

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS**



**EFFECTO DEL ESTRES INDUCIDO POR DEFICIENCIA DE SALES
NUTRITIVAS EN UN SISTEMA DE CULTIVO RACEWAY AWL DE
LAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus dimorphus*
EN LA OBTENCION DE ACEITE**

Tesis presentada por los bachilleres

**GOMEZ CASTILLO CLAUDIA VANESSA
RODRIGUEZ MANRIQUE JORGE LUIS**

Para optar El título Profesional de ING. BIOTECNOLOGO

ASESOR: José A. Villanueva Salas, Ph D

AREQUIPA – PERU

2012

INDICE GENERAL

I. CAPITULO: MARCO TEORICO	10
1.1 ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE MICROALGAS – CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS	10
1.1.1 Morfología de las microalgas.....	12
1.1.2 Reproducción	14
1.2 CINETICA DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS	15
1.2.1 Fases de Crecimiento	15
1.2.2 Tasa de crecimiento (μ)	16
1.2.3 Tiempo de generación (g)	17
1.2.4 Numero de generaciones (n)	17
1.2.5 Recuento poblacional.....	17
1.3 DEMANDAS DE DESARROLLO.....	18
1.4 TIPOS DE CULTIVO	19
1.4.1 Cultivos Intensivos.....	20
1.4.2 Cultivos Extensivos	20
1.4.3 Cultivo Discontinuo (BATCH).....	20
1.4.4 Cultivo Continuo.....	20
1.4.5 Cultivo Semicontinuo	21
1.4.6 Cultivo Axénico	21
1.4.7 Cultivo Monoespecífico.....	21
1.5 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EL CULTIVO DE LAS MICROALGAS.....	21
1.5.1 Aislamiento de microalgas.....	21
1.5.2 Mantenimiento de cepas:	24
1.5.3 Cultivo Inicial:	24
1.5.4 Cultivo intermedio:	24
1.5.5 Cultivo de 10 a 20 l. (Raceway – AWL):	25
1.5.6 Parámetros de Cultivo.....	25
1.6 MEDIOS DE CULTIVO.....	31
1.6.1 Medio Hidropónico.....	31
1.7 SISTEMA DE CULTIVO	32
1.7.1 Sistemas Raceway.....	32
1.8 INDUCCION DEL ESTRÉS	33
1.9 SEPARACION Y COSECHA	34
1.10 EXTRACCION DE ACEITE.....	35
1.10.1 Caracterización del Aceite.....	35

1.10.2 Aplicaciones del Aceite de Microalgas	38
II. CAPITULO: MATERIALES Y METODOS.....	39
2.1 MATERIALES.....	39
2.1.1 Lugar de ejecución.....	39
2.1.2 Material Biológico	39
2.1.3 Materiales y equipos de laboratorio	39
2.2 METODOS.....	40
2.2.1 Muestreo y Aislamiento de Cepas	40
2.3 SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	42
2.4 PREPACION DEL MEDIO HIDROPONICO	43
2.5 CULTIVO DE MICROALGAS.....	43
2.5.1 Mantenimiento de Cepas.....	43
2.5.2 Cultivo inicial.....	45
2.5.3 Cultivo Intermedio	45
2.6 CULTIVO EN SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO.	46
2.7 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO.	47
2.8 INDUCCION DEL ESTRES POR DEFICIENCIA DE SALES NUTRITIVAS.	48
2.9 SEPARACION Y COSECHA DE LAS MICROALGAS.....	48
2.10 SECADO	49
2.11 EXTRACCIÓN DE ACEITE POR SOLVENTES	49
2.11.1 Destilación.....	49
2.12 CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE	49
2.12.1 Peso específico	49
2.12.2 Índice de refracción	49
2.12.3 Índice de saponificación	50
2.12.4 Determinación de Índice de Yodo. (Método de Wijs)	50
2.12.5 Determinación del Índice de Peróxidos. (Método volumétrico)	51
2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
III. CAPITULO: RESULTADOS Y DISCUSION	54
3.1 MUESTREO Y AISLAMIENTO	54
3.2 CULTIVO DE MICROALGAS.....	54
3.2.1 Selección de concentración óptima del medio de cultivo	54
3.2.2 Mantenimiento de cepas.	58
3.2.3 Cultivo inicial.....	59
3.2.4 Cultivo Intermedio.	59
3.3 PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN EL SISTEMA RACEWAY AWL.....	62

3.4 OBTENCIÓN Y RECUPERACIÓN DE BIOMASA.....	66
3.5 OBTENCIÓN DE ACEITE POR EXTRACCIÓN CON SOLVENTES	69
3.6 CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS	72
3.6.1 Peso específico.....	72
3.6.2 Índice de refracción.....	72
3.6.3 Índice de saponificación:	72
3.6.4 Índice de Yodo. (Método de Wijs)	73
3.6.5 Índice de Peróxido	73
IV. CONCLUSIONES	75
V. RECOMENDACIONES	77



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de las microalgas	11
Tabla 1.2 Contenido lipídico de algunas microalgas (%).....	12
Tabla 1-3 Taxonomía de <i>Chlorella vulgaris</i>	13
Tabla 1.4 Taxonomía de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	14
Tabla 1.5 Análisis para determinar la calidad de aceite según CODEX 210	36
Tabla 2.1 Cuadro comparativo de las modificaciones realizadas en el Sistema de Cultivo Raceway AWL	47
Tabla 2.2 Pesos de muestra propuestos de acuerdo al índice de peróxido.....	51
Tabla 3-1 Densidad poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de medio de cultivo.	55
Tabla 3-2 Densidad poblacional de <i>Scenedesmus Dimorphus</i> a diferentes concentraciones de medio de cultivo.....	56
Tabla 3-3 Densidad Poblacional de la Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> Durante sus Periodos de cultivo.	60
Tabla 3.4 Densidad poblacional de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> a través de sus tres etapas de cultivo.....	61
Tabla 3.5 Concentración inicial, final (Cel/ml) y Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes concentraciones de medio (100, 15, 10, 5 y 0%) en nueve días de desarrollo.	64
Tabla 3.6 Concentración inicial, final (Cel/ml) y Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes concentraciones de medio (100, 15, 10, 5 y 0%) en nueve días de desarrollo.	65
Tabla 3.7 Densidad poblacional y Biomasa obtenida en peso seco de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus dimorphus</i> a diferentes concentraciones (15%, 10% y 5%) de Sales Nutritivas	68
Tabla 3.8 Parámetros Evaluados y Resultados obtenidos a lo largo del cultivo de las Microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus dimorphus</i> bajo distintas Concentraciones de Sales Nutritivas	71

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1.1. Vista al microscopio de <i>Chlorella vulgaris</i> .	13
Figura N°1.2. Vista microscópica de <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	14
Figura N°1.3. Curva de crecimiento de las microalgas.	16
Figura N°1.4. Cámara de recuento Neubauer	17
Figura N°1.5. Aislamiento de microalgas (técnica de la micropipeta).	23
Figura N°3.1. Curvas de crecimiento para <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de medio de cultivo.	56
Figura N°3.2. Curvas de crecimiento para <i>Scenedesmus dimorphus</i> a diferentes concentraciones de medio de cultivo.	57
Figura N° 3.3. Figuras de las tres etapas de cultivo para microalgas,	59
Figura N° 3.4. Curvas de crecimiento obtenidas en cada etapa del cultivo de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> .	60
Figura N°3.5. Curvas de crecimiento obtenidas en cada etapa del cultivo de microalgas <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	62
Figura N°3.6. Curvas de densidad poblacional para <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de medio de cultivo.	64
Figura N° 3.7. Curvas de densidad poblacional para <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada bajo estrés a diferentes concentraciones de medio de cultivo.	65
Figura N°3.8. Floculación de las microalgas.	66
Figura N°3.9. Biomasa obtenida por floculación	67
Figura N°3.10. Secado de las microalgas en estufa	67
Figura N°3.11. Extracción en equipo Soxhlet	69
Figura N° 3.12. Extracción en equipo Soxhlet – Sifoneado.	69
Figura N°3.13. Diagrama de caja para <i>Chlorella vulgaris</i> .	94
Figura N°3.14. Diagrama de caja para <i>Scenedesmus dimorphus</i> .	94

RESUMEN

En el presente trabajo se cultivaron dos especies de microalgas chlorophytas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*, estas se aislaron mediante técnicas de dilución, rayado en agar y pipeteo capilar, a partir de muestras tomadas de una poza de oxidación en el distrito de la Joya en la ciudad de Arequipa.

Se probaron diferentes concentraciones (50%, 25%, 15%, 10% y 5%) de medio de cultivo con el fin de determinar en cuál de ellos las microalgas presentan un mejor crecimiento, encontrándose que a una concentración de medio del 15% ambas especies mostraron los mejores resultados, obteniéndose para *Chlorella vulgaris* 5.6×10^5 cel/mL y para *Scenedesmus dimorphus* 1.1×10^5 cel/mL al quinto día de cultivo, mientras que las demás concentraciones mostraron valores inferiores a estos.

Con el objetivo de corroborar el efecto que tiene la deficiencia de sales nutritivas, en el contenido de aceite, es que se realizaron cultivos a concentraciones cada vez menores (10% y 5%) a la ya establecida como óptima (15%) del medio de cultivo obteniendo los siguientes resultados en cuanto a densidad poblacional; para el cultivo al 15% *Chlorella vulgaris* reportó una densidad de 7.76×10^7 cel/mL y *Scenedesmus dimorphus* 7.63×10^7 cel/mL, para los cultivos al 10% se obtuvo 5.58×10^7 cel/mL y 5.6×10^7 cel/mL respectivamente y para los cultivos realizados al 5% 4.58×10^7 cel/mL para *Chlorella vulgaris* y 4.63×10^7 cel/mL para *Scenedesmus dimorphus*. Los cultivos tuvieron un periodo de duración de 7 a 9 días en cada etapa (cultivo inicial, cultivo secundario y cultivos en el sistema Raceway-AWL modificado).

El sistema de cultivo empleado para el desarrollo de este trabajo fue el Raceway AWL o de circuito, al cual se le realizaron modificaciones para mejorar algunas de sus características básicas como: agitación (neumática), intensidad luminosa (5000 lux), temperatura regulada mediante termostato (20°C), pH (6-7), fuente de carbono (CO²), turbulencia, área y volumen de cultivo.

La extracción del aceite fue realizada mediante una mezcla de solventes (Cloroformo – Alcohol isopropílico) con una posterior destilación para separar el aceite y recuperar el solvente, el aceite obtenido se sometió a pruebas fisicoquímicas (peso específico, índice de refracción, índice de saponificación, índice de yodo e índice de peróxido) establecidas por el CODEX PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS CODEX STAN 210-1999, para validar el aceite como tal y evaluar su calidad, los resultados finales determinaron que los cultivos bajo condiciones de estrés muestran un mayor rendimiento en cuanto a cantidad de aceite, obteniéndose para *Chlorella vulgaris* 0.2342 mL aceite/gr , 0.2932 mL aceite/gr, 0.3123 mL aceite/gr para 15%, 10% y 5% respectivamente. En el caso de *Scenedesmus* se obtuvo 0.3397 mL aceite/gr, 0.4223 mL aceite/gr y 0.4264 ml aceite/gr para 15%, 10% y 5% respectivamente. En base a estos resultados se pudo concluir que la disminución de sales nutritivas incrementa la cantidad de aceite en las microalgas pero si se reduce mucho la cantidad de sales nutritivas no solo incrementa el tiempo de duplicación (crecimiento muy lento) sino que también reduce el tiempo de vida del cultivo.

Palabras clave: Microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, aceite, sales nutritivas, Raceway, medio de cultivo

ABSTRACT

In this work, two species were grown chlorophytas microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*, these were isolated by dilution techniques, and pipetting graded agar capillary samples taken from a pool of oxygenation in the Jewelry District in Arequipa.

Different concentrations were tested (50%, 25%, 15%, 10% and 5%) of culture medium in order to determine which of them exhibit a better algae growth, it was found that an average concentration of 15% both species showed the best results, obtained for *Chlorella vulgaris* 5.6×10^5 cells / mL and *Scenedesmus dimorphus* 1.1×10^5 cells / mL on the fifth day of culture, whereas the other showed concentrations below these values.

In order to corroborate the effect of deficiency of nutrient salts in the oil content is that cultures were performed at increasingly lower concentrations (10% and 5%) to the already established as optimal (15%) of the medium crop the following results regarding population density, for growing *Chlorella vulgaris* 15% reported a density of 7.76×10^7 cells / mL and *Scenedesmus dimorphus* 7.63×10^7 cel / mL, for crops 10% was obtained 5.58×10^7 cel / mL and 5.6×10^7 cells / mL respectively and for the crops grown 5% 4.58×10^7 / cel / mL for *Chlorella vulgaris* and 4.63×10^7 cells / mL for *Scenedesmus dimorphus*. The cultures had a duration of 7 to 9 days in each stage (initial cultivation, cultivation crops secondary Raceway system in the modified STL).

This modified culture system employed for the development of this work was the STL Raceway circuit, to which you made changes to improve some of its basic features as: agitation (air), light intensity (5000 lux), heated thermostat (20 ° C), pH (6-7), carbon source (CO₂), turbulence, crop area and volume.

Oil extraction was done using a solvent mixture (chloroform - isopropyl alcohol) with a subsequent distillation to purify and recover the solvent oil, the oil obtained was subjected to physicochemical tests (specific gravity, refractive index, saponification, iodine value and peroxide value) established by Codex for VEGETABLE OILS CODEX STAN 210-1999, to validate the oil itself and evaluate its quality, the final results determined that the crops under stress conditions show better performance in terms a quantity of oil for obtaining *Chlorella vulgaris* oil 0.2342 ml / g, oil 0.2932 ml / g, oil 0.3123 ml / g for 15%, 10% and 5% respectively. For *Scenedesmus* oil was obtained 0.3397 mL / g, 0.4223 ml oil / g and oil 0.4264 ml / g for 15%, 10% and 5%

respectively. And is that based on these results it was concluded that greatly reduce the amount of nutrient salts not only increases the doubling time (slow growth) but also reduces the life of the crop.



Key Words: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, oil, sales nutritivas, Raceway, medio de cultivo

INTRODUCCION

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática, como es la falta de fuentes alternas de aceites naturales que no comprometan cultivos que son normalmente destinados al consumo humano, como es el caso de la soja, colza, palma, maíz, cáñamo, etc. y que al mismo tiempo sean alternativas basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂ es así que el aceite a partir de microalgas se pinta como una opción promisorias. (GARIBAY HERNÁNDEZ Adriana, et al. Biodiesel a Partir de Microalgas , 2009)

Las microalgas son organismos fotosintéticos capaces de asimilar energía solar y CO₂ para convertirlo en agua, O₂ y macromoléculas orgánicas tales como carbohidratos y lípidos. Algunas especies naturalmente o bajo condiciones de estrés tales como alta luz o deprivación de nutrientes acumulan cantidades significativas de lípidos como su principal fuente de almacenamiento de carbón. El contenido promedio de lípidos en microalgas varía entre 20 y 40 % del peso celular seco. (HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances), (PERALES VELA, Hugo Virgilio. et al. Growth photosynthetic and respiratory responses to sublethal copper concentrations in *Scenedesmus incrustatus*, 2007)

Aunado a lo anterior, otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta. No obstante, los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa de microalgas, entre otros. Ante estos inconvenientes, la optimización de los sistemas de cultivo de microalgas es imprescindible. (GARIBAY HERNÁNDEZ Adriana, et al. Biodiesel a Partir de Microalgas, 2009).

Las principales aplicaciones de los lípidos (ácidos grasos) de microalgas son, enriquecimiento de alimento para peces, posibilidad de uso para producción de biodiesel y fuente de ácidos grasos esenciales en la dieta humana. (GRECQUE DE MORAIS, Michelle et al. Perfil de Ácidos Grasos de microalgas cultivadas con dióxido de carbono, 2009)

El uso de microalgas para producir biocombustible ya viene siendo aplicado en varios países de Europa y América, como alternativa ecológicamente viable, debido al aumento del precio del petróleo y los problemas ambientales generados por este tipo de combustible, es por eso que cada día se vienen realizando más investigaciones sobre cómo mejorar los cultivos, producción y eficiencias en este proceso cobrando más fuerza el uso de las microalgas como una alternativa para la obtención de biodiesel. (GARIBAY HERNÁNDEZ Adriana, et al. Biodiesel a Partir de Microalgas, 2009).

El principal objetivo en este trabajo comparar el efecto del estrés por carencia de sales nutritivas en el contenido de lípidos presentes en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*.



HIPOTESIS

En vista que es conocido el gran porcentaje de aceite que poseen las microalgas en su estructura y que este aceite es usado como fuentes de reserva en casos de déficit de sales nutritivas, es entonces posible el incremento del contenido de aceite (ácidos grasos) encontrados en las microalgas "*Chlorella vulgaris*" y "*Scenedesmus dimorphus*", mediante la inducción de estrés celular, variando las concentraciones de sales nutritivas en el medio de cultivo.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto del estrés inducido por deficiencia de sales nutritivas en el sistema de cultivo Raceway AWL de las microalgas "*Chlorella vulgaris*" y "*Scenedesmus dimorphus*" para la obtención de lípidos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la cinética de crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en tres concentraciones (5%, 10%, 15%) de sales nutritivas
- Rediseñar y construir el sistema de cultivo "Raceway AWL" mejorando las condiciones de cultivo para las microalgas.
- Evaluar el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* frente a la deficiencia de sales nutritivas en el medio de cultivo en el sistema de cultivo Raceway AWL modificado en este trabajo.
- Evaluar la cantidad y calidad de aceite obtenido en la biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en tres concentraciones de sales nutritivas.
- Evaluar estadísticamente los resultados obtenidos para cada especie a diferentes concentraciones de sales nutritivas.

VARIABLES DE ESTUDIO

VARIABLES		INDICADORES
Independiente	Concentración de sales nutritivas	mg/mL
Dependientes	Cantidad de aceite	Millilitros
	Cinética de crecimiento	Células/mililitro Horas
	Microalgas (<i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus dimorphus</i>)	Presencia/Ausencia



I. CAPITULO: MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE MICROALGAS – CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS

Las algas tienen una larga historia de fósiles, algunos de ellos posiblemente extendiéndose hasta el origen de las plantas celulares Fotosintéticas, consideradas generalmente como el grupo a partir del cual se originaron plantas más complejas. Morfológicamente (forma y estructura) son plantas celulares que crecen como células individuales o agregaciones, aunque estas son relativamente indiferenciables en órganos. Sin embargo la gama de formas y color es vasta, desde células diminutas, de unos cuantos micrómetros en diámetro, hasta las grandes algas marinas del Antártico. (Krueger R. et al. 1973) La clasificación de las microalgas se muestra a continuación en la tabla N° 1-1

Normalmente o preferentemente las microalgas habitan los ambientes húmedos, en la tierra, aire, mar, lagunas, hielo y nieve. Ocupan las capas más superficiales, hasta los niveles donde hay incidencia de luz solar. Su función dentro de la naturaleza destaca por su rol de formar parte del primer eslabón dentro de la cabeza trófica. Las microalgas contienen clorofila como pigmento fotosintético, producen oxígeno como un derivado de la fotosíntesis. Cada división se caracteriza por su propia distribución de pigmento, además de la presencia de clorofila. (Krueger R. et al. 1973) Introduction to microbiology)

TABLA 1.1.
CLASIFICACIÓN DE LAS MICROALGAS. SE DESCRIBEN LAS PRINCIPALES DIVISIONES EN LAS CUALES LAS MICROALGAS HAN SIDO CLASIFICADAS DE ACUERDO A PARÁMETROS DIVERSOS TALES COMO PIGMENTACIÓN, CICLO DE VIDA, ESTRUCTURA CELULAR, ETC. (16)

Clase	Características
Chlorophyta (algas verdes)	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir ya sea como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones.
Bacillariophyta (diatomeas)	Las diatomeas predominan en aguas oceánicas, no obstante también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares.
Heterokontophyta	División constituida por una gran diversidad de clases dentro de las cuales destaca la Crysophyceae (algas doradas), conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos.
Cianobacteria	Las cianobacterias son microorganismos procariotes cuya estructura y organización son similares a las de las bacterias. Desempeñan un papel relevante en la fijación del nitrógeno atmosférico

Fuente: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Las algas acumulan grasas en condiciones de crecimiento estancado, a expensas de la síntesis de proteínas. (Aldave Augusto. 1989) Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores, como se señala en la Tabla N° 1-2. Las especies que producen más de un 30% de materias grasas se denominan 'oleaginosas'. (Garibay Adriana; et al. 2009)

La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. (Garibay Adriana; et al. 2009) (Trujillo M. 1997).

Una concentración baja en grasas señala condiciones óptimas de crecimiento de los cultivos algales. Mientras que se mantengan estas condiciones, no se hace necesario medidas para controlar este parámetro. (Aldave Augusto. 1989) (Trujillo M. 1997)

En correlación con la concentración de proteínas, los carbohidratos muestran una variación diurna natural la que se debe a su acumulación durante el día por la actividad fotosintética, mientras que durante la noche no hay fotosíntesis prevalece la formación de proteínas. (Aldave Augusto. 1989)

TABLA 1.2
CONTENIDO LIPÍDICO DE ALGUNAS MICROALGAS EXPRESADO EN BASE AL PESO SECO (%).

Especie	Proteína	Carbohidratos	Contenido de Lípidos	Ácidos Nucleicos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	2	-
<i>Spyrogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-22	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella gracilis</i>	57	32	6	-
<i>Prymnesium parvum</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrical</i>	43-56	25-30	4-7	-

Fuente: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. (GARIBAY HERNÁNDEZ Adriana, et al. Biodiesel a Partir de Microalgas .Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tijuana – Ensenada México, 2009)

1.1.1 Morfología de las microalgas

En cuanto a su morfología la célula posee paredes ligeramente rígidas y pueden también presentar láminas que cubren la parte exterior de las paredes. Los organelos que contiene pigmentos de las clorofíceas y euglenofíceas son llamados cloroplastos, un nombre que indica que su color típicamente predominante es el verde, otros organelos pigmentados de las microalgas se les conoce como cromatóforos; estas células poseen sistemas enzimáticos relacionados con la fotosíntesis. (Alexopoulos C. 1967).

Chlorella vulgaris

Chlorella apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años. Es un alga verde unicelular de agua dulce; de forma esférica, cerca de 10 a 15 micras de diámetro, cloroplasto parietal en forma de “U” con o sin pirinoide, se reproducen a través de 4-8 células hijas de protoplasto de la célula madre, dividiéndose en cuatro células cada 20 horas (Kanno Toshhiro et. al. 2005). Es cosmopolita extensamente encontrada en lagos y pantanos con abundante materia orgánica por todo el mundo. El nombre *Chlorella*

proviene del griego Chloros, que significa verde, y del latín ella, que significa cosa pequeña. (Aldave Augusto.1989) (Alexupoulos C. 1967).

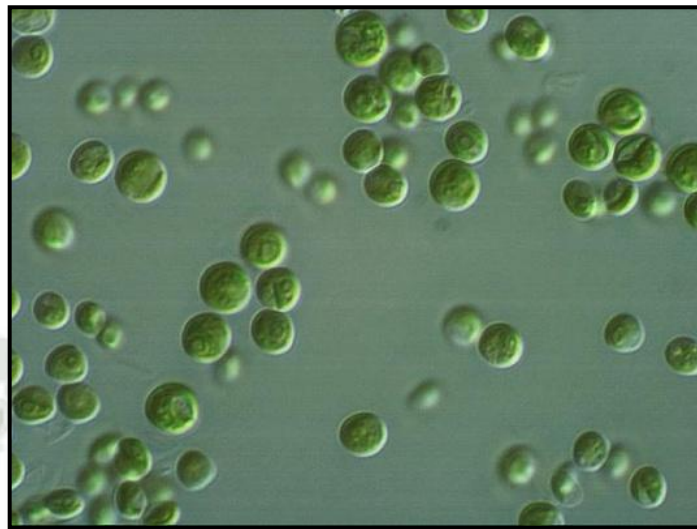


Figura N°1-1-

Vista al microscopio de *Chlorella vulgaris*.

Fuente: Seattle, Washington, USA; cement wall, 1000x, DIC. 01 Nov 2008. Karl Bruun.

TABLA 1-3
TAXONOMÍA DE *Chlorella vulgaris*

Taxonomía de <i>Chlorella vulgaris</i>
Reino: Protocista
División: Chlorophyta
Clase Chlorophyceae
Orden: Chlorococcales
Familia: Oocystaceae
Género: <i>Chlorella</i>
Especie: <i>vulgaris</i>

Fuente: Augusto Aldave Pajares, (1989) Algas

Comparada con otras plantas, *Chlorella* tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de otras plantas. (Aldave Augusto. 1989).

Scenedesmus dimorphus

Microalga chlorophyta cosmopolita forma cenobios que se disponen en una serie recta o ligeramente desplazados sobre el eje mayor, células fusiformes, cloroplasto parietal con pirenoide, diámetro celular de 4 a 15 μm . (Aldave Augusto. 1989).



Figura N°1-2

Vista microscópica de *Scenedesmus dimorphus*.

Fuente: Bainbridge Island, Washington, USA; garden watering can, 1000x,
DIC. 05 Jul 2009. Karl Bruun.

TABLA 1.4
TAXONOMÍA DE *Scenedesmus dimorphus*.

Taxonomía de <i>Scenedesmus dimorphus</i>
Reino: Plantae
División: Chlorophyta
Clase: Chlorophyceae
Orden: Chlorococcales
Familia: Scenedesmaceae
Género: Scenedesmus
Especie: Dimorphus

Fuente: NCBI Gen Bank

1.1.2 Reproducción

En muchas ocasiones la reproducción de las microalgas ocurre sin ningún cambio en su ploidía, es decir son asexuales. Los mecanismos asexuales incluyen fisión, esporulación y liberación de fragmentos nucleados en formas multicelulares. La fisión es comúnmente binaria y ocurre dentro de la pared celular parenteral, si esta se encuentra presente. En otros tipos, la pared original es descartada y cada uno de los progenitores construye una pared antes o después de liberarse de la pared de la célula madre. Los procesos sexuales no han sido reportados para algas procariotas contrariamente a lo ocurrido con las algas eucariotas. (Gonzales Annabel. 2000)

1.2 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

1.2.1 Fases de Crecimiento

Son cinco las fases de crecimiento en un cultivo típico de microalgas. En las que se definen por el número de células presentes a un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo. (Gonzales Annabel. 2000)

Fase de latencia o 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. Muchas enzimas metabólicas llegan a ser inactivas y las concentraciones de materiales celulares caen a niveles que afectan la división de la célula, antes de reanudar el crecimiento a las algas les toma un corto periodo de tiempo aclimatarse a su medio acuático. Otro factor que contribuye a la fase inicial, es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes de que la fase exponencial comience. Altas concentraciones de calcio, magnesio o fósforo pueden extender la fase de latencia. Esta fase se puede dilatar entre 1 a 3 días, dependiendo del tamaño y del estado del inóculo. (Gonzales Annabel. 2000)

Fase exponencial o desarrollo logarítmico

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 suele prolongarse por semanas (Gonzales Annabel. 2000)

Fase de declinación de la fase exponencial

La división celular es lenta cuando los nutrientes han sido consumidos y su carencia limita el crecimiento, puede durar de uno a dos días en que la edad del cultivo alcanza su valor máximo. (Gonzales Annabel. 2000)

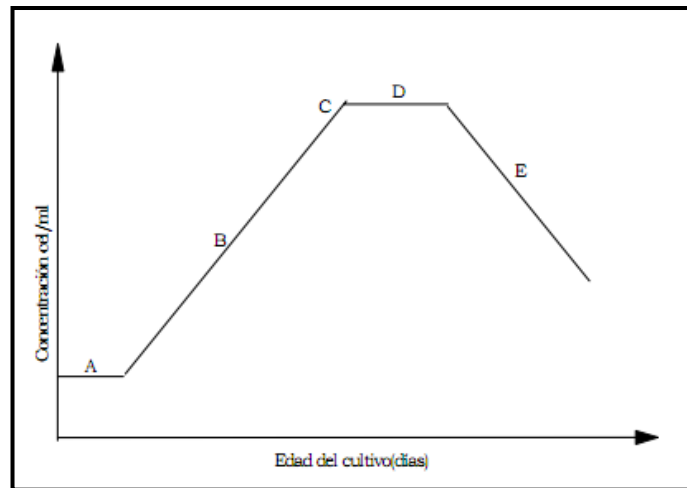


Figura N°1-3.-

Curva de crecimiento de las microalgas.

Fuente: Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica de litoral. Ecuador (1994).

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 periodo relativamente prolongado. Esta fase es muy corta en grupos de cultivos donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados. (Gonzales Annabel. 2000)

Fase de declinación o muerte

Durante esta fase las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes, la densidad celular comienza a 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 aun se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa. (Gonzales Annabel. 2000)

1.2.2 Tasa de crecimiento (μ)

La tasa de crecimiento para los cultivos de microorganismos es un valor referencial que indica la velocidad de crecimiento de nuestro cultivo y se expresa mediante la siguiente fórmula: (Band Christine J. 1997).

1.2.3 Tiempo de generación (g)

El tiempo de generación en cultivos microalgales es lapso de tiempo que demora una microalga en dividirse y se expresa a través de la siguiente fórmula: (Band Christine J. 1997).

1.2.4 Numero de generaciones (n)

El número de generaciones en cultivos microalgales es la cantidad de duplicaciones que ha tenido la microalga y se expresa empleando la siguiente fórmula: (Band Christine J. 1997).

1.2.5 Recuento poblacional

El objetivo de contar microalgas no es solamente establecer la población (densidad) de células por mililitro que hay en un recipiente, sino también determinar numéricamente el grado de división celular en un determinado tiempo. Los resultados permiten estimar en cierto modo la situación de un cultivo y relacionarlo con la curva de crecimiento de esa población algal.

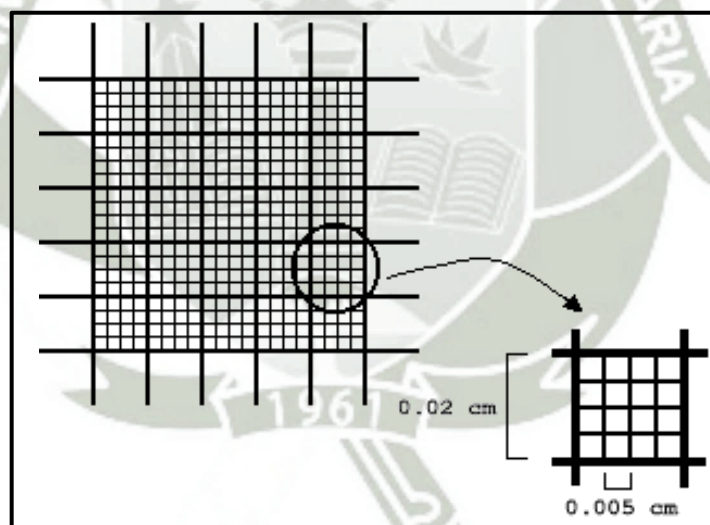


Figura N°1-4.-

Cámara de recuento Neubauer

Fuente: Microbiología, Editorial Paraninfo (1997)

El método empleado para contar algas es sencillo. Implica el uso de un dispositivo que permita el conteo como la Cámara de Neubauer. Es necesario homogenizar el cultivo y seleccionar el dispositivo indicado para

el conteo, en el que las microalgas se distribuyan adecuadamente. (Hernández Aurelio. 1997).

La cámara de Neubauer es un instrumento de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para el análisis de sangre (recuento de leucocitos, eritrocitos, trombocitos) y recuento de células en el liquor. Además las cámaras de recuento sirven para contar bacterias, espermatozoides y esporas de hongo.

Todas las cámaras de recuento muestran el mismo principio de construcción. Dentro de una rectangular placa de vidrio óptico especial del tamaño de un portaobjetos se encuentran en el tercio medio cuatro ranuras longitudinales, que son paralelas a los laterales cortos. Las dos grandes superficies laterales no están tratadas y sirven para la rotulación.

1.3 DEMANDAS DE DESARROLLO

Las microalgas necesitan ciertos elementos para lograr desarrollarse con comodidad y rapidez, la cantidad de estos nutrientes tanto como su presentación son fundamentales para su crecimiento, entre ellos tenemos:

Nitrógeno. Forma parte de un gran número de compuestos orgánicos necesarios, aminoácidos, proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos y clorofila. (Gonzales Annabel. 2000).

Fósforo. Forma parte de compuestos orgánicos importantes como la glucosa, ATP, ácido nucleicos, fosfolípidos y ciertas enzimas. (Gonzales Annabel. 2000).

Azufre. Está incorporado dentro de diversos compuestos orgánicos que incluyen aminoácidos, proteínas, coenzima A y las vitaminas Tiamina y Biotina. (Gonzales Annabel. 2000).

Magnesio. Es un elemento esencial para las algas formando parte de la molécula de clorofila y para la actividad de muchas coenzimas, incluyendo aquellos pasos importantes en la actuación del ATP, así mismo es esencial para mantenerla estructura de la ribosa (Gonzales Annabel. 2000).

Calcio. Influye en la permeabilidad de la membrana, se encuentra en las vacuolas, precipitado en las paredes de las células. Es esencial para *Scenedesmus* en mínimas concentraciones. (Gonzales Annabel. 2000)

Hierro.- Es necesario para síntesis de clorofila, es parte esencial del citocromo el cual actúa como portador de electrones para la fotosíntesis y en la respiración. (Gonzales Annabel. 2000).

Cloro.- Necesario para la fotosíntesis, donde activa enzimas para la producción de oxígeno a partir del agua se suponen otras acciones adicionales. (Gonzales Annabel. 2000).

Manganeso.- Activa una o más enzimas en la síntesis de ácidos grasos así como es la enzima responsable de la formación del ARN y ADN. Participa en la producción d oxígeno a partir del agua. (Gonzales Annabel. 2000).

Cobre.- Actúa como portador de electrones y es parte de alguna enzima. Puede formar parte en la fijación del nitrógeno. (Gonzales Annabel. 2000).

Molibdeno.- Actúa como portador de electrones en la conversión del NH_4 a NO_3 y es esencial para la fijación del nitrógeno. (Gonzales Annabel. 2000).

Carbono, Hidrogeno, Oxígeno.- Son parte de todos los compuestos orgánicos. (Gonzales Annabel. 2000). El carbono en forma de CO_2 cuenta con la siguiente solubilidad:

TABLA 1.5
TABLA DE SOLUBILIDADES EN AGUA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA (GRAMOS DE SOLUTO POR CADA 100 GR DE AGUA)

Sustancia	Temperatura (°C)				
	0	20	40	60	80
Cloruro de sodio	35.7	36.0	36.6	37.3	38.4
Dicromato de potasio	5	13.1	29.2	50.5	73.0
Bicarbonato de sodio	6.9	9.6	12.7	16.4	
Yoduro de estaño		1.0	1.4	2.1	3.0
Nitrato de plata	122	222	376	525	669
Dioxide de carbon	0.33	0.17	0.10	0.06	
Sulfato de cerio	15.9	8.7	5.6	3.9	
Dioxido de azufre	22.8	11.3	5.4		

1.4 TIPOS DE CULTIVO

El desarrollo de un método de cultivo de microalgas, depende de los requerimientos y exigencia de la calidad de los elementos mencionados en las diversas etapas en las que deben ser suministrados. Según sus exigencias, los cultivos pueden clasificarse de dos modos: (Gonzales Annabel. 2000).

1.4.1 Cultivos Intensivos

Cultivos en que los factores del crecimiento se mantienen completamente bajo control, de modo tal que obtiene una máxima respuesta. ((Gonzales Annabel. 2000).

1.4.2 Cultivos Extensivos

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

Independientemente de estas dos clasificaciones, el método empleado en el cultivo según la forma de cosecharlo, se clasifica en:

1.4.3 Cultivo Discontinuo (BATCH)

En estos cultivos la población va pasado por las distintas fases de crecimiento, ajustándose generalmente a una función logística. Estos producen cambios fisiológicos de la población a medida que transcurre el tiempo de cultivo. (Gonzales Annabel. 2000).

Estos tipos de cultivos tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y son adecuados para estudiar la cinética de crecimiento y los parámetros que inciden en el crecimiento celular. Esta supone la recogida completa del recipiente de cultivo y es la forma más simple de operar, aunque también 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. (Abalde A et. al. 1995).

1.4.4 Cultivo Continuo

Es aquel en que se mantiene la fase exponencial durante largo periodo de tiempo, así como las características químicas del medio, la temperatura y la luz, son sostenidas en un calor constante. La ventaja de estos cultivos es que muestras tomadas a distintos tiempos son idénticas. Para ellos 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. Abalde A et. al. 1995).

1.4.5 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. Se pueden mantener sistemas interiores para la producción de microalgas durante semanas utilizando métodos semicontinuos, los cultivos pueden ser cuidadosamente controlados. Abalde A et. al. 1995). Según la pureza del cultivo se clasifican en

1.4.6 Cultivo Axénico

Son cultivos donde la población se mantiene libre de bacteria. Es un tipo de cultivo delicado que requiere de un manejo cuidadoso. (Gonzales Annabel. 2000).

1.4.7 Cultivo Monoespecífico

Son cultivos en que la población de microalga se encuentra con una pequeña carga bacteriana. Esos son los que más se utilizan industrialmente debido a que es muy difícil mantener cultivos sin bacteria. En los cultivos unialgales las microalgas crecen mejor que en los axénico, ya que se produce una interacción beneficiosa entre la bacteria y las microalgas, pues la bacteria excreta vitaminas y otras sustancias al medio que pueden ser utilizadas por las microalgas. No obstante si la carga bacteriana es excesiva puede inhibir el crecimiento algal o bien hacer el cultivo no apto para su utilización (Gonzales Annabel. 2000).

1.5 PROCEDIMIENTO GENERAL EN EL CULTIVO DE LAS MICROALGAS

Para lograr cultivar las microalgas de manera eficiente, es necesario seguir una serie de etapas, una secuencia de procedimientos que de no ser tomados en cuenta o al saltar alguno de ellos, traerán consigo problemas en el momento del cultivo y desarrollo de las microalgas.

1.5.1 Aislamiento de microalgas

La aplicación de los siguientes métodos consecutivos para una colecta natural de algas microscópicas produce cultivos monoespecíficos o

axénicos. Aunque tales métodos son sencillos, la preparación de cultivos axénicos requiere de paciencia y perseverancia. (Arellano H.1994).

En el aislamiento existente varias técnicas y modificaciones a estas, pero en general se dividen en tres grandes categorías (Arellano H.1994).

- Técnica de diluciones seriadas
- Técnica de la micropipeta
- Técnica de aislamiento en agar.

Estas tres técnicas

Técnica de diluciones seriadas

Esta técnica es selectiva y se emplea para obtener a las especies predominantes y/o más competitivas de una muestra de agua, a su vez, por la misma razón se eliminan fácilmente las menos abundantes, que podrían ser consideradas de escaso interés debido a su crecimiento aparentemente inferior. (Arellano H.1994).

La técnica consiste en hacer diluciones progresivamente decrecientes de orden 1:10 a partir de la muestra original. Para este fin, se evalúa primeramente por conteo directo el número de cel/ml de la muestra de agua, haciendo diluciones sucesivas hasta lograr concentraciones teóricas de fracciones de célula en la última dilución. (Arellano H.1994).

Técnica de la micropipeta

El uso de la micropipeta permite ser selectivo en cuanto a que se aíslan las especies que uno mismo elige. Es la técnica más directa para obtener una cepa monoespecífica. Es la técnica que se utiliza para obtener cultivos clonales, o sea cultivos iniciadores con una sola célula o entidad microalgal. (Arellano H.1994).

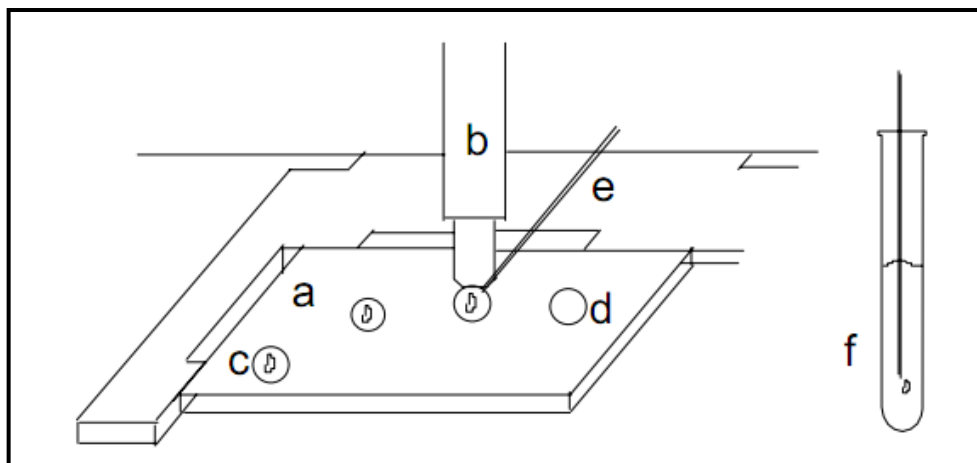


Figura N°1-5.-

Aislamiento de microalgas (técnica de la micropipeta). a: portaobjetos, b: objetivo, c: cultivo, d: medio fresco, e: micropipeta, f: microalga aislada en medio fresco y estéril.

Fuente: Folleto de Algas. Escuela Superior Politécnica de litoral. Ecuador (1994).

Cuando no se cuenta con pipetas capilares, una manera de preparar micropipetas es colocando en la flama de un mechero la parte final de la pipeta Pasteur y con la ayuda de una pinza, alargarla hasta obtener una fina pipeta capilar. Es recomendable usar la micropipeta una sola vez para cada traspaso, esto es con el objeto de evitar cualquier tipo de contaminación. (Arellano H.1994).

Técnica del agar

Algunas microalgas se aíslan más fácilmente de otro contaminante en agar, ya que solo se promueve el crecimiento de las especies que son capaces de crecer en este tipo de medios. Al utilizar modificaciones con esta técnica (rayado o rociado), se podrán obtener cultivos monoespecífico sobre todo en las partes finales (rayado) o en las zonas donde las gotitas de agua sean más pequeñas y se encuentren más dispersas (rociado). (Arellano H.1994).

Rayado paralelo en placas de agar

Esta técnica se usa cuando la muestra de agua contiene gran variedad de especies (Arellano H.1994).

1.5.2 Mantenimiento de cepas:

En esta etapa las cepas (stocks) de microalgas se mantienen en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo y/o en placas con agar. El medio de cultivo se prepara según el procedimiento descrito para cada caso y según la especie, sea ésta de mar o de agua dulce. Esta etapa tiene carácter de cultivo axénico por lo que un máximo de cuidado se debe tener para no contaminar las cepas. La intensidad de luz debe estar entre 500 y 1000 lux y la temperatura de 15 grados centígrados constante. (Arellano H.1994).

1.5.3 Cultivo Inicial:

El cultivo inicial se desarrolla en matraces de 500 ml con 250 ml de medio. La inoculación de las microalgas se realiza cuando los matraces esterilizados han alcanzado la temperatura ambiente, transfiriendo asépticamente bajo una campana de luz UV, un volumen de 1 a 5 ml de cepa al medio fresco. La boca de estos recipientes se debe flamear para evitar que microorganismos puedan ingresar al interior. Luego de la inoculación los matraces son puestos en la estantería iluminada junto a uno de los matraces viejos para observar luego de uno a dos días el crecimiento rápido del nuevo cultivo. Estos cultivos deben agitarse manualmente en forma periódica y suavemente, a fin de variar la posición de las células. La intensidad de luz debe estar entre 1500 y 2000 lux. (Arellano H.1994).

1.5.4 Cultivo intermedio:

Esta etapa se desarrolla en matraces de 1000 a 2000 ml, con medios del 60 al 65% de la capacidad total. Se transfieren los antiguos cultivos que hacen de stock (cultivo inicial) de 4 a 7 días. Esta inoculación se hace bajo el mismo esquema del caso anterior evitando que las microalgas sedimentadas pasen al nuevo medio. Se transfieren aproximadamente del 80 al 90% del volumen total. Los nuevos recipientes son agitados con aire filtrado a máximo 1 μ m. La temperatura se puede mantener a 18 grados centígrados, igual que para la etapa anterior. La intensidad de luz puede ajustarse entre 2000 y 2500 lux. (Arellano H.1994).

1.5.5 Cultivo de 10 a 20 l. (Raceway – AWL):

Los cultivos intermedios son empleados como inóculo para los recipientes de 10 a 20 litros. Tomar las precauciones del caso para prevenir la contaminación, evitando además transferir las microalgas sedimentadas de los cultivos intermedios. La intensidad luminosa se ajusta entre 2 000 y 5 000 lux. La temperatura se mantiene entre 18 y 20 grados centígrados. En cultivos batch las poblaciones microalgales alcanzan densidades mayores a los 4 millones de células por mL. Filtrar el aire como en el caso anterior. (Arellano H.1994).

1.5.6 Parámetros de Cultivo

Un cultivo tiene tres diferentes componentes: un medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado; las microalgas creciendo en el medio y aire, para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera. Los parámetros más importantes según Barsanti *et al.*, 2006 que regulan el crecimiento de las microalgas son, cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura. (Gonzales Annabel. 2000)

Temperatura

Es un factor fundamental para el crecimiento de las microalgas. La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental, ya que la temperatura celular es igual a la temperatura del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio como el pH. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, si bien dentro de los rangos óptimos tiene poca influencia sobre la concentración final de biomasa, existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentado la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura, dentro de un rango determinado, por encima del cual el crecimiento disminuye, a veces bruscamente, hasta llegar a cero si continúa el aumento de la temperatura. La mayoría de las microalgas tienen una curva de respuesta del crecimiento a la temperatura con una amplia meseta, y un rápido descenso después del óptimo con pronunciados efectos inhibitorios para

temperaturas que superan el óptimo en sólo a 2 o 3 °C. (Abalde A. et al. 1995), (Gonzales Annabel. 2000)

La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies. (Kanno Toshihiro et. al. 2005)

Luz

Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones Fotosintéticas en las microalgas. Aquí, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados. (Gonzales Annabel. 2000).

❖ Intensidad

Se necesita de una cierta intensidad de luz para que se realice la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie. Después de lo cual la intensidad se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, del crecimiento. Una célula que se encuentre en condiciones limitantes de luz crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de la energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La adaptación a bajas intensidades implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula. Aunque las células adaptadas a intensidades son más eficientes para absorber la energía luminosa, el rendimiento del quantum permanece constante, lo cual sugiere que no pueden utilizar la luz absorbida con mayor eficiencia. Si la intensidad de la luz es alta, existe suficiente luz, el crecimiento celular es entonces limitado por la tasa de fijación del carbono, que a su vez depende del metabolismo de la célula. Así las células expuestas a intensidades altas de luz utilizan menos recursos propios para la síntesis de clorofila y más para la carboxilasa y quizás otra enzima de las reacciones oscuras. (Gonzales Annabel. 2000).

❖ **Fotoinhibición**

Las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición. La fotoinhibición o fotoinactivación puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz, implicando la fotodestrucción de pigmentos fotosíntesis. Esto se manifiesta como un “bleaching” de pigmentos dependiente del oxígeno y de la luz, la que a intensidades elevadas de luz tiene efectos letales sobre las células y puede producir la pérdida total de un cultivo. La fotoinhibición depende de la intensidad y calidad (longitud de onda) de la luz, así como el tiempo de exposición, siendo más pronunciada con exposiciones prolongadas a intensidades altas de luz. Los efectos dañinos de la iluminación pueden ser intensificados por otros factores, como deficiencia de nutrientes o temperaturas extremas. (Gonzales Annabel. 2000).

❖ **Fotoperiodo**

En condiciones normales las microalgas están sometidas a periodos de luz/oscuridad y esta alternativa generalmente se utiliza en su cultivo.

Los periodos de luz/oscuridad se ajustan para el cultivo de cada especie en particular, la introducción de un ciclo celular es un importante adelanto ya que el ciclo día-noche es quizás el factor cíclico ambiental más importante en la mayoría de los sistemas. (Gonzales Annabel. 2000).

❖ **Longitud de onda**

En cuanto a la calidad de luz (longitud de onda) se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos, y puede afectar también a la composición bioquímica ya que la composición espectral de la luz afecta a la incorporación de fósforo. (Gonzales Annabel. 2000).

❖ **Fuentes de luz**

Cuando los demás factores están dentro de límites razonables, la disponibilidad de luz es un factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos, de ahí la importancia de la fuente de luz para el cultivo. La luz utilizada para el cultivo de microalgas puede ser artificial o luz natural. (Gonzales Annabel. 2000).

✓ **Natural**

Tiene la ventaja de no suponer un gasto energético, pero tiene los inconvenientes de que no se puede controlar ni el fotoperiodo ni la intensidad; asimismo, se producen variaciones diarias, estacionales, en función del tiempo atmosférico, etc. (Gonzales Annabel. 2000).

✓ **Artificial**

La luz artificial tiene espectro de emisión que no es necesariamente idéntica a la luz del sol y la calidad de luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalga, por lo que hay que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar. Las lámparas fluorescentes tubulares son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Éstas dan menos calor que otros tipos de luz artificial y son igualmente eficientes en promover tasas de división y crecimiento máximos. (Gonzales Annabel. 2000).

pH

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas no son libremente permeables a los iones hidrogeno e hidroxilo, por lo tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana. (Gonzales Annabel. 2000).

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Independientemente cada microalga presente un pH óptimo para su crecimiento, un descenso suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta cierto límite. (Gonzales Annabel. 2000).

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO_2 y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) e influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas. Tiene un efecto marcado en la solubilidad de varios compuestos metabólicos, de modo que, un aumento de pH puede llegar a ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza. La

asimilación de nitrato y amonio está estrechamente relacionada con el pH del medio, dado que la absorción de nitrógeno cambia el pH ya que la asimilación del nitrato tiende a aumentar el pH. ((Gonzales Annabel. 2000).

El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo. (Kanno Toshihiro et. al. 2005)

Aireación

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las microalgas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. (Kanno Toshihiro et. al. 2005)

Una agitación adecuada del cultivo permite un movimiento rápido de las células desde la zona iluminada (zona fótica) a la zona profunda oscura del tanque de cultivo, y de vuelta a la zona iluminada, lo que produce un patrón dinámico de luz-oscuridad para las células individuales. El continuo cambio entre las fases de oscuridad y luz, representa uno de los requerimientos más básicos para una elevada productividad de biomasa. (Gonzales Annabel. 2000)

Otra razón para mantener la agitación se relaciona con las gradientes gaseosas que se forman alrededor de las células microalgales en el curso de su actividad metabólica. Estas gradientes imponen restricciones a la tasa de crecimiento de un cultivo. Una alta densidad de células fotosintéticamente activas provocan concentraciones extremadamente altas de oxígeno disuelto, durante las horas de fotosíntesis máxima y en condiciones de estancamiento, es muy común que se produzca una supersaturación de oxígeno por encima del 400%. (Gonzales Annabel. 2000)

Tamaño de inóculo y densidad de población optima

La concentración óptima o tamaño del inóculo, juega un papel importante en posterior desarrollo del cultivo. Concentraciones demasiado bajas puede perderse por fotooxidación u otras causa, mientras que si son demasiados altas se producen pérdidas debido a la respiración o a una ineficiente utilización de la energía lumínica. El inóculo inicial debe estar

constituido por células de una sola especie en buen estado con una densidad mayor a los 3×10^7 cel/mL. La calidad del inóculo debe comprobarse en cada paso de las distintas escalas de cultivo. (Gonzales Annabel. 2000).



1.6 MEDIOS DE CULTIVO

Un cultivo puede ser definido como un ambiente artificial en el que las microalgas crecen. En teoría las condiciones del cultivo deben semejarse al ambiente natural de la microalga; en la realidad existen diferencias significativas. La imposición de un ambiente artificial en una población celular que sobrevivió anteriormente bajo condiciones complejas y fluctuantes, siguiendo un ciclo de vida estacional, causa inevitablemente un periodo de adaptación fisiológica o de selección, en el que el crecimiento de la población puede no ocurrir o es muy lento. (Kanno, Toshihiro et. al. 2005)

Uno de los obstáculos en la producción industrial de microalgas es la formulación y preparación de un medio de cultivo, química y económicamente apropiado. Los medios de cultivo utilizados para microalgas se pueden agrupar en tres categorías: medios completamente sintéticos, medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplemento mineral y utilización de residuos o aguas residuales. Los medios de cultivo sintéticos pueden ser comerciales o prepararse en el laboratorio es conveniente que sean fáciles de hacer o reconstituir en el laboratorio y fáciles de conservar. El enriquecimiento del agua dulce o el agua de mar natural con diferentes nutrientes químicos aumenta enormemente el crecimiento y las tasas de división celular en los cultivos microalgales estos tipos de medio pueden ser reproducidos exactamente en cualquier momento a causa de que las formulas químicas de sus constituyentes son conocidas exactamente, siendo adecuadas para el crecimiento específico de ciertos microorganismos. (Gonzales Annabel. 2000).

1.6.1 Medio Hidropónico

Una de las características de las soluciones hidropónicas es que permiten una nutrición balanceada y completa de las plantas, alcanzándose una alta eficiencia en el uso del agua y nutrientes. Los medios de cultivo hidropónico sirven eficientemente para plantas superiores, probablemente, cumplan la misma función en los cultivos de algas (vegetales inferiores). Al respecto no existe bibliografía sobre el tema. (Contreras Carmen. 1998)

En la actualidad se comercializa una solución hidropónica, elaborada en la Universidad Nacional Agraria La Molina, la misma que tiene altos rendimientos en la producción de hortalizas, hecho que ha conllevado a que los horticultores la utilicen con mayor frecuencia. Anexo 4

1.7 SISTEMA DE CULTIVO

La construcción de un sistema de producción de microalgas está enfocada principalmente a establecer un sistema de alto rendimiento y la necesidad comercial de minimizar costos. (Barra Ronny. et al. 2008).

La eficiencia de un sistema de cultivo microalgal depende de la capacidad del sistema para utilizar la energía disponible de luz, sin que se produzca una sobresaturación de luz, causando la fotoinhibición, definiéndose ésta como la pérdida de la capacidad fotosintética provocando el blanqueamiento y la muerte celular. Cuando los cultivos pasan del laboratorio a los sistemas de producción exteriores poseen baja densidad poblacional y baja densidad óptica, por lo que necesitan sombreado para evitar la fotólisis. La idea es que la energía de luz recibida sea utilizada en la fotosíntesis y no como energía calorífica. Por otra parte la exposición prolongada a altas densidades de luz puede provocar la muerte fotooxidativa, donde aparece en el cultivo exceso de espuma, el alga se blanquea y el agua se torna amarillenta. Otro problema que se presenta es la pérdida de agua por evaporación, en sistemas abiertos ésta pérdida es más significativa que en un sistema cerrado. (Barra Ronny. et al. 2008).

1.7.1 Sistemas Raceway

Los sistemas INTENSIVOS en acuicultura son ampliamente conocidos y consisten principalmente en el cultivo de peces con utilización de un alto flujo abierto de agua cuyo objeto abarca dos propósitos: a) proporcionar oxígeno a los peces, elemento indispensable para su vida y bienestar y b) retirar los productos de desechos del metabolismo de los animales, para que no se acumulen en el propio cultivo, ni en sus alrededores.

Estos sistemas pueden utilizar cerramientos como tanques, ciertos raceways, silos y todos aquellos sistemas donde el agua sea reutilizada.

Los cultivos en “raceways” (estanques alargados y estrechos construidos generalmente en cemento) fueron y siguen siendo empleados en muchos países (incluido Argentina) para la producción de truchas, constituyendo sistemas abiertos. El volumen de agua requerido para trabajar en sistema intensivo es muy elevado, con recambios de agua de aproximadamente tres veces por hora para el mantenimiento de la calidad de agua, con producciones cercanas a los 10-15 kg/m³.

En muchos países, el acceso al agua de abastecimiento para este tipo de cultivo, ha sido regulado actualmente, por lo que muchos inversores han

decidido apostar a los cultivos de recirculación, o sea con re-utilización del agua; cambiándose aproximadamente, solo un 10% diario de la misma. Este recambio sirve a los efectos de suplir la evaporación, lavado y purgado de los desechos sólidos.

Este sistema está parcialmente constituido por un canal, donde el cultivo microalgal circula dentro de un flujo turbulento generado por rueda de paletas o por burbujeo de aire. Un flujo turbulento es un requerimiento esencial para una alta producción de masa de microalgas, la turbulencia es necesaria para asegurar una buena mezcla y así prevenir la decantación de microalgas, promover las velocidades de transferencia de masa o consumo de nutrientes y lo más importante para asegurar que cada célula del cultivo sea expuesta a la luz absorbida en las capas superiores. (Barra Ronny. et al. 2008). En unidades de cultivo horizontales, los mecanismos más utilizados para promover la turbulencia en la actualidad son las ruedas de paletas, bombas y hélices. (Barra Ronny. et al. 2008).

Las principales características de este sistema son:

- Buena distribución de la concentración de las microalgas en el cultivo.
- Construcción relativamente simple
- Costo operacional energético relativamente bajo.
- Facilidad sobre el control de las variables (temperatura, luminosidad).

1.8 INDUCCION DEL ESTRÉS

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección. Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores

Algunos de los parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son: la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y sobre todo, la productividad de lípidos. Este último parámetro determina el costo del proceso de cultivo, mientras que la concentración de la biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de los procesos de extracción y transformación.

Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células. Desafortunadamente esta situación ideal es muy difícil de encontrar en la práctica, dado que las células con alto contenido de lípidos son producidas bajo condiciones de estrés fisiológico, el cual está asociado a condiciones limitantes de nutrientes y por lo tanto, de baja productividad de biomasa y de lípidos. (Loera Maribel. 2010)

1.9 SEPARACION Y COSECHA

La separación de las algas del medio de cultivo corresponde a uno de los factores más críticos del proceso, tanto por la dificultad que implica el manejo de un producto con tamaño medido en micras (entre 3 y 30 μm), como las implicaciones que significa el manejo ambiental de las aguas residuales que el costo de la cosecha contribuye de una manera muy importante (del 20 al 40%), al costo total de producción de la biomasa y la inclusión de nuevos elementos a la ecuación como corresponden a los agentes floculantes obliga a buscar eficiencias que permitan compensar el costo y el efecto residual de estos productos en la muestra. (Barajas A. et al. 2008)

Los métodos más comunes de cosecha de la biomasa algal incluyen centrifugación (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares), filtración cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente grandes o filamentosas y en algunos casos, sedimentación por gravedad, flotación o técnicas de electroforesis. Sin embargo, la centrifugación es el proceso más costoso y generalmente se aplica sólo cuando se recuperan metabolitos de alto valor agregado. En consideración a que la mayoría de las microalgas oleaginosas son pequeñas o no filamentosas, la filtración no es un método fácilmente aplicable a la producción de biodiesel a partir de microalgas. En contraste, en la actualidad, la floculación con ciertas modificaciones a la floculación tradicional que utiliza sales metálicas que contaminan la biomasa, está siendo investigada por diversos grupos de investigación. La recuperación de biomasa microbiana por floculación, se basa en el hecho de que la superficie de todas las bacterias, cianobacterias y microalgas están cargadas negativamente debido a la presencia de polisacáridos extracelulares. (Loera Maribel. 2010)

1.10 EXTRACCIÓN DE ACEITE

El alga seca retiene sus aceites que pueden extraerse mediante prensado (70 a 75%) y en combinación con solventes como hexano, benceno o éter. (Loera Maribel. 2010)

Este proceso se puede realizar con o sin rompimiento celular previo. El rompimiento celular puede llevarse a cabo por métodos tradicionales como el uso de la “prensa francesa” que utiliza altas presiones o por un método más moderno que es la electroporación, en el cual se aplica un campo eléctrico a las células para lograr perforaciones en su pared celular. La extracción de los lípidos se puede realizar con solventes químicos en una o dos etapas es importante mencionar que la extracción con solventes no es amigable con el ambiente, especialmente por las emisiones a la atmósfera y por la disposición final del mismo. La separación de aceite y ciclo-hexano se efectúa mediante destilación. Con la combinación de estos dos procesos (prensado y solventes) es posible obtener alrededor de 90% del aceite contenido en algas. (Loera Maribel. 2010)

1.10.1 Caracterización del Aceite

La caracterización de lípidos se realizó para evaluar la calidad del aceite obtenido, los análisis se basaron en el CODEX PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS (CODES STAN 210 – 1999), esta norma se empleará para estandarizar los valores en cuanto a las características fisicoquímicas que debe poseer un aceite vegetal.

Según el CODEX establece los siguientes análisis para determinar la calidad de un aceite:

TABLA 1.6
ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE ACEITE SEGÚN CODEX 210

Método de análisis y muestra	Referencia
Determinación de la materia volátil a 105°C	De conformidad con UIQPA: 2.601 o ISO 662:1998
Determinación de las impurezas insolubles	De conformidad con UIQPA 2.604 o ISO 663:2000.
Determinación del contenido de jabón	De conformidad con BS 684 Sección 2.5.
Determinación del contenido de cobre y de hierro	De conformidad con ISO 8294: 1994, UIQPA: 2.631 o AOAC 990.05 o AOCS Ca 18b-91.
Determinación de la densidad relativa	De conformidad con: UIQPA 2.101, con el factor de conversión apropiado.
Determinación de la densidad aparente	De conformidad con ISO 6883: 2000, con el factor de conversión apropiado o AOCS Cc 10c-95.
Determinación del índice de refracción	De conformidad con UIQPA 2.102 o ISO 6320: 2000 o AOCS Ce 7-25.
Determinación del índice de saponificación (IS)	De conformidad con UIQPA 2.202 o ISO 3657: 1988.
Determinación del índice de yodo (IY)	Wijs - de conformidad con UIQPA 2.205/1, ISO 3961: 1996, AOAC 993.20, o AOCS Cd 1d-92 (97), o por cálculo - de conformidad con AOCS Cd 1b-1987 (97). En la norma se establece el método que debe aplicarse para aceites vegetales especificados.
Determinación de la materia insaponificable	De conformidad con UIQPA 2.401 (parte 1-5) o ISO 3596: 2000 o ISO 18609:2000.
Determinación del índice de peróxido (IP)	De conformidad con UIQPA 2.501 (según lo enmendado), AOCS Cd 8b-90 (97) o ISO 3961: 1998.
Determinación del contenido total de carotenoides	De conformidad con BS 684 Sección 2.20.
Determinación de la acidez	De conformidad con UIQPA 2.201 o ISO 660:1996 o AOCS Cd 3d-63.
Determinación del contenido de esteroides	De conformidad con ISO 12228: 1999 o UIQPA 2.403
Determinación del contenido de tocoferoles	De conformidad con UIQPA 2.432 o ISO 9936: 1997 o AOCS Ce 8-89.
Ensayo de Halphen	De conformidad con AOCS Cb 1-25 (97).
Índice de Crismer	De conformidad con AOCS Cb 4-35 (97) y AOCS Ca 5a-40 (97).
Ensayo de Baudouin (Ensayo de Villavecchia modificado o ensayo del aceite de sésamo)	De conformidad con AOCS Cb 2-40 (97).
Índice de Reichert e Índice de Polenske	De conformidad con UIQPA 2.204.

Los análisis considerados para evaluar la calidad de nuestro aceite fueron los siguientes:

Peso específico.

El peso específico es un valor que nos indica la relación de peso (gr) que existe entre el aceite analizado y el agua.

Índice de refracción

El índice de refracción de un aceite se define como la razón de la velocidad de la luz en el vacío con respecto a la velocidad de la luz en el aceite evaluado. Por razones prácticas, normalmente los instrumentos comparan

con la velocidad de la luz en el aire en lugar del vacío. El índice de refracción es característico dentro de ciertos límites para cada aceite por lo que es un indicador de pureza del aceite.

Este valor está relacionado con el grado de saturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces y puede estar influenciado por el daño que sufre el aceite tras la oxidación.

Índice de saponificación:

El análisis del índice de saponificación es uno de los procedimientos fundamentales para lograr determinar la calidad de la grasa que se obtiene

Índice de Yodo. (Método de Wijs)

El índice de yodo representa la cantidad de insaturaciones que presenta nuestro aceite, mientras mayor sea el resultado, el aceite tendrá mayor cantidad de ácidos grasos insaturados o poliinsaturados,

Índice de Peróxido

Este parámetro indica en que extensión ha experimentado el aceite la rancidez oxidativa.

Los resultados obtenidos de las pruebas anteriormente desarrolladas, nos indican que el aceite de microalgas obtenido presenta un bajo índice de saponificación, valor que es muy útil en el momento de la refinación del aceite o para una neutralización posterior, un bajo índice de saponificación indicaría que el aceite es de buena calidad. De la misma forma y confirmando lo anteriormente dicho sobre el índice de saponificación, el índice de Yodo obtenido indica que el aceite posee un número moderado de ácidos grasos insaturados, el cual es un dato importante al momento de calificar un aceite. Se considera que un aceite es de mejor calidad cuando posee mayor cantidad de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados.

Los valores obtenidos en el análisis del Índice de Peróxido nos revelan que el aceite obtenido no posee una muy buena resistencia a la oxidación, esto se debe a la cantidad de ácidos grasos insaturados que posee, por lo que debe tener un buen cuidado al almacenarse para evitar su oxidación. Por otro lado, las pruebas realizadas dan como conclusión que el aceite de microalgas obtenido es de buena calidad, fácilmente aprovechable para la conversión a biodiesel.

1.10.2 Aplicaciones del Aceite de Microalgas

Las aplicaciones productivas y comerciales de las microalgas son tan diversas como numerosas son las especies que integran este grupo de organismos. Sus usos van desde la producción de alimentos para consumo humano hasta la producción de hidrógeno con aplicaciones energéticas.

En momentos en que las empresas de alimentos y productos de consumo enfrentan problemas para obtener aceite de palma sin dañar el medio ambiente, se está apostando por una alternativa prometedora el aceite de microalgas.

Esta innovación se produce en momentos en que grandes empresas de alimentos se encuentran bajo presión por parte de defensores del medio ambiente para poner un límite al uso de aceite de palma, cuya cosecha ha ocasionado deforestación en Indonesia y Malasia, y dañado el hábitat de orangutanes. Usar aceite de algas en cremas o alimentos podría ayudar a las empresas alimentarias a elevar su reputación “verde” y reducir al mismo tiempo su exposición a mercados volátiles de diseño y desarrollo e técnicas de cultivo a gran escala para la producción de microalgas destinadas a consumo en alimentación humana y para la elaboración de piensos animales, así como la elaboración de dietas para acuicultura, ya que estos microorganismos son esenciales en las primeras fases de desarrollo de la mayoría de especies que se crían con esta técnica.

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el uso de los cultivos de alto contenido oleaginoso no ha sido estudiado exhaustivamente.

II. CAPITULO: MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Lugar de ejecución

La fase experimental del siguiente trabajo fue realizada en los laboratorios 302 y 303 del pabellón H de la Universidad Católica de Santa María.

2.1.2 Material Biológico

- Muestra de la poza de Oxidación del distrito de “La Joya”.
- Microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*

2.1.3 Materiales y equipos de laboratorio

Material de vidrio

- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mL.
- Beakers de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL.
- Cámara de Neubauer.
- Láminas porta y cubre objetos.

Equipos

- Agitador Magnético JENWAY Model 1000.
- pH-metro JENWAY Model 3510.
- Termómetro digital JENWAY MODEL 3510.
- Termómetro ambiental BOHECO.
- Baño Termostato VICKING MODELO MASSON.
- Estufa P. SELECTA.
- Incubadora P. SELECTA.
- Autoclave TUTTNAVER 1730 M.
- Microscopio BELTEC SCIENTIFICA BK 3200
- Balanza analítica ADVENTURER OHVS

- Centrífuga KPLC series.
- Equipo RACEWAY AWL modificado.

Medios de cultivo y reactivos

- Medio de cultivo Hidropónico “La Molina”.
- Medio de cultivo para microalgas (agar).
- Cloroformo.
- Sulfato de aluminio.
- Dióxido de Carbono.
- Hexano.
- Agua destilada.

2.2 METODOS

2.2.1 Muestreo y Aislamiento de Cepas

Muestreo

La muestra fue tomada de una laguna de oxidación ubicada en el distrito de La Joya – Arequipa. Lo más importante fue tratar que la muestra de agua sea homogénea, representativa y por sobre todo que en la extracción no se modifiquen las propiedades del agua a analizar. Al tratarse de una fuente de agua estancada se sostuvo el envase por el fondo, a una profundidad de por lo menos 20 cm, con la boca hacia arriba, y ligeramente inclinado, apuntando hacia la corriente. Se tomaron aproximadamente 100 ml en envases de vidrio (borosilicato), se emplearon envases estériles y se enjuagaron varias veces con el agua a analizar procurando que la tapa no permita la salida del líquido, ni tampoco la entrada de elementos contaminantes. (Gonzales Benito et al. 2006)

Aislamiento de cepas

Para lograr aislar las cepas utilizadas, se emplearon tres técnicas de aislamiento consecutivas iniciando por:

❖ Diluciones seriadas

- El procedimiento para diluir la muestra se llevó a cabo homogenizando la muestra de agua y de aquí se tomó 1 ml para inocularlo en uno de los tubos que contenía 9 ml de medio, obteniendo así la dilución 1:10.
- Se utilizó esta dilución y se traspasó 1 ml a otro tubo para obtener la dilución 1:100.
- Se repitió sucesivamente la misma técnica para obtener diluciones 1:1.000 y 1:10.000. Este último tubo se subdividió en 10 tubos finales, inoculando 1 ml en cada tubo, en este caso se obtuvieron 10 tubos con una dilución de orden 1:100.000.
- Una vez obtenidas las diluciones, se procedió a realizar dos técnicas de aislamiento para comprar la efectividad de cada una, estas son:

❖ Pipeteo capilar

- Se empleó la tapa de una placa Petri invertida como área para aislamiento:
- Se colocaron de 10 a 15 gotas de una colección natural en el centro de la tapa invertida.
- Se colocaron 8 gotas de solución hidropónica adecuada en 8 posiciones rodeando la colección natural.
- Se marcó primero con número la posición de cada gota por la cara interior de la tapa.
- Usando una pipeta Pasteur nueva estirada y estéril, se transfirieron las microalgas deseadas de las diluciones anteriores a la gota número 1 del medio de cultivo.
- Se transfirió una cantidad menor de microalgas desde la gota número 1 hasta la gota número 2.

- Se repitió este proceso de transferencia con el resto de las gotas del medio de cultivo hasta asegurarse que una mínima unidad microalgal requerida éste presente en una gota.
- Se transfirió esta cantidad de microalgas a tubos de ensayos que contenían el medio de cultivo esterilizado.
- Se colocaron los tubos bajo condiciones favorables para crecimiento.

❖ **Rayado en agar**

- Se prepararon placas Petri (vidrio) de 100 x 15 mm, conteniendo fitagel al 2%.
- Se colocaron dos gotas de las diluciones cerca de la periferia en el medio solidificado.
- Con el asa de kolle (punta esterilizada sumergida en alcohol y quemada), bajo criterio de asepsia, se rayó en paralelo la muestra formando pequeñas estrías.
- Se cubrió la placa, se invirtió e incubó de 4 a 8 días bajo adecuada condición de crecimiento.
- Pasado este tiempo se observó directamente en el estereoscopio el rayado y se seleccionaron las colonias deseadas que se encontraban libres de otros organismos.
- Se removieron las colonias seleccionadas usando una pipeta Pasteur estirada estéril o el asa de platino y fueron colocadas en una gota de medio de cultivo estéril sobre un cubreobjeto.
- En un microscopio compuesto se observaron las unidades de microalgas deseadas y que pertenecían a la misma especie.
- El procedimiento de rayado se repitió de una sola zona, se constató y nuevamente se incubó para que se formen las colonias. Este segundo rayado reduce la contaminación por bacterias y asegura agrupaciones de unidades algales de la misma especie.
- Se transfirieron las unidades microalgales de una colonia a un medio líquido (tubo de ensayo) o solidificado.

2.3 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo a utilizar fue un medio hidropónico, elegido por su bajo costo y su buena eficiencia. Se determinó la concentración óptima mediante una serie de

pruebas a distintas concentraciones (50%, 25%, 15%, 5%). Para ello se preparó 5 ml de medio por cada concentración y se agregó 1 ml de inóculo por cada especie. Se realizó el conteo diario en cámara de Neubauer para analizar la cinética de crecimiento en cada concentración y así determinar cuál de ellas es la óptima para el crecimiento de las microalgas. (Contreras Carmen. 1998)

2.4 PREPACION DEL MEDIO HIDROPONICO

La solución hidropónica fue adquirida de la Universidad Nacional Agraria La Molina, el kit incluyó dos frascos, el frasco A de macronutrientes (1 L.) y el frasco B de micronutrientes (0.4 L.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante para la elaboración de 1 L. de medio se debieron tomar 5 ml del frasco A y 2 ml del frasco B. Para la preparación de las diferentes concentraciones deseadas se realizaron los cálculos necesarios como se muestra en el anexo 5.

2.5 CULTIVO DE MICROALGAS

2.5.1 Mantenimiento de Cepas

El mantenimiento de las cepas se realizó en botellas de plástico transparentes de 500 ml de capacidad. Se tomaron 2 ml del cultivo a concentración óptima de medio hidropónico, conteniendo las microalgas en fase exponencial a una concentración de 6×10^7 cel/ml como inóculo y se traspasó a 20 ml del mismo medio. (Uribe, E. 1994) Para realizar la cinética de crecimiento de las microalgas se utilizó una cámara de Neubauer, un microscopio óptico (100x) y una pipeta Pasteur. Se hicieron conteos diarios en microscopio óptico a 40X para determinar la densidad poblacional y evaluar su crecimiento. El cultivo se mantuvo bajo condiciones naturales (luz solar y Fotoperiodos), se agitó periódicamente para evitar la sedimentación y fomentar el intercambio de gases. (Arellano A. Álvarez. 1994)

Esta etapa tiene una duración de 6 días para luego pasar al cultivo inicial. La cinética de crecimiento fue determinada por las siguientes ecuaciones:

Tasa de crecimiento

Para su cálculo se empleo la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{C_f}{C_o}\right)}{t_1 - t_2}$$

Ecuación 1.

Dónde:

μ = Tasa de Crecimiento (hrs⁻¹).

C_f = Concentración final (cel/ml).

C_o = Concentración inicial (cel/ml).

t_1 = Tiempo inicial (hrs).

t_2 = Tiempo final (hrs).

Tiempo de generación (g)

Para su cálculo se emplea la siguiente fórmula:

$$g = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Ecuación 2.

Dónde:

g = Tiempo de generación (hrs).

μ = Tasa de crecimiento (hrs⁻¹).

Numero de generaciones

Para su cálculo se emplea la siguiente fórmula:

$$n = \frac{t}{g}$$

Ecuación 3.

Dónde:

n = Número de generaciones.

t = Tiempo (hrs).

g = Tiempo de generación (hrs).

Recuento Poblacional

La ecuación empleada fue la siguiente:

$$\frac{\text{Numero total de microorganismos}}{\text{ml}} = \frac{\text{microalgas contadas} \times \frac{1}{\text{dilucion}}}{\text{Numero de cuadrados contados} \times \text{Volumen del cuadrado}}$$

Ecuación 4.

2.5.2 Cultivo inicial

El cultivo inicial se desarrolló en matraces de 500 ml de capacidad, se adicionaron 20 ml tomados del cultivo anterior a una concentración de $3,0 \times 10^7$ cel/ml en un volumen de 250 ml del mismo medio. Se realizaron conteos para ambas especies en la cámara de Neubauer para obtener la cinética de crecimiento de cada especie. El cultivo se mantuvo bajo condiciones naturales (luz solar y Fotoperiodos) y agitación periódica, controlando el pH en un rango de 7.5 y 8 utilizando para ello el pH-metro y regulándolo con carbonato de sodio. (Arellano Álvarez. 1994) (Uribe E. 1994). El cultivo inicial tiene una duración de 6 días, para luego pasar a la etapa del cultivo intermedio.

2.5.3 Cultivo Intermedio

El cultivo intermedio se llevó a cabo en matraces de vidrio de 1000 ml de capacidad. Se adicionaron 200 ml del cultivo inicial a una concentración de 9.3×10^7 cel/ml en un volumen de 800 ml del mismo medio. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para ambas especies y así obtener la cinética de crecimiento de cada. A partir de esta etapa el cultivo se tuvo bajo condiciones controladas. (Abalde et. al. 1995); (Arellano Álvarez. 1994)

- La intensidad luminosa se mantuvo en un rango de 2000 a 2500 lux para lo cual se utilizó un fluorescente de 25 watts, la intensidad luminosa fue monitoreada mediante un luxómetro.
- Se programaron Fotoperiodos de 18 horas de luz frente a 6 horas de oscuridad, para lo cual se utilizó un temporizador Panasonic que reguló los Fotoperiodos.
- El pH se mantuvo en un rango de 7.5 a 8 mediante la inyección de CO_2 que detiene el aumento del pH ocasionado por el metabolismo de las microalgas, los valores de pH fueron monitoreados con el pH-metro.

- Se monitoreo la temperatura utilizando un termómetro, y se mantuvo entre un rango de 16 a 18 °C.
- La agitación y aireación se realizó por medio de bombas de pecera HP-200 de dos salidas cada bomba, las cuales proporcionaban la cantidad de aire y la turbulencia necesaria en el medio para evitar la sedimentación de las microalgas.

2.6 CULTIVO EN SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO.

Se realizaron modificaciones al sistema de cultivo “Raceway” tradicional debido al volumen del cultivo y la agitación requerida. El sistema de cultivo Raceway AWL modificado tiene una capacidad útil de trabajo de 10 L en los cuales se inocularon 700 ml tomados del cultivo intermedio con una densidad celular de 1.25×10^8 cel/ml.

Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para obtener la cinética de crecimiento de cada especie. Las condiciones del cultivo fueron las siguientes:

- La intensidad luminosa se mantuvo en un rango de 4000 a 5000 lux para lo cual se utilizaron dos fluorescente de 25 watts, la intensidad luminosa fue monitoreada mediante un luxómetro.
- Se programaron fotoperiodos de 18 horas de luz frente a 6 horas de oscuridad, para lo cual se utilizó un temporizador Panasonic que reguló los fotoperiodos.
- El pH se mantuvo en un rango de 7.5 a 8 mediante la inyección de CO₂ que detiene el aumento de pH ocasionado por el metabolismo de las microalgas, los valores de pH fueron monitoreados con un pH-metro JENWAY Model 3510. La inyección de CO₂ fue a través de mangueras tipo ligadura a las cuales se les hizo agujeros para inyectar el CO₂ por burbujeo.
- La temperatura se mantuvo de 18 a 20 °C mediante un termostato y fue monitoreada utilizando un termómetro.
- La agitación y aireación utilizó 3 bombas de pecera HP-200 por cada sistema de cultivo, las cuales suministraron el aire mediante los conductos establecidos para la agitación.

2.7 REDISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO

El sistema de cultivo Raceway AWL tradicional fue rediseñado con el fin de proveer condiciones más favorables para las especies empleadas. Tales como la reducción del número de canales para incrementar la velocidad del flujo en el cultivo, la aplicación de agitación neumática debido al material del sistema y el remplazo de la luz natural por artificial para tener un mayor control de la intensidad luminosa aportada

En la tabla 2-1 se mencionan las modificaciones que se llevaron a cabo en el sistema Raceway AWL para adaptar y mejorar las condiciones de este equipo a una escala de laboratorio, así como los parámetros considerados en la modificación del sistema Raceway y sus respectivas características.

TABLA 2.1
CUADRO COMPARATIVO DE LAS MODIFICACIONES REALIZADAS EN EL SISTEMA DE CULTIVO RACEWAY AWL

Parámetros	Raceway AWL Standard	Raceway AWL Modificado
Superficie y volumen de cultivo	Según requerimiento	Superficie: 0.29 m ² Volumen: 14.5 Lt
Agitación	Por paletas	Neumática (inyección de aire)
Iluminación	Luz natural (solar)	Luz artificial (fluorescentes 5000 lux)
Tipo de cultivo	Batch	Batch

Fuente: Elaboración propia

El equipo fue diseñado para contener adecuadamente 10 L de medio de cultivo, desarrollar una agitación con un flujo transicional y tener conductos por los cuales inyectar el CO₂ para la estabilización del pH y crecimiento de la microalga. El sistema Raceway original cuenta con 2 canales de transporte a diferencia del modificado que cuenta con 4 canales, se realizó esta modificación para reducir el volumen que posee cada canal para que pueda ser agitado con mayor vigorosidad. Se construyó el Sistema Raceway modificado con material de vidrio de 0.5 cm de espesor, lo más delgado posible para que deje pasar la mayor cantidad de luz posible y a la vez resista los 10 L que ocupará el medio de cultivo.

Como se mencionó se realizaron modificaciones al tradicional sistema de cultivo "Raceway AWL" y se hizo el conteo celular en cámara de Neubauer para obtener la cinética de crecimiento de cada especie. A partir de esta etapa el cultivo se tuvo bajo condiciones controladas tales como intensidad luminosa, Fotoperiodos, pH, temperatura y agitación. Anexo 1

2.8 INDUCCION DEL ESTRES POR DEFICIENCIA DE SALES NUTRITIVAS.

Para lograr el estrés celular en las microalgas se redujo la concentración del medio de cultivo en tres oportunidades, la concentración óptima para el crecimiento de las microalgas fue al 15% (según las pruebas descritas en el punto 2.3) del cual se tomó una alícuota y se inoculó en medios de cultivo al 10%, 5% y 0% para evaluar el efecto causado por la disminución de sales nutritivas.

Para determinar el momento en el cual las microalgas consumen todo el nitrógeno e ingresan al estrés celular se realizaron análisis de nitrógeno total al medio de cultivo cada 4 días, las muestras de medio fueron enviadas al laboratorio de control de calidad de la Universidad Católica para ser analizadas. Anexo 2

2.9 SEPARACION Y COSECHA DE LAS MICROALGAS.

Antes de iniciar la separación y cosecha de las microalgas se tuvo que vaciar el Sistema de cultivo Raceway, esto se logró utilizando el conducto de desagüe del equipo.

La separación y cosecha es una de las etapas más difíciles del proceso, ya que se busca la mayor eficiencia de este. Una de las técnicas más utilizadas es la floculación, para la recolección de microalgas los productos químicos más utilizados son: Sulfato de aluminio, cal o quitosano. Cuando se añade a la solución de microalgas una cantidad adecuada de floculante provoca la neutralización de las cargas de las algas, lo que hace que se peguen unas a otras según *David Sieg. Making Algae Biodiesel at Home.* (Loera Maribel. 2010).

Para determinar la cantidad adecuada de Sulfato de aluminio $Al_2(SO_4)_3$ fue necesario realizar pruebas preliminares, tratando de utilizar la menor cantidad posible para no alterar el peso seco a obtener. Se probó con 5 ml de Sulfato de Aluminio a concentraciones de 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm, para 1 Lt de muestra de microalgas, se mezcló y agito vigorosamente y se dejó en reposo para facilitar la formación de flocs.

Luego de formar el precipitado de microalgas se extrajo el sobrenadante mediante sifoneado. Una vez finalizadas las pruebas se pudo determinar que la concentración más adecuada para flocular las microalgas fue de 100 ppm.

2.10 SECADO

El proceso de secado se realizó en una estufa *P. Selecta* en recipientes de acero inoxidable a 75 °C por 5 hrs. (Barajas et. al. 2008)

2.11 EXTRACCIÓN DE ACEITE POR SOLVENTES

Hay una gran diversidad de metodologías, porque los tejidos biológicos no son similares al considerar su estructura, textura, sensibilidad y el contenido de lípidos. La extracción se llevó a cabo en un equipo Soxhlet de 200 mL de capacidad y utilizando como solventes 150 mL de cloroformo y 50 ml de alcohol isopropílico. Se llevó la mezcla hasta ebullición a 85 °C. El proceso de extracción del aceite se llevó a cabo durante 3 hrs, pasando luego a una destilación para separar la mezcla. (Barajas et. al. 2008).

2.11.1 Destilación

Para separar el solvente utilizado en la etapa anterior se realizó una destilación a 85 °C de temperatura en la cual la mezcla cloroformo - alcohol se encuentra en ebullición quedando como remanente el aceite de microalgas. (Guerra F. et al. 2004)

2.12 CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE

El aceite para ser considerado como tal, debe cumplir con una serie de parámetros de calidad. Para su caracterización se emplearon diferentes análisis de requerimiento para así confirmar la identidad de este. Los análisis fueron:

2.12.1 Peso específico

Es una prueba gravimétrica en la cual se llenó un picnómetro con la muestra de aceite y permaneció en un baño a 25°C por 30 min, se secó y pesó. El peso específico se expresó como la relación del peso del aceite con respecto al agua (g de aceite/g agua).

2.12.2 Índice de refracción

Se define así a la relación de la velocidad de la luz en el aire (técnicamente un vacío) con respecto a la velocidad de la luz en el aceite. Se obtuvo

midiendo directamente en un refractómetro a 20-25°C para la muestra de aceite obtenida.

2.12.3 Índice de saponificación

El índice de saponificación denota el peso de hidróxido potásico en mg que se requieren para saponificar un gramo del aceite. Se pesó alrededor de 2,5 ml de muestra (filtrada si el aceite no es transparente) en un erlenmeyer de 250-300ml, se pipetearon 25 ml de la solución de KOH y se conectó el condensador e hirvió hasta que el aceite esté completamente saponificado (aproximadamente 30 minutos). Seguidamente se enfrió y tituló con HCl 0,5 N usando fenolftaleína (1 ml) como indicador. Se corrió un blanco junto con las muestras usando la misma pipeta para medir la solución de KOH.

$$\text{Índice de Saponificación} = \frac{(V_B - V_M) \times N \times 56,61}{\text{Peso de la muestra}}$$

Ecuación 3.1

Dónde:

V_B : Volumen utilizado (en ml) de ácido clorhídrico en el blanco

V_M : Volumen utilizado (en ml) de ácido clorhídrico en la muestra

N: Normalidad de la solución de ácido clorhídrico empleada

2.12.4 Determinación de Índice de Yodo. (Método de Wijs)

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación (números de dobles enlaces) de las grasas. Se pesó alrededor de 4 gotas de aceite en una fiola de yodo de 500 ml luego se disolvió en 10 ml de cloroformo y se añadieron 10 ml del reactivo de Wijs y se dejó reposar exactamente 30 minutos en la oscuridad agitando ocasionalmente. Seguidamente se añadieron 5 ml de solución de KI al 15%, se agitó vigorosamente y se añadieron 100 ml de agua recién hervida y enfriada, lavando cualquier cantidad de yodo libre de la tapa. A continuación se tituló el yodo con tiosulfato 0,1 N añadiéndolo gradualmente, con agitación constante, hasta que el color amarillo de la solución se desvaneció, luego se añadió 1 ml del indicador y se continuó la titulación hasta que el color azul desapareció completamente.

$$\text{Índice de Yodo} = \frac{(V_B - V_M) \times c \times 12,69}{\text{Peso de muestra}}$$

Ecuación 3.2

Dónde:

c : Valor numérico de la concentración exacta, expresada en moles por litro, de la solución volumétrica patrón de tiosulfato sódico utilizada

V_B : Volumen utilizado (en ml) de la solución de tiosulfato sódico utilizada para el ensayo en blanco.

V_M : Volumen utilizado (en ml) de la solución de tiosulfato sódico utilizada para la muestra.

2.12.5 Determinación del Índice de Peróxidos. (Método volumétrico)

Se define como los miliequivalentes (mEq) de peróxido por kilogramo de aceite. Es una determinación volumétrica de la cantidad de grupos peróxidos e hidroperóxidos. La cuantificación se basa en la reacción del yoduro de potasio con los peróxidos para liberar yodo, el cual es titulado con tiosulfato de sodio, empleando almidón como indicador

Se tomó la muestra y se almacenó fuera del alcance de la luz, y se mantuvo refrigerada dentro de envases de vidrio, totalmente llenos y herméticamente cerrados con tapones.

Se pesaron 0,001 g de muestra en función del índice de peróxidos que se presume, con arreglo al cuadro siguiente:

TABLA 2.2
PESOS DE MUESTRA PROPUESTOS DE ACUERDO AL ÍNDICE DE PERÓXIDO.

Índice de peróxidos que se supone (meq de O_2/kg)	Peso de la muestra problema (g)
de 0 a 12	de 5,0 a 2,0
de 12 a 20	de 2,0 a 1,2
de 20 a 30	de 1,2 a 0,8
de 30 a 50	de 0,8 a 0,5
de 50 a 90	de 0,5 a 0,3

Se añadieron 10 ml de cloroformo a la muestra y se disolvió rápidamente la muestra problema mediante agitación luego se añadieron 15 ml de ácido acético y, a continuación, 1 ml de solución de yoduro potásico. Se cerró el matraz y agitó durante 1 minuto

manteniéndolo fuera del alcance de la luz durante 5 minutos, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C.

Se añadieron 75 ml aproximadamente de agua destilada y se valoró (agitando al mismo tiempo) el iodo liberado con la solución de tiosulfato sódico utilizando la solución de almidón como indicador simultáneamente se realizó un ensayo en blanco.

$$IP = \frac{V \times N \times 1000}{\text{Peso de la muestra}}$$

Ecuación 3.3

Dónde:

V: Volumen de solución (en ml) valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo, convenientemente corregidos para tener en cuenta el ensayo en blanco

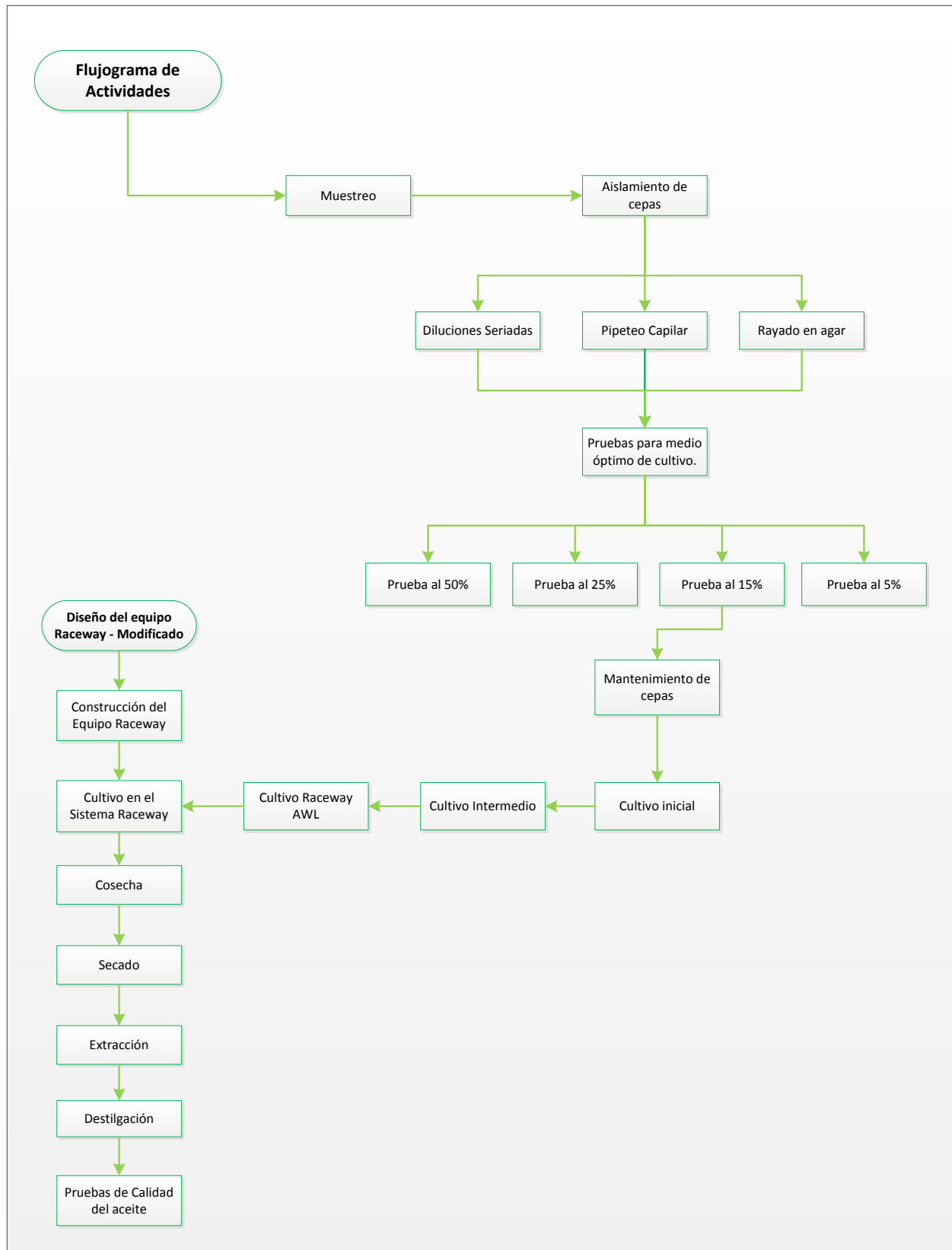
N: Normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada

P: Peso en gramos de la muestra problema.

2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico IBM SPSS v21 con la finalidad de determinar si existe una diferencia significativa entre las pruebas realizadas a diferentes concentraciones de medio de cultivo (15%, 10% y 5%).

FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



III.CAPITULO: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 MUESTREO Y AISLAMIENTO

Se logró obtener la muestra de una laguna de Oxidación en el Distrito de la Joya – Arequipa. La muestra fue transportada al laboratorio donde se procedió con el aislamiento de las microalgas.

Utilizando la metodología planteada se logró aislar con éxito los dos tipos de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*), inicialmente se presentaron problemas por la abundante cantidad de Chlamidomonas presentes en la muestra, afortunadamente, luego de las diluciones realizadas, el número de Chlamidomonas se redujo muy significativamente, lo que nos permitió aislar con mayor facilidad las especies en cuestión. Las microalgas fueron aisladas de la misma muestra pero en momentos separados, predominando las de la especie de *Chlorella vulgaris*.

Luego del aislamiento, se pudo apreciar que aún había un número mínimo de Chlamidomonas en la muestra, pero ellas fueron desapareciendo con el tiempo debido a la competencia de nutrientes con las microalgas.

3.2 CULTIVO DE MICROALGAS

3.2.1 Selección de concentración óptima del medio de cultivo

Se inoculó la cepa aislada en diferentes concentraciones de medio hidropónico (10%, 15%, 25% y 50%) para cada cepa de microalga utilizada.

TABLA 3-1
DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella vulgaris* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MEDIO DE CULTIVO.

Días	Microalgas/ml			
	<i>Chlorella vulgaris</i> 10%	<i>Chlorella vulgaris</i> 15%	<i>Chlorella vulgaris</i> 25%	<i>Chlorella vulgaris</i> 50%
1	9.0×10^4	1.17×10^5	3.9×10^4	4.15×10^4
2	1.07×10^5	1.25×10^5	6.5×10^4	5.55×10^4
3	1.15×10^5	2.05×10^5	1.04×10^5	7.9×10^4
4	2.75×10^5	3.7×10^5	1.06×10^5	11.2×10^5
5	3.55×10^5	5.55×10^5	6.5×10^4	1.15×10^5
6				3.0×10^4
Media	$1,88 \times 10^5$	$2,74 \times 10^5$	$0,75 \times 10^5$	$2,40 \times 10^5$

En la tabla N^o3-1, se muestran los resultados obtenidos durante la etapa de experimentación para la selección de la concentración de solución hidropónica adecuada para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. En esta se aprecia que el cultivo realizado en solución hidropónica a una concentración del 15%, fue la que presentó mayor densidad poblacional (5.55×10^5 Microalgas/ml), en comparación con las otras tres concentraciones (10, 25 y 50%). Esto se debe a que a la concentración del 15% de nuestro medio de cultivo los nutrientes se presentan en formas mejor asimilables. Por el contrario al diluir el medio a concentraciones menores a la del 15% se presenta una deficiencia de sales nutritivas, volviéndose un factor limitante para el desarrollo de las microalgas. A su vez al saturar el medio con sales nutritivas las microalgas no responden adecuadamente en cuanto a su desarrollo población, provocándose una inhibición por saturación del medio. .

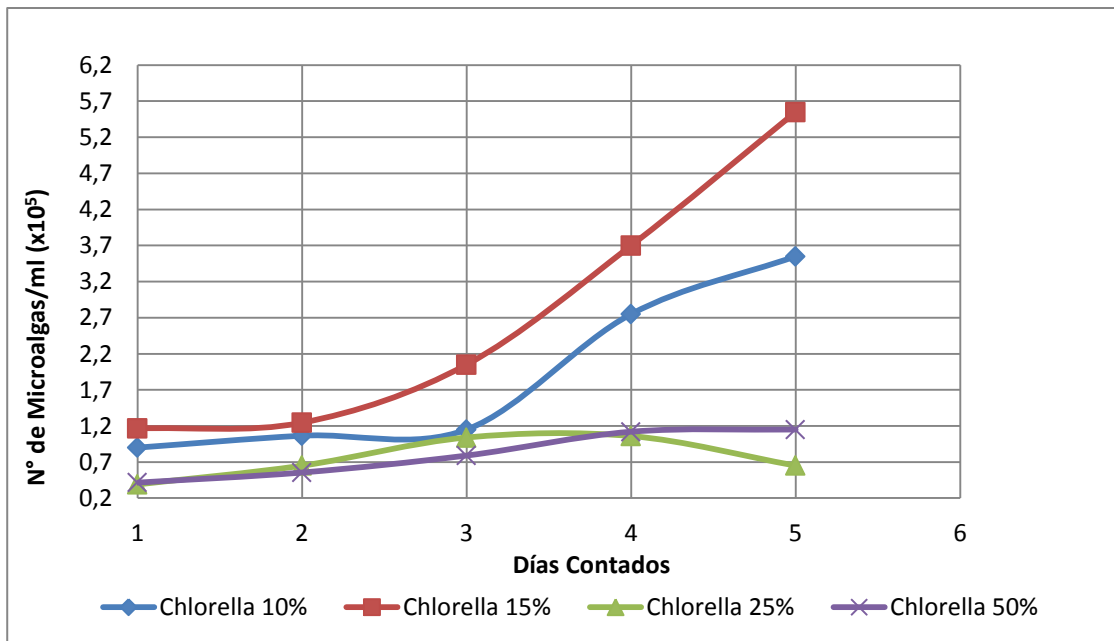


Figura N° 3.1

Curvas de crecimiento para *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de medio de cultivo.

En la figura Nª 3.1, se muestran las curvas que detallan el comportamiento de *Chlorella vulgaris* cultivada a diferentes concentraciones de solución hidropónica. La diferencia poblacional entre los cultivos confirma lo especulado con anteriormente, que para esta especie se logro una mayor tasa de reproducción en un cultivo con solución hidropónica a una concentración del 15%.

TABLA3-2
DENSIDAD POBLACIONAL DE *Scenedesmus dimorphus* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MEDIO DE CULTIVO.

Días	Microalgas/ml			
	<i>Scenedesmus dimorphus</i> 10%	<i>Scenedesmus dimorphus</i> 15%	<i>Scenedesmus dimorphus</i> 25%	<i>Scenedesmus dimorphus</i> 50%
1	2.0 x10 ³	5.0 x10 ³	1.3 x10 ⁴	1.6 x10 ⁴
2	1.0 x10 ⁴	2.3 x10 ⁴	3.9 x10 ⁴	5.1 x10 ⁴
3	5.2 x10 ⁴	7.5 x10 ⁴	4.1 x10 ⁴	7.3 x10 ⁴
4	6.5 x10 ⁴	1.1 x10 ⁵	6.3 x10 ⁴	6.3 x10 ⁴
Media	3,225 x10 ⁴	5,325 x10 ⁴	3,9 x10 ⁴	5,075 x10 ⁴

En la tabla Nª 3-2, se muestran los resultados obtenidos esta vez para *Scenedesmus dimorphus*, en el caso de esta especie es también notable la diferencia en cuanto a densidad poblacional, mostrando un mejor desarrollo a la concentración del 15% en comparación de los otros medios

de cultivo (10, 25 y 50%). Como lo mencionado anteriormente en el caso de la microalga *Chlorella vulgaris* estos resultados se deben a la disponibilidad de las sales nutritivas y en la forma en la que estas son asimiladas por las microalgas.

Esta premisa es confirmada por la Figura N^a 3-2, en la que podemos apreciar las curvas resultado de los conteos que se llevaron a cabo para cada cultivo a distintas concentraciones.

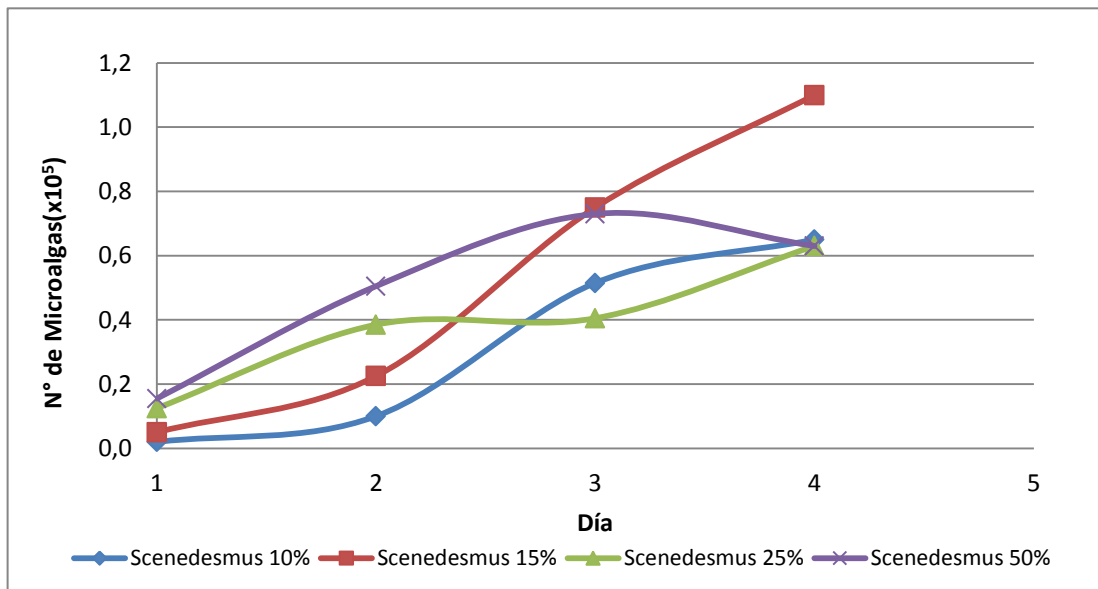


Figura N^o 3.2

Curvas de crecimiento para *Scenedesmus dimorphus* a diferentes concentraciones de medio de cultivo.

Es así y en base a las experiencias ya descritas que se decidió seleccionar como concentración óptima para el cultivo de microalgas una solución hidropónica al 15%, por ser esta en la que las proporciones de sales nutritivas cubre las necesidades metabólicas de ambas especies. Esta premisa fue confirmada por un análisis estadístico realizado con el programa SPSS v.21. En el anexo 3 se adjuntan los resultados para el test de Tuckey en el que se corrobora la prueba de homogeneidad para *Chlorella vulgaris*, necesaria para determinar la posibilidad de llevar a cabo un análisis ANOVA, en esta se observa que la significancia es mayor a 0.05 rechazando así la hipótesis alternativa que afirma que las muestras no son homogéneas. El análisis ANOVA donde se aprecia que P o significancia es mayor a 0,05 indicando que en efecto existe una diferencia estadística. Por lo tanto y basado en los resultados obtenidos para el test

de Tukey, en la cual se observa que entre *Chlorella* 5% y *Chlorella* 15% no existe diferencia estadística, al igual que entre *Chlorella* 15% y *Chlorella* 10%, caso que no se repite para *Chlorella* 5% y *Chlorella* 10% entre las cuales si existe una diferencia estadística.

Para el caso de *Scenedesmus* la significancia es mayor a 0,05 rechazando así la hipótesis alternativa que afirma que los datos no son homogéneos, para el análisis ANOVA donde se observa que P es menos a 0.05 indicando que si existe una diferencia estadística. y en el mismo anexo el test de Tukey lo confirma al ubicar los tres grupos en distintas ubicaciones.

En este también se presentan los diagramas de caja para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* a diferentes concentraciones en los que se obtuvo que *Chlorella* al 15% presenta una asimetría negativa ya que los datos se encuentran concentrados hacia la parte superior de la distribución, mientras que para *Chlorella* al 10% existe una simetría, por otro lado en el caso de *Chlorella* al 5% la mediana que indica la simetría coincide con el primer cuartil (Q_1) indicando que hay muchos datos concentrados en el mismo punto lo que podría indicar una distribución muy homogénea de éstos. En el caso de *Scenedesmus dimorphus* llama la atención la dispersión en la distribución de los datos para *Scenedesmus* al 15% con una ligera asimetría negativa mientras que tanto *Scenedesmus* al 10% y *Scenedesmus* al 5% muestran una buena simetría.

3.2.2 Mantenimiento de cepas.

Para el adecuado mantenimiento de cada especie se tomaron las muestras previamente aisladas por diluciones, rayado en agar, pipeteo capilar y se inocularon; para cada especie por separado; en botellas con 20 mL de solución hidropónica al 15%.

Esta etapa tuvo una duración de 7 días hasta lograr una densidad celular óptima (3×10^7 cel/ml) para inocular a la siguiente etapa, durante esta fase no fue necesario controlar parámetros determinantes como agitación, pH, CO_2 , o Fotoperiodos de luz, solo se tuvo presente que a los cultivos recibieran suficiente luz natural durante el día.

Los conteos de esta y las siguientes etapas se encuentran en el anexo 6

3.2.3 Cultivo inicial

Ésta etapa de cultivo se llevó a cabo en botellas con una capacidad de 650 mL y un volumen de 250 mL de solución hidropónica empleando como inóculo los 20 mL obtenidos de la etapa anterior (mantenimiento de cepas). Para la realización de este cultivo no se controlaron parámetros tales como pH, temperatura, agitación o Fotoperiodos, solo se tuvo en cuenta que las cepas recibieran luz natural directa.

3.2.4 Cultivo Intermedio.

Para llevar a cabo esta tercera etapa de cultivo, se inocularon 100 mL del cultivo anterior (Cultivo inicial) en matraces de vidrio con un volumen de 1 L. en el caso de esta etapa el único parámetro que se tuvo en cuenta la agitación del medio, esto debido al nuevo volumen con el que se trabajó y el incremento de la probabilidad de que las microalgas se sedimenten. En la imagen N° 3-1 se muestran las fotografías tomadas durante cada etapa de cultivo, en estas se puede apreciar la diferencia en cuanto a coloración de cada una, esto principalmente al incremento de la densidad de microalgas.

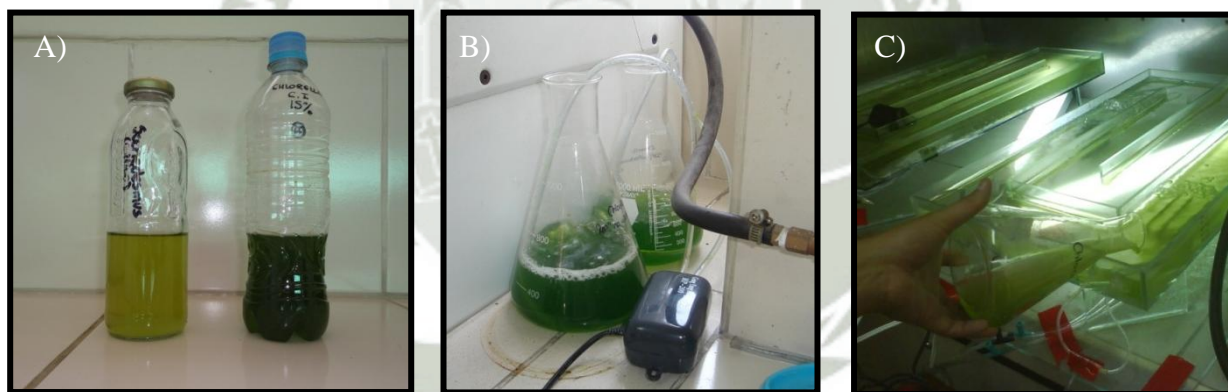


Figura N° 3.3

Figuras de las tres etapas de cultivo para microalgas, (A) Cultivo Inicial, (B) Cultivo Intermedio, (C) Cultivo en Raceway AWL

Los resultados para las tres etapas de cultivo se explican con mayor detalle en la tabla N° 3-3 para *Chlorella vulgaris* y en la tabla N° 3-4 para *Scenedesmus dimorphus*. Como era de esperarse en el Cultivo intermedio se obtuvo el mayor valor para densidad poblacional, esto debido al volumen del cultivo.

TABLA 3-3
DENSIDAD POBLACIONAL DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* DURANTE SUS PERIODOS DE CULTIVO.

<i>Chlorella vulgaris</i> (Microalgas/ml)			
Día	Mantenimiento de cepas (20ml)	Cultivo Inicial (250 ml)	Cultivo Intermedio (1000 ml)
0	6.0×10^5	3.9×10^6	$7,6 \times 10^6$
1	1.5×10^6	7.0×10^6	1.8×10^7
2	1.6×10^6	1.6×10^7	2.5×10^7
3	2.1×10^6	2.3×10^7	4.0×10^7
4	2.6×10^7	5.1×10^7	5.4×10^7
5	6.5×10^7	6.4×10^7	9.1×10^7
6		9.4×10^7	1.3×10^8

En la tabla N° 3.3 se observa un resumen de cada periodo de cultivo descritos anteriormente y en la cual se muestra con mejor claridad el incremento de la densidad poblacional con respecto a los días transcurridos. Se puede apreciar que la densidad población se mantiene relativamente constante en cada periodo, cumpliéndose de esta manera el objetivo de cultivar la cepa de volúmenes menores a mayores sin alterar drásticamente el tiempo de duplicación de las microalgas.

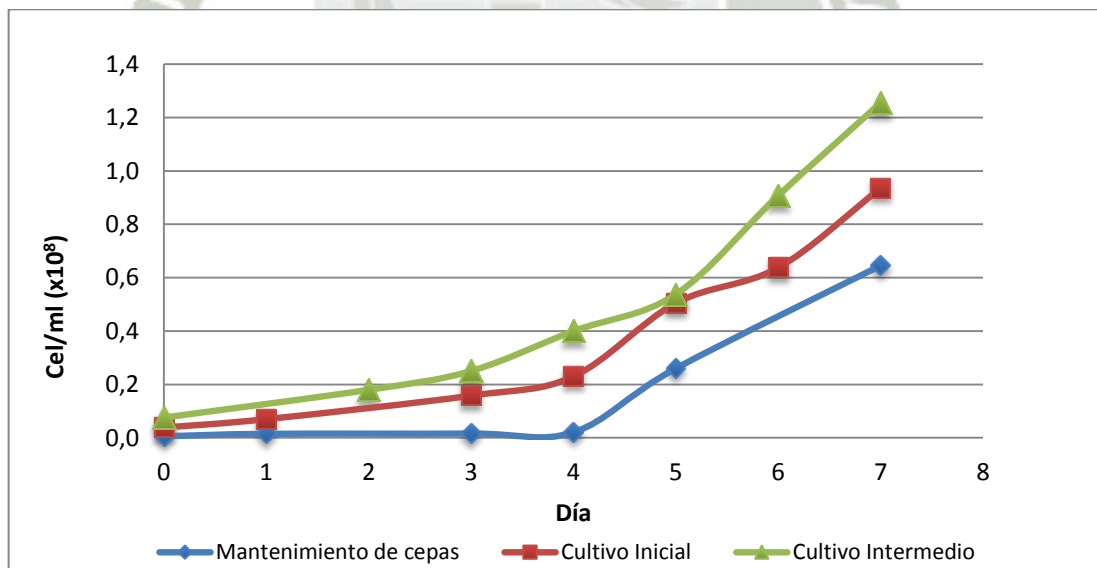


Figura N° 3.4-

Curvas de crecimiento obtenidas en cada etapa del cultivo de microalgas, Chlorella vulgaris

En la figura N° 3.4 se muestran las curvas obtenidas en cada periodo de cultivo para *Chlorella vulgaris*, podemos apreciar que en el Mantenimiento de cepas, cumplió con su objetivo de asegurar la supervivencia de la

especie, de igual forma tanto la curva correspondiente al cultivo inicial como la de cultivo intermedio presentaron buenos resultados en cuanto al tiempo de duplicación.

Por otro lado, para la cepa *Scenedesmus dimorphus* los resultados obtenidos durante los tres periodos de cultivo se presentan en la tabla N^o 3.4 con mayor detalle.

TABLA 3.4
DENSIDAD POBLACIONAL DE LA MICROALGA *Scenedesmus dimorphus* A TRAVÉS DE SUS TRES ETAPAS DE CULTIVO.

<i>Scenedesmus dimorphus</i> (Microalgas/ml)			
Día	Mantenimiento de cepas (20ml)	Cultivo Inicial (250ml)	Cultivo Intermedio (1000ml)
0	$5,5 \times 10^6$	1.4×10^6	2.5×10^6
1	$7,7 \times 10^6$	2.1×10^6	7.0×10^6
3	1.4×10^7	3.8×10^6	9.8×10^6
4	1.6×10^7	7.0×10^6	1.5×10^7
5	2.1×10^7	1.5×10^7	2.5×10^7
7	3.6×10^7	3.3×10^7	3.5×10^7
			5.3×10^7

En la tabla N^o 3.4 se muestra el resumen de cada periodo de cultivo para *Scenedesmus dimorphus*, en él se puede apreciar el incremento de la densidad poblacional con respecto a los días transcurridos. La densidad poblacional se mantiene relativamente constante en cada periodo, sin alterar drásticamente el tiempo de duplicación de las microalgas.

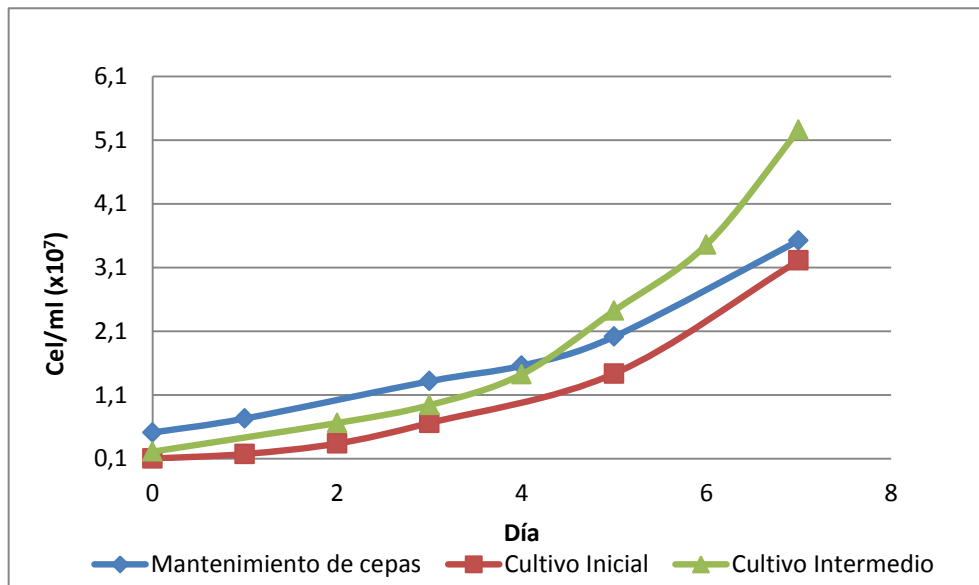


Figura 3.5

Curvas de crecimiento obtenidas en cada etapa del cultivo de microalgas, Scenedesmus dimorphus

La figura N° 3.4 muestra la curva de crecimiento en cada periodo de cultivo de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, pudiéndose apreciar un comportamiento similar con respecto al crecimiento de la microalga en los tres periodos.

3.3 PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN EL SISTEMA RACEWAY AWL

Para la etapa final en el cultivo y reproducción efectiva de microalgas se elevó la escala del cultivo a un volumen de 10 L de solución hidropónica contenida en un sistema Raceway – AWL Modificado el cual fue inoculado con el cultivo obtenido en la etapa anterior (Cultivo Intermedio).

Es en esta etapa que se inició con la inducción del estrés por deficiencia de sales nutritivas. Primeramente se tomó 1 L de cepas que venían reproduciéndose a una concentración de 15% de solución hidropónica y se inoculó en otro Sistema Raceway – AWL Modificado con solución hidropónica a una concentración de 10% bajo condiciones controladas, el pH se mantuvo en un rango de 6 a 7, la temperatura en un margen de 18 – 19°C y una constante agitación provocada por cuatro bombas de aire apoyada por la inyección de CO₂.

El mismo procedimiento se llevó a cabo inoculando otro sistema Raceway AWL – Modificado a una concentración del 5%, es importante mencionar que con el fin de comprobar el efecto de la deficiencia de sales en el tiempo de duplicación y tasa de crecimiento de las microalgas, también se realizaron cultivos al 100%, y 0%, todos bajo la misma modalidad de los ya descritos anteriormente. Para comprobar la veracidad de los resultados obtenidos en los cultivos bajo estrés se realizaron tres repeticiones para cada uno de ellos.

En la tabla N° 3.5, se muestran los valores obtenidos en los cultivos de *Chlorella vulgaris* realizados a diferentes concentraciones de medio hidropónico (100, 15, 10, 5 y 0%), en ella se puede ver la diferencia entre las tasa de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación para cada caso. Los resultados indican que el cultivo con mayor densidad celular fue el realizado en medio hidropónico al 15% de concentración, obteniendo la más alta tasa de crecimiento y por lo tanto el menor tiempo de duplicación.

Los cultivos realizados en los medios a concentraciones de 100% y 0% no mostraron buenos resultados como era de esperarse, al final de los 9 días de cultivo mostraron una pobre densidad celular con tasas de crecimiento demasiado altas por lo que se descarta por completo su posibilidad como medio de crecimiento.

TABLA 3.5
CONCENTRACIÓN INICIAL, FINAL (CEL/ML) Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MEDIO (100, 15, 10, 5 Y 0%) EN NUEVE DÍAS DE DESARROLLO.

<i>Chlorella vulgaris</i>	Concentración de Medio de Cultivo				
	100%	15%	10%	5%	0%
Conc. Inicial (Cel/ml)	6.5×10^5	2.6×10^6	2.0×10^6	2.2×10^6	6.7×10^7
Conc. Final (Cel/ml)	1.2×10^6	7.8×10^7	5.7×10^7	4.6×10^7	3.3×10^5
Tasa de crecimiento - μ (hrs-1)	0.003	0.016	0.015	0.014	0.007
Tiempo de duplicación - Td (hrs)	262.42	43.84	44.75	49.46	93.03

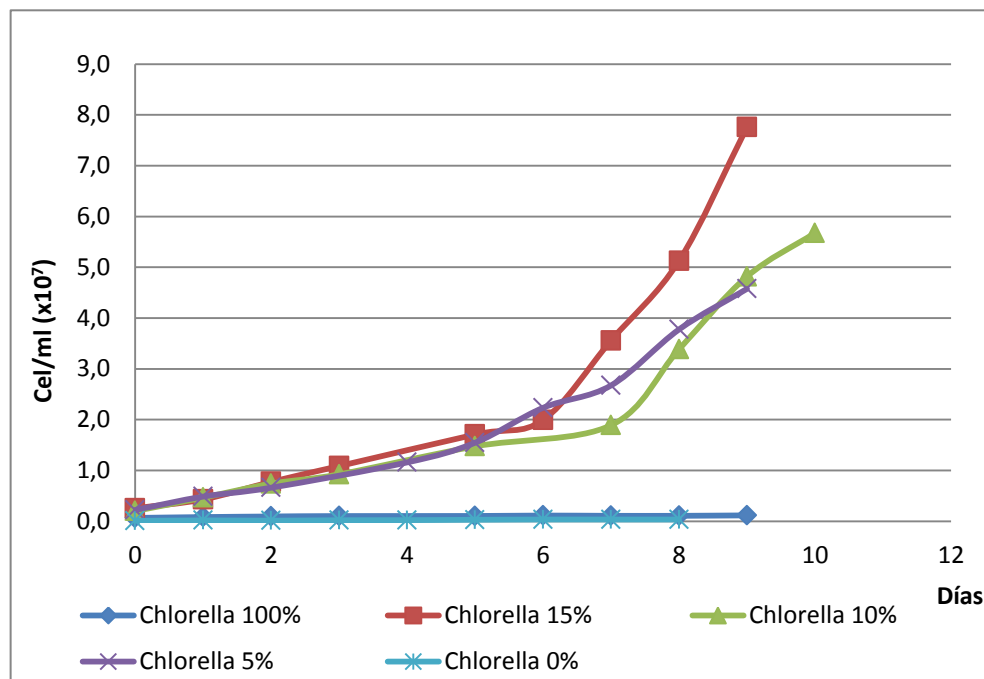


Figura N° 3.6

Curvas de densidad poblacional para Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de medio de cultivo

En la figura N°3.5, se observa claramente la ventaja del cultivo realizado en medio hidropónico al 15% de concentración mostrando una densidad poblacional superior a la de los demás cultivos. Los cultivos al 10% y 5% de concentración, mostraron un crecimiento moderado, mientras que los cultivos realizados al 100% y 0% no lograron una reproducción adecuada obteniendo una densidad poblacional demasiado escasa.

En la tabla N° 3.6, se muestran los valores obtenidos en los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* realizados a diferentes concentraciones de medio hidropónico (100, 15, 10, 5 y 0%), en ella al igual que en la tabla anterior, se puede apreciar la diferencia entre las tasa de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación en cada cultivo. Estos valores indican que el cultivo con mayor

densidad celular fue el realizado en medio hidropónico al 15% de concentración, obteniendo la más alta tasa de crecimiento y por lo tanto el menor tiempo de duplicación.

Los cultivos realizados en los medios a concentraciones de 100% y 0% no mostraron buenos resultados como era de esperarse, al final de los 9 días de cultivo mostraron una pobre densidad celular con tasas de crecimiento demasiado altas por lo que se descarta por completo su posibilidad como medio de crecimiento.

TABLA 3.6
CONCENTRACIÓN INICIAL, FINAL (CEL/ML) Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus dimorphus* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MEDIO (100, 15, 10, 5 Y 0%) EN NUEVE DÍAS DE DESARROLLO.

<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Concentración de Medio de Cultivo				
	100%	15%	10%	5%	0%
Conc. Inicial (Cel/ml)	7.50×10^5	2.13×10^6	2.14×10^6	2.17×10^6	1.17×10^5
Conc. Final (Cel/ml)	1.10×10^6	7.63×10^7	5.6×10^7	4.63×10^7	3.17×10^5
Días de cultivo	9	9	9	9	9
Tasa de crecimiento - μ (hrs ⁻¹)	0.002	0.017	0.015	0.014	0.005
Tiempo de duplicación - Td (hrs)	390.92	41.82	45.87	48.91	149.94

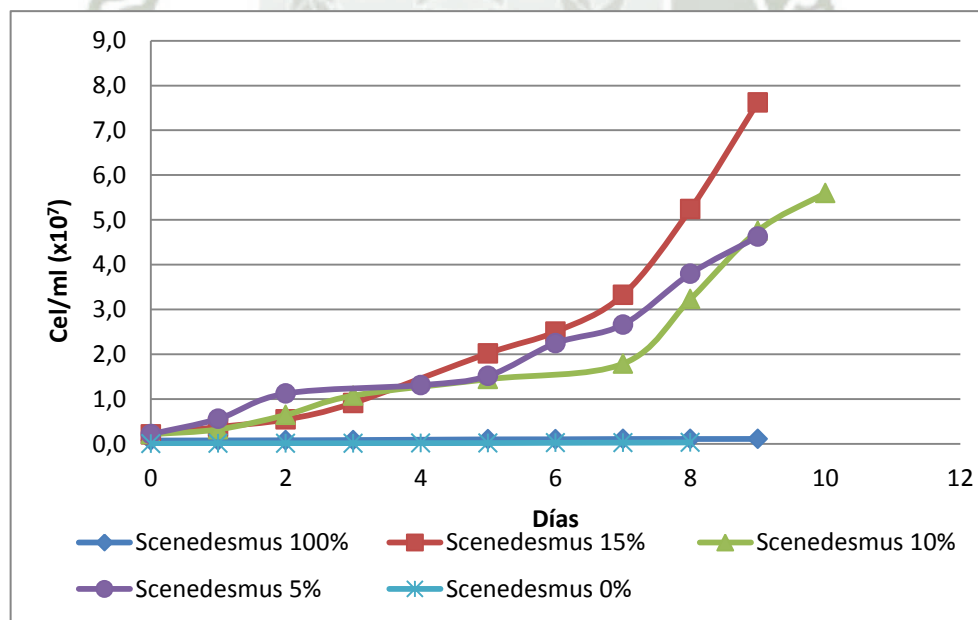


Figura N° 3.7

Curvas de densidad poblacional para Scenedesmus dimorphus cultivada bajo estrés a diferentes concentraciones de sales nutritivas.

En la figura N° 3.7, es obvia la ventaja del cultivo realizado en medio hidropónico al 15% de concentración mostrando una densidad poblacional por encima de los demás cultivos. Las pruebas realizadas al 10% y 5% de concentración, mostraron un crecimiento aceptable, mientras que los cultivos realizados al 100% y 0% no mostraron resultados favorables obteniendo una densidad celular demasiado baja.

3.4 OBTENCIÓN Y RECUPERACIÓN DE BIOMASA.

La biomasa obtenida luego de la floculación y decantación (Figura. N° 3.1, N° 3.2) fue secada (Figura. N° 3.2) y cuantificada por el peso seco de cada cultivo. De las tres concentraciones de medio de cultivo utilizadas (15%, 10% y 5%) se pudo determinar que la mayor cantidad de biomasa obtenida fue en los cultivo al 15% con un peso de biomasa seca de 8.9903 gr para *Chlorella vulgaris* y 10.0599 gr para *Scenedesmus dimorphus*. A pesar de que *Chlorella vulgaris* posee mayor cantidad de microalgas que *Scenedesmus dimorphus*, esta última reportó una mayor peso debido a su mayor tamaño.



Figura N°3.8

Prueba de floculación de las microalgas en pera de decantación con Sulfato de aluminio (100 ppm)



Figura N°3.9

Biomasa de microalgas obtenida por floculación

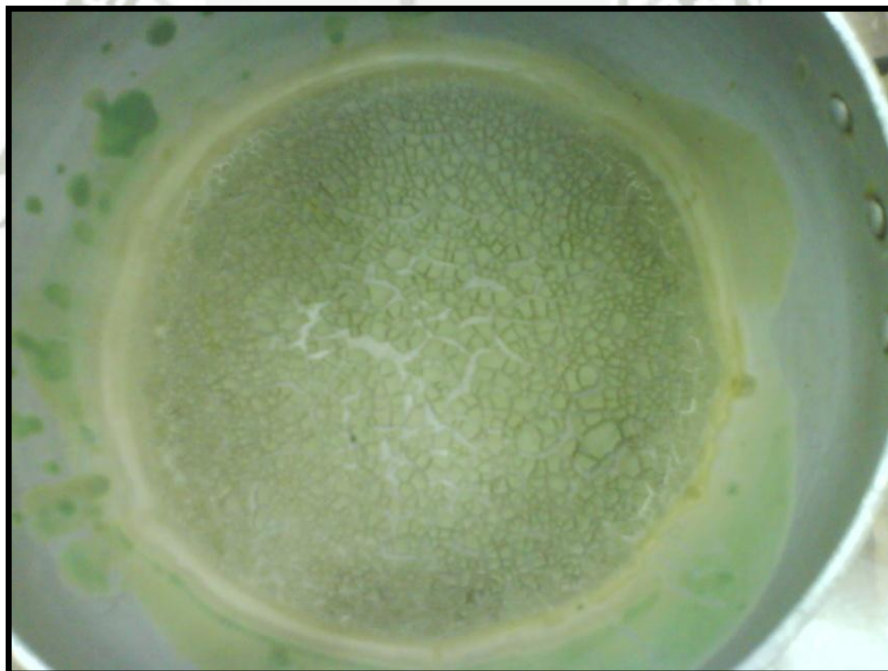


Figura N°3.10

Secado de las microalgas en estufa

TABLA 3.7

DENSIDAD POBLACIONAL Y BIOMASA OBTENIDA EN PESO SECO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus dimorphus* A DIFERENTES CONCENTRACIONES (15%, 10% Y 5%) DE SALES NUTRITIVAS

Parámetros	Rep.	<i>Chlorella vulgaris</i>				<i>Scenedesmus dimorphus</i>			
		Concentración de medio de cultivo				Concentración de medio de cultivo			
		15%	10%	5%	Media	15%	10%	5%	Media
Cel/ml	1	8.15 x 10 ⁷	6.05 x 10 ⁷	4.70 x 10 ⁷	6.30 x 10 ⁷	7.88 x 10 ⁷	5.60 x 10 ⁷	4.90 x 10 ⁷	6.13 x 10 ⁷
	2	7.65 x 10 ⁷	5.13 x 10 ⁷	4.48 x 10 ⁷	5.75 x 10 ⁷	7.55 x 10 ⁷	5.38 x 10 ⁷	4.40 x 10 ⁷	5.78 x 10 ⁷
	3	7.48 x 10 ⁷	5.85 x 10 ⁷	4.55 x 10 ⁷	5.96 x 10 ⁷	7.45 x 10 ⁷	5.83 x 10 ⁷	4.58 x 10 ⁷	5.95 x 10 ⁷
	X	7.76 x 10 ⁷	5.68 x 10 ⁷	4.58 x 10 ⁷		7.63 x 10 ⁷	5.60 x 10 ⁷	4.63 x 10 ⁷	
Biomasa (gr)	1	9.3563	8.0024	6.2896	7.8828	10.2569	8.5687	7.3415	8.7224
	2	8.8790	7.8552	6.0357	7.5899	10.0254	8.2546	7.0511	8.4437
	3	8.7355	7.9729	6.1544	7.6209	9.8974	8.8074	7.1977	8.6342
	X	8.9903	7.9435	6.1599		10.0599	8.5436	7.1968	

En la tabla N° 3.7 se muestran los diferentes pesos obtenidos por cada cultivo realizado, se puede observar que mientras va disminuyendo la concentración del medio de cultivo (15%, 10% y 5%) también disminuye la producción de biomasa, esto es debido a la deficiencia de sales nutritivas que posee el medio de cultivo en cada caso.

3.5 OBTENCIÓN DE ACEITE POR EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

En la extracción del aceite (Figura N°3.4 y N°3.5), se realizaron tres ensayos para cada concentración (15%, 10% y 5%) como se aprecia en la tabla resumen N° 3.8.

En la tabla N° 3.8 se presentan los resultados para las experiencias realizadas al 15% se puede observar que la cantidad de biomasa seca obtenida para *Chlorella vulgaris* por triplicado fue alrededor de 8,9 gr. en 10 L. y de lípidos disponibles en un promedio de 1,9 g lo que corresponde a un 21% en base al peso seco cuando sus valores normales se encuentran entre 14 - 22%. Por otro lado para *Scenedesmus dimorphus* al 15% en el que se obtuvo alrededor de 10 g. por 10 L. de cultivo se observó una cantidad de 3 g. de lípidos, lo que correspondería a un 31% del peso seco de ésta encontrándose sus valores normales entre 16 – 40%.



Figura N°3.11
Extracción de aceite de microalgas en equipo Soxhlet



Figura N° 3.12
Extracción de aceite de microalgas en equipo Soxhlet – Sifoneado.

En la tabla N° 3.8 se muestran los resultados obtenidos para los cultivos por triplicado para ambas especies a una concentración de 15%, 10% y 5% respectivamente, en la primera de estas observamos que en el caso de *Chlorella vulgaris* se obtuvo en promedio una cantidad de 8,9 g de biomasa y recuperando tras la extracción en presencia de solventes 1,92 g de lípidos lo que correspondería a aproximadamente un 21% del peso seco de este cultivo, en el caso de *Scenedesmus dimorphus* se pudo obtener 10,05 g de la cual se alcanzó extraer 3,12 g de lípidos lo que correspondería a un 31% de su peso seco. En la misma tabla se presentan los resultados obtenidos para los cultivos realizados a un 10%, en los que se puede apreciar que la cantidad de biomasa recuperada para ambas especies es mayor a la obtenida trabajando al 15% así como presentar un mayor porcentaje de lípidos en base a su peso seco, sin embargo los resultados para los cultivos a un 5% se puede ver claramente que tanto los valores para biomasa recuperada como para lípidos extraídos (% peso seco) se acercan mucho a los obtenidos a un 10% pero mostrando una cantidad de biomasa recuperada muy baja para 10 L de medio de cultivo lo que indicaría que al disminuir la cantidad de sales nutritivas previsto efectivamente repercute en la cantidad de lípidos obtenidos.

TABLA N°3.8

PARÁMETROS EVALUADOS Y RESULTADOS OBTENIDOS A LO LARGO DEL CULTIVO DE LAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus dimorphus* BAJO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SALES NUTRITIVAS

		<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Scenedesmus dimorphus</i>		
Parámetros	Rep.	Concentración de medio de cultivo			Concentración de medio de cultivo		
		15%	10%	5%	15%	10%	5%
Biomasa (gr)	1	9.3563	8.0024	6.2896	10.2569	8.5687	7.3415
	2	8.8790	7.8552	6.0357	10.0254	8.2546	7.0511
	3	8.7355	7.9729	6.1544	9.8974	8.8074	7.1977
	Media	8.9903	7.9435	6.1599	10.0599	8.5436	7.1968
Lípidos (gr)	1	1.8237	2.2256	1.8742	3.1402	3.3008	2.8983
	2	1.9924	2.0305	1.6997	3.1275	3.2419	2.7015
	3	1.9574	2.1301	1.7009	3.1032	3.3512	2.8153
	Media	1.9245	2.1287	1.7583	3.1236	3.2980	2.8050
Lípidos (ml)	1	1.9953	2.4350	2.0505	3.4357	3.6114	3.1710
	2	2.1799	2.2216	1.8596	3.4218	3.5469	2.9557
	3	2.1416	2.3305	1.8609	3.3952	3.6665	3.0802
	Media	2.1056	2.3290	1.9237	3.4175	3.6083	3.0690
% Recuperado	1	19.4900	27.8100	29.8000	30.6200	38.5200	39.4800
	2	22.4400	25.8500	28.1600	31.2000	39.2700	38.3100
	3	22.4100	26.7100	27.6400	31.3500	38.0500	39.1100
	Media	21.4467	26.7900	28.5333	31.0567	38.6133	38.9667
Aceite Recuperado(ml/gr)		0,23421	0,29320	0,31229	0,33972	0,42234	0,42644

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

3.6.1 Peso específico.

El peso específico es un valor que nos indica la relación de peso (gr) que existe entre el aceite analizado y el agua. El resultado obtenido para la prueba del picnómetro fue de 0.915 gr de aceite/gr de agua, este valor se asemeja a los normalmente obtenidos en los aceites de Palma, Colza, Girasol. (Anexo 5)

3.6.2 Índice de refracción

Para la obtención de este valor se leyó la muestra a 20°C con un refractómetro, el resultado obtenido fue de 1.466 debido a que la viscosidad y el índice de refracción guardan una dirección directamente proporcional el valor obtenido indicaría que la muestra analizada cumple con los parámetros normales de un aceite.

3.6.3 Índice de saponificación:

El análisis del índice de saponificación es uno de los procedimientos fundamentales para lograr determinar la calidad de la grasa que se obtiene. Debido a que nuestra muestra se trata de un aceite muy similar a los aceites vegetales y según el CODEX STAN 33±1981, el índice de saponificación debería estar en un rango de 180 a 198 mg KOH/gr aceite.

Después de haber realizado el procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

Volumen de Ácido Clorhídrico en la muestra (VM)	:	5.2
Volumen de Ácido Clorhídrico en el blanco (VB)	:	24.5
Normalidad del Ácido Clorhídrico (N)	:	0.5
Peso de la Muestra	:	2.84

El índice de saponificación obtenido fue de 192.4 mg de KOH por gr de muestra, resultado que se encuentra dentro del rango aceptable para un aceite vegetal.

3.6.4 Índice de Yodo. (Método de Wijs)

El índice de yodo representa la cantidad de insaturaciones que presenta nuestro aceite, mientras mayor sea el resultado, el aceite tendrá mayor cantidad de ácidos grasos insaturados o poliinsaturados,

Luego de realizar el procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

Volumen de Tiosulfato en blanco (VB)	:	2,3
Volumen de Tiosulfato en muestra (VM)	:	4,6
Concentración del Tiosulfato (c)	:	0,5
Peso de la muestra (gr)	:	3,45

El resultado de la prueba fue 145.2 lo cual indicaría que la muestra presenta una cantidad moderada de ácidos grasos insaturados.

3.6.5 Índice de Peróxido

Este parámetro indica en que extensión ha experimentado el aceite la rancidez oxidativa.

Volumen de Tiosulfato en muestra (VM)	:	7,19
Concentración del Tiosulfato (c)	:	0,01
Peso de la muestra (gr)	:	5,0

El resultado obtenido mediante titulación fue de 14,38 meq oxígeno activo/kg aceite el cual indica que la cantidad (meq) de oxígeno contenido en la muestra de aceite, se encuentra dentro del rango mencionado en la metodología, demostrando así que la muestra obtenida mediante extracción, puede ser en efecto considerado como un aceite que cumple con los estándares de calidad aceptable.

Los resultados obtenidos de las pruebas anteriormente desarrolladas, nos indican que el aceite de microalgas obtenido presenta un bajo índice de saponificación, valor que es muy útil en el momento de la refinación del aceite o para una neutralización posterior, un bajo índice de saponificación indicaría que el aceite es de buena calidad. De la misma forma y confirmando lo anteriormente dicho sobre el índice de saponificación, el índice de Yodo obtenido indica que el aceite posee un número moderado de ácidos grasos insaturados, el cual es un dato importante al momento de calificar un aceite. Se considera que un aceite es de mejor calidad cuando posee mayor cantidad de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados. Los valores obtenidos en el análisis del Índice de Peróxido nos revelan que el aceite obtenido no posee una muy buena resistencia a la oxidación, esto se

debe a la cantidad de ácidos grasos insaturados que posee, por lo que debe tener un buen cuidado al almacenarse para evitar su oxidación. Por otro lado, las pruebas realizadas dan como conclusión que el aceite de microalgas obtenido es de buena calidad, fácilmente aprovechable para la conversión a biodiesel.



IV. CONCLUSIONES

PRIMERA- Se logró determinar el medio óptimo de cultivo para los dos tipos de microalgas. Los conteos realizados en diferentes concentraciones de medio de cultivo Hidropónico (50%, 25%, 15% y 5%) demostraron que la concentración óptima para el crecimiento de estas microalgas fue al 15% obteniéndose una densidad poblacional de 2.74×10^5 cel/ml para *Chlorella vulgaris* y 5.32×10^4 cel/ml para *Scenedesmus dimorphus*, mientras que para las demás concentraciones se reportaron valores inferiores, por lo que se utilizó esta concentración de medio para cultivar las microalgas hasta llegar a la etapa en la que se aplicaría el estrés (Cultivo en Sistema Raceway AWL).

SEGUNDA.- Se logró modificar con éxito el Sistema Raceway tradicional, realizando modificaciones en cuanto su agitación, número de canales, iluminación y adición de CO₂, obteniendo buenos resultados en cuanto al crecimiento y cinética de las microalgas.

TERCERA.- Ambas especies de microalgas presentan una disminución en su cinética de crecimiento al ser cultivadas en una solución con bajas concentraciones de sales nutritivas (15%), debido al estrés ocasionado las células redireccionan toda la energía que normalmente usan para dividirse al almacenaje de lípidos en forma de aceite lo que da como resultado el incremento del volumen final extraído.

CUARTA.- Según los resultados reportados en los análisis de caracterización del aceite, se pudo constatar frente a la NORMA DEL CODEX PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS CODEX STAN 210-1999 que el aceite obtenido de ambas especies cumple con los estándares de calidad requeridos para ser aceptado como un aceite de buena calidad y en cuanto a la cantidad de aceite extraído se concluyó que en el caso de *Chlorella vulgaris* el mayor volumen se reportó a una concentración de 10% obteniéndose 0.29 mL/gr de biomasa mientras que para *Scenedesmus dimorphus* se obtuvieron 0.42 mL/gr de biomasa.

El hecho que se haya obtenido mayor cantidad de aceite en cultivos realizados a una concentración inferior (10%) a la concentración definida como óptima (15%) confirma

que las microalgas producen mayor cantidad de aceite cuando se encuentran bajo estrés celular.



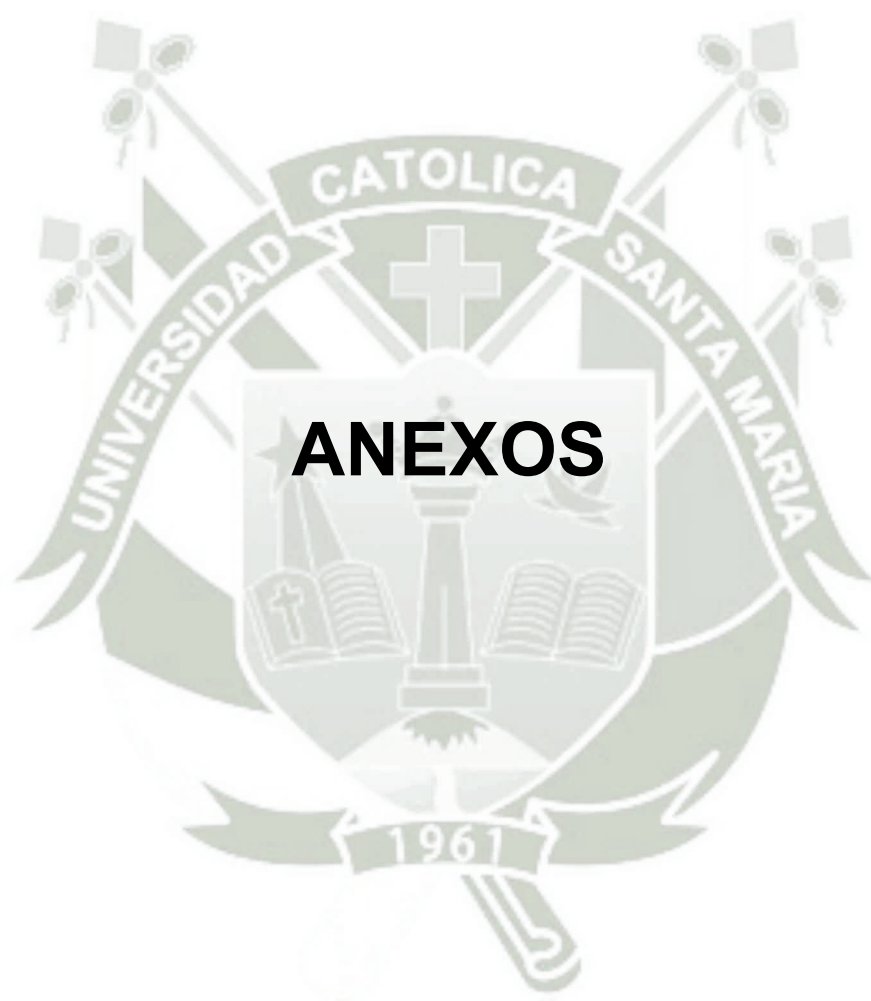
V.RECOMENDACIONES

- En caso de utilizar soluciones hidropónicas probar nuevas concentraciones para diferentes cepas de microalgas.
- Probar la eficiencia del diseño del equipo Raceway AWL modificado con otras especies de microalgas.
- Incluir la operación de sonicación como etapa anterior al secado de la biomasa para aumentar las posibilidades de una mayor recuperación de aceite.
- Realizar la extracción con diferentes combinaciones de solventes a diferentes concentraciones.
- Utilizar la torta residual como materia prima para la obtención de nuevos productos ricos en proteínas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) ABALDE, JULIO. et al *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones* Editorial: Universidad de Coruña 1-210. 1995
- 2) ALDAVE PAJARES, AUGUSTO. *Algas* Editorial: Libertad. 1ª ed. [s.l.] 382 p. 1989
- 3) ALEXOPOULOS, CONSTANTINE JHONS. & BOLD C, HAROLD. *Algae and fungi* Editorial: Macmillian. 4a ed. [s.l.] 368-392 p .1970
- 4) ANTI, KAUTTO. (2011) Flujos residuales para el cultivo de Microalgas
- 5) ARELLANO ALVAREZ, HENRY. Escuela Superior Politécnica de litoral: Folleto de Algas. Ecuador. 1994
- 6) BAND SCHMIDT CHRISTINE J. *Generación biotecnológica para la producción de microalgas*. [Ecuador]: Instituto de Industrias UMAR, 1997. 30 p.
- 7) BARAJAS ANDRÉS. et al. *Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel*. [Colombia]: Universidad Industrial de Santander – UIS. 2011. 59 p.
- 8) BARRA, RONNY; GUARTATANGA, SONIA. *Diseño de un fotobioreactor Industrial para el Cultivo de Spirulina (Arthospira platensis)*. [Ecuador]: Escuela Superior Politécnica del Litoral – Centro de Investigación Científica y Tecnológica. 2008. 7 p
- 9) CONTRERAS RIVEROS CARMEN ROSA. “Evaluación de la producción de *Spirulina platensis* utilizando como medio de cultivo la solución hidropónica La Molina”. Director: Dr. Joseph Lebou. Universidad Nacional de San Agustín - Arequipa, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias – Escuela Profesional y Académica de Ingeniería Pesquera, 1998
- 10) GARIBAY HERNÁNDEZ ADRIANA et al. (2009) “Biodiesel a Partir de Microalgas .Instituto de Biotecnología”. En: *Principios y Aplicaciones de Biotecnología Microalgal*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 11) GONZALES BENITO JAVIER et al. Gestión Ambiental. *Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de Córdoba: Especificaciones para muestras de agua*. 2006, vol. 4(40), p. 7-14.
- 12) GONZALES REYES ANNABEL MIREYA. “Alternativas en el cultivo de microalgas” Director: Dr. Henry Álvarez. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ,2000
- 13) GREQUE DE MORAIS, MICHELE et al. *Perfil de Ácidos Grasos de microalgas cultivadas con dióxido de carbono*. [s.l.] 2009.

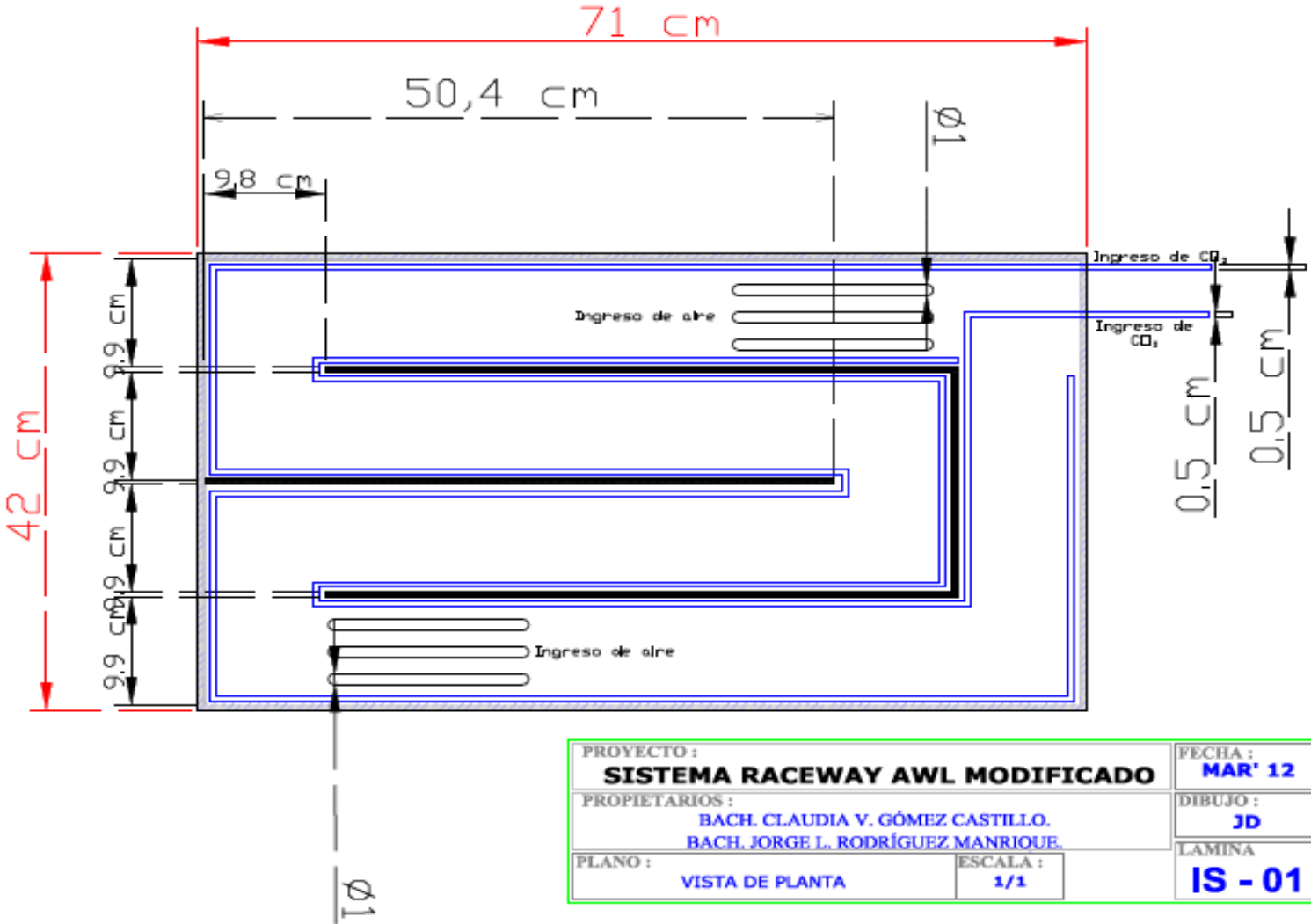
- 14) GUERRA MILLAN FRANCISCO.J. et al. *Destilación simple*. Univerisidad Iberoamericana. Mexico DF. 2008. 20p.
- 15) HERNANDEZ MUÑOZ AURELIO. *Microbiología*. Editorial Paraninfo: Madrid. 1997.
- 16) MILTON SOMMERFELD, ERIC JARVIS. et al. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances*. Plant Journal. Department of Chemistry and Geochemistry. USA. 2008. 19p.
- 17) KANNO, TOSHIHIRO. UYAMA, KAZIE. *Chlorella vulgaris: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier*. Ed. Woodland Publishing. [s.l.]. 2005. 63p.
- 18) KRUEGER G, ROBERT; NICHOLAS W, GILLHAM& COGGIN H, JOSEPH. *Introduction to microbiology*. Ed. Macmillan. [s.l.] 1973. 815 p.
- 19) LOERA-QUEZADA M. MARIBEL. *Las microalgas oleoginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades*. Veracruz – México. 2010. 116 p.
- 20) PERALES VELA, HV. et al. *Growth photosynthetic and respiratory responses to sublethal copper concentrations in Scenedesmus incrassatulus (Chlorophyceae)*. Ed. Chemosphere. China. 2007.
- 21) TAUB B. FRIEDA. *Algae culture as source of feed*. University of Washington. 1968.
- 22) TRUJILLO V. M. *Manual de Técnicas de Aislamiento de cepas de microalgas. Informe Técnico*. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, 29. CTACT9701. 1997.
- 23) 7° Curso Internacional Cultivo de Moluscos. Eduardo Uribe T: Agosto de 1994. *Tecnología de Cultivo de microalga*. Coquimbo - Chile. 16-56p.





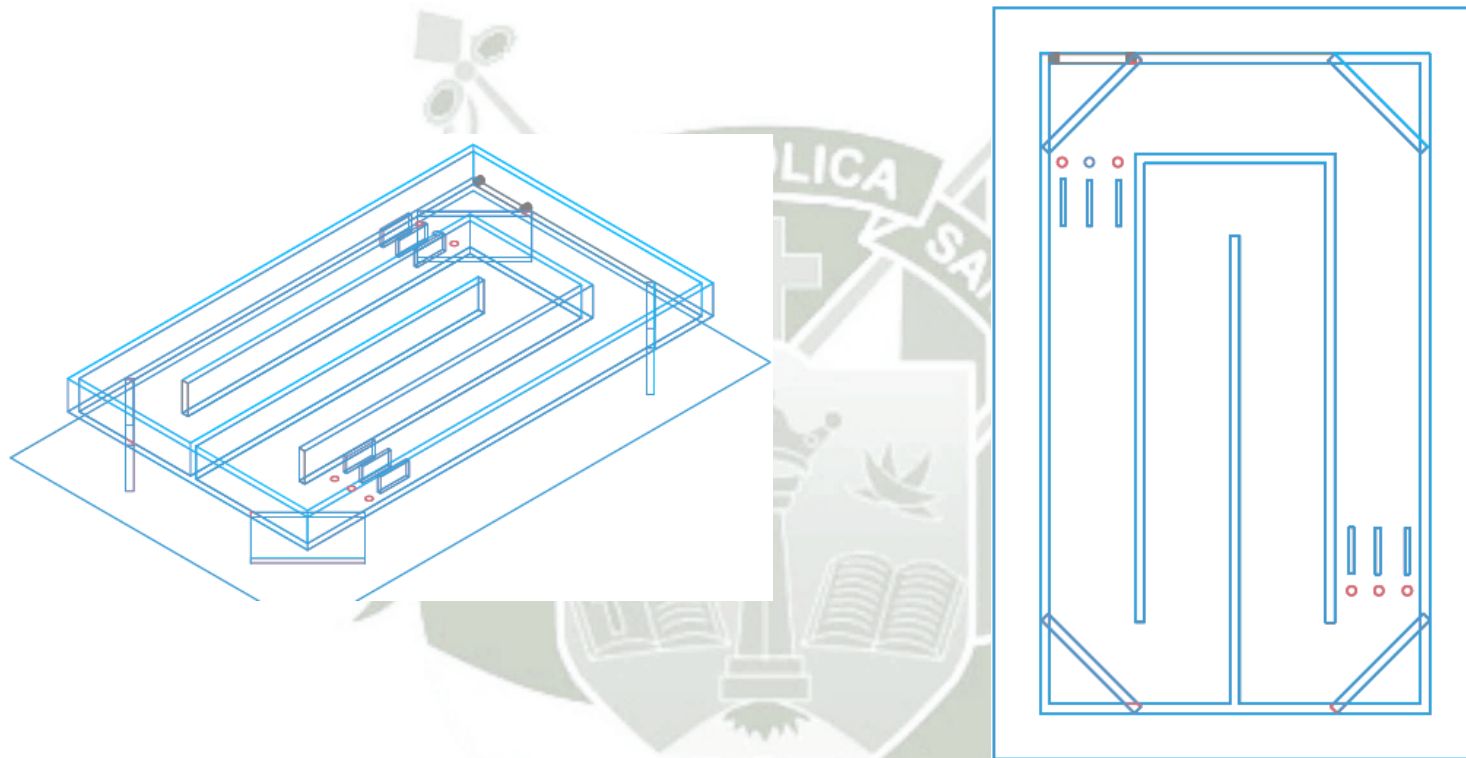
ANEXO 1
SISTEMA DE CULTIVO
RACEWAY–AWL MODIFICADO

ANEXO 1-A.- Raceway AWL modificado Vista de Planta.

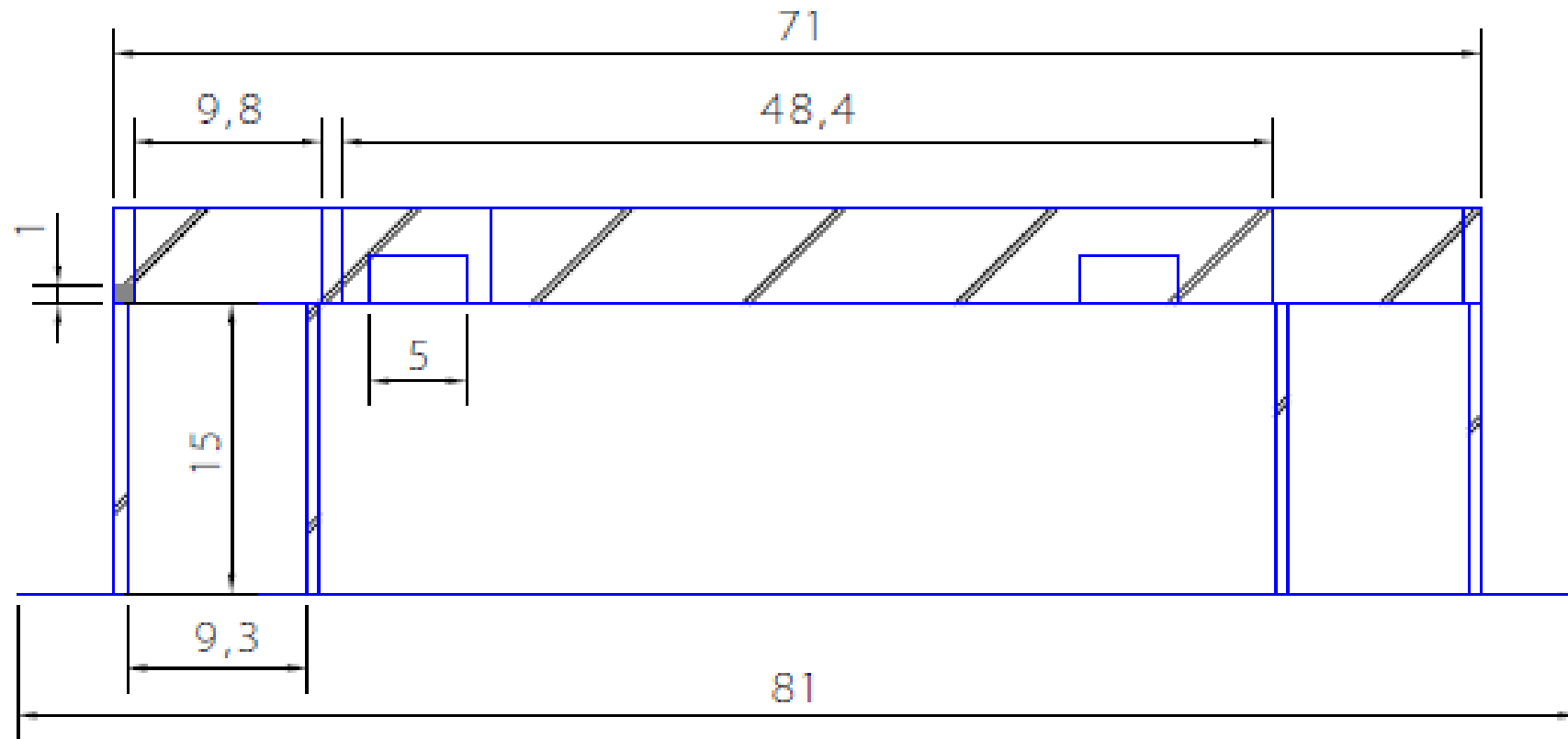


PROYECTO : SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO		FECHA : MAR' 12
PROPIETARIOS : BACH. CLAUDIA V. GÓMEZ CASTILLO. BACH. JORGE L. RODRÍGUEZ MANRIQUE.		DIBUJO : JD
PLANO : VISTA DE PLANTA	ESCALA : 1/1	LAMINA IS - 01

ANEXO 1-B.- Isométrico Raceway AWL modificado

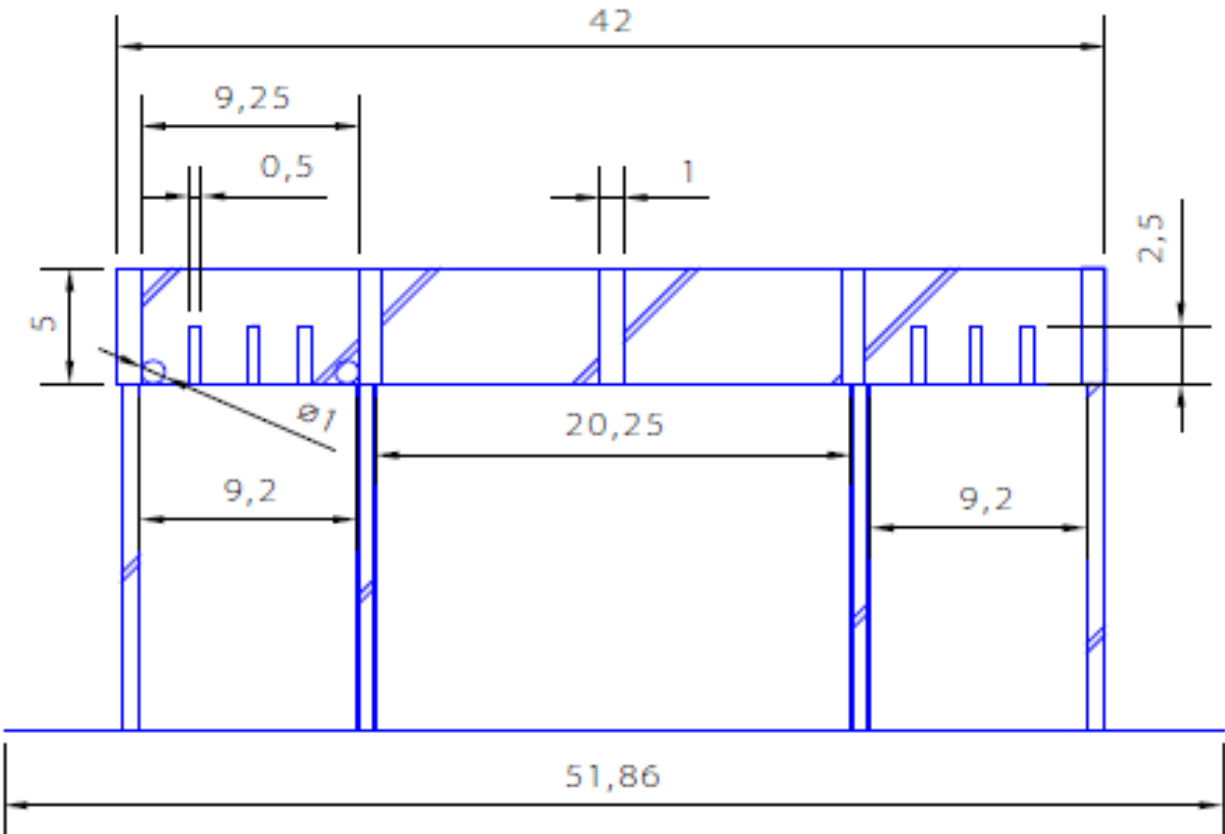


ANEXO 1-C.- Raceway AWL modificado Vista Lateral Izquierdo.



PROYECTO: SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO	FECHA: ABR' 12
PROYECTADA: BACH. CLAUDIA V. GÓMEZ CASTILLO. BACH. JORGE L. RODRÍGUEZ MANRIQUE.	LÁMINA: LI - 01
PLANO: LATERAL IZQUIERDO	ESCALA: 1/1

ANEXO 1-D.- Raceway AWL modificado Vista Frontal.



PROYECTO : SISTEMA RACEWAY AWL MODIFICADO		FECHA : ABR' 12
PROYECTISTA : BACH. CLAUDIA V. GÓMEZ CASTILLO. BACH. JORGE L. RODRÍGUEZ MANRIQUE.		LÁMINA F - 01
PLANO : FRONTAL	ESCALA : 1/1	



ANEXO 2

ANÁLISIS DE LABORATORIO

ANEXO 2-A. Análisis Físicoquímico para cultivos al 15%



Urb. San José s/n.
Umacollo
Arequipa
Perú
Teléfono
+5154 251210
Anexo 1166
Telefax
251144

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA03A12.000459

Nombre del Cliente : CLAUDIA GOMEZ CASTILLO
Dirección del Cliente : COVISEAL C-1 PAUCARPATA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA A, CHLORELLA
MUESTRA B, HLM
MUESTRA C, SCENEDESMUS
Lote : PILOTO
Cantidad : 50 mL
Fecha de Emisión de Reporte : 10/01/2012
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICOQUIMICO

ANALISIS	RESULTADO		
	A	B	C
DETERMINACIÓN DE NITROGENO (%) Alimentos Cocidos De Reconstitución Instantánea. Determinación de Proteínas. Método Kjeldahl. NTP 209.262.2001	0,014	0,028	0,009

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente reporte se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO 2-B. Análisis Físicoquímico para cultivos al 10%



Urb. San José s/n.
Umacollo
Arequipa
Perú
Teléfono
+5154 251210
Anexo 1166
Telefax
251144

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD



INFORME DE ENSAYO

N° DE INFORME: ANA03A12.000460

Nombre del Cliente : CLAUDIA GOMEZ CASTILLO
Dirección del Cliente : COVISEAL C-1 PAUCARPATA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA A, CHLORELLA
MUESTRA B, HLM
MUESTRA C, SCENEDESMUS
Lote : PILOTO
Cantidad : 50 mL
Fecha de Emisión de Reporte : 10/01/2012
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICOQUIMICO

ANALISIS	RESULTADO		
	A	B	C
DETERMINACIÓN DE NITROGENO (%) Alimentos Cocidos De Reconstitución Instantánea. Determinación de Proteínas. Método Kjeldahl. NTP 209.262.2001	0,007	0,022	0,006

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente reporte se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO 2-C. Análisis Físicoquímico para cultivos al 5%



Urb. San José s/n.
Umacollo
Arequipa
Perú
Teléfono
+5154 251210
Anexo 1166
Telefax
251144

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD



INFORME DE ENSAYO

N° DE INFORME: ANA03A12.000461

Nombre del Cliente : CLAUDIA GOMEZ CASTILLO
Dirección del Cliente : COVISEAL C-1 PAUCARPATA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA A, CHLORELLA
MUESTRA B, HLM
MUESTRA C, SCENEDESMUS
Lote : PILOTO
Cantidad : 50 mL
Fecha de Emisión de Reporte : 10/01/2012
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICOQUIMICO

ANALISIS	RESULTADO		
	A	B	C
DETERMINACIÓN DE NITROGENO (%) Alimentos Cocidos De Reconstitución Instantánea. Determinación de Proteínas. Método Kjeldahl. NTP 209.262.2001	0,004	0,013	0,002

[Firma]
Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente reporte se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



ANEXO 3
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba de homogeneidad de varianzas para *Chlorella vulgaris*

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,068	2	6	0,935

Análisis ANOVA para *Chlorella vulgaris*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,207	2	0,103	11,258	0,009
Intra-grupos	0,055	6	0,009		
Total	0,262	8			



Test de Tukey para *Chlorella vulgaris*.

VAR00001	Nº	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Chlorella 5%	3	1,758267	
Chlorella 15%	3	1,924500	1,924500
Chlorella 10%	3		2,128733
Sig.		0,165	0,089

Prueba de homogeneidad de varianzas para *Scenedesmus dimorphus*.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,938	2	6	0,224

Análisis ANOVA para *Scenedesmus dimorphus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,375	2	0,187	42,900	0,000
Intra-grupos	0,026	6	0,004		
Total	0,401	8			

Test de Tukey para Scenedesmus dimorphus.

VAR00001	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Scenedesmus 5%	3	2,805033		
Scenedesmus 15%	3		3,123633	
Scenedesmus 10%	3			3,297967
Sig.		1,000	1,000	1,000



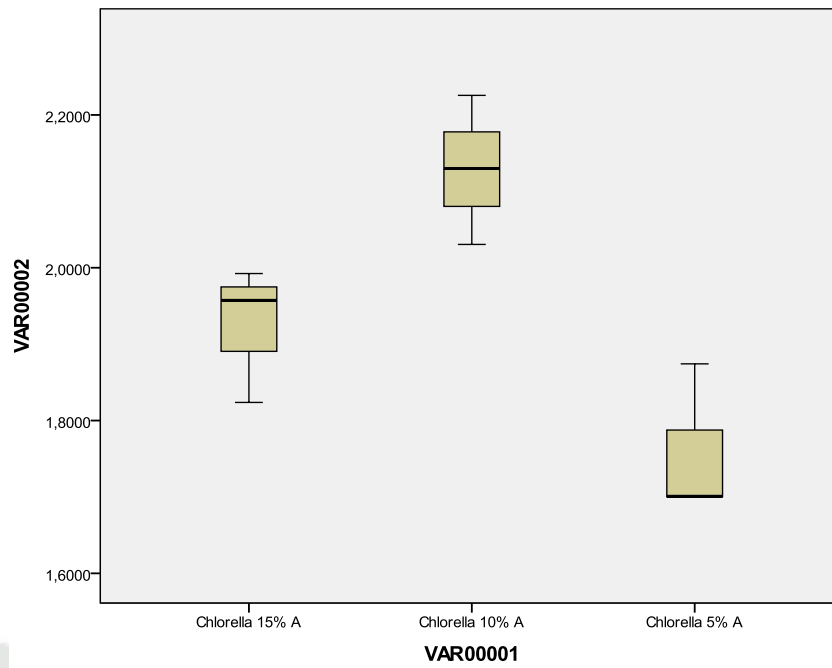


Diagrama de caja para Chlorella vulgaris.

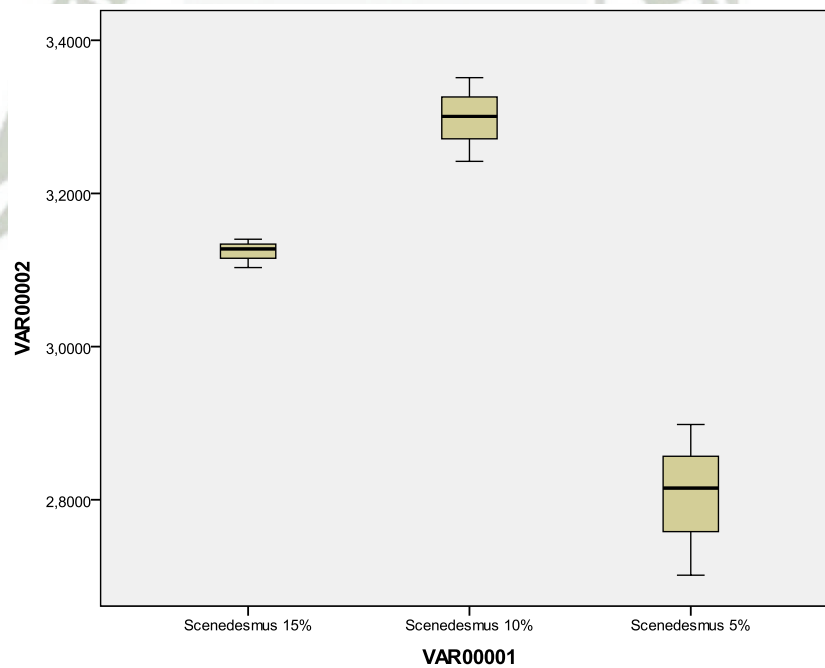


Diagrama de caja para Scenedesmus dimorphus.



ANEXO 4 PANEL FOTOGRÁFICO

Muestras tomadas de la Poza de Oxidación



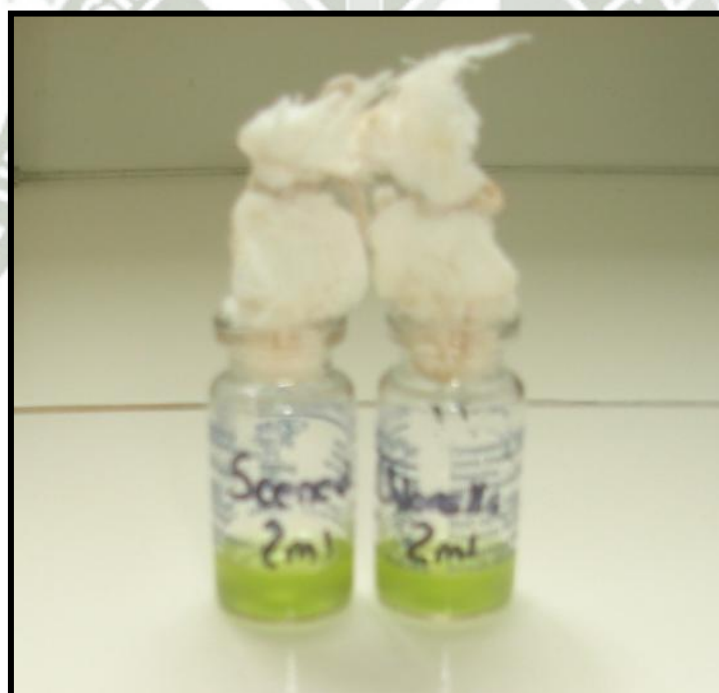
Método de aislamiento por diluciones seriadas



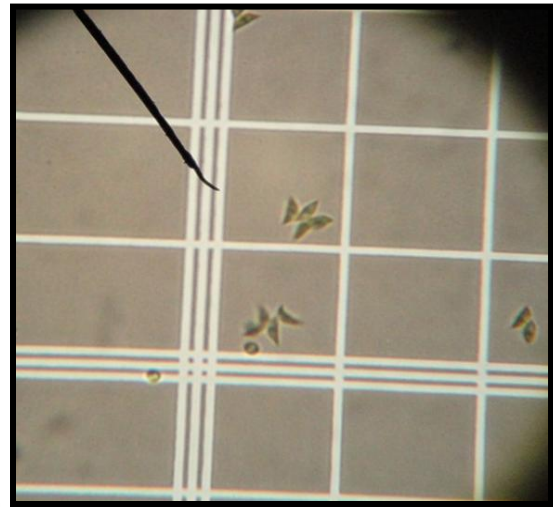
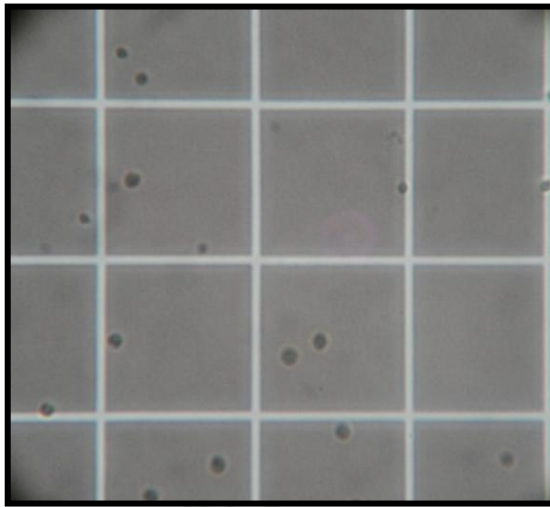
Método de aislamiento por rayado en Agar



Mantenimiento de cepas.



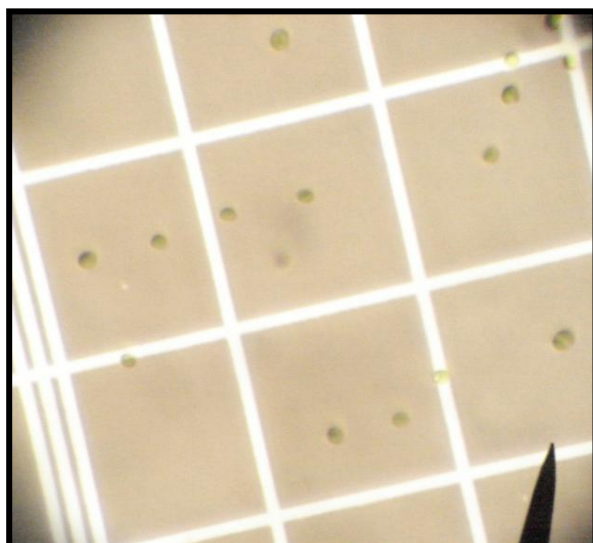
Cultivo Inicial



Conteo para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en el cultivo Inicial

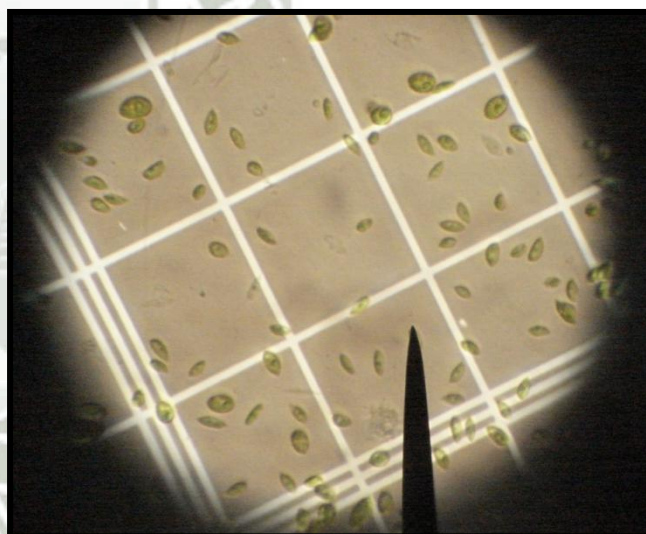
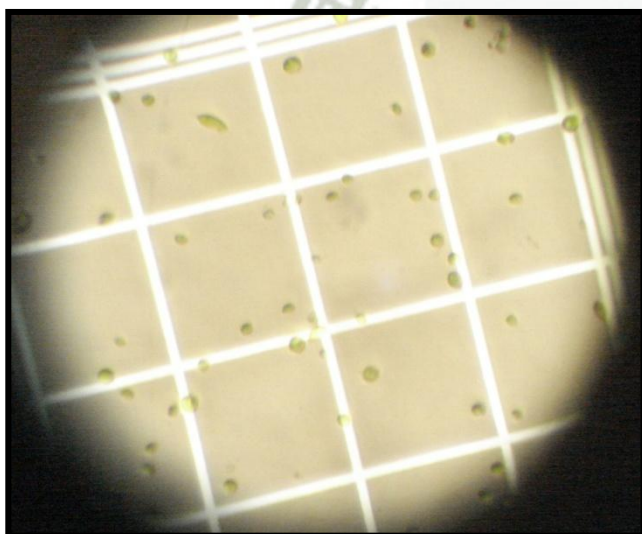


Cultivo Intermedio



Conteo para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en el cultivo intermedio

Cultivo en Raceway – AWL.



Conteo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en el Sistema Raceway AWL.

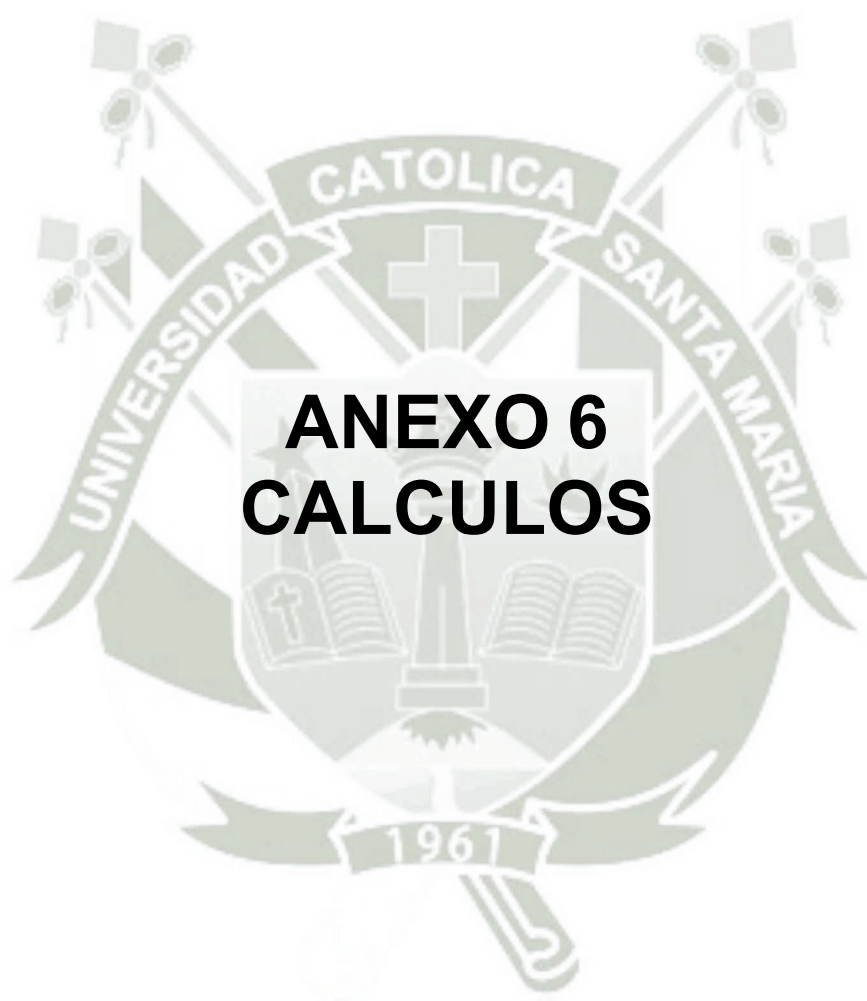


ANEXO 5
COMPOSICION MEDIO
HIDROPONICO LA MOLINA

Solución Hidropónica “La Molina”

Solución Concentrada A: (para 5.0 litros de agua, volumen final)	Pesos
Nitrato de potasio	550.0 g
Nitrato de amonio	350.0 g
Superfosfato triple	180.0 g
Solución Concentrada B: (para 2.0 litros de agua, volumen final)	Pesos
Sulfato de magnesio	220.0 g
Quelato de hierro 6% Fe	17.0 g
Solución de Micronutrientes	400 ml
Solución Micronutrientes: (para 1.0 litro de AGUA DESTILADA o HERVIDA)	Pesos
Sulfato de Manganeso	5.0 g
Ácido Bórico	3.0 g
Sulfato de Zinc	1.7 g
Sulfato de Cobre	1.0 g
Molibdato de Amonio	0.2 g





ANEXO 6 CALCULOS

Concentración de Sales Nutritivas en Medio Hidropónico

Solución A (100%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = 5 \text{ mL}$$

Solución B (100%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = 2 \text{ mL}$$

Solución A (50%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 50\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = 2,5 \text{ mL}$$

Solución B (50%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 50\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = 1 \text{ mL}$$

Solución A (15%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 15\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = 0,75 \text{ mL}$$

Solución B (15%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 15\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = 0,3 \text{ mL}$$

Solución A (10%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 10\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = \mathbf{0,5 \text{ mL}}$$

Solución B (10%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 10\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = \mathbf{0,2 \text{ mL}}$$

Solución A (5%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 5\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = \mathbf{0,25 \text{ mL}}$$

Solución B (5%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 5\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = \mathbf{0,1 \text{ mL}}$$

Solución A (0%)

$$5 \text{ mL (Sol. A)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} \rightarrow 0\%$$

$$X \text{ (Sol. A)} = \mathbf{0 \text{ mL}}$$

Solución B (0%)

$$2 \text{ mL (Sol. B)} \rightarrow 100\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} \rightarrow 0\%$$

$$X \text{ (Sol. B)} = \mathbf{0 \text{ mL}}$$



ANEXO 7 CONTEOS DE CULTIVOS

PRIMERA REPETICION 15%
(*Chlorella vulgaris*)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml	Volumen total (ml)	Microalgas totales	μ (hrs ⁻¹)	Td (hrs)
28/09/2011	28/09/2011	0	0	3	6	4	7	4	4,8	10,0	1	2.500.000,00	10.000,00	2,50E+10		
				4	7	2	4	6	4,6							
				7	6	8	10	7	7,6							
28/09/2011	29/09/2011	1	24	13	13	6	10	9	10,2	18,0	1	4.500.000,00	10.000,00	4,50E+10	0,0245	28
				10	11	5	5	15	9,2							
				14	12	10	10	6	10,4							
28/09/2011	30/09/2011	2	48	14	16	15	15	14	14,8	30,4	1	7.600.000,00	10.000,00	7,60E+10	0,0232	29,92
				17	14	13	16	15	15,0							
				15	14	15	16	15	15,0							
28/09/2011	01/10/2011	3	72	29	28	19	12	18	21,2	43,8	1	10.950.000,00	10.000,00	1,10E+11	0,0205	33,79
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
28/09/2011	03/10/2011	5	120	29	28	19	12	18	21,2	68,5	1	17.125.000,00	10.000,00	1,71E+11	0,0160	43,23
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
28/09/2011	04/10/2011	6	144	29	28	19	12	18	21,2	80,2	1	20.050.000,00	10.000,00	2,01E+11	0,0145	47,94
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
28/09/2011	05/10/2011	7	168	29	28	19	12	18	21,2	140,1	1	35.025.000,00	10.000,00	3,50E+11	0,0157	44,11
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
28/09/2011	06/10/2011	8	192	29	28	19	12	18	21,2	20,0	10	50.000.000,00	10.000,00	5,00E+11	0,0156	44,42
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
28/09/2011	07/10/2011	9	216	29	28	19	12	18	21,2	32,6	10	81.500.000,00	10.000,00	8,15E+11	0,0161	42,97
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							

SEGUNDA REPETICION 15%
(*Chlorella vulgaris*)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml	Volumen total (ml)	Microalgas totales	M (hrs ⁻¹)	Td (hrs)
10/10/2011	10/10/2011	0	0	2	6	4	7	4	4,6	11,0	1	2.750.000,00	10.000,00	2,75E+10		
				5	7	2	4	6	4,8							
				6	6	8	10	7	7,4							
10/10/2011	11/10/2011	1	24	13	13	6	10	9	10,2	17,0	1	4.250.000,00	10.000,00	4,25E+10	0,0221	31
				10	11	5	5	15	9,2							
				14	12	10	10	6	10,4							
10/10/2011	12/10/2011	2	48	14	16	15	15	14	14,8	32,1	1	8.025.000,00	10.000,00	8,03E+10	0,0243	28,53
				17	14	13	16	15	15,0							
				15	14	15	16	15	15,0							
10/10/2011	13/10/2011	3	72	29	28	19	12	18	21,2	43,8	1	10.950.000,00	10.000,00	1,10E+11	0,0205	33,79
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
10/10/2011	14/10/2011	4	96	29	28	19	12	18	21,2	69,2	1	17.300.000,00	10.000,00	1,73E+11	0,0202	34,40
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
10/10/2011	15/10/2011	5	120	29	28	19	12	18	21,2	80,2	1	20.050.000,00	10.000,00	2,01E+11	0,0173	39,95
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
10/10/2011	17/10/2011	7	168	29	28	19	12	18	21,2	143,6	1	35.900.000,00	10.000,00	3,59E+11	0,0159	43,70
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
10/10/2011	18/10/2011	8	192	29	28	19	12	18	21,2	19,0	10	47.500.000,00	10.000,00	4,75E+11	0,0153	45,20
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
10/10/2011	19/10/2011	9	216	29	28	19	12	18	21,2	30,6	10	76.500.000,00	10.000,00	7,65E+11	0,0158	43,76
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							

RCERA REPETICION 15%
(*Chlorella vulgaris*)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml	Volumen total (ml)	Microalgas totales	M (hrs ⁻¹)	Td (hrs)
24/10/2011	24/10/2011	0	0	3	6	4	7	4	4,8	9,6	1	2.400.000,00	10.000,00	2,40E+10		
				4	7	2	4	6	4,6							
				7	6	8	10	7	7,6							
24/10/2011	25/10/2011	1	24	13	13	6	10	9	10,2	16,4	1	4.100.000,00	10.000,00	4,10E+10	0,0206	34
				10	11	5	5	15	9,2							
				14	12	10	10	6	10,4							
24/10/2011	26/10/2011	2	48	14	16	15	15	14	14,8	30,4	1	7.600.000,00	10.000,00	7,60E+10	0,0232	29,92
				17	14	13	16	15	15,0							
				15	14	15	16	15	15,0							
24/10/2011	27/10/2011	3	72	29	28	19	12	18	21,2	42,6	1	10.650.000,00	10.000,00	1,07E+11	0,0201	34,44
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
24/10/2011	28/10/2011	4	96	29	28	19	12	18	21,2	67,1	1	16.775.000,00	10.000,00	1,68E+11	0,0198	34,96
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
24/10/2011	29/10/2011	5	120	29	28	19	12	18	21,2	78,7	1	19.675.000,00	10.000,00	1,97E+11	0,0172	40,32
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
24/10/2011	31/10/2011	7	168	29	28	19	12	18	21,2	143,2	1	35.800.000,00	10.000,00	3,58E+11	0,0158	43,75
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
24/10/2011	01/11/2011	8	192	29	28	19	12	18	21,2	22,5	10	56.250.000,00	10.000,00	5,63E+11	0,0162	42,74
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							
24/10/2011	02/11/2011	9	216	29	28	19	12	18	21,2	29,9	10	74.750.000,00	10.000,00	7,48E+11	0,0157	44,06
				30	32	10	24	24	24,0							
				21	16	13	20	17	17,4							

PRIMERA REPTICION 15%
(*Scenedesmus dimorphus*)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml (E2)	Volumen total (ml)	Microalgas totales	M (hrs ⁻¹)	Td
28/09/2011	28/09/2011	0	0	2	3	5	6	2	3,6	8,2	1	2.050.000,00	10.000,00	2,05E+10		
				1	2	0	5	1	1,8							
				4	4	4	2	0	2,8							
28/09/2011	29/09/2011	1	24	4	3	5	4	3	3,8	15,0	1	3.750.000,00		3,75E+10	0,0252	27,55
				4	4	2	5	5	4,0							
				4	5	5	5	4	4,6							
28/09/2011	30/09/2011	2	48	6	8	12	8	2	7,2	22,3	1	5.575.000,00		5,58E+10	0,0208	33,26
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	01/10/2011	3	72	6	8	12	8	2	7,2	35,5	1	8.875.000,00		8,88E+10	0,0204	34,06
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	03/10/2011	5	120	6	8	12	8	2	7,2	80	1	20.000.000,00	2,00E+11	0,0190	36,52	
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	04/10/2011	6	144	6	8	12	8	2	7,2	100,5	1	25.125.000,00	2,51E+11	0,0174	39,83	
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	05/10/2011	7	168	6	8	12	8	2	7,2	130,3	1	32.575.000,00	3,26E+11	0,0165	42,10	
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	06/10/2011	8	192	6	8	12	8	2	7,2	21,3	10	53.250.000,00	5,33E+11	0,0170	40,86	
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
28/09/2011	07/10/2011	9	216	6	8	12	8	2	7,2	31,5	10	78.750.000,00	7,88E+11	0,0169	41,04	
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							

SEGUNDA REPETICION 15%
(Scenedesmus dimorphus)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml (E2)	Volumen total (ml)	Microalgas totales	μ (hrs ⁻¹)	Td
10/10/2011	10/10/2011	0	0	2	3	5	6	2	3,6	9,1	1	2.275.000,00	10.000,00	2,28E+10		
				1	2	0	5	1	1,8							
				4	4	4	2	0	2,8							
10/10/2011	11/10/2011	1	24	4	3	5	4	3	3,8	15,2	1	3.800.000,00	10.000,00	3,80E+10	0,0257	26,95
				4	4	2	5	5	4,0							
				4	5	5	5	4	4,6							
10/10/2011	12/10/2011	2	48	6	8	12	8	2	7,2	20,7	1	5.175.000,00	10.000,00	5,18E+10	0,0193	35,93
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	13/10/2011	3	72	6	8	12	8	2	7,2	38,4	1	9.600.000,00	10.000,00	9,60E+10	0,0214	32,32
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	14/10/2011	4	96	6	8	12	8	2	7,2	82,5	1	20.625.000,00	10.000,00	2,06E+11	0,0240	28,82
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	15/10/2011	5	120	6	8	12	8	2	7,2	99,3	1	24.825.000,00	10.000,00	2,48E+11	0,0208	33,35
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	17/10/2011	7	168	6	8	12	8	2	7,2	138,6	1	34.650.000,00	10.000,00	3,47E+11	0,0168	41,18
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	18/10/2011	8	192	6	8	12	8	2	7,2	20,3	10	50.750.000,00	10.000,00	5,08E+11	0,0167	41,47
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							
10/10/2011	19/10/2011	9	216	6	8	12	8	2	7,2	330,2	10	825 500 000,00	10.000,00	8,26E+12	0,0278	24,96
				7	9	11	5	4	7,2							
				5	3	5	7	7	5,4							

TERCERA REPETICION 15%
(*Scenedesmus dimorphus*)

Fecha de Inóculo	Fecha Conteo	Días	Hrs	1er Cuad.	2do Cuad.	3er Cuad.	4to Cuad.	5to Cuad.	Promedio	Promedio Válido	Dilucion 1/(X)	Microalgas/ml (E2)	Volumen total (ml)	Microalgas totales	μ (hrs ⁻¹)	Td		
24/10/2011	24/10/2011	0	0	2	3	5	6	2	3,6	8,2	1	2.050.000,00	10.000,00	2,05E+10				
				1	2	0	5	1	1,8									
				4	4	4	2	0	2,8									
24/10/2011	25/10/2011	1	24	4	3	5	4	3	3,8	15,0	1	3.750.000,00		10.000,00	3,75E+10	0,0252	27,55	
				4	4	2	5	5	4,0									
				4	5	5	5	4	4,6									
24/10/2011	26/10/2011	2	48	6	8	12	8	2	7,2	22,3	1	5.575.000,00			10.000,00	5,58E+10	0,0208	33,26
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	27/10/2011	3	72	6	8	12	8	2	7,2	35,5	1	8.875.000,00				10.000,00	8,88E+10	0,0204
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	28/10/2011	4	96	6	8	12	8	2	7,2	80	1	20.000.000,00	10.000,00				2,00E+11	0,0237
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	29/10/2011	5	120	6	8	12	8	2	7,2	100,5	1	25.125.000,00		10.000,00			2,51E+11	0,0209
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	31/10/2011	7	168	6	8	12	8	2	7,2	130,3	1	32.575.000,00			10.000,00		3,26E+11	0,0165
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	01/11/2011	8	192	6	8	12	8	2	7,2	21,3	10	53.250.000,00				10.000,00	5,33E+11	0,0170
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									
24/10/2011	02/11/2011	9	216	6	8	12	8	2	7,2	31,5	10	78.750.000,00	10.000,00				7,88E+11	0,0169
				7	9	11	5	4	7,2									
				5	3	5	7	7	5,4									



**ANEXO 8
INFORMACION
COMPLEMENTARIA**

Investigaciones con Microalgas Oleaginosas como fuente de aceite

A continuación se muestran algunas investigaciones realizadas en distintas especies de microalgas, observándose resultados que se asemejan a los obtenidos en el presente trabajo.

En el 2010 el Programa de Ingeniería Química de la Universidad de Cartagena realizó una investigación a cargo de la docente Lesly Tejeda, titulada “Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella nativa* como materia prima para la producción de biodiesel”. Este trabajo tuvo como objetivo comparar la calidad y cantidad de aceite extraído de dos especies de microalgas, la halófila (*Dunaliella salina*) y una especie de agua dulce del género *Chlorella*, aislada en la Bahía de Cartagena (Colombia), con el fin de evaluar su posible integración en la producción de biodiesel. Para el cultivo de ambas especies se utilizó la misma metodología manteniendo condiciones óptimas para cada especie de pH, concentración de nitrógeno, intensidad lumínica y temperatura. La extracción del aceite se llevó a cabo por el método Bligh y Dyer, además la calidad del aceite se evaluó de acuerdo a la norma técnica colombiana. A manera de resultados, se encontró que con la *Dunaliella* se obtuvo una mayor producción de biomasa por día, sin embargo la cantidad de aceite encontrado en la *Chlorella* fue mayor. El aceite obtenido a partir de las dos especies presentó una calidad adecuada para la producción de biodiesel ambas especies de microalgas tienen unos rendimientos de mL lípidos / L cultivo muy semejantes, aunque la *Chlorella Nativa* presenta una leve ventaja.

TABLA A-1. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE EXTRAÍDO

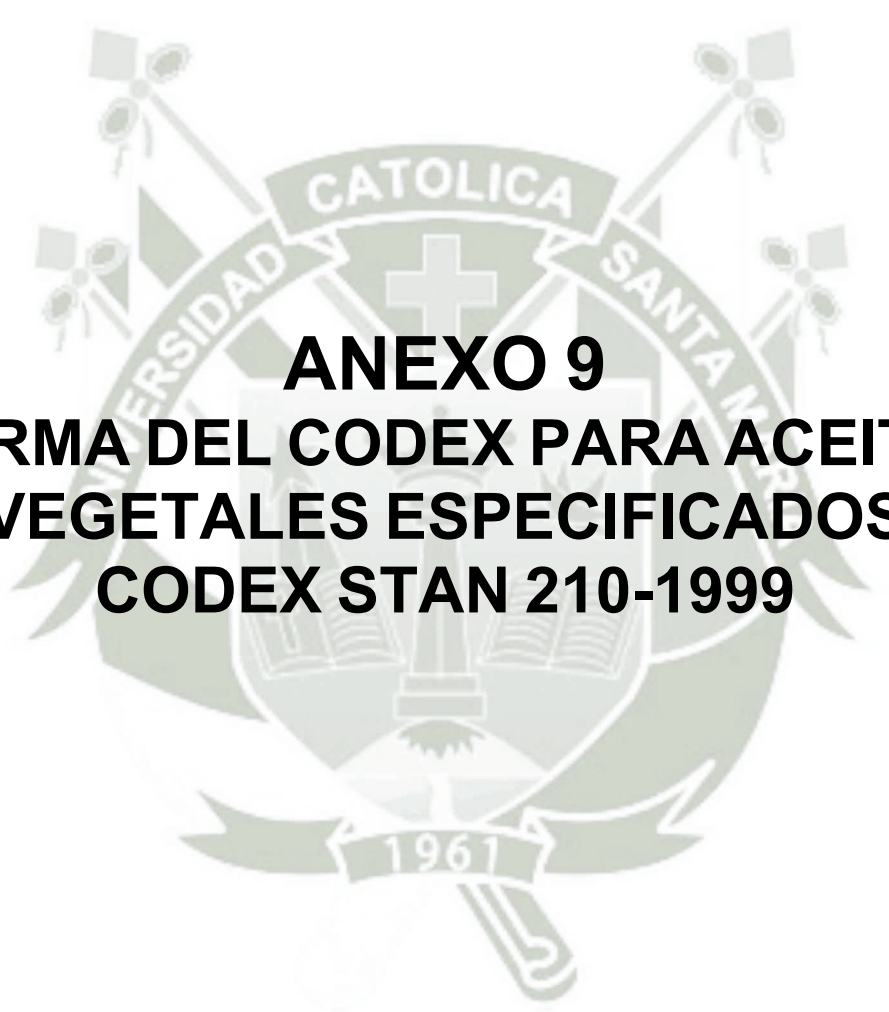
	Índice de acidez (mg NaOH/gr)	Índice de refracción (nD)	Índice de peróxido	Índice de yodo (Wijs)	Densidad (a 20°C)
<i>Dunaliella salina</i>	0.39	1459	2.5	73.5	0.8912
<i>Chlorella nativa</i>	0.16	1468	1.62	62	0.898

La Tabla A-1 nos muestra los valores obtenidos de los análisis de los aceites de los cultivos de microalgas, los cuales se encuentran en los rangos óptimos de calidad de aceite.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las experiencias, se tiene que la microalga *Dunaliella salina* crece satisfactoriamente a las condiciones de cultivo seleccionadas, logrando valores superiores a los 26 millones de células por ml, mientras que en

Chlorella nativa la cual por medio de una alta velocidad de agitación por aireación y un valor de pH inicial de 7,5 se logró inducir un ambiente donde se presentó un factor de estrés en su crecimiento, lo que se tradujo en una mayor producción de lípidos. En base a lo anterior se plantea la posibilidad de evaluar diferentes estreses que aumenten el contenido de lípidos en la microalga *Dunaliella Salina*, y diferentes condiciones de cultivo que incrementen la densidad celular de los cultivos de *Chorella Nativa*.





ANEXO 9
NORMA DEL CODEX PARA ACEITES
VEGETALES ESPECIFICADOS
CODEX STAN 210-1999

CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD

Ámbito de aplicación

La presente Norma se aplica a los aceites vegetales comestibles que se indican en la siguiente tabla en forma idónea para el consumo humano.

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

	Dosis Máxima
Materia volátil a 105°	0.2% m/m
Impurezas insolubles	0.05% m/m
Contenido de jabón	0.005% m/m
Hierro (Fe)	
Aceites vírgenes	1,5 mg/kg
Aceites vírgenes	5,0 mg/kg
Cobre (Cu):	
Aceites refinados	0,1 mg/kg
Aceites vírgenes	0,4 mg/kg
Índice de ácido:	
Aceites refinados	0,6 mg de KOH/g de aceite
Aceites prensados en frío y vírgenes	4,0 mg de KOH/g de aceite
Aceites de palma vírgenes	10,0 mg de KOH/g de aceite
Índice de peróxido:	
Aceites refinados hasta	10 miliequivalente de oxígeno activo/kg de aceite
Aceites prensados en frío y vírgenes	15 miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite

Cuadro 2: Características químicas y físicas de aceites vegetales crudos (véase el Apéndice de la Norma)

	Aceite de maní	Aceite de babasú	Aceite de coco	Aceite de semilla de algodón	Aceite de pepitas de uva	Aceite de maíz	Aceite de semilla de mostaza	Aceite de palma	Aceite de almendra de palma
Densidad relativa (x° C/agua a 20°C)	0.912-0.920 x=20°C	0.914-0.917 x=25°C	0.908-0.921 x=40°C	0.918-0.926 x=20°C	0.920-0.926 x=20°C	0.917-0.925 x=20°C	0.910-0.921 x=20°C	0.891-0.899 x=50°C	0.899-0.914 x=40°C
Densidad aparente (g/ml)								0.889-0.895 (50°C)	
Índice de refracción (ND 40°C)	1.460-1.465	1.448-1.451	1.448-1.450	1.458-1.466	1.467-1.477	1.465-1.468	1.461-1.469	1.454- 1.456 at 50°C	1.448-1.452
Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)	187-196	245-256	248-265	189-198	188-194	187-195	168-184	190-209	230-254
Índice de yodo*	86-107	10-18	6.3-10.6	100-123	128-150	103-135	92-125	50.0-55.0	14.1-21.0
Materia insaponificable (g/kg)	≤ 10	≤ 12	≤ 15	≤ 15	≤ 20	≤ 28	≤ 15	≤ 12	≤ 10
Relación de isótopo de carbono estable**									-13.71 to -16.36

* Los índices de yodo se calculan a partir de la composición de ácidos grasos con la excepción de los relativos al aceite de mostaza, oleína de palma, estearina de palma, aceite de colza y aceite de sésamo (método Wijs).

**Véanse las siguientes publicaciones:

Woodbury SP, Evershed RP and Rossell JB (1998). Purity assessments of major vegetable oils based on gamma 13C values of individual fatty acids. *JAOCS*, **75** (3), 371-379.

Woodbury SP, Evershed RP and Rossell JB (1998). Gamma 13C analysis of vegetable oil, fatty acid components, determined by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis. *Journal of Chromatography A*, **805**, 249-257.

Woodbury SP, Evershed RP, Rossell JB, Griffith R and Farnell P (1995). Detection of vegetable oil adulteration using gas chromatography combustion / isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **67** (15), 2685-2690.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1996). Authenticity of single seed vegetable oils. Working Party on Food Authenticity, MAFF, UK.

Cuadro 2: Características químicas y físicas de aceites vegetales crudos (véase el Apéndice de la Norma) (continuación)

	Oleína de palma	Estearina de palma	Aceite de colza	Aceite de colza de bajo contenido de ácido erúico	Aceite de cártamo	Aceite de cártamo (aceite oleico ato)	Aceite de sésamo	Aceite de soja	Aceite de girasol	Aceite de girasol (aceite oleico alto)
Densidad relativa (x° C/agua a 20°C)	0.899-0.920 x=40°C	0.881-0.891 x=60°C	0.910-0.920 x=20°C	0.914-0.920 x=20°C	0.922-0.927 x=20°C	0.913-0.919 x=20°C; 0.910-0.916 x=25°C	0.915- 0.924 x=20°C	0.919-0.925 x=20°C	0.918-0.923 x=20°C	0.909-0.915 x=25°C
Densidad aparente (g/ml)	0896-0.898 at 40°C	0.881-0.885 at 60°C				0.912-0.914 at 20°C				
Índice de refracción (ND 40°C)	1.458-1.460	1.447-1.452 at 60°C	1.465-1.469	1.465-1.467	1.467-1.470	1.460-1.464 at 40°C; 1.466-1.470 at 25°C	1.465-1.469	1.466-1.470	1.461- 1.468	1.467- 1.471 at 25°C
Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)	194-202	193-205	168-181	182-193	186-198	186-194	186-195	189-195	188-194	182-194
Índice de yodo*	≥ 56	≤ 48	94-120	105-126	136-148	80-100	104-120	124-139	118-141	78-90
Materia insaponificable (g/kg)	≤ 13	≤ 9	≤ 20	≤ 20	≤ 15	≤ 10	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15

* Los índices de yodo se calculan a partir de la composición de ácidos grasos con la excepción de los relativos al aceite de palma, al aceite de almendra de palma, oleína de palma, estearina de palma (método Wijs)