martins et al., 2018).

Las ventajas que tienen los biocombustibles producidos a partir de la biomasa microalgal, en comparación a los combustibles fósiles convencionales, son las siguientes: alta productividad, menor uso de la tierra (se utilizan principalmente fotobiorreactores con parámetros controlados), bajo requisito en el recurso hídrico utilizado (pueden usarse aguas residuales), mitigación del CO₂ y favorecimiento en su producción sostenible dado que es un recurso renovable (Zhou et al., 2015).

El cultivo de microalgas para producir biodiésel, se considera una solución práctica debido a su alta tasa de crecimiento y la capacidad de sintetizar una gran cantidad de lípidos dentro de sus células. Sin embargo, la rentabilidad del sistema de cultivo es el principal problema en la producción de biodiésel (Bei Tan et al., 2018).

El problema radica en que el proceso de producción utiliza una elevada cantidad de energía y químicos, debido a la gran porción de biomasa de microalgas que queda como residuos. Se investigaron los impactos ambientales del ciclo de vida de la producción de biodiésel a base de microalgas. Se evaluaron distintas consecuencias relacionadas a la formación de smog fotoquímico, la acidificación, la emisión de gases de efecto invernadero y los demás impactos ambientales (Soratan et al., 2014).

Rogers et al., identificó barreras en los costos y los recursos a utilizarse en la producción del biocombustible. Concluyendo que se requieren inversiones sustanciales que incluyen costos principales centrados en la eficiencia de la extracción y al contenido de lípidos. Estrategias alternativas podrían abordar las barreras de costos para que la producción de biocombustibles a partir de microalgas, alcance todo su potencial (Rogers et al., 2014).

La mejora de la tecnología de combustible de algas y bioproductos de escala piloto a nivel comercial es posible superando los desafíos y limitaciones asociados. Subproductos con extensas aplicaciones utilizados en la bioenergía, la industria nutracéutica y farmacéutica, pueden hacer rentable la obtención de bioetanol, biodiesel y acetite vegetal, a partir de microalgas (Khan, et al., 2018).

Adeyeni et al., estableció que un sistema de cultivo artificial (fotobiorreactor) como el más efectivo, en términos de alto volumen de producción debido a las mejores condiciones ambientales de cultivo. Sin embargo, se requieren trabajos adicionales para identificar el proceso de extracción de mayor rendimiento económico y de mayor rendimiento energético, para mejorar la viabilidad económica del sector mundial de biocombustibles de algas (Adeniyi et al., 2018).

La huella hídrica del cultivo de microalgas en un sistema cerrado se encuentra en el rango de 2.4 a 6.8 m³/kg de biomasa seca, siendo la etapa de operación la que tiene mayor contribución

(> 60%), debido a que en esta etapa se utiliza agua y nutrientes. Por lo cual, se concluye que es necesario seguir realizando las investigaciones necesarias para que la producción del biocombustible a base de microalgas sea rentable y acceda al mercado actual (Martins, et al., 2018).

Respecto al cultivo y al índice de crecimiento de las microalgas, se tiene bien en claro que la cantidad de agua dulce necesaria no es elevada (incluso se puede utilizar aguas residuales), no se requiere de grandes extensiones de tierra para su producción y se llegaría a reducir el impacto generado por los combustibles fósiles disminuyendo la generación de gases de efecto invernadero (Dickinson et al., 2016).

Dada su mayor producción lipídica y de biomasa respecto a otras especies, *Chlorella vulgaris* resulta idónea para su explotación como fuente de ácidos grasos para la producción de biodiesel, con una composición lipídica promedio de 27,8%. Esta especie es fácilmente adaptable a diferentes condiciones de cultivo y sustratos, característica deseable para cultivos a gran escala, y presenta un corto ciclo de crecimiento, disminuyendo los riesgos de contaminación con especies no deseadas (Rodríguez et al., 2016).

Según Dairy et al., la mejor condición para el crecimiento y la producción lipídica de la microalga *Chlorella Vulgaris* se da en un fotobiorreactor con régimen mixotrófico, medio alcalino (pH de 9 a 10), temperatura de 30°C, intensidad de luz de 5 a 7 kLux, aireación de 100 ml/min, utilizando nitrógeno y glucosa (en una concentración de 20 y 0.5 g/L respectivamente) como fuente de nutrientes. La cantidad de biomasa producida fue de 3.43 g/L y la producción lipídica fue de 66.25 mg/L/día (Daliry et al., 2017).

Rodríguez et al., determinó la influencia de las variables pH y concentración de nitrógeno, con y sin presencia de oligoelementos, sobre la productividad del crecimiento de la biomasa de microalgas. Los resultados demostraron que en el intervalo estudiado (pH entre 6 y 8 y concentración de NaNO_3 entre 0,5 y 1 g/L) estas variables no tienen un efecto significativo en el crecimiento, mientras que la presencia de oligoelementos lo favorece (Rodríguez et al., 2016).

El objetivo del estudio realizado por Nayak, et al., fue determinar la influencia del ácido sulfhídrico y el nitrógeno para mejorar la productividad de los lípidos en el cultivo de dos

etapas de *Chlorella sp.* Para ello, ajustó la duración de las etapas repletas de nitrógeno (N^+) y agotadas (N^-) dentro de un período de 9 días utilizando urea como fuente de nitrógeno. El mayor contenido de lípidos del 36.7% y la productividad de $216.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ la obtuvieron a los cinco días de N^+ seguidos por cuatro días de condiciones de N^- . La reposición de fósforo y otros nutrientes ($N^-P^+O^+$) al comienzo de la falta de nutrientes dio como resultado una mejora de 1.55 y 1.68 veces en la productividad de los lípidos en comparación con los controles de una sola etapa y cero nutrientes ($N^-P^-O^-$), respectivamente. Las propiedades estimadas del biodiésel basadas en los perfiles de ácidos grasos cumplieron con todos los criterios de los estándares internacionales. Los hallazgos de este estudio indican que el ajuste adecuado del período de disponibilidad de nitrógeno y la presencia de otros nutrientes es muy importante para maximizar la productividad de los biocombustibles en el cultivo de microalgas de dos etapas (Nayak, et al., 2019).

De manera similar Cho, et al. estudió la influencia del nitrógeno en los cambios en los pigmentos, así como en la producción de biomasa y lípidos por *Chlorella vulgaris*. Utilizó seis lámparas fluorescentes blancas de 30W. Para verificar las respuestas de crecimiento a diferentes concentraciones de Nitrógeno total (TN), la concentración de TN se ajustó a 50-250 mg/L con nitrato de sodio (NaNO_3). TN se suministró a medio BG11 de la siguiente manera: 250 mg/l a los 0 días; 100 mg / l en el día 25; 70 mg/l en el día 40; y 50 mg/l en el día 62. Después del día 76, se mantuvieron nuevamente 250 mg/l de TN. Los resultados determinaron que la biomasa máxima de algas y la producción de lípidos se obtuvieron a partir de 70 mg/L de concentración de TN, junto con un aumento significativo en la transmisión de luz y la reducción de pigmentos. Asimismo, la composición de los ácidos grasos poliinsaturados aumentó notablemente a bajas concentraciones de TN. Estos resultados sugieren que la reducción en la síntesis de pigmentos mediante la modulación de la concentración de nitrógeno puede servir como una eficaz estrategia para potenciar la biomasa algal y la producción de lípidos (Cho et al., 2019).

Con el fin de optimizar las concentraciones de biomasa y lípidos de *Chlorella vulgaris* UTEX 26, la investigación fue diseñada en tres etapas, inicialmente los medios de cultivo BBM (Bold Basal Medium) y HAMGM (Medio de Crecimiento Mínimo Altamente Asimilable). Posteriormente, el compuesto fuente de nitrógeno fue optimizado para reducir las concentraciones de amonio y nitrato. Como resultado del proceso de optimización, el medio de cultivo mejoró el 40% de la biomasa ($0,73 \text{ g L}^{-1}$) en comparación con el medio BBM y el 85%

de la concentración de lípidos (281 mg L^{-1}), con respecto al medio HAMGM. El análisis por cromatografía de gases reveló que C16: 0, C18: 0, C18: 1, C18: 2 y C18: 3 fueron los principales ácidos grasos producidos por *Chlorella vulgaris* UTEX 26 (Ramírez et al., 2016).

En la investigación realizada por Tejeda et al., se estudió el cultivo de las microalgas *Chlorella sp.* y *Dunaliella salina* bajo diferentes condiciones de pH, concentración de nitrógeno (mg L^{-1}), y la caracterización de los aceites obtenidos, con el fin de evaluar su potencial uso como materia prima en la producción de biodiésel. Las microalgas fueron cultivadas en medio Conwy modificado, durante 15 días y la concentración de nitrógeno fue ajustada con nitrato de sodio (NaNO_3). Los resultados expresaron que *D. salina* alcanzó una máxima concentración celular de 1.15×10^6 células mL^{-1} en 6 días de cultivo en unas condiciones de 8.5 pH y 0.1 mg L^{-1} concentración de nitrógeno, mientras que *Chlorella sp.* presentó una máxima concentración celular de 2.6×10^7 células mL^{-1} en 14 días de cultivo en unas condiciones de 7.5 pH y 0.1 mg L^{-1} concentración de nitrógeno. Asimismo, en el aceite de *D. salina* se encontró una concentración de 51% p/p de ácido linolénico, mientras que para el aceite de *Chlorella sp.* fue de 39% p/p. Con relación al ácido oleico, el aceite de *Chlorella sp.* presentó una concentración de 35% p/p, superior al aceite de *D. salina*, con 25% p/p. El aceite de la microalga *Chlorella sp.* presentó una distribución de ácidos grasos más uniforme y con menos insaturaciones, en comparación con el aceite de la microalga *D. salina*, lo que podría significar mejores propiedades de lubricación, altos puntos de ebullición y poderes caloríficos (Tejeda et al., 2015).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Microalgas

2.2.1.1 Características generales

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotas y eucariotas, capaces de utilizar nutrientes como el dióxido de carbono (CO_2), agua y energía solar para producir biomasa y se consideran interesantes en este contexto ya que poseen un elevado contenido en aceites (hasta un 60% en peso) (Mulumba et al., 2012).

Viven en condiciones no muy favorables y se localizan en hábitats diversos como agua de mar, agua dulce, agua salobre, aguas residuales o en el suelo, bajo un amplio intervalo de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes, debido a su estructura unicelular o multicelular simple (Rodríguez et al., 2016).

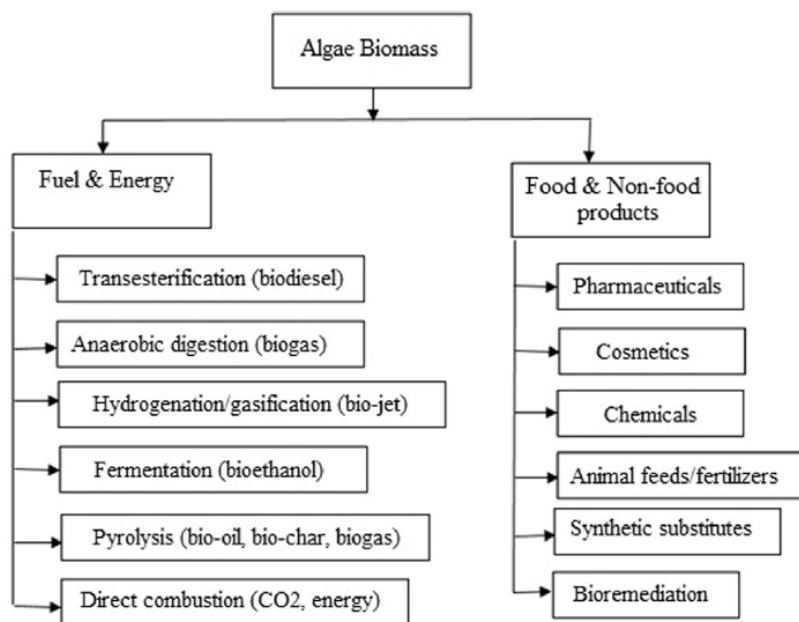
2.2.1.2 Productos obtenidos a partir de las microalgas

Actualmente, la producción mundial de microalgas se destina principalmente a aplicaciones de elevado valor añadido, ya que la biomasa de algas, además de contener proteínas, lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, minerales y vitaminas, posee excelentes cualidades para la obtención de productos naturales. Las microalgas se pueden usar potencialmente en un gran número de áreas de biotecnología, biocombustibles, cosméticos, productos farmacéuticos, nutrición, aditivos alimentarios, acuicultura y prevención de la contaminación (Sun et al., 2010).

2.2.1.3 Usos y aplicaciones de las microalgas

El potencial de la aplicación de las microalgas generalmente muestra que esta materia prima sigue siendo un recurso sin explotar, pudiendo llegar a ser de gran utilidad comercial brindando beneficios a la economía global, dado que existen millones de microalgas (Sunganya et al., 2016).

Figura 1. Diagrama de los productos de la biomasa microalgal



Fuente: Suganya, Varman, Masjuki, & Renganathan, 2016

a. Productos alimenticios y no alimenticios

El alto contenido de proteínas de las microalgas las ha convertido en un importante extracto recombinante, como C-ficocianina, astaxantina y β -caroteno, fuentes de vitamina A y aditivos cosméticos (Johnson & Wen, 2009).

Las algas se produjeron por primera vez comercialmente como aditivos alimentarios en Japón a principios de los 60's que luego se expandió a Estados Unidos, India, Israel y Australia (Kandiyoti et al., 2017).

El consumo humano de biomasa de algas se centra en muy pocas especies como *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*, que generalmente se comercializan como productos saludables y alimenticios que vienen en tabletas o en polvo. (Gao et al., 2012) En el tratamiento de aguas residuales del cultivo heterotrófico de la producción de microalgas, los sistemas tienden a ser una idea prometedora para la limpieza ambiental. Compuestos orgánicos como el fósforo y el nitrógeno de algunos los desechos en cuerpos de agua también se pueden usar como nutrientes para biomasa de algas (Johnson & Wen, 2009).

Tabla 2.Productos alimenticios y no alimenticios a base de microalgas

Categories	Products
Pharmaceuticals	Astaxanthin, β -carotene, Omega-3 fatty acid, CoenzymeQ. 10
Cosmetic	Anti-cellulite, Skin anti-ageing, and sensitive skin treatment
Chemicals	Paints, Dyes, Colourants
Animal feeds/fertilizers	Shrimp feed, shellfish feed, marine larvae, fertilizers
Synthetic substitutes	Biopolymers bioplastics, Lubricants
Hydrocolloids	Agar, Aliginate, Carrageenan
Bioremediation	Wastewater treatments and nutrients, CO2 capture, carbon credits

Fuente: Johnson & Wen, 2009.

b. Combustible y energía

Las microalgas convierten eficientemente la energía solar, debido a que sus células crecen en suspensiones acuosas y tienen un rendimiento eficiente, acceso a CO₂, agua y otros nutrientes.

El contenido de aceite de las algas, en relación con su peso en seco, las convirtió en el combustible renovable ideal y fuente de energía a través de diferentes procesos de conversión como la transesterificación, digestión anaerobia,

fermentación, pirólisis y combustión directa. Sin embargo, algunos de estos métodos de conversión son complejos y con altos costos económicos. A pesar de lo mencionado, pueden llegar a ser comercialmente viables si todos sus subproductos se utilizan de manera óptima (Ghadiryantar et al., 2016).

2.2.1.4 Microalga *Chlorella* sp.

El nombre *Chlorella* proviene del griego “Chloros”, que significa verde, y del latín ella, que significa cosa pequeña; fue descubierta y nombrada por el holandés Martinus Willem Beijerincken en 1890 (Ríos, 2010).

Chlorella es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. Pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Chlorophyceae*. Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos, es una de las primeras formas de vida; ha estado en la tierra desde el periodo pre-Cámbrico por más de 2,5 millones de años. Su característico color verde esmeralda y el olor de hierba agradable se deben a su alto contenido de clorofila. *Chlorella* tiene un tamaño de 2 a 8 μm que hace posible que se observe sólo bajo un microscopio (Infante et al., 2011).

La reproducción asexual se representa por medio de autoesporas y forman grupos irregulares o colonias, esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluidos en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos (Jimenez & Jimenez, 2012).

2.2.1.5 Clasificación taxonómica de la microalga *Chlorella* sp.

Tabla 3 Taxonomía de *Chlorella* sp

Reino	<i>Protista</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Chlorococcales</i>
Familia	<i>Oocystaceae</i>
Género	<i>Chlorella</i>

Fuente: Posten & Feng Chen, 2015

2.2.1.6 Características biológicas de la microalga *Chlorella sp.*

Chlorella es una especie con una alta concentración de nutrientes, lo que le permite mantener vida independiente, contiene alrededor de 18 aminoácidos, incluidos todos los aminoácidos esenciales, lo que la convierte en una fuente de proteína completa y de alta calidad, tiene una amplia gama de vitaminas (incluyendo vitamina A, C, E) que favorecen el valor nutricional de su biomasa (Quintana et al., 1999).

También contiene la mayor concentración de clorofila (5 a 10 veces mayor que cualquier otra microalga) y ácidos nucleicos (RNA y DNA), ácidos nucleicos esenciales para la producción de energía, estructura y función celular (Quintana et al., 1999).

Las microalgas representan una fuente natural importante de principios activos de gran valor en el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones; además, pueden ser usadas para la producción de componentes de alto valor añadido y como biomasa propia para el inicio de procesos de bioproducción (Carbajal et al., 2010).

a. Lípidos

La microalga *Chlorella sp.*, es una de las microalgas más representativas por su elevado contenido de lípidos, además, se destaca que la producción de lípidos se encuentra influenciada por varios factores físicos y químicos, esta modificación provoca una respuesta de estrés que se manifiesta por variaciones en la composición de lípidos sintetizados, que varía de una especie a otra (Pérez et al., 2011).

Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol formados por ácidos grasos con cadenas constituidas de 14-20 átomos de carbono, pueden ser saturados o insaturados como: ácido eicosapentaenoico, y ácido linoléico (Albarracin, 2007).

b. Vitaminas

Los cultivos de *Chlorella* son utilizados como suplemento alimenticio sustituyendo fuentes alimenticias comunes; su contenido vitamínico depende del genotipo, estado

del ciclo de crecimiento, estado nutricional, intensidad de la luz y otros factores que pueden afectar el desarrollo y metabolismo de la microalga (Quintana et al., 1999).

c. Clorofila

Chlorella tiene la mayor cantidad de clorofila en comparación con todas las algas verde y otras plantas, su contenido de clorofila puede llegar tan alto como el 7% del total de sus de peso, 10 veces más que la *Spirulina*, y 10 veces más que la alfalfa (Camacho et al., 1999).

d. Aminoácidos

Chlorella tiene una buena composición de aminoácidos, tiene 8 aminoácidos esenciales, además contiene una gran cantidad de aminoácidos no esenciales, por lo que puede compensar deficiencias en el cuerpo, siendo una proteína completa (Quintana et al., 1999).

e. Sales minerales

Los componentes minerales como el potasio, el calcio, el magnesio o aquellos elementos como el hierro, el zinc y el selenio son indispensables para las reacciones del metabolismo celular. Estos están presentes a su vez para reforzar la formación de sustancias como los huesos, los dientes y uñas para favorecer una formación de mejor calidad, resistentes. *Chlorella* además de contener dichos minerales, es también una fuente de ácido lipídico, un factor de crecimiento microbiano importante (Bertoldi et al., 2006).

2.2.1.7 Cultivo de microalgas

En general, las microalgas dependen para su crecimiento de un suministro de carbono y de una fuente de luz para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismo. Al considerar el empleo de microalgas para la producción de biodiesel, es importante definir cuantitativamente la influencia de factores que intervienen en su crecimiento y que favorecen la producción de lípidos, así como su interrelación para poder manipularlos en la obtención de biomasa con determinadas características. Entre las condiciones de cultivo afectan factores abióticos como la concentración de

nutrientes, la calidad y cantidad de luz, la temperatura, el O₂, el CO₂, el pH, la salinidad y factores operacionales como mezclado y la edad del cultivo (Arias et al., 2013).

2.2.1.8 Cinética de crecimiento de las microalgas

Son cinco las fases de crecimiento en un cultivo típico de microalgas. Las cuales se definen por un número de células presentes a un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo (González Reyes, 2000).

a. Fase inicial

En esta fase es poco el incremento o densidad celular, es una fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones de medio. Esta fase se puede dilatar entre 1 a 3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo (González Reyes, 2000).

b. Fase exponencial

En esta fase la división celular se incrementa en función del tiempo. El incremento de la población existente es debido a que las células están asimilando los nutrientes en el medio y su proceso de reproducción asexual es activo. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta 4 días. Si se controla la dilución del cultivo ésta etapa puede prolongarse por semanas (González Reyes, 2000).

c. Fase de declinación de la fase exponencial

La división celular es lenta cuando los nutrientes, luz, pH, CO₂, u otros factores físicos o químicos han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento, y puede durar de uno a dos días en los cuales la edad del cultivo alcanza su valor máximo (González Reyes, 2000).

d. Fase estacionaria

En esta fase el factor limitante (carencia de nutrientes) y tasa de crecimiento están balanceados, es decir, que las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un período relativamente prolongado (González Reyes, 2000).

e. Fase de declinación

Durante esta fase las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes, la densidad celular comienza fenecer rápidamente liberando azúcares, proteínas, lípidos, los cuales son aprovechados en algunos casos por bacterias oportunistas que se alimentan de ella desplazando a la población que aún se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa (González Reyes, 2000).

2.2.1.9 Formas de cultivo

El desarrollo de un método de cultivo de microalgas, depende de los requerimientos y exigencia de la calidad de éstos (González Reyes, 2000).

a. Según su naturaleza**- Cultivos Intensivos**

Son aquellos cultivos en los que los factores del crecimiento se mantienen completamente bajo control, de tal modo que se obtiene una máxima respuesta en la producción de la población (González Reyes, 2000).

- Cultivos Extensivos

Son aquellos cultivos en que solo se controlan las variables más accesibles en el manejo técnico, tales como las características químicas del medio y la densidad del cultivo, como reguladora de la luz (González Reyes, 2000).

b. Según la forma de cosecha**- Cultivos Discontinuos (BATCH)**

Estos tipos de cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar las cinéticas de crecimientos y los parámetros que inciden en el crecimiento celular. Ésta supone la recogida completa del recipiente de cultivo y es la forma más simple de operar, aunque supone mayor trabajo que otros sistemas.

La carga de nutrientes y la luz, son proporcionadas al inicio del cultivo, aun cuando pueden realizarse ajustes de luz en las primeras fases del cultivo (González Reyes, 2000).

- **Cultivo continuo**

Es aquel cultivo en el que se mantiene la fase exponencial durante largos períodos de tiempo, así como las características químicas del medio, la temperatura y la luz, son sostenidas en un valor constante.

La ventaja de estos cultivos es que las muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ello, hay que añadir continuamente nutrientes en la misma medida en que son retirados del medio, para mantener los parámetros de crecimiento y población celular a nivel constante.

Para mantener cultivos continuos, todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes. La densidad del cultivo se controla, manteniéndola a concentración constante (González Reyes, 2000).

- **Cultivo semicontinuo**

Es la combinación de los dos métodos anteriores, en este tipo de cultivo, parte del volumen se recoge para su utilización, generalmente al final de la fase exponencial, y la cantidad que se retira se reemplaza con medio de cultivo fresco (González Reyes, 2000).

c. **Según la pureza del cultivo**

- **Cultivos Axénicos**

Son aquellos en los que hay una sola especie de microalga, cultivos en que la población se mantiene libre de bacterias.

Es un tipo de cultivo delicado que requiere de un manejo cuidadoso (González Reyes, 2000).

- **Cultivos Monoespecíficos**

Son cultivos en que la población de microalga se encuentra con una pequeña carga bacteriana. Éstos son los que más se utilizan industrialmente, debido a que es muy difícil mantener cultivos sin bacterias.

En los cultivo unialgales las microalgas crecen mejor que en los axénicos, ya que se produce una interacción beneficiosa entre la bacteria y las microalgas (González Reyes, 2000).

2.2.1.10 Parámetros de Cultivo

a. Nutrientes

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato o como amonio (Hernández et al., 2014).

El nitrógeno ha sido demostrado como el principal regulador en el crecimiento y acumulación de lípidos. Dado que la disminución de nutrientes limita el crecimiento celular, al momento de seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la acumulación de lípidos, es necesario maximizar su producción volumétrica para cada cepa (Arias et al., 2013).

- **Bold's Basal Medium (Medio BBM)**

Bold's Basal Medium (BBM) es un medio de algas de agua dulce que se ha utilizado para cultivar una variedad de cultivos de algas verdes sin la necesidad de extracto de suelo o vitaminas.

La naturaleza predominantemente inorgánica de este medio se facilita como medio de mantenimiento del cultivo axénico (Bold & Nichols, 1965).

b. Luz

La intensidad luminosa influye notablemente en la actividad fotosintética, el contenido de pigmento y composición química de la microalga. El efecto de la luz es un aspecto importante a considerar en el cultivo de una especie microalgal, para la producción de biocombustibles, es necesario considerar su intensidad, su calidad espectral y la necesidad de establecer un fotoperiodo (Arias et al., 2013).

c. Temperatura

La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C (Hernández et al., 2014).

Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en la célula, además de que los efectos son específicos para cada especie (Arias et al., 2013).

d. Agitación

La agitación de los cultivos de microalgas es necesaria para evitar la sedimentación celular y para asegurar su exposición uniforme a la luz y a los nutrientes, además de que favorece el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el medio externo. Un mezclado inadecuado, reduce la productividad de biomasa y puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo (Arias et al., 2013).

2.2.1.11 Sistemas de Cultivo para Microalgas

En la producción de organismos fotoautótrofos existen 2 diseños básicos: cultivo abierto, donde la biomasa está expuesta a las condiciones medioambientales; y cerrados, denominados fotobiorreactores con poco ningún contacto con el medio externo. Un sistema de cultivo es diseñado en base a diversos criterios: la biología de la especie a cultivar, forma de cultivo, requerimientos nutricionales, lumínicos y resistencia al estrés; relación de la superficie iluminada; sistema de regulación de temperatura (Hernández et al., 2014).

a. Sistemas de Cultivos Abiertos

Son los sistemas más comunes, comprenden tanto modificaciones naturales, como lagunas y estanques; medios artificiales con variedad de diseños. Las ventajas de los sistemas abiertos radican en su bajo costo y facilidad de construcción y operación, así como en la alta durabilidad (Hernández et al., 2014).

Sin embargo, en un sistema de cultivo abierto es difícil mantener una sola especie de microalga, debido a la facilidad de contaminación biológica, que puede incluso suponer la infección de dicho cultivo por bacterias u otros microorganismos. El modo de conseguir mantener un monocultivo en este tipo de sistemas es mediante el control de las condiciones ambientales (Parque Científico y Tecnológico de Gijón, 2013).

Por ello, muchas producciones comerciales se reducen a especies que crecen en condiciones ambientales extremas, tales como pH y temperatura (Hernández et al., 2014).

b. Sistemas de Cultivos Cerrados

Las dificultades en los sistemas de cultivo abiertos han favorecido el desarrollo de cultivos cerrados. Éstos permiten un importante control de los parámetros, disminuyendo sustancialmente los problemas presentes en los sistemas abiertos (Hernández et al., 2014).

Los sistemas cerrados se encuentran en total aislamiento con el ambiente exterior y, por tanto, sin contacto directo con la atmósfera. Este aislamiento total del medio externo supone una reducción total de la contaminación, un mayor control de las condiciones de cultivo y, en general, una mayor rentabilidad (Parque Científico y Tecnológico de Gijón, 2013).

- Fotobiorreactores

Los rendimientos de los fotobiorreactores son superiores a los de los sistemas abiertos ya que proveen protección contra agentes externos (contaminación, patógenos o depredadores) y minimizan el impacto del clima (lluvias, evaporación y fluctuaciones de temperatura estacionales).

El ensuciamiento de las superficies transparentes debido a bacterias y otros organismos (entre ellos, las propias algas) es uno de los mayores problemas operativos de los fotobiorreactores (Greenwell et al., 2010).

2.2.2 Biocombustible

Los biocombustibles son combustibles producidos a partir de biomasa o residuos de materias primas, principalmente destinados al transporte (OSINERGMIN, 2017).

Los biocombustibles son una alternativa emergente al combustible de base fósil, del cual nos hemos vuelto dependientes para satisfacer nuestras necesidades energéticas (Fernández et al., 2012).

2.2.2.1 Tipos de biocombustible

a. Biocombustibles de primera generación

Los biocombustibles líquidos de primera generación son los más socorridos; esto se demuestra porque hoy en día se está produciendo aproximadamente el equivalente a 20 millones de toneladas de petróleo, lo que significa 1% del consumo mundial total (Salinas & Gasca, 2009).

b. Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles de segunda generación se distinguen de los de primera generación en dos aspectos: se obtienen de vegetales que no tienen una función alimentaria, y se producen con innovaciones tecnológicas que permitirán ser más ecológicos y avanzados que los actuales (Salinas & Gasca, 2009).

c. Biocombustibles de tercera generación

El término “tercera generación” se ha empezado a aplicar recientemente a los biocombustibles y se refiere a los biocombustibles obtenidos a partir de algas o microalgas.

Por ello también se les conoce como oleoalgal, oilgae o algaeoleum. Anteriormente, los biocombustibles obtenidos de las algas quedaban englobados en los de segunda generación, pero visto los superiores rendimientos partiendo de menor cantidad de materia prima, se ha considerado apropiado crear un grupo específico para ellos (Viswanath et al., 2010).

- Biodiesel a partir de microalgas

Hoy en día se está estudiando su viabilidad de producir biodiesel a partir de microalgas marinas como una fórmula para disminuir presión a muchas materias primas y liberar campos de cultivo para dedicarlos a la alimentación (Salinas et al., 2009).

El biodiésel es un biocombustible sintético líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación, y que se aplica en la preparación de sustituto total o parcial del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo (Riba Ruíz, 2010).

2.2.3 Microalgas como fuente de biodiesel**- Lípidos en microalgas**

Muchas microalgas acumulan altos niveles de aceite, que pueden ser convertidos en biodiesel. Las microalgas pueden acumular más del 80% de los lípidos en el peso seco de la biomasa (Chisti, 2007).

La mayoría de las microalgas acumulan lípidos neutros; debido al bajo grado de insaturación, estos lípidos son esenciales para la producción de biodiesel (Viswanath et al., 2010).

Según el Departamento de Energía de los Estados Unidos, el rendimiento de aceite de las algas es de 10 a 100 veces más alto que los cultivos convencionales de semillas oleaginosas como la palma. Las microalgas tienen un alto rendimiento teórico de producción de 47,000 a 308,000 L ha en un año; mientras que el aceite de palma tiene la capacidad de producir 5,950 L de biodiesel por año (Ahmad et al., 2011).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

2.3.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotas y eucariotas, las cuales captan el dióxido de carbono de la atmósfera y utilizan energía solar para producir biomasa.

2.3.2 Microalga *Chlorella sp.*

La microalga *Chlorella sp.* presenta un color verde esmeralda y olor de hierba debido a su contenido alto de clorofila. Tiene un tamaño de 2 a 8 μm , por lo cual solo es posible observar la muestra en un microscopio.

2.3.3 Biocombustibles

Los biocombustibles son combustibles producidos a partir de restos orgánicos o también llamados biomasa. Existen tres tipos de biocombustibles: primera generación, segunda generación y tercera generación; los biocombustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de vegetales no destinados a la alimentación, con potencial energético y una tasa de crecimiento elevado.

2.3.4 Fotobiorreactor

Sistema cerrado que proporciona un microambiente adecuado y estable (pH, concentración de oxígeno, luz y temperatura), así como también los nutrientes necesarios para para que el cultivo de microalgas genere una cantidad importante de biomasa.

2.3.5 Biodiésel

Combustible líquido obtenido a partir de lípidos de origen natural, como los aceites vegetales o las grasas animales, los cuales son sometidos a procesos de transesterificación.

2.3.6 Secuenciación

Procedimiento para la identificación taxonómica de una determinada muestra, con la secuenciación del ADN se determina la clase de información genética que es transportado por un segmento específico de ADN.

2.3.7 Medio de cultivo BBM

El medio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) es utilizado para cultivar variedad de cultivos de algas verdes, entre los cuales se encuentra la microalga *Chlorella sp.*

2.3.8 Inoculación

Proceso por medio del cual se inicia el cultivo de la microalga *Chlorella sp.* con una densidad celular determinada, agregando biomasa concentrada en medio BBM.

2.3.9 FAME

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) son un tipo de éster de ácido graso que se derivan por el método de transesterificación de grasas con metanol. Las moléculas en el biodiesel son principalmente ésteres metílicos de ácidos grasos, obtenidas generalmente de aceites vegetales; son utilizados para producir detergentes y biodiesel.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El enfoque de la investigación cuantitativa describirá el fenómeno resultante y explicará las variables que influyen para la obtención de biocombustible.

El diseño de la investigación es experimental, y se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes, para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador (Hernández Sampieri, 2014).

3.2 CAMPO DE VERIFICACIÓN

3.2.1 Ubicación espacial

Esta investigación se llevará a cabo en los laboratorios de investigación de la Universidad Católica de Santa María.

3.2.2 Unidades de estudio

Las condiciones para el desarrollo de la microalga *Chlorella sp.* con alto contenido lipídico.

3.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

3.3.1 Población

La población comprende la microalga *Chlorella sp.*, la cual tiene la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes como las sales minerales, en condiciones autotróficas y sustancias orgánicas (Chinnasamy, 2010).

3.3.2 Muestra

La muestra se extraerá de un cuerpo hídrico ubicado en la localidad de Pampa de Camarones, distrito de Sachaca, ciudad de Arequipa. Las coordenadas se detallan a continuación.

Tabla 4 Coordenadas UTM de la toma de muestra

Norte	Este
8 183 794.3	225 260.5

Fuente: Elaboración propia

3.3.3 Muestreo

La muestra será tomada directamente con una botella de 150 ml de capacidad, de preferencia color ámbar, a 20-30 cm de profundidad. Se llenará el frasco hasta el 90% de su capacidad (Ministerio del Ambiente, 2014).

3.4 MATERIALES

3.4.1 Materiales

Tabla 5 Listado de Materiales

MATERIALES		
Material	Cantidad	Características / Descripción
Botella de borosilicato con tapa	3 unidades	Capacidad de 1000 ml
Botella de borosilicato con tapa	18 unidades	Capacidad de 250 ml
Filtros	1 bolsa	Filtros para aire
Bombas de aire	8 unidades	Flujo de 3L/min
Conexión Tee	30 unidades	Conexión Tee para manguera
Llave de paso	30 unidades	Conexión para manguera
Matraz	1 unidad	Capacidad de 1000 ml
Varilla de vidrio	1.50 m	6 mm de diámetro
Varilla de vidrio	3 m	5 mm de diámetro
Varilla de vidrio	1.50 m	4 mm de diámetro
Cápsulas	18 unidades	Capacidad de 100 ml
Tubos Falcon	1 bolsa	Capacidad de 15 ml
Pipeta Pasteur	3 unidades	Material de vidrio
Acrílico	2 m	Acrílico transparente de 6mm de grosor
Manguera cristal	15 m	Transparente de 6 mm de diámetro
Fiola	1 unidad	Capacidad de 1000 ml
Focos LED	3 unidades	Focos LED de 3000 lux
Tiras LED	2 unidades	Tira LED color blanco, autoadhesiva.

Fuente: Elaboración propia

3.4.2 Reactivos

Tabla 6 Listado de Reactivos

REACTIVOS		
Reactivo/Medio	Cantidad	Características/Grado de pureza
Nitrato de sodio	100g	NaNO ₃ / Grado P.A.
Cloruro de calcio dihidratado	30g	CaCl ₂ .2H ₂ O / Grado P.A.
Sulfato de zinc heptahidratado	50g	ZnSO ₄ .7H ₂ O / Grado P.A.
Cloruro de manganeso tetrahidratado	50g	MnCl ₂ .4H ₂ O / Grado P.A.
Óxido de Molibdeno (VI)	50g	MoO ₃ / Grado P.A.
Sulfato de cobre pentahidratado	50g	CuSO ₄ .5H ₂ O / Grado P.A.
Nitrato de cobalto hexahidratado	50g	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O / Grado P.A.
Ácido bórico	50g	H ₃ BO ₃ / Grado P.A.
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	200g	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ / Grado P.A.
Cloruro de calcio dihidratado	30g	CaCl ₂ .2H ₂ O / Grado P.A.
Cloroformo	5 L	CHCl ₃
Metanol	1.5 L	CH ₃ OH

Fuente: Elaboración propia

3.4.3 Equipos

Tabla 7 Listado de equipos

EQUIPOS		
Equipo	Modelo / Marca	Características/Descripción
Luxómetro	3252 / Control Company	Fuente de luz: Diurna, Tungsteno, Fluorescente, Mercurio. Rango/ Resolución: 0 A 1999 (1lux); 2000 A 19,990 (10 lux); 20,000 A 50,000 (100 lux) Exactitud: $\pm 4.5\%$ Fotocelda: 2" y Cable: 1M
Centrífuga	Rotofix 32A / HETTICH	Voltaje: 208-240V Amperaje: 1,4 A Frecuencia: 50-60Hz Velocidad máxima: 6000 rpm Densidad máxima: 1,2 kh/dm ³
Bortex	9453VWALEU / VWR	Voltaje: 230V Watts: 135 Amperios: 0.6 Frecuencia: 50/60 Hz 1 Fase
Baño ultrasónico	DC-150H / mrc Laboratory Equipment	Poder Ultrasonico: 150W Frecuencia Ultasonica: 40kHz Poder calorífico: 300W Voltaje: 220-240V Capacidad: 6 L
Balanza Analítica	ENTRIS224-1S / Sartorius Lab Instruments	Voltaje: 220-240V Peso máximo: 220 g Precisión: 0,1 mg
Campana Extractora	EFA-6UDRCW-8 / ESCO	Poder: 100W Voltaje: 220-240 V AC Frecuencia: 50/60Hz Potencia: 1PH
Estufa	0494898 / J.P. SELECTA S.A.	Poder: 250W Voltaje: 230V Frecuencia: 50/60Hz Amperaje: 1.6
Cocina eléctrica	BPL-9890 / BRUDER	Voltaje: 220V Frecuencia: 50-60Hz

Fuente: Elaboración propia

3.5 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP.*

3.5.1 Recolección de muestra para la obtención de la microalga *Chlorella sp.*

La recolección de la muestra de agua para la obtención de la microalga *Chlorella sp.* se realizó en base al protocolo de colecta de comunidades biológicas del Ministerio del Ambiente (Ministerio del Ambiente, 2014).

Como se detalla en el Sección 3.3, se realizó el muestro de agua en un cuerpo hídrico ubicado en la localidad de Pampa de Camarones, distrito de Sachaca. Se seleccionó el punto de muestreo y se tomaron sus coordenadas, señaladas en la Tabla 4.

3.5.2 Preparación de medio Bold Basal Medium (BBM)

3.5.2.1 Preparación de Soluciones Stock

Las soluciones stock fueron realizadas al diluir los reactivos de la Tabla 08 y Tabla 09 en 250 ml y 50 ml de agua destilada respectivamente, estas soluciones podrán ser guardadas y almacenadas para utilizarlas cuando sean requeridas (Arredondo et al., 2007).

Tabla 8. Soluciones stock del 1-6 del medio BBM

SOLUCIONES STOCK PRINCIPALES		
Solución N°	Reactivo	Cantidad
1	NaNO ₃	6.25 g
2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.875 g
3	NaCl	0.625 g
4	K ₂ HPO ₄	1.875 g
5	KH ₂ PO ₄	2.5 g
6	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.625 g

Fuente: (Arredondo et al., 2007)

Tabla 9. Soluciones stock del 7-10 del medio BBM

SOLUCIONES STOCK DE ELEMENTOS TRAZA		
Solución N°	Reactivo	Cantidad
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.103 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.180 g
	MoO ₃	0.089 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.196 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49 g
8	H ₃ BO ₃	0.061 g
9	EDTA	6.250 g
	KOH	3.875 g
10	FeSO ₃ .7H ₂ O	0.623 g
	H ₂ SO ₄	0.125 ml

Fuente: (Arredondo et al., 2007)

3.5.2.2 Preparación del medio BBM

Para elaborar 100 ml de medio BBM, se agregó 1000 µL de las soluciones stock del número 1 al 6, y 100 µL de las soluciones stock del número 7 al 10, enrazando a un volumen de 100 ml con agua destilada, para luego ser autoclavado a 121°C a 15 psi durante 20 minutos (Arredondo et al., 2007).

En la preparación de medio BBM sin nitrógeno, se excluye la solución stock número 1, la cual contiene Nitrato de Sodio. Cabe resaltar que el medio BBM posee una concentración de 0.025 mg/L de Nitrato de Sodio.

La preparación del medio BBM se realizó en un ambiente inocuo con la ayuda de una micropipeta de 1000 µL y una de 100 µL, y una fiola esterilizada.

3.5.3 Método de Aislamiento en placas agar

- Se utilizó el medio BBM, adicionando 2% de agar.
- Se esterilizó en el autoclave a 120 ° C y 1.1 kg/cm² de presión durante 15 min.
- Se dejó secar a temperatura ambiente y antes que se solidifique, se vació en placas Petri estériles.
- Con un asa de col se tomó 1 o 2 gotas de la muestra de agua y se realizó el sembrado mediante la técnica de rayado en estrías, sellando la placa e incubando durante 8 días.
- Posteriormente, se seleccionó con un asa de col las colonias libres de microalgas de otros microorganismos y se volvió a realizar el procedimiento de aislamiento (Arredondo et al., 2007).

3.5.4 Escalamiento de la cepa

La placa de *Chlorella sp.*, se utilizó para escalar el cultivo en medio líquido, se tomó colonias identificadas y se diluyeron en 50 ml de medio BBM, se instaló un sistema de iluminación LED de 3000 lux y una bomba de aire con un flujo de 3 lt/min, para proporcionar condiciones de iluminación y aireación.

3.5.5 Purificación haciendo uso de antibiótico

- Se diluyó 700 mg de Eritromicina en 1 L de agua destilada.
- Se agregó 50 ml de la solución concentrada al cultivo y se procedió a incubar por un periodo de 48 horas.
- Después de incubar los cultivos de microalgas de 24 a 48 h bajo condiciones adecuadas, se transfirió asépticamente a un medio BBM estéril y sin antibióticos, observándose los cultivos regularmente durante 2 a 3 semanas, para comprobar si están exentos de bacterias (Arredondo et al., 2007).

3.5.6 Secuenciación de la microalga

Para identificar la especie de la microalga cultivada, se mandó a analizar dos muestras de 50 ml de microalga en medio BBM al laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín. El procedimiento de identificación consistió en cuatro etapas principales: extracción de ADN, Amplificación por PCR, Secuenciación y análisis bioinformático.

3.5.7 Cultivo y mantenimiento de la cepa *Chlorella sp.*

Se repartió el cultivo inicial en dos botellas de borosilicato que contenían 250 ml de medio BBM con nitrógeno (0.250 mg/L de concentración de Nitrato de Sodio) y sin nitrógeno (en ausencia de Nitrato de Sodio), colocando en cada una 100 ml del medio inicial. Para mantener el cultivo microalgal, se agregó 50 ml de medio cada quince días.

Se instaló un sistema de iluminación LED de 3000 lux y una bomba de aire con un flujo de 3 lt/min, para permitir la fotosíntesis y la aireación.

3.6 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LA CEPA *CHLORELLA SP.*

3.6.1 Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal

3.6.1.1 Montaje experimental de fotobiorreactores

Se realizó el montaje de seis fotobiorreactores en botellas de borosilicato de 250 ml de capacidad, para ello se realizó dos perforaciones (de 6 mm y 4 mm) en cada una de las tapas de las botellas. Para cada fotobiorreactor, se cortó 13 cm de la varilla de 6 mm y 8 cm de la varilla de 4 mm, la cual fue doblada posteriormente en calor.

Se insertaron las varillas de vidrio en las perforaciones realizadas anteriormente, la varilla de 6 mm fue conectada a una fuente de aireación marca Rokasd, modelo AP-208, con una potencia de 2.5W y un flujo de salida de aire de 3L/min, utilizando accesorios como llaves de paso, filtros de aire y Tees, así mismo, la varilla de 4 mm fue utilizada para la salida de aire del sistema.

Se instaló un sistema de iluminación LED de 3000 lux, para permitir la fotosíntesis en las microalgas, con un fotoperiodo de 12:12 horas.

3.6.1.2 Inoculación de la cepa en el medio BBM

a. Protocolo para el recuento celular con cámara de Neubauer

- Se agitó el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.
- Se diluyó 1 ml de la muestra con 9 ml de agua destilada; cuando la muestra está muy concentrada, se debe volver a repetir la dilución 1:10. Generalmente

una dilución 1:10 es suficiente, pero es necesario verificar que la concentración resultante sea suficiente para obtener una precisión adecuada.

- El tubo se agita y se succiona una muestra con una micropipeta.
- Se llena la cámara con el cubreobjeto ya puesto, colocando la punta de la micropipeta en la muestra, cuidando que el volumen depositado sea suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente. Si esto sucede, se seca y limpia la parte inferior de la cámara y se observa al microscopio para verificar que las células tengan una distribución adecuada (no agrupada).
- Generalmente se enfoca la cámara con el objetivo 10X, aunque en ocasiones cuando se trata de células pequeñas, se utiliza el de 40X. Esto facilita la identificación de las células, discriminando los residuos y demás objetos con tamaño similar a la especie que se está cultivando.
- El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C y D. En el caso de las células que tocan las líneas de demarcación entre cuadros, se cuentan solamente las que tocan dos de los cuatro lados, seleccionados al azar.
- Para tener un recuento más preciso, se usan tres o más submuestras de cada muestra y con éstas se calcula la concentración media. Para calcular la concentración celular (cél/mL) se utiliza la fórmula:

$$C = N * D$$

Donde:

C = cel/ml

N = Células contadas

D = Factor de dilución

- Con los datos de concentración celular (cél/ ml) de cada recuento en tiempos sucesivos (generalmente a intervalos de 24 h) se obtiene la curva de crecimiento graficando en el eje de las “Y” los valores de concentración y en el eje de las “X” el tiempo (en días) (Arredondo et al., 2007).

b. Inoculación de medio BBM a una concentración inicial de 1'000,000 cel/ml

Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer del cultivo inicial, obteniendo una concentración de 77'000,000 cel/ml. Posteriormente, mediante una ecuación simple, se calculó un inóculo de 3.250 ml de biomasa microalgal, para tener una concentración de 1'000,000 cel/ml en 250 ml de medio BBM. Se instaló el sistema por triplicado de 3 botellas inoculadas en medio BBM con nitrógeno y 3 botellas sin nitrógeno.

3.6.1.3 Elaboración de la curva de crecimiento microalgal

Se monitoreó el crecimiento de la microalga *Chlorella sp.*, tomando una alícuota de 1 ml cada 24 horas durante 360 horas. Se realizó el conteo por duplicado de cada muestra, utilizando la cámara de Neubauer de 0.1 mm. Se recolectaron los datos del conteo celular, y se construyó la curva de crecimiento (colocando al tiempo en el eje X y la concentración de biomasa en el eje Y), considerando un tiempo de 360 horas. Los cultivos iniciaron con una densidad celular de 1'000,000 cel./ml.

3.6.1.4 Extracción de lípidos utilizando el método Blight y Dyer modificado por IMARPE

a. Método de Blight y Dyer modificado por IMARPE

- Se pesa entre 5 y 50 mg de microalgas en un tubo de ensayo de 15 ml, tubo 1. Se adicionaron 3 ml de una mezcla de solventes cloroformo:metanol (1:2).
- Se somete a ultrasonido por 3 ciclos de 15 min en un baño de agua.
- Se deja reposar los tubos por 24 horas a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favoreció la extracción completa de los lípidos.
- Se somete a ultrasonido por 3 ciclos de 15 min en un baño de agua.
- Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min. Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un tubo de vidrio de 15 ml (tubo 2). A la biomasa residual (tubo 1), se agrega 1,5 ml de solución $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2); se agita en Vortex por espacio de un minuto y se centrifugó nuevamente a 4500 rpm por 20 min recuperando el extracto, tubo 2.

- Se agrega 2 ml de solución salina de 0,58% NaCl al tubo 2, que contiene el extracto, y se agitó en Vortex por 1 min.
- Se centrifuga a 4500 rpm por 10 min y se eliminó el 90% de la fase superior.
- Se separa la fase inferior (CHCl₃:lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur (se debe tratar de recuperar sólo cerca del 90% de esta fase, no toda). Se coloca la fase clorofórmica recuperada en un nuevo tubo 3.
- Se lava la fase acuosa remanente con 1 ml de CHCl₃, se mezcló en Vortex y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm durante 10 min, se recupera la fase inferior (CHCl₃: lípido) y se coloca en el tubo 3.
- Se seca la fase clorofórmica (tubo 3) a 70°C, bajo la campana de seguridad
- El contenido de lípidos se determina gravimétricamente (IMARPE, 2011).

b. Extracción lipídica

- Se extrajo 45 ml de cada cultivo en tres tubos Falcon de 15 ml, se centrifugaron las muestras a bajas revoluciones para no desnaturalizar las células (3000 rpm durante 20 min).
- Se recolectó el pellet formado en el tubo Falcon, colocándolo en una cápsula y secándolo a 110°C por 1 hora.
- La biomasa seca fue pulverizada, y se pesaron seis muestras de 40 mg de microalgas pulverizadas, las muestras fueron tratadas siguiendo el método de Blight y Dyer modificado por IMARPE descrito anteriormente.
- Este método es frecuentemente empleado para la extracción de lípidos totales de microalgas oleaginosas debido a su simplicidad y efectividad. La cantidad de lípidos totales extraídos se calculó con la siguiente ecuación (IMARPE, 2011):

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = (\text{PL} - \text{PM}) \times 100$$

Donde:

PL = Peso seco de los lípidos totales

PM = Peso seco de las Microalgas.

3.6.2 Elaboración del diseño experimental

Se determinó que los parámetros a optimizar son intensidad de luz (2000, 6000 y 10 000 lx), temperatura (22, 25 y 28°C) y pH (5, 7 y 9).

Se realizó un diseño factorial, en el que se consideró tres factores cuantitativos que fueron la intensidad de luz, temperatura y pH.

Tabla 10 Niveles de variables para el diseño factorial

Variables		Niveles		
		I	II	III
X1	pH	5	7	9
X2	Temperatura, °C	22	25	28
X3	Intensidad de luz, lux	2000	6000	10000

Fuente: Elaboración propia

3.6.3 Construcción del sistema para la evaluación de parámetros

De acuerdo al diseño experimental, se debe realizar 54 ensayos en tres tiempos, es decir 18 ensayos a la vez, que permitan controlar las condiciones de temperatura, intensidad de luz y pH.

3.6.3.1 Control de la temperatura

Se diseñó y construyó un sistema Baño María para el control de parámetros, con acrílico transparente de 6 mm de grosor, cortado con tecnología láser. Las dimensiones del Baño María fueron de 51.5 cm de largo, 26.4 cm de ancho y 13 de alto, además se contó con dos divisiones de 26.4 cm de largo y 13 cm de ancho. (Ver Anexo 1)

Se ensambló las piezas del sistema de acrílico con pernos de 1/8" de diámetro y una fina capa de silicona industrial para evitar fugas, se forró el sistema con papel aluminio incrementando la incidencia de luz, además se acondicionó una tapa de cartón forrada de papel aluminio, para evitar el ingreso de la luz natural. Para mantener la temperatura, se utilizaron 3 celdas Peltier TEC1-12706 que fueron conectadas a una fuente de alimentación modelo UTP3305, la cual permitía regular el voltaje de las celdas. El baño María se llenó con agua destilada y se introdujo las celdas Peltier, que transmitían calor al agua y mantenían los biorreactores a la temperatura indicada. (22, 25 y 28°C)

3.6.3.2 Control de la intensidad de luz

Se acondicionó una caja de cartón forrada con papel aluminio, de 52 cm de largo, 27 cm de ancho y 25 cm de alto, para cerrar el baño María y evitar el ingreso de luz natural. Se incluyó la prolongación de las dos divisiones realizadas en el baño María, además se realizó tres agujeros de 5 cm de diámetro al medio de cada espacio dividido, para poder colocar el sistema de iluminación.

Se instalaron 3 focos LED E2 GU10 6W, se midió la intensidad de luz con el luxómetro a la distancia en la que encontrarían los biorreactores, dando un resultado de 15 000 lx, para reducir la intensidad de luz, se colocó capas de papel blanco hasta alcanzar los valores establecidos de 2000, 6000 y 10 000 lx. El sistema fue conectado a un temporizador que permitía establecer un fotoperiodo de 12:12 horas.

3.6.3.3 Modificación del pH del medio BBM sin nitrógeno

Se preparó un total de 4 500 ml de medio BBM sin nitrógeno, luego se dividió el medio en tres partes iguales de 1 500 ml cada una. Para la acidificación del medio se utilizó Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) y se midió con el potenciómetro hasta alcanzar un pH de 5. Asimismo, para la basificación del medio se utilizó Hidróxido de sodio (NaOH) diluido en agua destilada, el cual fue agregado hasta alcanzar un pH de 7 y 9.

3.6.3.4 Inoculación de la cepa *Chlorella sp.*

Se realizó el conteo celular del cultivo de *Chlorella sp.* en cámara de Neubauer, obteniendo una concentración de 45'500,000 cel/ml. Para una concentración inicial de 1'000,000 cel/ ml se calculó un inóculo de 5.495 ml de biomasa microalgal para cada biorreactor.

3.6.3.5 Conexión de la aireación

Los biorreactores utilizados fueron 18 botellas de borosilicato de 250 ml, con dos perforaciones de 6 mm y 4 mm en cada una de las tapas, en las que se colocó dos varillas de vidrio con un largo de 13 cm y 8 cm, para la aireación y salida del aire respectivamente.

Para romper la burbuja y tener una aireación uniforme se conectaron difusores en cada varilla de 6 mm de diámetro. Se adecuó un sistema para la distribución de la aireación, que consistió en tubos herméticamente sellados, con seis perforaciones superiores y dos inferiores de 6 mm de diámetro.

Las perforaciones superiores fueron conectadas a llaves de paso que regulaban la intensidad de la aireación, y las perforaciones inferiores fueron conectadas a fuentes de aireación marca Rokasd, modelo AP-208, con una potencia de 2.5W y un flujo de salida de aire de 3L/min, utilizando uniones simples.

Tanto las fuentes de aireación como los biorreactores fueron conectados al tubo con manguera cristal transparente de 6 mm de diámetro. En total se conectaron dos fuentes de aireación para seis biorreactores.

3.6.3.6 Extracción de lípidos

Una vez concluido el periodo de cultivo, se cosechó la biomasa microalgal, la cual fue centrifugada en tubos Falcon de 45 ml a 3000 rpm durante 20 min.

Se recolectó el pellet formado en el tubo Falcon, colocándolo en una cápsula y secándolo a 110°C por 1 hora.

La biomasa seca fue pulverizada, y las muestras fueron tratadas siguiendo el método de Blight y Dyer modificado por IMARPE descrito anteriormente en la Sección 3.6.1.4. Se determinó la cantidad de ácidos grasos mediante gravimetría.

3.6.4 Análisis estadístico

Se procesaron los datos con el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI, mediante un diseño factorial. El análisis estadístico permite optimizar los resultados de los parámetros de pH, intensidad de luz y temperatura, utilizados posteriormente.

3.7 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO

3.7.1 Diseño del fotobiorreactor para el cultivo de *Chlorella sp.*

El criterio para el dimensionamiento del fotobiorreactor fue empírico, determinado por las experiencias referenciadas en la literatura. El diámetro de las columnas no debe ser superior a 0.20 m, ya que la disponibilidad de la luz se verá severamente reducida, pero si es muy pequeño se verá afectado el crecimiento de las microalgas, dado que las temperaturas serán elevadas. La altura de la columna debe ser como máximo 4 m, para evitar que la concentración de oxígeno disuelto aumente exponencialmente (Rodríguez et al., 2016).

3.7.2 Montaje experimental del fotobiorreactor

El sistema fue construido a partir de dos tubos prefabricados en acrílico transparente de 20 y 5 cm de diámetro con un largo de 50 cm, se ensambló ambas piezas con dos tapas de acrílico, considerando siete agujeros en la tapa superior, seis para la aireación y uno para el control de la temperatura.

3.7.3 Control de la variación de la temperatura

Para el control de la variación de la temperatura se instaló un sensor de temperatura o Termocupla Tipo K, conectada a un adquirente de datos modelo 34972A.

3.8 PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN EL FOTOBIORREACTOR A CONDICIONES AMBIENTALES LOCALES Y CONTROLADAS EN LABORATORIO

3.8.1 Instalación del fotobiorreactor en condiciones ambientales de Arequipa

Se preparó 15 L de medio BBM sin nitrógeno y se modificó su pH a 8.25 con Hidróxido de Sodio. El pH se determinó de acuerdo al valor óptimo del análisis estadístico descrito en el Capítulo IV, sección 4.2.4.

El fotobiorreactor fue instalado en el cuarto piso del pabellón F de la Universidad Católica de Santa María.

3.8.2 Instalación del fotobiorreactor en condiciones controladas de laboratorio

De acuerdo al análisis estadístico descrito en el Capítulo IV, sección 4.2.4, se obtuvo los valores óptimos de pH a 8.25, intensidad de luz a 6599.51 lx y temperatura a 24.7 °C, los cuales serán aplicados al fotobiorreactor en condiciones controladas de laboratorio. Se preparó 15 L de medio BBM sin nitrógeno y se modificó su pH a 8.25 con Hidróxido de Sodio.

Se adaptó una caja de cartón de 30 cm de ancho y 75 cm de alto para proteger el cultivo de la luz natural. Se instaló tres focos LED E2 de 6W en los lados de la caja, y se cubrió con papel blanco hasta alcanzar los 6600 lx. Con el fin de permitir una iluminación uniforme, se instaló un fluorescente LED VALUE T8 de 50 cm de largo y 2.5 cm de diámetro en el interior del tubo del fotobiorreactor de 5 cm de diámetro. El sistema de iluminación fue programado para tener un fotoperiodo de 12:12 horas. Para el mantenimiento de la temperatura a aproximadamente 24.7°C se utilizaron 3 celdas Peltier TEC1-12706 conectadas a una fuente de alimentación, la cual permitía regular el voltaje de las celdas.

3.8.3 Obtención de la biomasa microalgal

Una vez concluido el periodo de cultivo de 360 horas, tanto para el cultivo realizado a condiciones ambientales como a condiciones controladas en laboratorio, se dejó decantar la biomasa microalgal en un balde de 15 L de capacidad. Posteriormente, el medio concentrado se pasó a peras de decantación, luego se centrifugaron las muestras en tubos Falcon de 50 ml, a bajas revoluciones para no desnaturalizar las células (3000 rpm durante 20 min). Se recolectó el pellet formado en los tubos Falcon, colocándolo en cápsulas y secándolas a 110°C por 1 hora, la biomasa seca fue pulverizada con ayuda de una cucharilla metálica.

3.9 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL FAME OBTENIDO A PARTIR DE LA BIOMASA PRODUCIDA

3.9.1 Determinación de ácidos grasos

La biomasa microalgal fue analizada por el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, debidamente acreditado por

INACAL. El método validado utilizado para la caracterización lipídica fue el GC FID 001 Versión 001, por cromatografía de gases con detección FID.

El informe de ensayo N°ANA04K19.004353A para la Muestra 1, biomasa obtenida a partir del cultivo realizado en condiciones ambientales de Arequipa, se adjunta en el Anexo 6. Asimismo, el informe de ensayo N°ANA04K19.004353B, para la Muestra 2 realizada en condiciones controladas de laboratorio, se encuentra en el Anexo 7.



CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP.*

4.1.1 Muestra para la obtención de la microalga *Chlorella sp.*

La zona seleccionada para el muestreo presentaba características de estancamiento, el agua era de color verde, lo cual indicaba la presencia de microalgas.

Se utilizó una botella ámbar de 250 ml, se introdujo la botella a 30 cm de profundidad y se llenó el frasco hasta el 90% de su capacidad. Se obtuvo una muestra de 200 ml de agua color verde claro, un olor ligeramente fétido y una temperatura de 19°C.

Se etiquetó considerando los datos de procedencia, tipo de muestra, fecha y hora. Se procedió al cierre hermético y protección adecuada para su transporte. Las muestras fueron conservadas en recipientes “coolers” con icepacks.

4.1.2 Aislamiento de la muestra

Se aisló exitosamente la microalga *Chlorella sp.* por el método de placas agar mediante la técnica de rayado en estrías. Se identificó también la presencia de hongos y otros microorganismos, los cuales fueron descartados en el primer cultivo sólido.

La cepa *Chlorella sp.* presenta características morfológicas elipsoidales, siendo una alga unicelular inmóvil de 2 a 10 μm . (Des Abbayes et al., 1989)

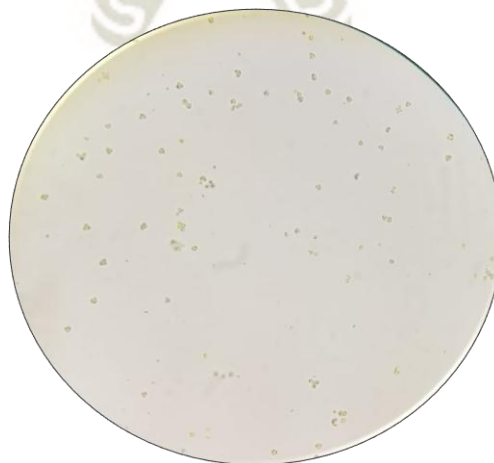


Figura 2. Vista 40X de microalga *Chlorella sp.*
Fuente: Elaboración propia

4.1.3 Escalamiento y purificación de la cepa

La cepa de *Chlorella sp.* se adaptó rápidamente al medio de cultivo líquido, mostrando un crecimiento exponencial y una coloración verde claro. Según la investigación realizada por Tomisek, la Eritromicina es el mejor antibiótico para purificar cultivos de *Chlorella sp.*, ya que no inhibe el crecimiento regular de la microalga (Tomisek et al., 1957).

El uso del antibiótico permitió la purificación de la muestra de microorganismos como bacterias y hongos, obteniendo un cultivo monoalgal de *Chlorella sp.*

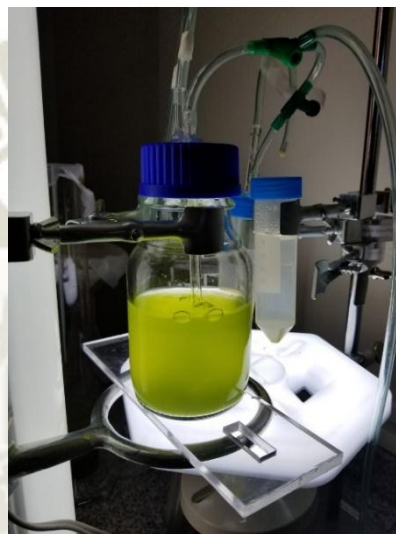


Figura 3. Cultivo monoalgal de *Chlorella sp.*
Fuente: Elaboración propia

4.1.4 Secuenciación de la microalga *Chlorella sp.*

El informe de secuenciación determinó que el ADN extraído de las muestras, pertenecen a la familia *Chlorellaceae* y género *Chlorella sp.* (Ver Anexo 2)

La muestra pertenece a un consorcio microalgal de *Chlorella sp.*, por lo que se identificó un patrón mixto asociado a la presencia de ADN de diferentes especies.

Tabla 11 Taxonomía de la microalga *Chlorella sp.*

Taxonomía	
Reino:	<i>Plantae (Primoplantae)</i>
División:	<i>Chlorophyta</i>
Clase:	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden:	<i>Chlorellales</i>
Familia:	<i>Chlorellaceae</i>
Género:	<i>Chlorella sp.</i>

Fuente: Informe de secuenciación (Anexo 2)

Diversas investigaciones han demostrado que *Chlorella sp.* presenta las mayores ventajas para la producción de biocombustibles tanto por su productividad lipídica como microalgal respecto a otras especies (Tejeda et al., 2015).

De acuerdo con Rodríguez et al., la microalga posee un promedio de 27,8% de contenido lipídico, lo que la hace idónea para su explotación como fuente de ácidos grasos. Además es fácilmente adaptable a diferentes condiciones de cultivo y sustratos, característica deseable para cultivos a gran escala, y presenta un corto ciclo de crecimiento, disminuyendo los riesgos de contaminación con especies no deseadas (Rodríguez et al., 2016). Asimismo, Tejeda et al., destaca a *Chlorella vulgaris* como la más comúnmente utilizada para la producción de biodiesel, debido a su alta productividad de biomasa (Tejeda et al., 2015).

4.1.5 Cultivo y mantenimiento de la cepa *Chlorella sp.*

El mantenimiento de las cepas se puede hacer en medio líquido o sólido, los cultivos líquidos de las cepas se mantienen en recipientes de volumen pequeño, la transferencia de los cultivos se realiza generalmente cada 15 - 20 días, dependiendo del crecimiento de la cepa (Arredondo et al., 2007). La microalga *Chlorella sp.* creció satisfactoriamente en botellas de borosilicato de 250 ml, tanto en medio BBM con nitrógeno y sin nitrógeno. El cultivo fue renovado cada 360 horas (15 días).



Figura 4. Cultivo de *Chlorella sp.* en medio BBM con y sin nitrógeno
Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la Figura 4, la pigmentación del cultivo con nitrógeno es un tono verde oscuro, sin embargo el cultivo con medio sin nitrógeno muestra una coloración verde claro.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LA CEPA *CHLORELLA SP*

4.2.1 Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal

4.2.1.1 Curva de crecimiento microalgal

La cinética de crecimiento para la microalga *Chlorella sp.* se determinó para un periodo de 360 horas. Se obtuvo un crecimiento satisfactorio tanto para la microalga con medio BBM a una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno, como para el medio BBM sin nitrógeno.

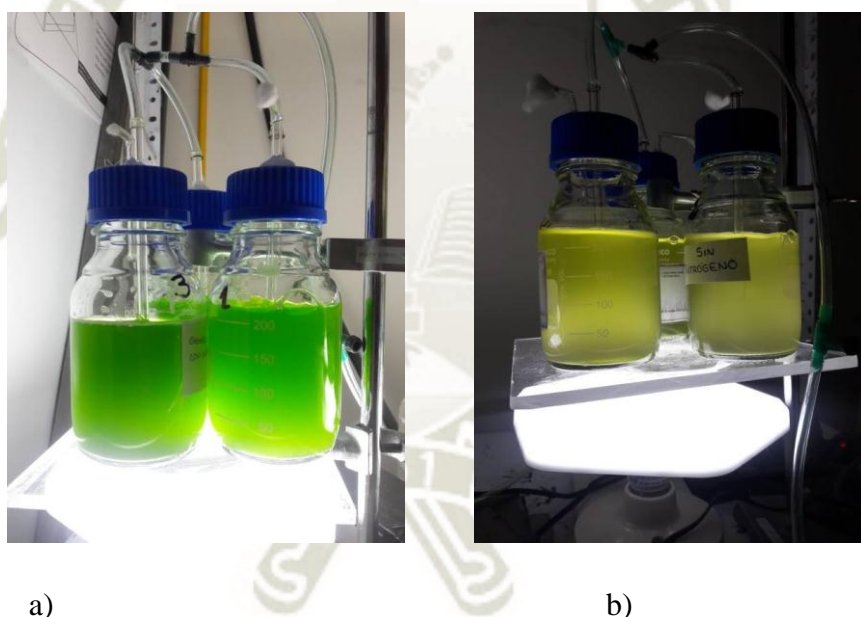


Figura 5. Fotobiorreactores con medio BBM a) a una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno b) en ausencia de nitrógeno

Fuente: Elaboración propia

El cultivo con nitrógeno presentó una coloración verde intenso (Figura 5.a), en cambio del cultivo sin nitrógeno presentó una coloración verde claro ligeramente amarillo. (Figura 5.b)

Se monitoreó el crecimiento de los seis cultivos cada 24 horas, además se realizó un conteo por duplicado de cada fotobiorreactor. En la Tabla 12, se muestra el promedio diario total de los resultados obtenidos del conteo.

Los cultivos iniciaron con una densidad celular de 1'000,000 cel/mL, alcanzando valores de crecimiento de hasta 129'000,000 cel/mL para una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno y 42'166,667 cel/mL en ausencia de nitrógeno.

Tabla 12 Conteo diario de la curva de crecimiento

N°	Tiempo (Horas)	Medio BBM A 0.250 mg/L de concentración de NaNO₃ (cel/ml)	Medio BBM en ausencia de nitrógeno (cel/ml)
0	0	1000000	1000000
1	24	2066667	1550000
2	48	4100000	3683333
3	72	5352222	4533333
4	96	7033333	5000000
5	120	11100000	5266667
6	144	14583333	16400000
7	168	38666667	24166667
8	192	32333333	28166667
9	216	62000000	31166667
10	240	113833333	36833333
11	264	113166667	37666667
12	288	115833333	38000000
13	312	117666667	38833333
14	336	129000000	39000000
15	360	124000000	42166667

Fuente: Elaboración propia

Las curvas de crecimiento en ambos medios de cultivo evidencian una rápida adaptación de la microalga al medio BBM. Sin embargo, se observa un menor crecimiento de la microalga en el medio BBM sin nitrógeno, respecto al cultivo con nitrógeno.

El Gráfico 1 muestra hasta las 120 horas una fase de adaptación, hasta las 240 horas se evidenció una fase de crecimiento exponencial y finalmente hasta las 336 horas, se aprecia una fase estacionaria, seguida de una fase de desaceleración.

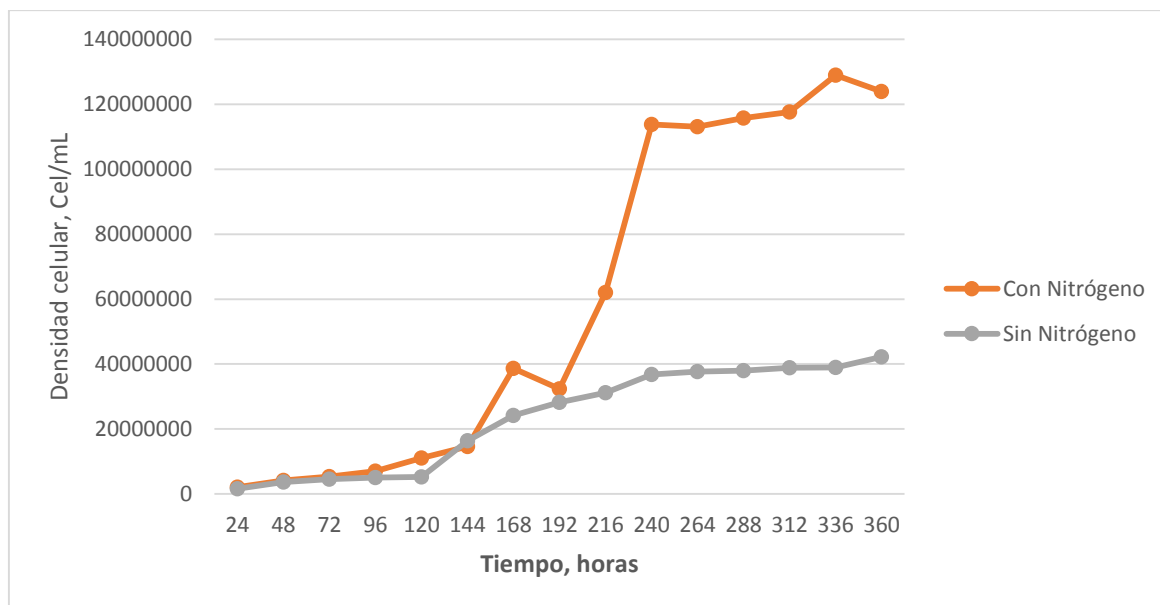


Gráfico 1. Influencia del nitrógeno en el crecimiento microalgal
Fuente: Elaboración propia

4.2.1.2 Extracción de lípidos a partir de la microalga *Chlorella sp*

La metodología de Blight y Dyer modificado por IMARPE, mostró ser efectiva en la determinación de ácidos grasos ya que no se necesita grandes cantidades de muestra ni de solventes.

La Tabla 13 muestra los resultados de los ensayos de extracción lipídica realizados por triplicado a la biomasa final de los seis fotobiorreactores de la curva de crecimiento, con la finalidad de evaluar tanto su densidad celular como su contenido lipídico.

Tabla 13 Resultados de la extracción de lípidos

Muestra	Peso seco de microalga (g)	Peso de la cápsula vacía (g)	Peso cápsula + lípidos extraídos (g)	Peso de lípidos microalgales (g)	Porcentaje de contenido lipídico (%)
BBM con Nitrógeno N°1	0.0409	54.5836	54.5926	0.009	22.00
BBM con Nitrógeno N°2	0.0405	57.1369	57.1465	0.0096	23.70
BBM con Nitrógeno N°3	0.0408	56.786	56.7942	0.0082	20.10
BBM sin Nitrógeno N°1	0.0408	53.638	53.6495	0.0115	28.19
BBM sin Nitrógeno N°2	0.0407	59.5449	59.5564	0.0115	28.26
BBM sin Nitrógeno N°3	0.0408	60.5599	60.5731	0.0132	32.35

Fuente: Elaboración propia

Los ensayos realizados por triplicado del contenido lipídico de cada muestra, muestran resultados similares, teniendo en el primer caso de *Chlorella sp.* cultivada en medio con nitrógeno un rango de 20.1% a 23.7% de contenido lipídico, en el caso de la cepa cultivada sin nitrógeno, los resultados varían de 28.2% a 32.3% de contenido lipídico.

La Tabla 14 muestra el promedio de los resultados y análisis de desviación estándar de la Tabla 15. Se obtuvo un contenido lipídico del 21.9% para medio BBM con nitrógeno y de 29.6% para medio sin nitrógeno, partiendo de un peso seco inicial de 40 mg.

Tabla 14 Contenido lipídico de *Chlorella sp.*

Medio de cultivo BBM	Contenido lipídico, %	Desviación estándar
Con Nitrógeno	21.90	1.80
Sin Nitrógeno	29.60	2.38

Fuente: Elaboración propia

Se determinó que el nitrógeno tiene gran influencia en el contenido lipídico de las microalgas, como se observa en la Tabla 14, se evidenció que las microalgas

cultivadas en el medio BBM sin nitrógeno tienen un contenido lipídico de 7.7% mayor que las cultivadas en el medio BBM con nitrógeno.

a. Efecto de la concentración de nitrógeno en el crecimiento microalgal

El Gráfico 1, muestra una densidad celular máxima de 129'000,000 cel/ml a una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno y de 42'166,667 cel/ml en ausencia de nitrógeno. De manera similar Rodríguez, obtuvo una densidad celular de 12'900,000 cel/ml a una concentración de 0.5 g/L de nitrógeno en medio Bristol, y de 10'100,000 cel/ml en ausencia de oligoelementos (Rodríguez et al., 2016).

La ausencia de nitrógeno influyó en la abundancia de biomasa, variando en un 67% menos densidad celular, por otro lado Rodríguez tiene una variación de 22% menos densidad celular, a pesar de tener una mayor concentración de nitrógeno, es probable que el tiempo de cultivo haya influenciado en la concentración de biomasa microalgal.

Los valores obtenidos en el estudio realizado por Tejeda, muestra que en *Chlorella sp.*, el crecimiento máximo fue de 26'000,000 cel/ml a una concentración de nitrógeno de 0.1 mg/L, y una densidad celular de 20'000,000 cel/ml a una concentración de 0.025 mg/L de nitrógeno, siendo 23% menor (Tejeda et al., 2015).

La absorción de nutrientes por parte de la microalga *Chlorella sp.* suele verse afectada por la composición general de nutrientes que apoyan el crecimiento de la biomasa microalgal (Kee Lam et al., 2017).

La limitación de nitrógeno en el cultivo de microalgas puede reducir el crecimiento y la productividad de la biomasa (Khan et al., 2018).

b. Efecto de la concentración de nitrógeno en la acumulación lipídica

La biomasa de las microalgas contiene tres componentes principales: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%, los carbohidratos, con porcentajes generalmente entre el 10-17% y los lípidos, con

porcentajes que varían del 4-61%. En menor medida (<6%) se encuentran los ácidos nucleicos. De todas ellas, los lípidos son las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles (Rodríguez et al., 2016).

La Tabla 13, muestra que a una concentración de 0.250 mg/L de nitrógeno se obtiene un rango de 20.1% a 23.7% de contenido lipídico, en el caso de la cepa cultivada sin nitrógeno, los resultados varían de 28.2% a 32.3% de contenido lipídico. Las muestras cultivadas en medio sin nitrógeno muestran un contenido lipídico es de hasta 7.7% mayor que el de las muestras cultivadas con nitrógeno. El máximo porcentaje lipídico es de 32.35% presentado por la muestra N°3 de *Chlorella sp.* cultivada en medio sin nitrógeno, representando casi la tercera parte del peso seco total.

El estudio presentado por Tejeda et al. obtuvo un contenido de lípidos máximo de 40.23%, a 0.1 mg/L de concentración de nitrógeno es decir un 12% más contenido lipídico que los resultados obtenidos en el presente estudio, sin embargo cabe mencionar que los aceites fueron extraídos de cultivos de 20 L (Tejeda et al., 2015).

El reciente estudio presentado por la revista *Bioresource Technology*, concluyó que la concentración de nitrógeno tiene una alta relevancia en la acumulación de lípidos celulares en microalgas, ya que el nitrógeno actúa como uno de los componentes críticos en el proceso funcional y la estructura celular (Cho et al., 2019).

El máximo contenido lipídico obtenido fue de 28.3% a una concentración de 70 mg/L de nitrógeno, en comparación a los resultados obtenidos en el presente estudio, el contenido lipídico fue hasta 4% mayor en ausencia de nitrógeno (Cho et al., 2019).

Las investigaciones realizadas para inducir la síntesis de lípidos a pequeña escala, concuerdan que bajo condiciones limitantes de nitrógeno se reduce el crecimiento, mientras que existe una gran variación en el contenido de lípidos y su perfil de ácidos grasos (Arias et al., 2013).

4.2.2 Diseño experimental

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que la ausencia de nitrógeno influye positivamente en el contenido lipídico, por lo que se realizó un diseño experimental considerando como medio de cultivo a BBM sin nitrógeno.

Una vez comprobada la influencia del nitrógeno en el crecimiento y acumulación lipídica; y de acuerdo a un análisis bibliográfico, se determinó las variables a realizar utilizando la factorial 2^k , para todas las combinaciones posibles. El resultado del diseño factorial por duplicado fue de un total de 54 ensayos. (Ver Anexo 3)

El número de ensayos se calculó reemplazando las variables cuantitativas en la siguiente ecuación:

Eq. 1

$$\text{N}^\circ \text{ ensayos} = (2^k + a) \cdot b \cdot c$$

Dónde: “k” es el número de variables numéricas (3), “a” es la cantidad de puntos centrales (1), “b” es la cantidad de niveles (3) y “c” son las repeticiones (2)

4.2.3 Sistema para la evaluación de parámetros

Se determinó que la temperatura sería el parámetro que definiría la ejecución de los ensayos, es decir se establecerán 18 muestras a una misma temperatura, pero a diferentes pH e intensidad de luz.

Se realizó el control de parámetros cada 24 horas, verificando la temperatura, el pH e intensidad de luz de los biorreactores. Las temperaturas fueron de 22, 25 y 28 °C reguladas con termómetro digital, pH de 5, 7, 9 ajustado con potenciómetro de pH WTW y la intensidad de luz de 2000, 6000 y 10000 lx regulado con luxómetro 3252 / Control Company.



Figura 6. Cultivo de *Chlorella sp.* en sistema de control de parámetros
Fuente: Elaboración propia

De acuerdo al diseño experimental, se realizó 54 ensayos en tres tiempos, es decir 18 ensayos a la vez. La primera temperatura regulada fue de 22°C, la segunda de 25°C y la última de 28°C, los parámetros de intensidad de luz y pH fueron adaptados. Los cultivos de *Chlorella sp.* se realizaron durante un periodo de 360 horas, concluido ese periodo se realizó la extracción de lípidos por el método de Blight & Dyer detallado en la Sección 3.6.3.6, a continuación se muestran los resultados obtenidos:

Como se observa en la Tabla 16, el máximo porcentaje lipídico obtenido fue de 59.94% a 22°C, intensidad de luz de 2000 lx y pH de 5.

Tabla 15 Optimización de pH e intensidad de luz a 22°C

Muestra	pH	Intensidad de luz, lx	Promedio de contenido lipídico, %	Desviación estándar
1	5	2000	59.94	0.47
2	7	2000	31.04	1.28
3	9	2000	45.91	1.86
4	5	6000	28.01	2.81
5	7	6000	37.44	2.04
6	9	6000	31.82	2.75
7	5	10 000	50.00	1.81
8	7	10 000	33.77	1.84
9	9	10 000	39.59	0.57

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado los resultados presentados a una temperatura de 25°C muestran un mayor porcentaje lipídico que a 22°C, el máximo contenido lipídico fue de 81.44% obtenido a una intensidad de luz de 6000 lux y a un pH de 7; el menor contenido lipídico fue de 56.21% obtenido a 2000 lux y a un pH de 5. (Tabla 16)

Tabla 16 Optimización de pH e intensidad de luz a 25°C

Muestra	pH	Intensidad de luz, lx	Promedio de contenido lipídico, %	Desviación estándar
1	5	2000	56.21	1.10
2	7	2000	65.48	1.68
3	9	2000	63.41	1.65
4	5	6000	60.11	1.91
5	7	6000	81.44	1.46
6	9	6000	67.87	1.70
7	5	10 000	69.06	1.91
8	7	10 000	79.38	0.30
9	9	10 000	65.31	1.44

Fuente: Elaboración propia

Los resultados a 28°C muestran un menor contenido lipídico en comparación a 22 y 25°C, el máximo contenido lipídico fue de 30.39% obtenido a una intensidad de luz de 10 000 lux y a un pH de 9. El menor contenido lipídico fue de 13.15% obtenido a 10 000 lux y a un pH de 7.

Tabla 17 Optimización de pH e intensidad de luz a 28°C

Muestra	pH	Intensidad de luz, lx	Promedio de contenido lipídico, %	Desviación estándar
1	5	2000	28.18	2.82
2	7	2000	20.96	1.64
3	9	2000	20.48	0.67
4	5	6000	18.32	0.96
5	7	6000	20.32	2.54
6	9	6000	25.48	0.68
7	5	10 000	15.76	1.28
8	7	10 000	13.15	1.42
9	9	10 000	30.39	1.39

Fuente: Elaboración propia

4.2.3.1 Influencia de la temperatura en la acumulación lipídica

Uno de los factores ambientales que afectan varios aspectos del crecimiento y la composición de ácidos grasos para varios microorganismos es la temperatura (Daliry et al., 2017).

El aumento de la temperatura en el rango óptimo (20-30°C) aumenta exponencialmente el crecimiento de algas, pero un aumento o disminución de la temperatura más allá del punto óptimo retrasa o incluso detiene el crecimiento y la actividad de las algas. Las bajas temperaturas afectan la fotosíntesis al reducir la actividad de asimilación del carbono, mientras que las temperaturas demasiado altas reducen la fotosíntesis al inactivar las proteínas fotosintéticas y alterar el equilibrio de energía en la célula (Khan et al., 2018).

Las condiciones de crecimiento a baja temperatura conducen a una reacción espontánea y cambian el mecanismo celular, por lo tanto, reducen la fluidez de las membranas celulares. Esto aumentará la proporción de ácidos grasos insaturados para compensar la reducción de la fluidez (Daliry et al., 2017).

Los resultados muestran que a una temperatura de 25°C, se tiene una mayor acumulación lipídica que a una temperatura de 22 y 28°C. Converti et al., 2009 encontró que un cultivo *Chlorella vulgaris* producía más carbohidratos y lípidos si se cultivaba a 25°C que a 30°C. Los aumentos de temperatura de 25 a 30 ° C reducen la cantidad de porcentaje de lípidos de 14.7% a 9.5% (Converti et al., 2009).

Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en la célula, además de que los efectos son específicos para cada especie (Arias et al., 2013).

4.2.3.2 Influencia de la intensidad de luz en la acumulación lipídica

La intensidad de la luz es uno de los principales factores limitantes en el cultivo de microalgas. La duración y la intensidad de la luz afectan directamente su

fotosíntesis y tienen influencia sobre la composición bioquímica de las microalgas y el rendimiento de la biomasa (Khan et al., 2018).

El máximo contenido lipídico obtenido fue a una intensidad de luz de 6000 lx a un fotoperiodo de 12:12 horas. Mata et al. reportó que para una intensidad de luz de 12 000 lx durante 12 horas de luz diurna produjo un mayor rendimiento de biomasa, mientras que la biomasa disminuyó cuando se redujo la intensidad de luz (Mata et al., 2010).

Sin embargo, en el estudio realizado por Daliry et al. bajo diferentes intensidades de luz de 3000, 5000 y 7000 lx, se determinó que la máxima producción lipídica se da en un rango de 5000 a 7000 lx (Daliry et al., 2017). En concordancia con los resultados obtenidos, el máximo contenido lipídico se obtuvo a 6000 lx, encontrándose en el rango establecido por Daliry.

La luz es un factor importante en el proceso de fotosíntesis para convertir el dióxido de carbono en compuestos orgánicos, como carbohidratos y proteínas. Si el crecimiento de microalgas se realiza con limitación de luz, los mecanismos celulares progresan para producir carbono en aminoácidos y otros compuestos esenciales para la célula (Daliry et al., 2017).

4.2.3.3 Influencia del pH en la acumulación lipídica

Uno de los factores importantes en el cultivo de microalgas es el pH del medio de cultivo. Esto se debe a que la variación del pH en el medio de cultivo puede afectar en última instancia al metabolismo celular y al crecimiento de la biomasa de las microalgas (Kee Lam et al., 2017).

El pH neutro favoreció la acumulación lipídica en un máximo de 81.44% obtenido a 25°C. De manera similar, Kee Lam et al. obtuvo una tendencia de crecimiento lineal a pH 3 y 5, por otro lado para un medio de cultivo de pH más alto (condición alcalina), las microalgas mostraron curvas de crecimiento satisfactorias. El pH adecuado para el crecimiento óptimo de la mayoría de las especies de microalgas se encuentra en el rango de neutro a alcalino (Kee Lam et al., 2017).

4.2.4 Análisis estadístico de los resultados

De acuerdo a un análisis empírico de los resultados obtenidos en la evaluación de parámetros, se determina que la mayor acumulación lipídica se presenta a una temperatura de 25°C, una intensidad de luz de 10 000 lx y un pH de 9.

Una vez realizado el procesamiento de datos en el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI, el análisis estadístico de los resultados de evaluación de parámetros determinó el coeficiente de regresión lineal para el contenido lipídico, la ecuación se muestra a continuación:

Eq. 2

$$\begin{aligned} \text{Contenido lipídico} = & -2876,47 - 9,48708*\text{pH} + 0,000646944*\text{Intensidad de luz} \\ & + 241,922*\text{Temperatura} - 0,453472*\text{pH}^2 + 0,000150208*\text{pH}*\text{Intensidad de luz} \\ & + 0,645833*\text{pH}*\text{Temperatura} - 2,24046\text{E-}7*\text{Intensidad de luz}^2 + \\ & 0,0000432639*\text{Intensidad de luz}*\text{Temperatura} - 5,00228*\text{Temperatura}^2 \end{aligned}$$

La ecuación permite reemplazar los valores de los parámetros evaluados y obtener el contenido lipídico que le corresponde.

Asimismo, se realizó el Gráficos que permiten determinar las interacciones entre parámetros, donde A es pH, B es Intensidad de luz y C es temperatura.

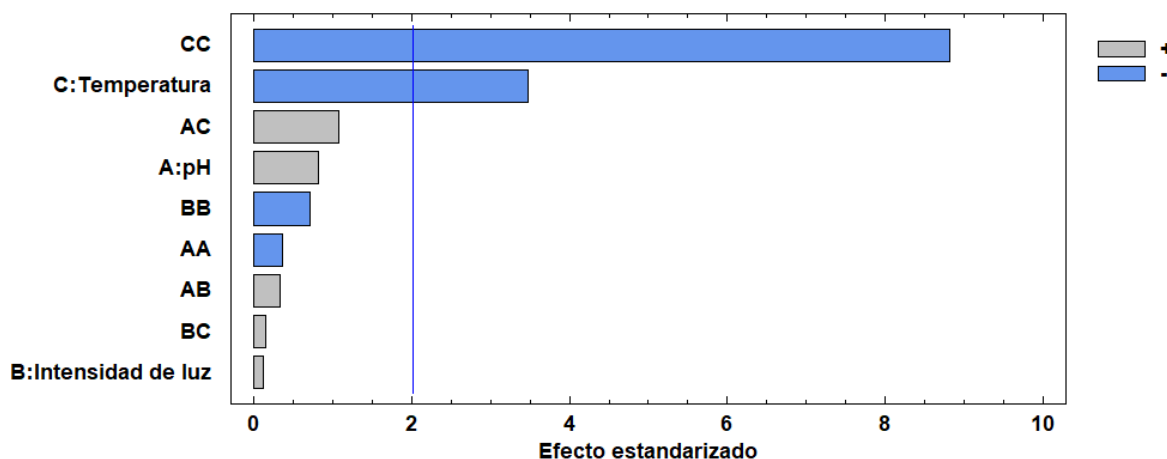


Gráfico 2 Diagrama de Pareto Estandarizado para Contenido Lipídico
Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

El diagrama de Pareto, muestra la temperatura como la variable más influyente para la acumulación lipídica, las variables que se encuentran a la derecha son las que más influyen en el proceso, mientras que las que se encuentran a la izquierda son las que menos influyen.

En el caso de la interacción de pH con la temperatura se muestra una tendencia positiva, es decir a mayor temperatura y pH básico, habrá un mayor contenido lipídico. El pH es la segunda variable de importancia y con una tendencia positiva, es decir a mayor pH mayor contenido lipídico. Las interacciones entre pH e intensidad de luz y temperatura e intensidad de luz, muestran una tendencia positiva no relevante.

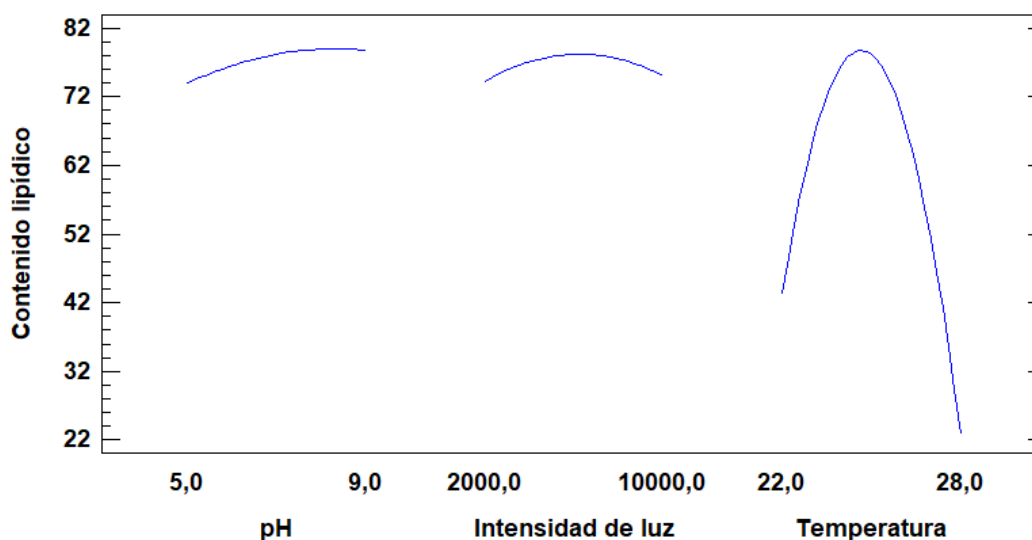


Gráfico 3 Efectos principales para contenido lipídico
Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

El Gráfico 3, muestra que para los parámetros considerados el máximo contenido lipídico alcanzable es de 79,39%. Asimismo, los valores óptimos para el pH es de 8,25, intensidad de luz de 6599,51 lux y una temperatura de 24,74°C. Siendo la temperatura, la variable con la curva más definida, el pH y la intensidad de luz, muestran curvas decrecientes.

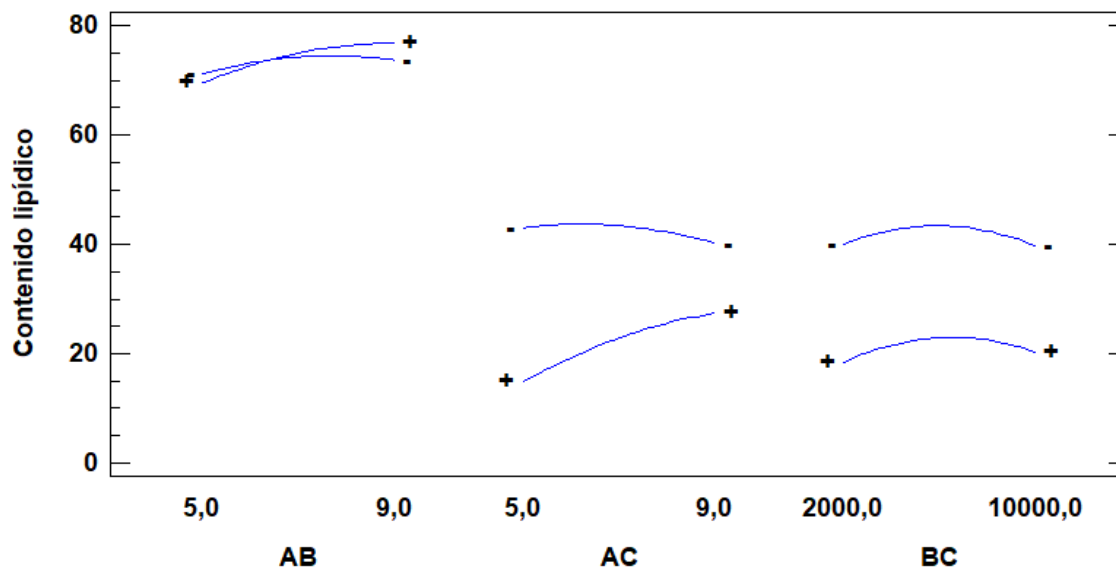


Gráfico 4 Interacción de parámetros para Contenido lipídico
Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

La interacción entre pH e intensidad de luz (AB) muestra que las líneas se entrecruzan pero se sobrepone una sobre la otra, por lo tanto la relación de ambas variables no afectan al contenido lipídico de forma relevante. En el caso de la interacción entre pH y temperatura (AC), se observa que de prolongarse las líneas de interacción se cruzarían en algún momento.

La relación inexistente entre la intensidad de luz y temperatura es debido a la influencia que ejercen en la acumulación lipídica de *Chlorella sp.* La evidencia sugiere que la luz actúa en la proliferación, ayuda a la respiración celular y la fotosíntesis. La luz es un factor importante en el proceso de fotosíntesis para convertir el dióxido de carbono en compuestos orgánicos, como carbohidratos y proteínas, en los que se libera agua y oxígeno (Daliry et al., 2017). Mientras que la temperatura puede afectar varios aspectos del crecimiento, la composición de ácidos grasos, las reacciones enzimáticas, el sistema de membrana celular y otras características (Zeng et al., 2011). Es decir el crecimiento de la microalga está limitado tanto por la intensidad de luz como por la temperatura; sin embargo, los mecanismos celulares que conducen la proporción de ácidos grasos dependen de la temperatura, en cambio la intensidad de luz regula las reacciones endotérmicas (suministrando la energía) para el metabolismo del carbono y producción de proteínas.

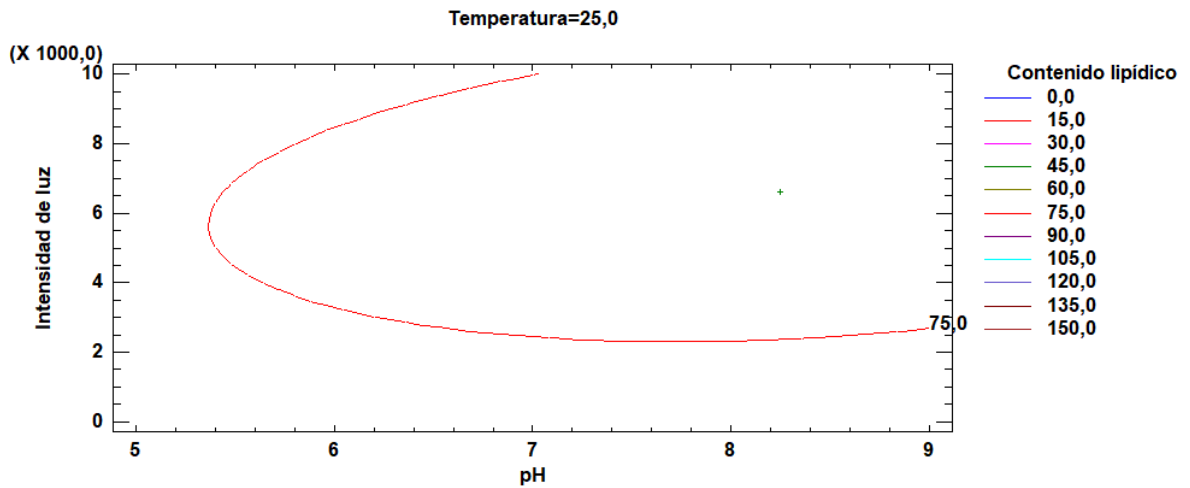


Gráfico 5 Superficie de Respuesta Estimada
Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

Las Gráficas 5 y 6 de superficie de respuesta estimada, nos muestran todos los puntos que están contenidos en el espacio. Según la tendencia se observa que el máximo contenido lipídico es de 75% aproximadamente, siendo la temperatura la variable más significativa.

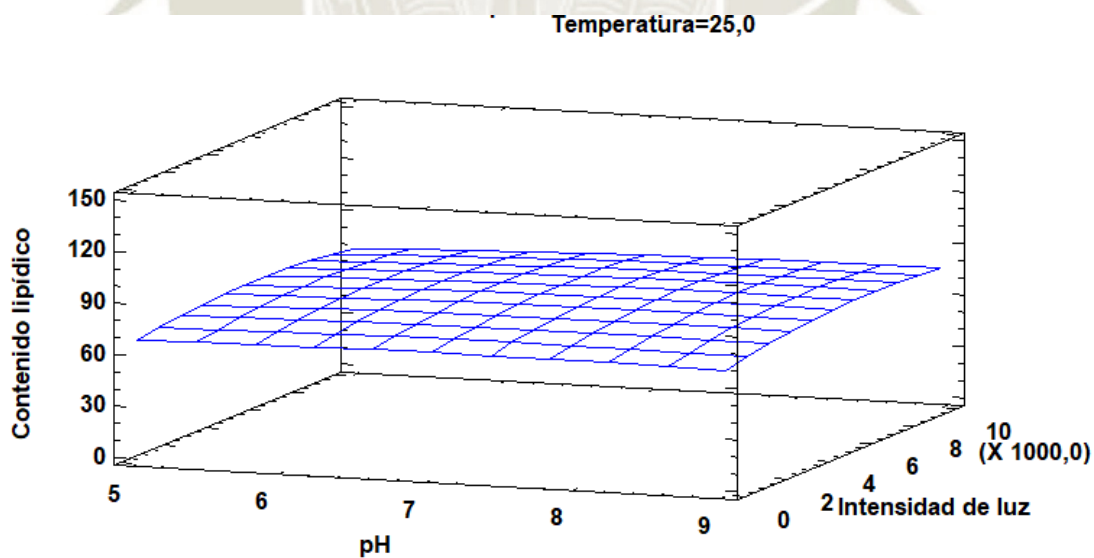


Gráfico 6 Superficie de Respuesta Estimada tridimensional
Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

Los parámetros que muestran los niveles en los cuales el contenido lipídico es el máximo posible se muestran en la Tabla 18. El máximo contenido lipídico

alcanzable es de 79,39% a un pH de 8,25, intensidad de luz de 6599,51 lux y 24,74°C.

Tabla 18. Máximo contenido lipídico

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	5,00	9,00	8,25
Intensidad de luz	2000,00	10000,00	6599,51
Temperatura	22,00	28,00	24,74

Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI

Daliry et al., determinó que las mejores condiciones para el crecimiento y producción lipídica de la microalga *Chlorella vulgaris*, se dan en un ambiente alcalino a un pH 9, intensidad de luz de 5000 a 7000 lx y una temperatura de 30°C (Daliry et al., 2017).

En comparación con los resultados obtenidos por la presente investigación, se puede determinar que el pH optimizado es similar para ambos casos, encontrándose en condiciones alcalinas. De igual manera, la intensidad de luz optimizada se encuentra en el rango reportado por Daliry et al. La diferencia más significativa de resultados es el de temperatura, la cual detalla es a 30°C, es decir 5.26°C más que la temperatura optimizada estadísticamente.

4.3 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FOTOBIORREACTOR PARA EL CULTIVO MICROALGAL

4.3.1 Diseño del fotobiorreactor para el cultivo de *Chlorella sp.*

Luego de seguir el criterio determinado por las experiencias referenciadas en la literatura descritas en la Sección 3.7.1 del Capítulo III. Se consideró un diámetro de 0.20 m y un subdiámetro interno de 0.05 m para permitir una iluminación uniforme del sistema bajo condiciones de laboratorio. Para un volumen de 15 L, se determinó una altura de 0.50 m. El material seleccionado para la construcción del fotobiorreactor fue acrílico transparente de 5 mm de grosor.

El diseño del fotobiorreactor se realizó en el programa AutoCad Mechanical 2019 (Ver Anexo 4). La modelación tridimensional se realizó en el software Inventor

Professional 2019, que proporcionó una vista 3D del sistema ensamblado (Ver Anexo 5).

4.3.2 Ensamblaje del fotobiorreactor

Una vez construido el fotobiorreactor, se colocaron seis varillas de vidrio de 4 mm conectadas con manguera cristal transparente a seis fuentes de aireación marca Rokasd, modelo AP-208, con una potencia de 2.5W y un flujo de salida de aire de 3L/min. Además, se instaló difusores para procurar una aireación uniforme. Se verificó la impermeabilidad del fotobiorreactor, para evitar fugas al momento de instalar el sistema.



Figura 7. Ensamblaje del fotobiorreactor
Fuente: Elaboración propia

4.3.3 Control de la variación de la temperatura

Como se detalló en el Capítulo III, con el objetivo de realizar un control de la temperatura tanto para condiciones controladas como ambientales, se instaló el sensor de temperatura o Termocupla Tipo K, la cual registró la temperatura del medio BBM cada 15 min, en el software Keysight BenchVue.

Este sistema permite exportar los datos en formato MS Excel, permitiendo su fácil procesamiento.

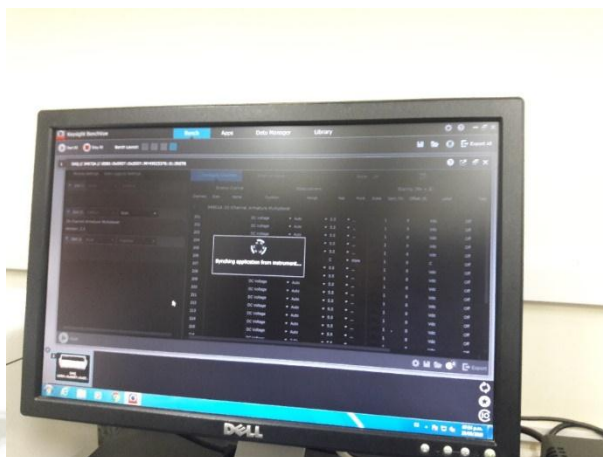


Figura 8. Software Keysight BenchVue
Fuente: Elaboración propia

4.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN EL FOTOBIORREACTOR A CONDICIONES AMBIENTALES LOCALES Y CONTROLADAS EN LABORATORIO

4.4.1 Inoculación y cultivo de *Chlorella sp.* en condiciones ambientales de Arequipa

Para la inoculación del medio BBM sin nitrógeno, se realizó el conteo celular del cultivo inicial de *Chlorella sp.* obteniendo una concentración de 43'375,000 cel/ml. Para una concentración inicial de 1'000,000 cel/ ml se calculó un inóculo de 345.820 ml de biomasa microalgal.

El fotobiorreactor fue expuesto constantemente a radiación solar y cambios de temperatura durante 360 horas. Durante este periodo se obtuvo un crecimiento satisfactorio y una tasa de evaporación media; se agregó 1.5 L de medio BBM sin nitrógeno a las 192 horas.



Figura 9. Fotobiorreactor expuesto a condiciones ambientales
Fuente: Elaboración propia

4.4.1.1 Variación de la temperatura

De acuerdo a lo detallado en la Sección 4.3.3, se registró la variación de la temperatura a la que se encontraba el medio, tanto de día como de noche. Como se muestra en el Gráfico 7, la temperatura tuvo un rango de variación de 15°C. La máxima temperatura registrada fue de 35.29°C a las 15:00 horas, y la mínima fue de 9.92°C registrada a las 6:00 horas. Considerando que la estación en la que se desarrolló el cultivo fue invierno, el rango de temperaturas no afectó el crecimiento de la microalga *Chlorella sp.*

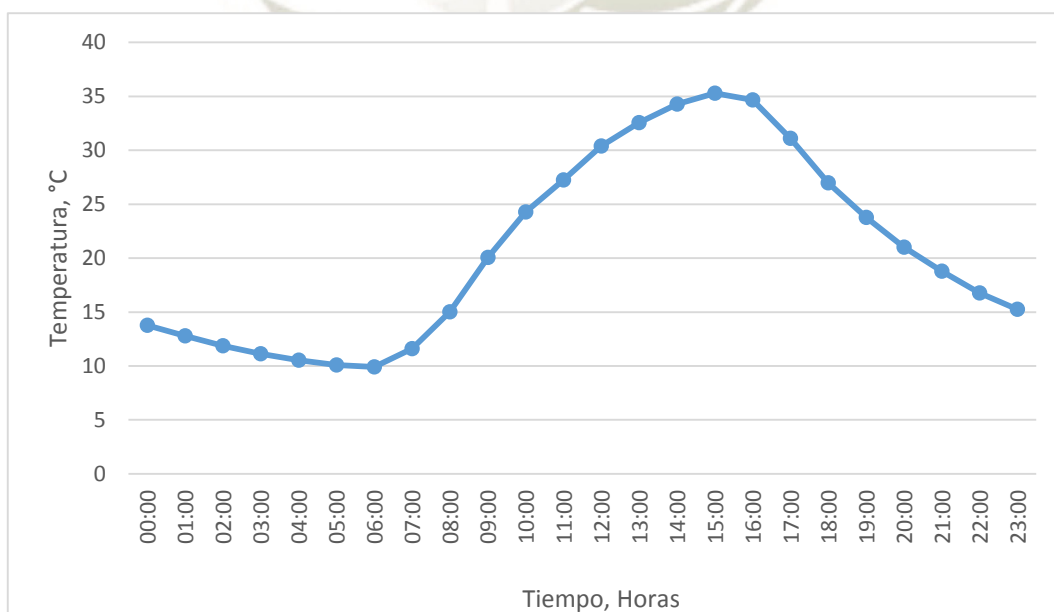


Gráfico 7 Variación de la temperatura a condiciones ambientales de Arequipa
Fuente: Elaboración propia

4.4.2 Inoculación y cultivo de *Chlorella sp.* en condiciones controladas de laboratorio

Para la inoculación del medio BBM sin nitrógeno, se realizó el conteo celular del cultivo inicial de *Chlorella sp.*, se realizó el conteo celular del cultivo de *Chlorella sp.* obteniendo una concentración de 37750,000 cel/ml. Para una concentración inicial de 1'000,000 cel/ ml se calculó un inóculo de 357.615 ml de biomasa microalgal.

El cultivo se mantuvo durante 360 horas, bajo condiciones controladas cada 24 horas. Durante este periodo se obtuvo un crecimiento satisfactorio, la tasa de consumo de medio y evaporación fue baja, sin embargo se agregó 1.5 L de medio BBM sin nitrógeno a las 192 horas, para procurar el contacto de la termocupla y el medio.



Figura 10. Fotobiorreactor a condiciones controladas de cultivo
Fuente: Elaboración propia

4.4.2.1 Variación de la temperatura

El análisis estadístico muestra un máximo contenido lipídico de 79,39% alcanzable a los parámetros optimizados de pH de 8,25, intensidad de luz de 6599,51 lux y 24,74°C. En ese sentido, se mantuvo una temperatura de aproximadamente 24,74°C, con un rango de variación de 3°C para un fotoperiodo de 12:12 horas.

Como se muestra en el Gráfico 8, la máxima temperatura registrada fue de 25.43°C a las 14:00 horas, y la mínima fue de 22.85°C registrada a las 1:00 horas. Se determinó que el sistema de iluminación influyó en la variación de la temperatura. El crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* fue satisfactorio, presentando una coloración verde claro ligeramente más intenso que el fotobiorreactor a condiciones ambientales de Arequipa.

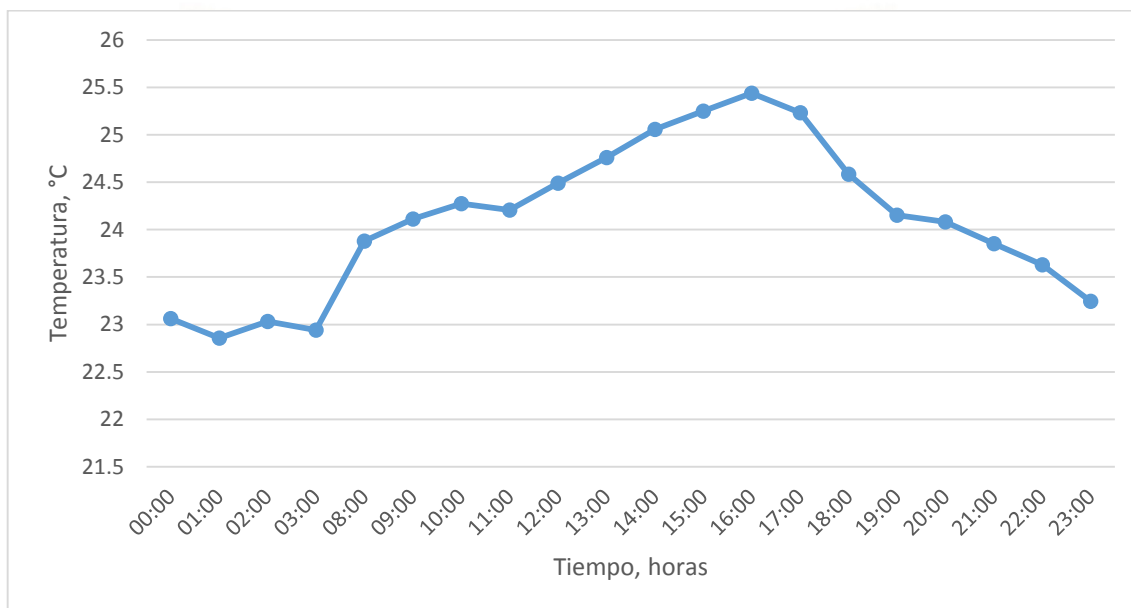


Gráfico 8 Variación de la temperatura a condiciones controladas de laboratorio
Fuente: Elaboración propia

4.4.3 Obtención de la biomasa microalgal

Para el fotobiorreactor a condiciones ambientales de Arequipa, se obtuvo 4.5737 g de biomasa microalgal. Sin embargo, para el fotobiorreactor a condiciones controladas de laboratorio se obtuvo un total de 4.3787 g., es decir 0.195 g menos biomasa que la producida por el cultivo a condiciones ambientales. Es probable que la incidencia de luz solar natural haya beneficiado la producción celular en un 4.26%.

Tejeda et al., 2015 obtuvo una productividad de biomasa para *Chlorella sp.* de 98.61 mg L⁻¹ día⁻¹, a un pH de 8.5, intensidad de luz de 3000 lx y una concentración de nitrógeno de 0.1 mg L⁻¹ (Tejeda et al., 2015). A condiciones similares de pH pero en ausencia de nitrógeno, se determinó una productividad de 25.38 y 26.50 mg L⁻¹ día⁻¹ para el fotobiorreactor a condiciones controladas y ambientales

respectivamente, es decir 74.27 y 73.13% menos que la reportada por el autor antes mencionado.

La baja productividad de biomasa se debe principalmente a la ausencia de Nitrato de Sodio en el medio BBM, por lo que el crecimiento celular se inhibe.

4.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL FAME OBTENIDO A PARTIR DE LA BIOMASA PRODUCIDA

4.5.1 Determinación de ácidos grasos

El Fatty Acid Methyl Ester (FAME), es el principal componente del biodiesel y por lo tanto, la composición química del perfil distintivo de FAME juega un rol crítico en la determinación de las propiedades del biodiesel. Es importante determinar el perfil lipídico microalgal tanto como las diferentes condiciones de cultivo que podrían inducir significativamente cambios en la biosíntesis de los ácidos grasos (Kee Lam et al., 2017).

Tabla 19 Análisis de Ácidos grasos

Análisis	Muestra 1 (g/100 ml)	Muestra 2 (g/100 ml)
Ácidos grasos Saturados	0.34	0.32
Ácidos grasos Monoinsaturados	0.02	0.02
Ácidos grasos Poliinsaturados	0.54	0.59
Peso Total	0.91	0.93

Fuente: Informe de ensayo N°ANA04K19.004353 A – B (Anexo 6 y 7)

Los resultados obtenidos del análisis de ácidos grasos, muestran para la Muestra 1 (fotobiorreactor a condiciones ambientales de Arequipa) un total de 0.91 g de FAME extraídos de 4.5737 g de biomasa microalgal, es decir la muestra tiene un contenido lipídico de 21.21% de su peso seco. La Muestra 2 (fotobiorreactor a condiciones de laboratorio), tiene 0.93 g de FAME, lo cual representa el 21.24% de su peso seco. En comparación, ambos resultados muestran un contenido lipídico mayor al 20%, sin embargo, la Muestra 2, contiene 0.03% más de FAME.

Tabla 20 Contenido Porcentual de Ácidos Grasos

Ácidos Grasos		Contenido lipídico	
		Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)
Ácido Palmitoleico	C16:1	34.147	28.819
Ácido Heptadecanoico	C17:0	3.268	3.104
Ácido Estéarico	C18:0	-	2.242
Ácido Oleico	C18:1	2.708	2.181
Ácido Linolénico	C18:2	32.543	31.448
Ácido Araquidónico	C20:4	10.388	18.770
Ácido Heneicosanoico	C21:0	16.946	13.437

Fuente: Informe de ensayo N°ANA04K19.004353 A – B (Anexo 6 y 7)

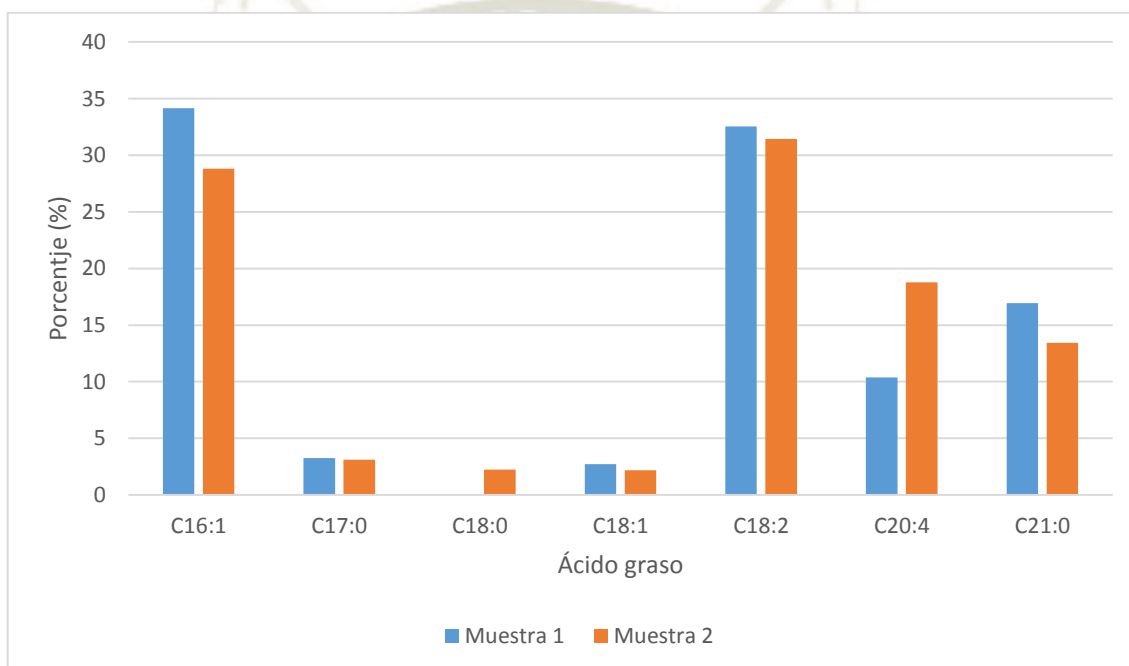


Gráfico 9 Perfil lipídico de las muestras 1 y 2

Fuente: Elaboración propia

Como se muestra en la Tabla 20, el análisis mostró la presencia de siete ácidos grasos (FAME) identificados: Ácido Palmitoleico (C16:1), Ácido Heptadecanoico (C17:0), Ácido Estéarico (C18:0), Ácido Oleico (C18:1), Ácido Linolénico (C18:2), Ácido Araquidónico (C20:4) y Ácido Heneicosanoico (C21:0). Estos ácidos grasos se encuentran generalmente en otros cultivos oleaginosos, como el aceite de soja, girasol y palma, que se ha confirmado que son adecuados para la producción de biodiesel (Kee Lam et al., 2017).

En comparación, la mayoría de resultados tienen una diferencia menor al 1% (Ácido Heptadecanoico, Oleico y Linolénico). La diferencia porcentual más significativa es la del Ácido Araquidónico. Los ácidos Palmitoleico y Heneicosanoico muestran una diferencia porcentual menor al 5%. El Ácido Esteárico, se encuentra en 2.242% en la Muestra 2, sin embargo en la Muestra 1 no fue detectado por el cromatógrafo.

En un estudio realizado por Tejeda et al., 2015 se cultivó *Chlorella sp.* a pH 8.5 y 0.1 mg L⁻¹ de concentración de nitrógeno, se obtuvo 0.51% de ácido esteárico, 34.9% de ácido oleico y 39.33% de ácido linolénico. Es decir, muestra un perfil lipídico similar a los determinados en la presente investigación. La diferencia porcentual más grande es con la del ácido oleico, la cual posee una insaturación. Es probable que las condiciones del cultivo y el contenido de nitrógeno haya influido en estas diferencias, sin embargo también concluye que *Chlorella sp.*, presentó una distribución de ácidos grasos que podría significar mejores propiedades de lubricación, altos puntos de ebullición y poderes caloríficos, entre otras, bajo ciertas condiciones de almacenamiento y conservación de aceite (Tejeda et al., 2015).

Se determinó que los tipos de ácidos Palmitoleico y el Linolénico fueron los más abundantes, perteneciendo a ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Ambos FAME obtenidos a las condiciones de cultivo antes mencionadas, presentan en su estructura una y dos insaturaciones, respectivamente. Esta característica es importante porque afecta directamente el aceite y, por lo tanto, el biodiesel producido a partir de su transesterificación. Las insaturaciones mejoran la operatividad del biodiesel a bajas temperaturas, pero disminuyen su estabilidad a la oxidación (Tejeda et al., 2015).

En el análisis de los perfiles lipídicos de las muestras, se encontró un elevado porcentaje de insaturaciones en su composición, siendo del 79.037% y 77.078% para la Muestra 1 y 2, lo cual tendría repercusiones en las propiedades fisicoquímicas y en el desempeño de la combustión del biodiesel (Tejeda et al., 2015).

4.5.2 Análisis de productividad

Chlorella sp. ha demostrado ser una microalga de rápido crecimiento, cultivo fácil y flexible, con alta resistencia a factores interferentes. Existen varios obstáculos tecnológicos y económicos para la producción a escala industrial de biodiésel a partir de aceite de microalgas; algunas de estas están relacionados con la velocidad de crecimiento, el rendimiento y la productividad del cultivo de microalgas (Tejeda et al., 2015).

Todos los esfuerzos de los investigadores en los últimos años son para economizar la producción de combustible a partir de microalgas. En primer lugar, se tienen en cuenta dos parámetros, incluido el crecimiento de microalgas y el lípido producido (Daliry et al., 2017).

En este estudio, se evaluó las condiciones óptimas de crecimiento en primera instancia y acumulación lipídica para obtener los principales factores influyentes en la acumulación de ácidos grasos.

Los ácidos grasos obtenidos del cultivo a condiciones ambientales de Arequipa presentan 1.959% mayor contenido de insaturaciones que el cultivo a condiciones controladas. Esta diferencia, junto con la mayor productividad de biomasa y de lípidos obtenida, hace que las condiciones ambientales de Arequipa (en comparación con las controladas en laboratorio), sean las más prometedoras para la producción industrial de biocombustibles a partir de la microalga *Chlorella sp.*, siendo una alternativa de energía sustentable y económica, ya que se adaptó con facilidad a la luz natural de Arequipa y presentó resultados similares a los optimizados.

En referencia a los resultados anteriores, se puede concluir que la productividad de biomasa y lipídica guardan una relación indirectamente proporcional.

Las microalgas, generalmente, responden a la ausencia de nutrientes mediante la intensificación de la vía metabólica, que sintetiza lípidos neutros; sin embargo, este aumento de la producción de lípidos no ocasiona, por lo general, un aumento de la tasa de crecimiento y, por ende, la división celular (Tejeda et al., 2015).

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se obtuvo y aisló un cultivo monoalgal por el método de placas agar mediante la técnica de rayado en estrías. Se cultivó e identificó por medio de la secuenciación del ADN, el consorcio microalgal perteneciente al género *Chlorella sp.*
- Se concluye que el nitrógeno influye favorablemente en el crecimiento de la microalga *Chlorella sp.*, sin embargo, su presencia limita el contenido lipídico hasta en un 7.7%. Se evaluó las condiciones óptimas a un pH de 8,25, intensidad de luz de 6599,51 lux y 24,74°C, para un máximo contenido lipídico alcanzable de 79,39%. La temperatura es la variable que más influye en el contenido lipídico, el pH y la intensidad de luz influyen de manera no significativa.
- Se diseñó el fotobiorreactor utilizando los software AutoCad Mechanical e Inventor Professional. Se construyó el fotobiorreactor de acrílico transparente de 15 L de volumen, el cual permitió el cultivo de la microalga *Chlorella sp.* a condiciones ambientales de Arequipa y controladas en laboratorio.
- Se produjo 4.5737 y 4.3787 g de biomasa microalgal en el fotobiorreactor a condiciones ambientales de Arequipa y condiciones controladas en el laboratorio, determinándose una productividad de 25.38 y 26.50 mg L⁻¹ día⁻¹ respectivamente. Es probable que la incidencia de luz solar natural haya beneficiado la producción celular en un 4.26%.
- Se determinó un total de 0.91 y 0.93 g de FAME, para la biomasa obtenida del fotobiorreactor a condiciones ambientales de Arequipa y a condiciones controladas de laboratorio, representando el 21.21 y 21.24% de su peso seco. El fotobiorreactor a condiciones controladas mostró 0.03% mayor contenido de FAME. Los ácidos grasos obtenidos del cultivo a condiciones ambientales de Arequipa presentaron mayor contenido de insaturaciones que el cultivo a condiciones controladas.

5.2 RECOMENDACIONES

- Purificar la muestra hasta obtener una especie de *Chlorella sp.* en específico.
- Realizar el cultivo con otro medio y probar su comportamiento a distintas concentraciones de nitrógeno.
- Construir un fotobiorreactor de una capacidad mayor a 50 L.
- Realizar la transesterificación y caracterización del biodiesel.
- Evaluar las propiedades del biocombustible de *Chlorella sp.* en comparación con diésel.



CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta , O., & Chaparra , G. (2009). Biocombustibles, Seguridad alimentaria y cultivos transgénicos. *Revista de Salud Pública 11*, 290-300.
- Adeniyi, O., Azimov, U., & Burlika, A. (2018). Algae biofuel: Current status and future applications. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 316-335.
- Ahmad, A., Derek, C., & Lim, J. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew Sust Energ Rev*.
- Albarracin, I. (2007). La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad.
- Arias Peñaranda, M., Martínez Roldán, A., & Cañizares Villanueva, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biología Colombia*, 43-68.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *CIB*.
- Bei Tan, X., Kee Lam, M., Uemura, Y., Wei Lim, J., Yiing Wong, C., & Teong Lee, K. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17-30.
- Bertoldi, F., Sant, E., & Barcelos, J. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y Aceites*.
- Blanken, W., Richard, P., Winter, L., Wiffels, R., & Janssen, M. (2016). Predicting microalgae growth. *Algal Research*, 28-38.
- Bold, & Nichols. (1965).
- Camacho, R., Martínez, S., & Sánchez, V. (1999). Contenido de clorofila en *Chlorella pyrenoidosa* durante el crecimiento heterotrófico sobre monosacáridos.
- Carvajal, M., Solbas, A., & García, J. (2010). Nuevos alimentos funcionales a partir de microalgas.
- Castillo, O., Torrez-Badajoz, S., Núñez-Colín, C., Peña-Caballero, V., Herrera, C., & Rodríguez, J. (2017). Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects. *Hidrobiológica*, 337-352.
- Chen, J., Li, J., Wenyi, D., Xiaolei, Z., Rajeshwar, D., Patrick, D., & Rao, Y. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 336-346.

- Chinnasamy, S. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007). Biodiésel from microalgae. *Biotechnology advances*, 294-306.
- Cho, K., Cho, D.-H., Heo, J., Kim, U., Jae Lee, Y., Choi, D.-Y., & Kim, H.-S. (2019). Nitrogen modulation under chemostat cultivation mode induces biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* and reduces antenna pigment accumulation. *Bioresource Technology*, 34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.063>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 1146-1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006
- Des Abbayes, H., Gaussen, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., Prévot, A., & De Ferré, Y. (1989). Botánica vegetales inferiores. Barcelona: Reverté S.A.
- Dickinson, S., Miranda, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., . . . Mahmoud, M. (2016). A review of biodiesel production from microalgae.
- Enzing, C., Ploeg, M., & Barbosa, M. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *EUR-Scientific and Technical Research Reports*.
- Fernández Linares, L., Montiel Montoya, J., Millán Oropeza, A., & Badillo Corona, J. (2012). Producción de Biocombustibles a partir de Microalgas. *Ra Ximhai*.
- Gandón Hernandez, J., Torres Baratute, Y., & García Díaz, M. (2017). Caracterización de un biocombustible obtenido a partir de aceite vegetal de desecho. *Tecnología Química*.
- Gao, Y., Gregor, C., Liang, Y., Tang, D., & Tweed, C. (2012). Algae biodiesel, a feasibility report. *Chem Cent*.
- Ghadiryannfar, M., Rosentrante, K., Keyhani, A., & Omid, M. (2016). A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. *Renew Sustain*.
- González Reyes, A. M. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas.
- González, A., Kafarov, V., & Guzmán, A. (2009). Development of methods of extraction of oil in the production line of biodiesel from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 577-596.
- Greenwell, H., Laurens, L., Shields, R., Lovitt, R., & Flynn, K. (2010). *Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges*.
- Hernández Pérez, A., & I. Labbé, J. (agosto de 2014). Microalgas, cultivos y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. doi:10.4067/S0718-19572014000200001

- Hernández Sampieri, R. (2014). *Metodología de la Investigación*. (I. Editores, Ed.) México D.F.: Mc Graw Hill.
- IMARPE. (2011). *Protocolo para determinación de lípidos*. Lima: Edición 01.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., & Barrios, F. (2011). Propagación de la microalga *Chlorella sp.* En cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en ciencias e Ingeniería*.
- Jimenez, J., & Jimenez, M. (2012). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de AND de *Chlorella vulgaris* Beyerinck.
- Johnson, M., & Wen, Z. (2009). Production of biodiesel fuel from the microalga. . *Energy Fuel*.
- Kandiyoti, R., Herod, A., Bartle, K., & Morgan, T. (2017). Fossil fuels and renewables. . *Solid fuels and heavy hydrocarbon liquids*.
- Kee Lam, M., Iqram Yusoff, M., Uemura, Y., Wei Lim, J., Gek Khoo, C., Teong Lee, K., & Chyuan Ong, H. (2017). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 197-207. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.032>
- Khan, M., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17-36. doi:<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Martins Adeniyi, O., Azimov, U., & Burluka, A. (2018). Algae biofuel: Current status and future applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 316-335. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.067>
- Martins, A., Marques, F., Cameira, M., Santos, E., Badenes, S., Costa, L., . . . Mata, T. (2018). Water footprint of microalgae cultivation in photobioreactor. *Energy Procedia*, 426-431.
- Martins, O., Azimov, U., & Burluka, A. (2018). Algae biofuel: Current status and future applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 217-232. doi:[10.1016/j.rser.2009.07.020](https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020)
- Mathimani, T., Uma, L., & Prabakaran, D. (2015). Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella sp.* BDUG 91771 lipid e An efficient biodiesel yield and its characterization. *Renewable Energy*, 523-533.

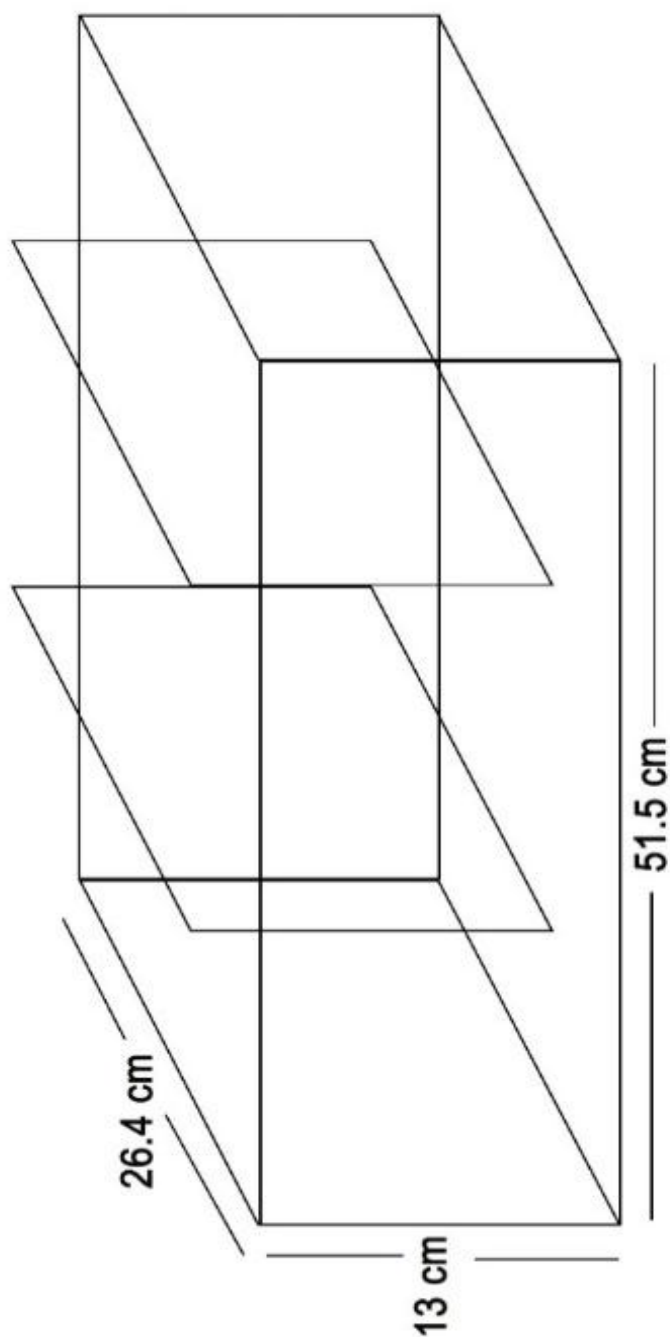
- Medina Villadiego, M., Ospino Roa, Y., & Tejeda Benítez, L. (2014). *Esterificación y transesterificación de aceites residuales para obtener biodiesel*.
- Ministerio del Ambiente. (2014). *Métodos de colecta, identificación y análisis de comunidades biológicas: plancton, perifiton, bento y necton en aguas continentales del Perú*. Lima: Zona Comunicaciones S.A.C.
- Mulumba, N., & Ihab, H. (2012). Tubular Photobioreactor for Microalgae Biodiesel Production. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*.
- OSINERGMIN. (2017). *La Industria de la energía renovable en el Perú: 10 años de contribuciones a la mitigación del cambio climático*. Lima: Gráfica BIBLIOS S.A.
- Parque Científico y Tecnológico de Gijón. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Parque Científico y Tecnológico de Gijón. Asturias: AST Ingeniería S.L.
- Pérez, J., & Fernández, P. (2011). Synthesis of neutral lipids in *Chlorella sp.* under different light and carbonate conditions. *Ciencia, Tecnología y Futuro*.
- Quintana, M., Hernandez, L., Morris, H., & Fernández, M. (1999). Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalgas *Chlorella sp.* *Revista Cubana Aliment.*, 9-13.
- Riba Ruíz, J. (2010). *Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible*.
- Ríos, S. (2010). Potencial productivo como base para cosméticos de dos especies de microalgas en el Municipio de Sincelejo.
- Rodriguez, P., Sánchez, Y., Zumalacárregui, L., Pérez, O., Hernández, A., Echeveste, P., & Lombardi, A. (2016). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *Afinidad*, 125-129.
- Rogers, J., Rosenberg, J., Guzman, B., Oh, B., Mimbela, L., Ghassemi, A., . . . Donohue, M. (2014). A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales. *Algal Research*, 76-88.
- Ruangsomborn, S. (2015). Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* Kmitl and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresource Technology*.
- Salinas, E., & Gasca, V. (2009). Los Biocombustibles. *El Cotidiano*.
- Sandoval, M. (2013). Diseño, Construcción y puesta en marcha de un fotobiorreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en el laboratorio de biotecnología y energías renovables de la empresa eléctrica Quito. Quito, Ecuador.
- Slade, R., & Bauen, A. (2013). Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*.

- Soratan, K., Barr, W., & Landis, A. (2014). Effects of co-products on the life-cycle impacts of microalgal biodiesel. *Bioresource Technology*, 157.166.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renew Sustain Energy*.
- Sun , J., Caton, J., & Jacobs, T. (2010). Oxides of nitrogen emissions from biodiesel-fuelled diesel engines. *Prog ENergy Combust Sci*.
- Taher, H., Al-Zuhair, S., & Al-Marzouqi, A. (2014). Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 159-167.
- Tejeda Benitez, L., Henao Argumedo, D., Alvear Alayón, M., & Castillo Saldarriaga, C. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería*, 43-54.
- Teo , C. L., Jamaluddin, H., Zain, N. M., & Idris, A. (2014). Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp. *Renewable Energy*, 1-5. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.01.027
- Tierra y derechos. (2012). Biocombustibles en el Perú: ¿Amenaza u oportunidad? *Tierra y derechos: Observatorio de los derechos de la Tierra en el Perú*, 4.
- Tomisek , A., Reid, R. M., Short, W. A., & Skipper, H. E. (1957). Studies on the photosynthesis reaction III. The effects of various inhibors upon growth and carbonate-fixation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology*, 7-10.
- Zheng, Y., Ji, X. J., Lian, M., Ren, L. J., Jin , L. J., Ouyang, P. K., & Huang, H. (2011). Development of temperature shift strategy for efficient docosahexaenoic acid production by a marine fungoid protist, *Schinochytrium* sp. HX-308. *Apply Biochemical Biotechnology*, 249-255.
- Zhou, X., Shuo, Y., Ranchi, C., & Reccab, O. (2015). Sustainable production of energy from microalgae: Review of culturing systems, economics, and modelling. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*.

ANEXOS

ANEXO 1

Anexo 1. Diseño del sistema para el control de parámetros



ANEXO 2**INFORME DE SECUENCIACIÓN**

Usuario: Universidad Católica de Santa María (UCSM).

Contacto: Srta. Allison Escalante Palacios

Muestra: Microalga

El proceso de identificación consiste en cuatro etapas principales, Extracción de ADN, Amplificación por PCR, Secuenciamiento y análisis bioinformático.

La extracción de ADN de la muestra se realizó usando el Kit “The MasterPure™ DNA Purification Kit” que provee todos los reactivos necesarios para la recuperación de ADN, durante el proceso se realizan análisis de pureza e integridad del ADN para poder pasar al siguiente paso.

Para la amplificación por PCR se utilizaron primers específicos para el gen ITS. Como en el proceso de extracción, en este paso se realizan pasos de control para la verificación de la integridad, calidad y cantidad de amplicon (Fragmento de ADN amplificado por PCR) obtenido antes de pasar al Secuenciamiento.

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit Qiagen PCR purification, y se siguió las instrucciones de la compañía, los productos purificados fueron secuenciados usando la técnica de Sanger que utiliza colorantes Big Dye V3.1 y leídos en un equipo ABI 3730xl.

La amplificación corresponde al gen ITS y para el cual cada nucleótido de la secuencia es marcado para poder ser detectado por el equipo.

Se analizaron dos secuencias.

La secuencia en crudo obtenido fue procesada realizando un análisis bioinformático. Se verificó la secuencia por visualización del electroferograma, se realizó el alineamiento correspondiente a las muestras más cercanas analizadas en el GenBank.

La elaboración del árbol se realizó con ayuda del programa MEGA 6.0.

Esta es la versión revisada del archivo FASTA. En este archivo, las bases de alta calidad con puntuaciones por encima de 20 se escriben con letras mayúsculas, las bases de baja calidad son escritas en minúsculas. Se recorta el inicio y extremos de las secuencias. Las muestras que no tienen alta calidad bases se omiten en este archivo. Esta secuencia es utilizada para la comparación en el análisis de identificación.

>1_Sample

UCSM_ITS1.ab1_1344

CCTTTGTGACTGCGGAGACATTGAATCGATCGAATCCACTCTGGTAACCA
ACCGTCCCCTCGCCCTGGTGCAGCGTCGGTCCCCTGTCTGGGGTCTTCT
GACCGCAGTTCAGGTCCGGCGGGCCTTACCCCCACGGGTGTCCCCTCGGG
GCCCCCTGGGCTGTAGGGTCGGTAATTATATTCAACTCATCCCACCCCAA

ACCTAAACTTAAACTAAAGCTGTCTAGTGTGTGCATCTCGGTGCCCCACT
CTAACCAAAGACAACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCCCGTATCGATG
AAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAA
CCATCGAATCTTTGAACGCAAATTGCGCCCCGAGGCTTCGGCCGAGGGCAT
GTCTGCCTCAGCGTCGGATTACACCCTCGCTCTCCCTCTCCTTTGGAGTG
GATATAACGGACCTGGCCTTCCCGGCTCCTCTTCGATTCATCGATGAGTC
CGGGTCGGCTGAAGTGTAAGGCTTGAGCATGGACCCCGTTTGCAGGGCA
ATGACTTGGTAAGCTAGCATCGCCTACACAGCCTGTCGTTGTCCGAGGGG
ACTTTGCTGGCGGCCTAGCAGGAATTCGGGGTGGTTCTGCCACCCCGAA
TGGCTCACACTTTCGACCTGAGCTCAGCAAAACTACCCGAATGAACTTAA
GCATATCATTGCGCGGAAAGAAAAAAAAAACCTAACTAAGATGCCCTTGT
TACCACTTTTTATTTACAAAACCCCCCCTAAATGCCAAAACCCTAATGG
GGAAATTGCTCAAAATTCCTGAAATCTTCGAATCCTTTGAACGCCAAAT
GCGGCTTCAAGGCCTTGGCCAAAAAACAAAGAACAGCCCCAACGTCCGG
GTTAAAAATCCCCCATCCCCCCTAACCAGCAAAGGGTTAAAAGGGGGGT
CCTGGGCGGAACCTGGGCTGGTTCCCACTTTTCAAGGGGTTTTCCCGTT
TGTAACCTATAAAAACAAACCGGAACCGAATTCCCCTTTCAAAGGCATC
CGGGAATCAACCGTAAAGAAAAAAGGGTTACCCCAAAGAACCCCCCTA
AAGGGCCCCACCAGGGGGGGGGCTGGTTATAAAGGCATAAAAGTATTAT
TTGTTGGGGGGCTGGGACTTTTTTTGTGATCCAACACCTCATAACGAAA
AAAAAAAACCCCTTTATTTTTTTCCCCGCACGAAAAGACCTAGCGCCAA
AAATAATTCTCCCCATGAAATTTTTATGCTTTTTTAAAATAAAACGAGC
GAGAAAAATAATTATGGTTGTTTGTGCGTCAATAAGACTAAGA

>Sample_1_UCSM_ITS4.ab1_1166

CGAATGGGTGTCTGCTGAGCTCAGGTCGAAAGTGTGAGACATTCGGGGTG
GCAGAACCACCCGAATTCTGCTAGGCCGCCAGCAAAGTCCCCTCGGAC
AACGACAGGCTGTGTAGCGATGCTACCTACCAAGTCATTGCCCTGCAAAC

GGGGTCCATGCTCAAGCCTCTACACTTCAGCCGACCCGGACTCATCGATG
AATCGCAGACGAGCCGGGAAGGCCAGGTCCGTTCTATCCACTCCAAAGGA
GAGGGAGAGCGAGGGTGTAAGCCGACGCTAAGGCAAACATGCCCTCGGCC
GAAGCCTCGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCACGGAATTC
TGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGGG
AGCCAAAATATCCGTTGTTGAAAGTTGTCTTTGGTTAGAGTGGGGCACCG
AGATGCACACACTATACAACTTTAGTTTAAAGTTTAGGTTTGGGGTGGGT
GAGTTGAATATAAATACCGACCCTACCGCGCAGGGGGGGCCCGAGGGGACA
CCCGTGGGGGTAAAGGCCACCCAACCTGAACTGCGGTCAGAAGACCCAG
ACAGGGGACCGACGCTCGCACCAGGGCAAGGGGACGGTTGGCCACCCGAG
TGGATTCCATCGATTCACTGATCCCTCCGCATTGTTTTCCAAACGGAAAC
CTTGTTACGACTTTTACCTTCCAAAAATTTTCGCCGCCCGCCGAATCCAAC
GCCACCCGCCCCCCCCCCCAAGGCCAAGCCGCCCCACCAACAACAAACG
AACAAACACCACCCAAAAAACACAAACCAAACACCACCACAAAGCCAGCG
AAGGACGACCGCAGAGCACAACAAAAGGGACGGGGGGGAGAGCGCGCGGA
GGGCACGAGAGCACGAAGGCGCAAAGGAAGCGCGCCAGGCACAGGGGCC
GCCGAGGCAGCCCGAACACCGGCAAACACCGAGAGAGCAACAGAGACG
AGAAGCCGGAGAACAAGGACAGCGACAGACGAGGGAGAGACCAAGCAGCC
GCGCAGGGGGGAGGGCGAAGAGACAACACCGACAGAGAGGGCCCGGCCGGC
GCGGACCCGCAAACAGAAGGGGCCACACGCAGGAGCCGAGGGGGGGAGGA
GGAACCAAGAGACGCC

Este archivo lista la puntuación de calidad de cada base en el archivo seq.txt revisado

>1_Sample UCSM_ITS1.ab1_1344

>190813-026_O03_Sample_1_UCSM_ITS4 0,1165:-1,-1:58,201:66,115 1 1166
4 2 3 4 5 3 3 4 3 3 4 5 5 6 13 8 16 9 8 53
39 40 26 36 51 51 51 51 31 54 54 58 46 46 46 51 58 46 27 20
14 23 28 26 31 46 32 28 31 46 31 31 36 46 46 48 26 15 25 30
27 16 18 26 19 18 26 41 31 29 41 48 49 45 27 20 36 46 46 32
32 28 26 36 46 58 58 51 51 51 58 58 58 51 36 28 28 36 31 58
58 58 36 28 46 51 28 28 52 51 51 52 52 31 25 27 18 27 28 46
36 34 32 51 32 51 58 58 46 31 31 51 41 29 29 58 58 58 34 34

58 34 32 58 51 36 25 27 41 46 51 58 58 34 34 58 58 25 36 46
51 32 51 26 17 17 29 51 34 51 34 34 58 61 51 34 32 51 51 25
58 58 32 36 25 32 52 51 51 51 32 26 17 17 28 29 25 26 16 27
36 34 14 13 6 6 6 15 20 9 9 27 24 28 35 44 44 28 26 31 27 26
17 17 26 25 41 29 29 41 31 36 28 34 45 26 17 26 16 41 32 32
52 52 52 52 51 51 51 41 41 41 26 16 26 49 48 47 27 10 10 20
40 43 31 22 31 28 38 20 9 20 20 9 9 16 24 29 26 15 26 28 26
25 14 12 12 26 25 27 26 16 31 30 27 15 15 15 26 31 25 26 16
28 40 16 16 26 30 46 29 27 25 29 47 26 17 28 31 31 31 31 41
26 15 25 30 21 10 20 40 40 36 25 26 20 34 44 48 31 28 36 41
48 45 36 41 26 50 41 29 28 34 32 32 51 46 28 36 25 31 46 52
32 32 25 25 58 52 46 36 25 41 52 41 32 26 18 27 51 51 41 46
51 49 49 46 26 26 25 16 31 30 30 31 31 26 40 42 42 31 22 27
40 40 26 14 26 41 17 17 27 31 31 41 49 49 49 40 15 20 35 28
45 50 51 29 29 41 52 26 15 26 51 58 58 58 31 51 25 34 58 34
32 46 50 24 20 5 5 12 19 25 29 29 31 30 31 41 41 29 17 21 26
12 12 18 14 14 26 44 45 39 28 28 42 45 41 31 15 15 26 15 15
27 30 35 42 42 47 43 27 18 26 36 45 48 41 25 26 21 28 41 29
31 25 31 29 25 31 16 26 26 16 21 34 33 31 20 31 26 15 15 17
19 5 5 5 11 11 26 41 30 42 42 34 26 17 22 37 37 35 25 17 28
17 26 37 34 17 17 26 42 28 21 21 16 27 41 28 28 23 30 23 18
8 7 14 11 12 25 27 27 20 15 15 25 30 27 28 30 19 26 20 26 25
26 34 36 36 36 22 13 22 20 31 33 27 14 14 16 19 19 25 32 32
32 35 40 43 43 30 12 12 22 35 35 27 18 25 38 24 17 17 11 16
9 15 18 15 15 21 25 24 20 12 9 25 19 15 20 7 5 8 9 20 20 27
18 17 25 31 21 21 17 36 29 21 11 19 30 26 18 15 18 18 18 18
26 26 21 25 30 20 14 20 22 16 7 3 3 15 13 25 16 16 11 15 20
20 8 8 20 40 40 48 49 50 50 50 51 51 51 51 50 50 21 21 31 22
22 23 37 43 20 11 11 11 33 27 28 27 20 16 22 16 3 3 3 3 3 3
3 3 3 3 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 5 5 3 3 3 5 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 5
5 5 5 3 4 3 3 3 3 3 3 4 5 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 3 3
3 3 3 3 3 3 3 3 3 5 3 3 3 5 3
3
3 3

26 15 26 17 26 31 32 52 52 51 51 41 41 41 57 50 35 40 40 24
57 58 58 58 51 36 25 28 51 51 51 36 29 25 32 28 15 11 8 14
14 25 32 32 32 46 46 51 51 58 58 31 29 29 51 51 51 58 41 36
36 51 51 32 58 51 34 51 32 32 58 51 51 51 51 51 50 51 28 28
23 21 22 11 17 30 24 31 41 41 24 10 10 3 16 50 49 51 46 41
41 51 58 51 51 51 51 51 51 58 41 41 51 58 51 51 51 58 58 46
46 58 58 58 51 51 51 58 58 51 46 46 46 50 27 27 22 23 26 45
51 51 51 51 46 41 20 20 28 51 41 41 50 51 26 18 26 50 50 49
49 40 19 17 30 45 47 48 47 25 19 16 6 20 46 40 41 31 22 27
41 40 40 16 7 16 45 45 46 42 42 41 41 39 18 5 10 23 18 16
22 22 25 15 15 5 12 25 21 18 18 18 34 43 44 48 48 45 45 31
45 31 48 48 47 43 39 27 15 6 6 19 8 8 18 15 20 20 17 12
10 31 40 40 42 33 34 42 42 22 19 4 13 10 34 27 17 26 14 16
31 34 36 46 46 40 40 30 20 21 26 41 41 40 40 36 28 28 46 44
15 3 6 14 25 14 14 16 41 42 30 13 13 23 17 3 3 13 3 3
13 17 15 7 10 11 19 21 9 6 6 17 17 25 16 16 13 3 13 30
22 19 22 25 30 29 34 38 9 9 12 20 32 30 22 19 30 21 20 20
15 20 19 21 20 9 3 3 3 13 3 13 22 14 12 11 20 21 14 22
29 24 19 19 21 10 6 6 7 21 7 7 3 3 13 12 9 9 20 9
11 9 19 15 12 5 18 16 22 23 30 23 22 18 15 10 6 5 10 10
10 10 10 10 11 24 27 20 8 12 8 3 3 13 13 3 21 13 22 20
11 28 11 19 24 21 10 20 12 27 35 21 16 13 3 3 36 35 26 26
11 11 6 9 20 10 10 20 14 22 15 30 30 20 23 17 12 23 16 37
31 31 19 28 30 28 22 22 3 3 13 13 3 28 13 13 3 20 3 21

22 18 6 6 7 6 13 3 3 9 9 18 18 12 16 3 3 3 11 10
6 9 9 11 15 9 8 8 8 15 3 3 3 6 8 8 7 9 8 6 7 3 3 3 9 10 8
13 3 3 26 23 14 13 3 3 3 3 3 11 3 12 10 7 3 7 3 6 10 11
16 15 14 11 11 8 3 3 3 12 17 15 15 15 10 7 7 7 12 12 8
15 8 8 10 8 8 8 11 11 10 10 8 6 18 15 10 3 16 16 16 16
15 8 8 11 8 8 10 10 5 5 7 5 5 8 9 5 8 8 8 9 20 16 9 15 10
8 8 9 8 9 7 7 15 9 11 7 10 8 5 6 6 6 10 16 13 8 13 12 11 9
7 5 5 8 9 8 8 10 14 13 10 8 7 7 5 6 8 7 6 6 6 5 8 11 8 12
14 7 7 7 7 8 15 14 11 10 9 7 7 7 15 11 10 7 9 15 15 12

10977776671414863712866363121010
 8717977111111176171515111077681616
 151199911141110633699886667336368
 7712119777971110661515141031099149
 814108877111011151110121010111010910
 1411977881210811111514111183310315
 1512333339833310883363683336610
 888

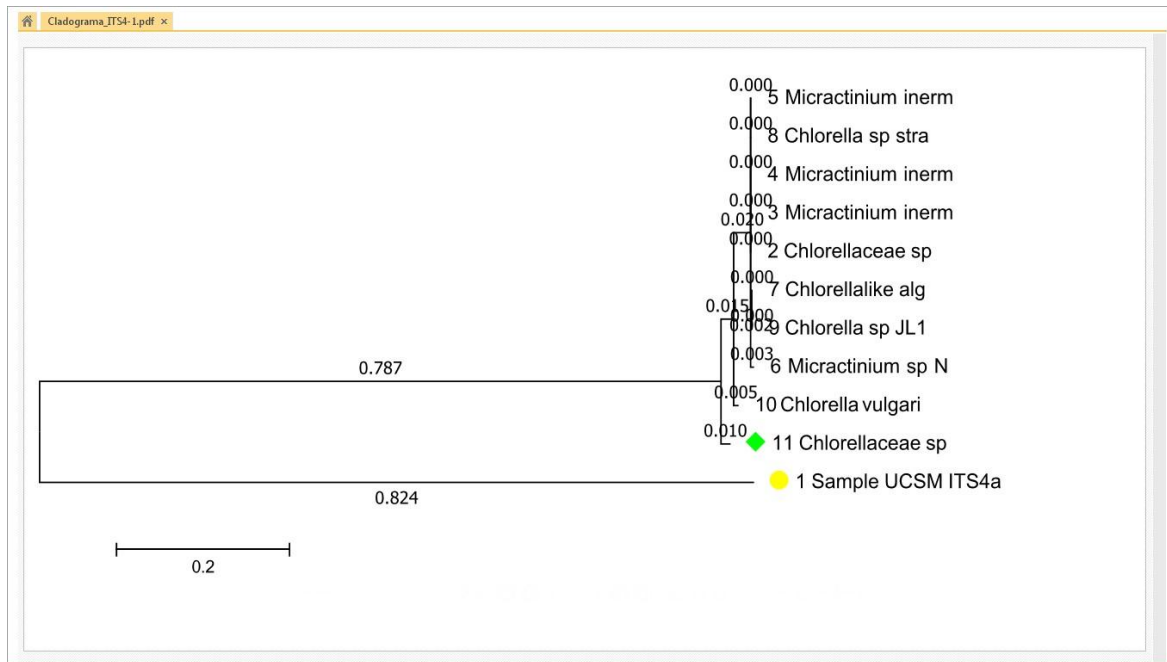
El siguiente archivo contiene información sobre las longitudes de lectura y puntuaciones de calidad para la muestra secuenciada.

	Label	Blast		Length			GC%
		N	X	Normal	QV≥16	QV≥20	
1	Sample_1_UCSM_ITS1	-	-	1053	496	383	52.0
2	Sample_1_UCSM_ITS4	-	-	712	423	319	55.0

>1_Sample UCSM_ITS1_GenBank_ BLAST

Query				Subject						Score			Identities		Strand
Name	Length	Start	End	DB	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)	
190813-026_M03_Sample_1_UCSM_ITS1	1344	10	748	-	KP204570	1377	365	1099	1212	656	0.0	716	743	96	Plus/Plus
190813-026_O03_Sample_1_UCSM_ITS4	1166	6	722	-	KP204587	1377	1044	328	1142	618	0.0	687	720	95	Plus/Minus

The screenshot displays a BLAST search interface. At the top, it identifies the search as 'BLAST' using 'blastn suite' for results related to 'RID-NCM868B014'. The 'Filter Results' section is active, showing options to filter by organism, percent identity, and E-value. Below this, the 'Sequences producing significant alignments' table is visible, listing various microbial sequences with their respective scores, lengths, and accession numbers.



IDENTIFICACIÓN

Se logra mediante la comparación de secuencias de ADN del gen ITS1 y ITS4.

>1_Sample UCSM ITS1.ab1_1344. Corresponde a:

Chlorellaceae_sp._MCWWS28_18S_ribosomal_RNA_gene_ACCESSION_KP204570.

>Sample_1_UCSM ITS4.ab1_1166 Corresponde a:

Chlorellaceae_sp._MCWWW9_18S_ribosomal_RNA_gene_ACCESSION_KP204587.

CONCLUSIONES

Se concluye que el ADN extraído de las muestras 1_Sample UCSM ITS1 y Sample_1_UCSM ITS4 en base los análisis realizados, tanto de los arboles filogenéticos los alineamientos y la búsqueda del GenBank que pertenecen a la familia Chlorellaceae y género Chlorella sp.

Taxonomía

Reino: Plantae (Primoplantae)

División: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Género: Chlorella sp.

OBSERVACIÓN

Como resultado de la secuenciación, se encontró difícil la identificación a nivel de especie debido a un patrón mixto. Por lo que suponemos que esto se debe a que la muestra no era una muestra puramente cultivada desde el principio; ya que en el electroferograma se observa picos que estarían asociados a la presencia de ADN no proveniente de la muestra a identificar en bajas cantidades.

File: Sample_1_UCSM_ITS1.ab1

Run Ended: 2019/8/14 2:47:38

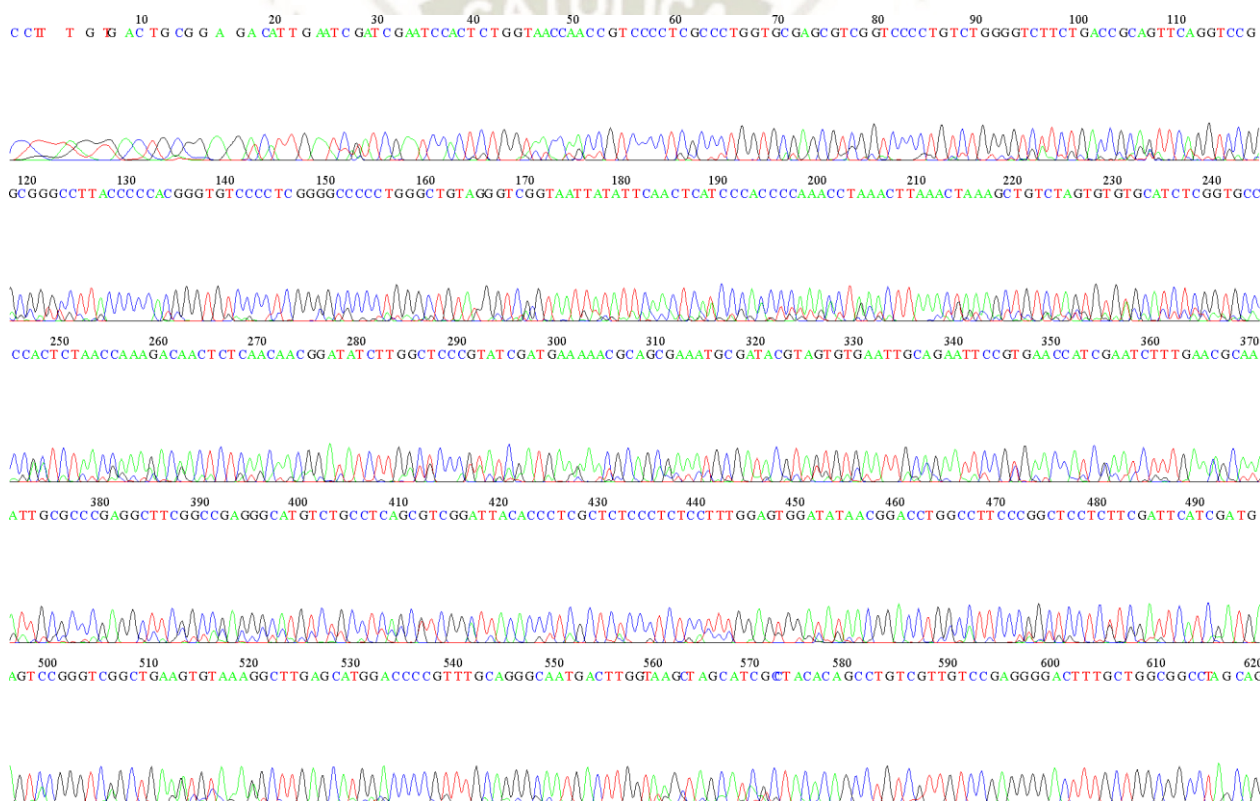
Signal G:3110 A:3124 C:5912 T:4646

Sample: Sample_1_UCSM_ITS1
scans

Lane: 4 Base spacing: 15.969254

1344 bases in 15959

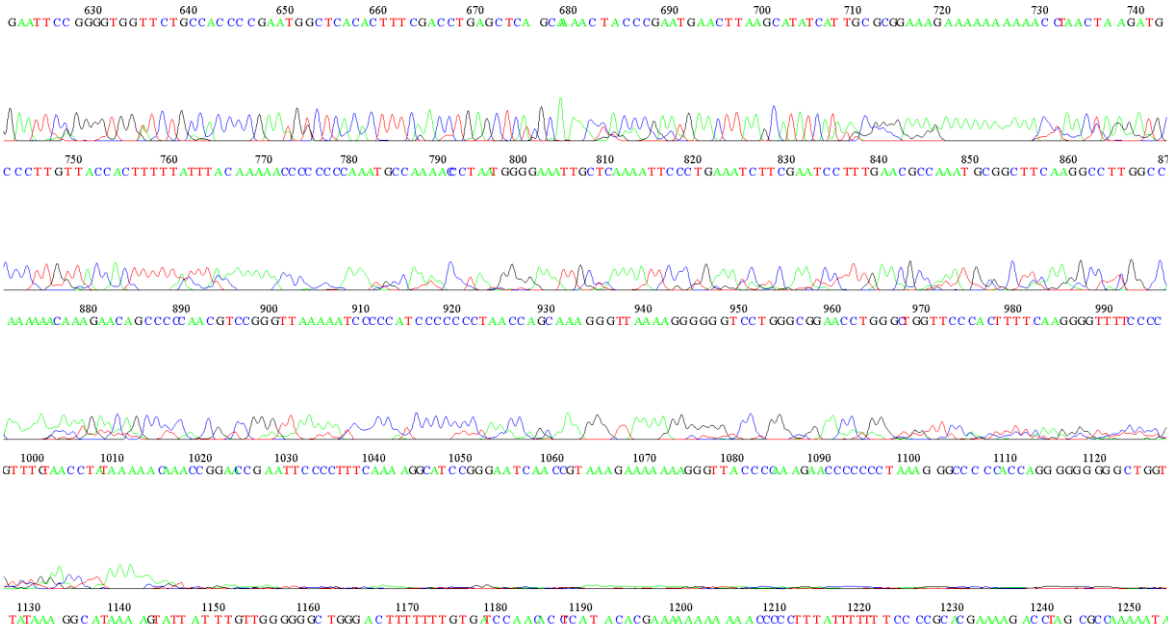
Page 1 of 2



File: Sample_1_UCSM_ITS1.ab1
Sample: Sample_1_UCSM_ITS1
scans

Run Ended: 2019/8/14 2:47:38
Lane: 4 Base spacing: 15.969254
Page 2 of 2

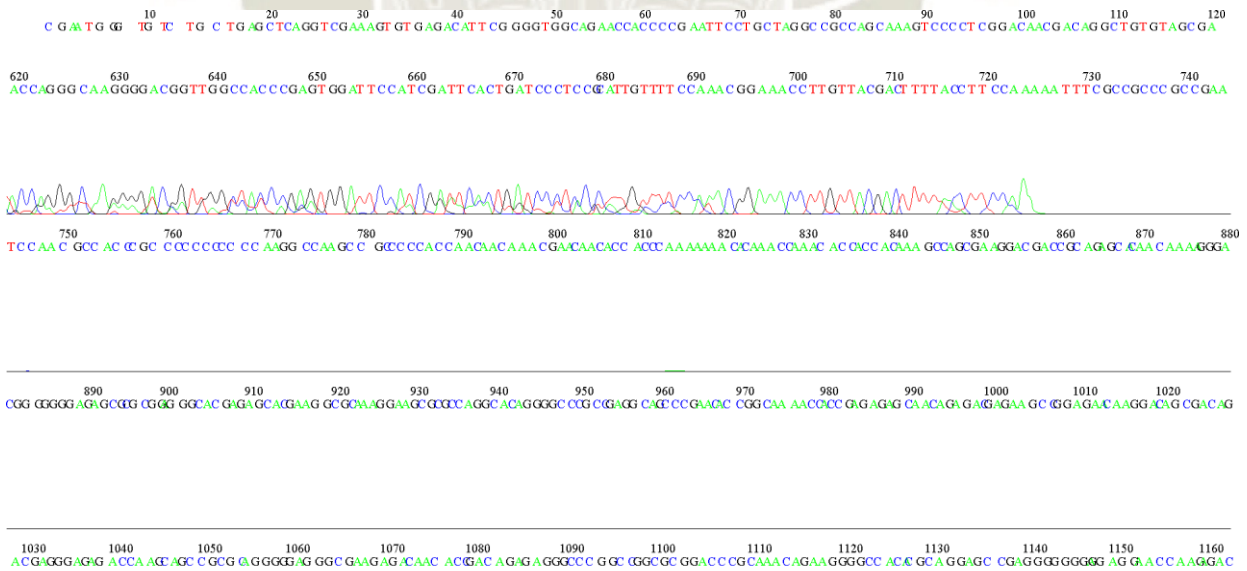
Signal G:3110 A:3124 C:5912 T:4646
1344 bases in 15959



File: Sample_1_UCSM_ITS4.ab1
Sample: Sample_1_UCSM_ITS4
scans

Run Ended: 2019/8/14 2:47:38
Lane: 2 Base spacing: 17.021912
Page 2 of 2

Signal G:821 A:949 C:1399 T:1151
1166 bases in 13540 scans



GCC

ANEXO 3

Anexo 3. Diseño factorial cuantitativo

BLOQUE	pH	Intensidad de luz, Lx	Temperatura, °C
1	7,0	6000,0	22,0
1	5,0	2000,0	25,0
1	9,0	10000,0	22,0
1	5,0	6000,0	28,0
1	7,0	6000,0	25,0
1	7,0	10000,0	25,0
1	5,0	10000,0	22,0
1	7,0	2000,0	28,0
1	5,0	2000,0	22,0
1	5,0	6000,0	22,0
1	7,0	10000,0	22,0
1	9,0	6000,0	22,0
1	5,0	6000,0	25,0
1	9,0	10000,0	28,0
1	7,0	6000,0	28,0
1	5,0	10000,0	25,0
1	5,0	10000,0	28,0
1	7,0	2000,0	25,0
1	9,0	6000,0	25,0
1	7,0	2000,0	22,0
1	5,0	2000,0	28,0
1	7,0	10000,0	28,0
1	9,0	2000,0	22,0
1	9,0	2000,0	28,0
1	9,0	6000,0	28,0
1	9,0	10000,0	25,0
1	9,0	2000,0	25,0
2	7,0	10000,0	28,0
2	5,0	2000,0	28,0
2	9,0	10000,0	22,0
2	7,0	10000,0	25,0
2	9,0	6000,0	28,0
2	9,0	6000,0	22,0
2	7,0	6000,0	28,0
2	5,0	10000,0	25,0
2	7,0	2000,0	25,0
2	5,0	6000,0	25,0
2	7,0	6000,0	25,0
2	9,0	2000,0	25,0
2	5,0	10000,0	28,0

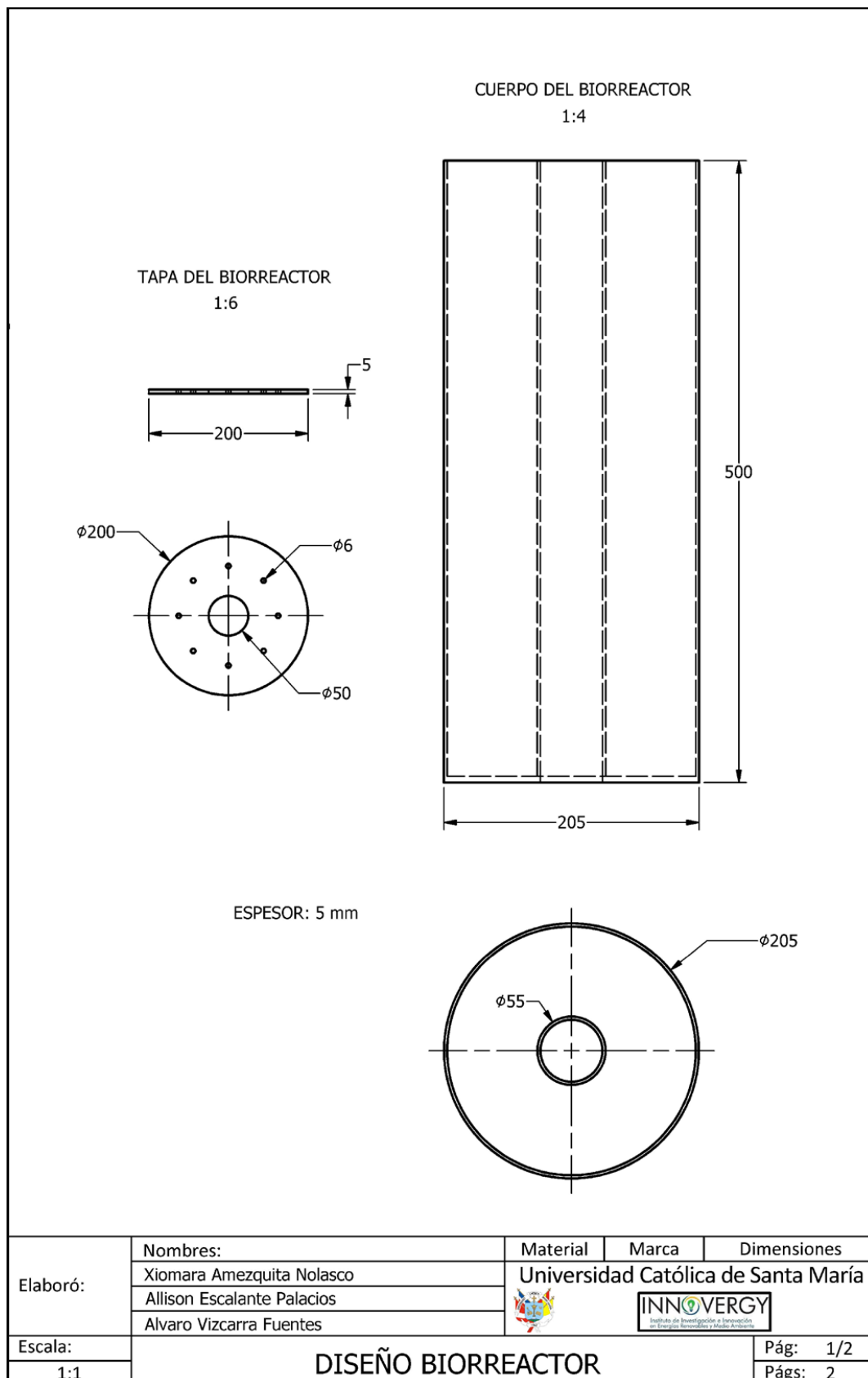
2	7,0	2000,0	28,0
2	7,0	10000,0	22,0
2	5,0	2000,0	25,0
2	9,0	10000,0	28,0
2	5,0	6000,0	28,0
2	9,0	2000,0	22,0
2	7,0	6000,0	22,0
2	9,0	6000,0	25,0
2	5,0	2000,0	22,0
2	5,0	6000,0	22,0
2	7,0	2000,0	22,0
2	9,0	2000,0	28,0
2	9,0	10000,0	25,0
2	5,0	10000,0	22,0

Fuente: STATGRAPHICS CENTURION XVI



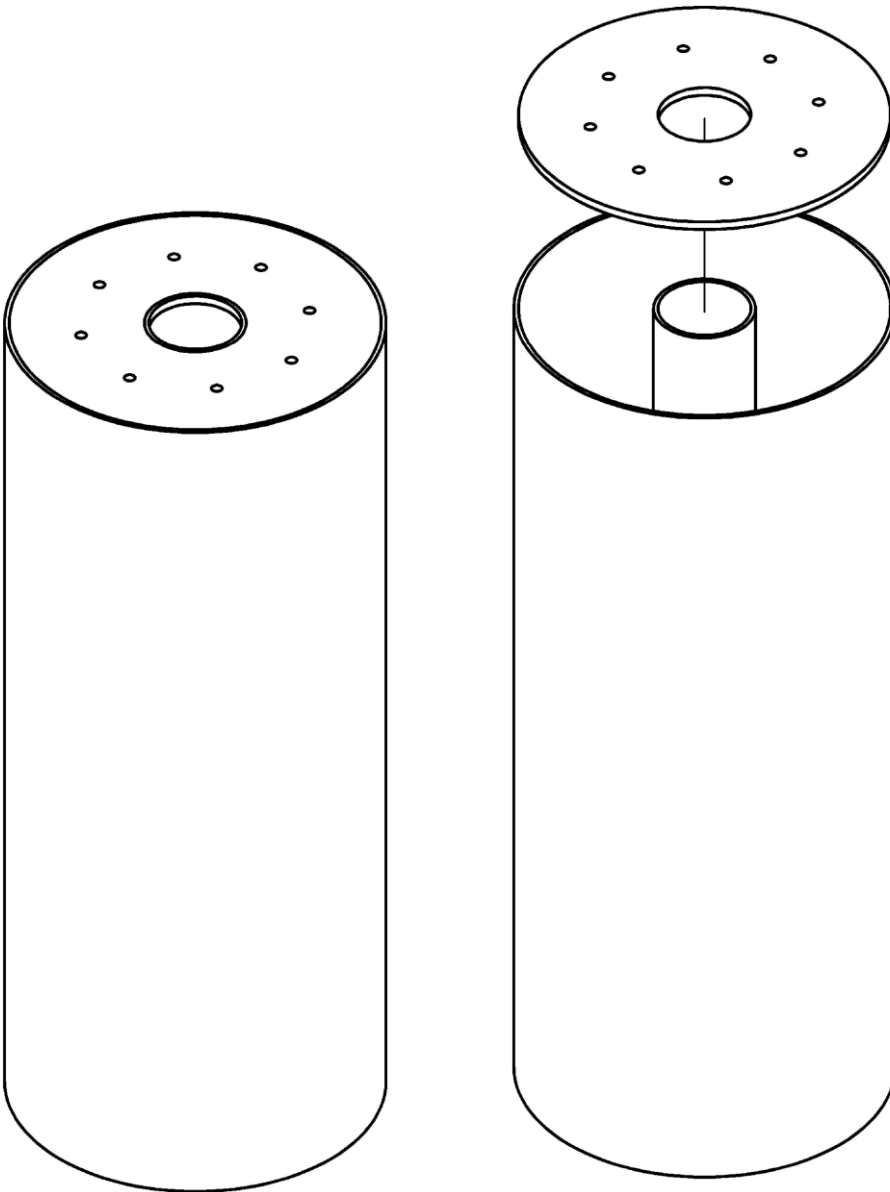
ANEXO 4


Anexo 4. Diseño del fotobiorreactor



ANEXO 5

Anexo 5. Diseño del fotobiorreactor



Elaboró:	Nombres:	Material	Marca	Dimensiones
	Xiomara Amezcua Nolasco	Universidad Católica de Santa María 		
	Allison Escalante Palacios			
	Alvaro Vizcarra Fuentes			
Escala:	DISEÑOR BIORREACTOR			Pág: 2/2
1:3				Págs: 2

ANEXO 6

Anexo 6. Informe de Ensayo N°01 de Determinación de Ácidos grasos



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
 AREQUIPA - PERU




INFORME DE ENSAYO N° ANA04K19.004353 A

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del Cliente : Allison Yolanda Escalante Palacios
Dirección del Cliente : Calle San Martín 212 Urb. El cercadito Tiabaya
RUC : no declara
Identificación del contacto : Allison Yolanda Escalante Palacios

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Descripción de la muestra : Muestra 1
Tamaño de muestra : 4g
Fecha de recepción : 04/11/2019
Fecha de ejecución de ensayo : 04/11/2019 al 12/11/2019
Fecha de emisión de informe : 13/11/2019
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS		
Cromatografía de Gases con Detección FID, método validado GC FID 001 Versión 001		
SATURADOS	g/100 mL	0,34
MONOINSATURADOS	g/100 mL	0,02
POLIINSATURADOS	g/100 mL	0,54
TRANS	g/100 mL	0,00

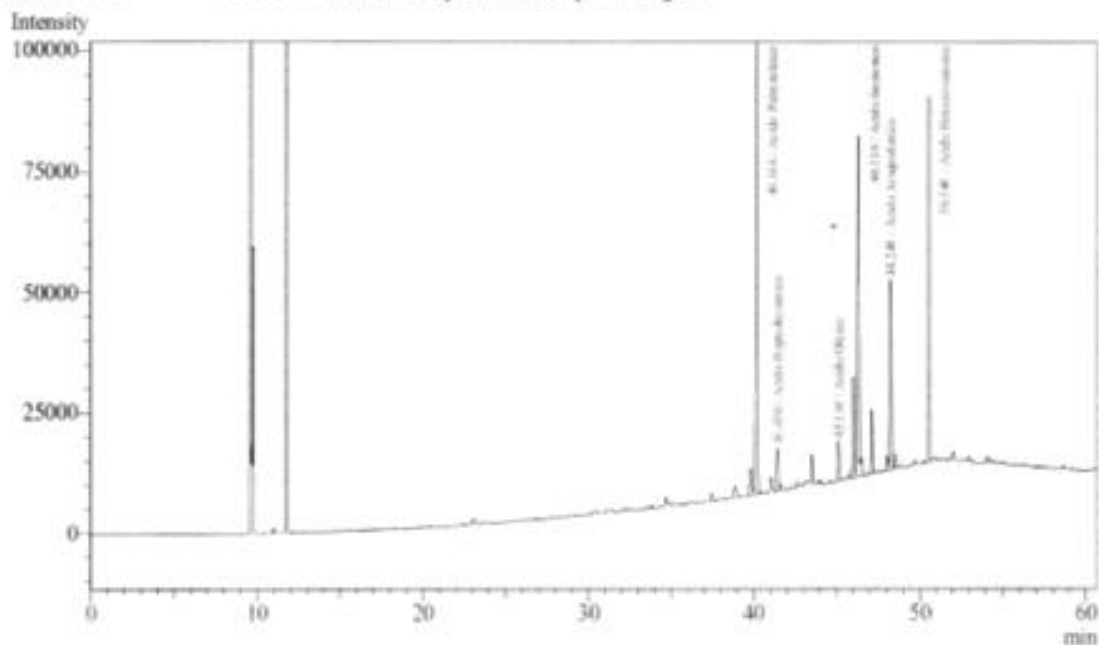
OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


Ricardo A. Abril Ramírez
 CCFDA 00824
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\muestra control\alga A 08-11-19.gcd
Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\Fame37ptos final.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	40.164	681826	97379	34.147	%		13	Acido Palmítico
2	41.430	67384	8988	3.268	%		14	Acido Heptadecanoico
3	45.110	55878	8247	2.708	%		18	Acido Oleico
4	46.310	658845	70640	32.543	%	V	19	Acido linolenico
5	48.248	219128	39564	10.388	%	V	21	Acido Araquidónico
6	50.540	359820	75650	16.946	%		25	Acido Heneicosanoico
Total		2042881	300468					



ANEXO 7

Anexo 7. Informe de Ensayo N°02 de Determinación de Ácidos grasos



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📍 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERÚ




INFORME DE ENSAYO N° ANA04K19.004353 B

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del Cliente : Allison Yolanda Escalante Palacios
Dirección del Cliente : Calle San Martín 212 Urb. El cercadito Tiabaya
RUC : no declara
Identificación del contacto : Allison Yolanda Escalante Palacios

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Descripción de la muestra : Muestra 2
Tamaño de muestra : 4g
Fecha de recepción : 04/11/2019
Fecha de ejecución de ensayo : 04/11/2019 al 12/11/2019
Fecha de emisión de informe : 13/11/2019
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS		
Cromatografía de Gases con Detección FID, método validado GC FID 001 Versión 001		
SATURADOS	g/100 mL	0,32
MONOINSATURADOS	g/100 mL	0,02
POLIINSATURADOS	g/100 mL	0,59
TRANS	g/100 mL	0,00

OBSERVACIONES:

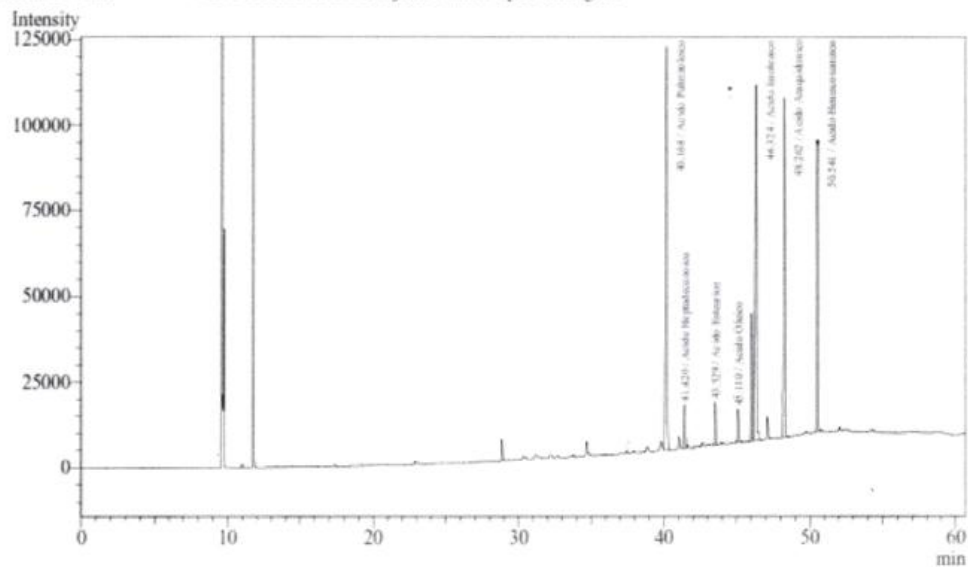
- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



f. Ricardo A. Abril Ramírez
 QDFA 00624
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\muestra control\ALGA B 08-11-19.gcd
Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\Fame37cptos final.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	40.168	828076	117908	28.819	%	V	13	Acido Palmítico
2	41.420	92089	12949	3.104	%	V	14	Acido Heptadecanoico
3	43.529	67571	12651	2.242	%		16	Acido Estearico
4	45.110	64763	9833	2.181	%		18	Acido Oleico
5	46.324	916201	104001	31.448	%	S	19	Acido linolenico
6	48.262	569762	99228	18.770	%		21	Acido Araquidónico
7	50.541	410583	85477	13.437	%		25	Acido Heneicosanoico
Total		2949045	442047					

