



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ
INFORME

**Manual para la producción de biomasa
microalgal en condiciones de invernadero**



**Octubre 2017
Callao, Perú**

MANUAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICRO-ALGAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO

MICROALGAE BIOMASS PRODUCTION MANUAL TO UNDER GREENHOUSE CONDITIONS

Alberto Oscanoa, Miguel Cervantes, Priscilla Febrero*

RESUMEN

Oscanoa A, Cervantes M, Febrero P. 2016. Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000.- El presente Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero está basado en la experiencia y resultados obtenidos durante siete años de trabajos de investigación realizados en el Laboratorio Invernadero y Sala de Procesos del Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú. Este manual presenta aspectos básicos del cultivo masivo de microalgas en tanques y biorreactores, y pretende servir de guía para el inicio del desarrollo del cultivo de microalgas. En general, este documento proporciona el marco teórico de técnicas y metodologías y su aplicación con base en las características de la infraestructura que posee el Imarpe. El manual está estructurado en secciones que detallan los diferentes procesos; donde se describe el objetivo y el alcance, los materiales requeridos, el procedimiento a realizar en forma de instrucciones numeradas, todo con la debida ilustración. Al final se agregan los Anexos, con un glosario de términos, formatos de colecta de datos, instrucciones para presentación de resultados y, referencias bibliográficas de apoyo.

PALABRAS CLAVE: Acuicultura; microalgas; cultivo; biorreactores; Perú.

ABSTRACT

Alberto Oscanoa, Miguel Cervantes, Priscilla Febrero. 2016. Microalgae biomass production manual to under greenhouse conditions. Inf Inst Mar, Per. Inf. 43(especial): 000-000 . The present Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero is based in seven years of the experiences and shows results obtained by Laboratorio Invernadero y Sala de Procesos del Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú. This manual describe basic aspects of micro algae massive culture in tanks and bioreactors, and is projected as a guide for initial develop of micro algae culture. In general, this document provides a framework of techniques and methodologies and their application grounded on the infrastructure characteristics. The work is structured in sections that detail the every processes; and remarks the objective and scope, the materials required, the procedure to be performed in the form of numbered instructions, all with proper illustration. At the end, Annexes contain a glossary, data collection formats, instructions for presentation of results and bibliographical references of support.

KEYWORDS: Aquaculture; Microalgae; culture; Bioreactors; Peru.

PRESENTACIÓN

El interés en el cultivo de microalgas para lograr cultivos masivos a fin de obtener compuestos de interés por el potencial biotecnológico que representan llevo al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) a desarrollar investigaciones en estos organismos. Con el apoyo del Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCYT) en el año 2008 se logró el acondicionamiento del Laboratorio de Invernadero y Sala de procesos, y el equipamiento del Laboratorio de Análisis Instrumental, y se iniciaron las investigaciones para la producción de biomasa

microalgal y la determinación de metabolitos de interés científico. Basados en nuestras experiencias elaboramos el Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero, donde se muestra información sobre las técnicas utilizadas en la producción de microalgas y la descripción de cada proceso.

Cada proceso se estructura en secciones; se comienza con el objetivo y el alcance para facilitar la comprensión del proceso, luego se indican los materiales que se requieren, se continúa con el procedimiento a realizar en forma de instrucciones nume-

*aoscano@imarpe.pe. Laboratorio Invernadero y Sala de Procesos del Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, del Instituto del Mar del Perú.

radas, que se complementan con figuras. De igual forma, encontrarán en este manual los Anexos, con instrucciones para expresión de resultados y formatos de llenado de datos, así como las referencias bibliográficas de apoyo. En este documento, también se proporciona el marco teórico de dichas técnicas y metodologías y su aplicación con base en las características de la infraestructura que presenta el Laboratorio Invernadero y Sala de procesos del IMARPE.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo diverso de microorganismos que presentan un amplio espectro de formas y tamaños que varían de 1 a 200 μm ; tienen pigmentos fotosintéticos como clorofila (a, b y c) y carotenos, y su forma de vida puede ser unicelular o colonial, (MADIGAN et al. 2004). Fijan más del 40% del carbón de la tierra, ofrecen a la biosfera una considerable proporción de oxígeno. Su importancia ecológica está basada en su abundancia, su extrema biodiversidad y la habilidad de sobrevivir en una variedad de ambientes (BERG et al. 2002; NORTON et al. 1996). Para su desarrollo requieren de CO_2 , nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros nutrientes menores.

El potencial de las microalgas es considerable, sobre todo si tomamos en cuenta que existen varios millones de especies, en comparación con las 250000 especies de plantas terrestres (BRENNAN y OWENDE 2010). Se han descrito hasta el momento 40000 especies de microalgas, pero solo 1% de estas han sido estudiadas para la obtención de sustancias bioactivas. Son una gran reserva de nuevos compuestos únicos e interesantes (YAMAGUCHI 1997). A mediados del siglo pasado, fue cuando realmente la biotecnología de microalgas comenzó a desarrollarse y por eso, hoy en día existen numerosas aplicaciones comerciales de las microalgas.

Sin embargo, y a pesar de las primeras expectativas, la explotación comercial de las microalgas se ha visto limitada a un número reducido de especies y a países con un gran potencial tecnológico, donde se realizan cultivos altamente tecnificados y relativamente costosos (PULZ y GROSS 2004). El cultivo de microalgas es una actividad que aún no se encuentra desarrollada, con niveles de producción limitados debido por una serie de factores (MENDOZA et al. 2011). A pesar de estas circunstancias, el cultivo de microalgas a gran escala, en grandes tanques de cultivo a cielo abierto es una actividad que ha propiciado la aparición de grandes y rentables explotaciones.

En Perú, son escasas las industrias dedicadas a esta actividad, por este motivo, el presente manual tiene por objetivo, proporcionar una guía práctica que permita establecer las nociones básicas para el manejo adecuado que requieren los cultivos de mi-

croalgas, teniendo como fuente de producción principal las especies: microalgas marinas; *Nannochloropsis oceanica*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloris maculata*, y las de agua dulce *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*, entre otras microalgas que pueden ser adaptadas al flujo de cultivo.

La metodología a aplicar en cada uno de los procesos, se basa en los trabajos de cultivo realizados durante casi siete años en el Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos (Laboratorio de Biotecnología Acuática) en sede central de IMARPE, información que se pone a disposición de todos aquellos que quieran incursionar en esta actividad. El creciente interés por invertir en esta industria en Perú, nos compromete a seguir mejorando los procesos de producción en los diferentes niveles de cultivo, lo que permitirá proporcionar información a futuro, que conlleve a una actividad menos costosa y más rentable, teniendo como base principal el mitigar cualquier impacto negativo al medio ambiente. Por este motivo el presente manual pretende servir de base para el desarrollo de la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero en la costa central y por extensión, a todo el litoral peruano, rico en lugares idóneos y en especies aptas para su cultivo.

MARCO TEÓRICO

Las microalgas han sido durante mucho tiempo objeto de un gran interés como una fuente alternativa de alimentos y sustancias bioactivas. Si bien en un primer momento fueron consideradas como una fuente de proteínas (proteína unicelular), al menos tan buena como otros vegetales y mucho más barata, los estudios realizados a lo largo de la década de los ochenta demostraron que la productividad y los costes de los cultivos intensivos de microalgas distaban de ser plenamente competitivos con la agricultura tradicional (SPOLAORE et al. 2006). En la actualidad son consideradas una fuente potencial, aún no suficientemente explorada, de sustancias bioactivas de interés en la industria alimentaria, farmacéutica y energética (CHU 2012; CLARSSON et al. 2007).

Estas sustancias alcanzan un gran valor en el mercado internacional y su demanda va en aumento al mismo ritmo que el desarrollo de la tecnología industrial, la biotecnología y la demanda internacional de nuevos medicamentos y compuestos de alimentación (SKJANES, REBOURS, & LINBLAND 2013). Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos cuyos usos potenciales aún no han sido suficientemente estudiados. Se han descrito más de 40000 especies de microalgas, sin embargo, menos del 1% ha sido sometido a trabajos de screening para la identificación de nuevas sustancias bioactivas o potenciales aplicaciones industriales o agricu-

rias (MENDOZA et al. 2011). Las microalgas constituyen una de las más importantes reservas de nuevos productos y aplicaciones, lo que justifica el alto interés que en la actualidad aún despiertan.

Los primeros trabajos sobre la explotación comercial de las microalgas datan de la década de los cincuenta del siglo pasado. Es en ese entonces cuando aparece el primer trabajo recopilatorio sobre el cultivo a gran escala de microalgas para consumo humano: Algal culture fromlaboratory topilotplant (BURLEW 1953). Desde entonces, han sido diversos los usos potenciales atribuidos a las microalgas y grandes las expectativas que se han forjado en torno a su cultivo, así tenemos, su utilización como piensos para animales, obtención de hormonas como las auxinas y giberelinas, su utilización como biofertilizantes, o en el tratamiento de aguas residuales (MENDOZA et al. 2011).

Los factores que son mencionados (MENDOZA et al. 2011) como limitantes en el cultivo de microalgas son:

- Las microalgas tienen una baja eficiencia fotosintética en condiciones de alta irradiación luminosa así como un estrecho margen de respuesta a las variaciones de irradiación, lo que repercute en tasas de crecimiento bajas y en la dificultad de optimizar su cultivo a gran escala.
- Los cultivos en grandes tanques a cielo abierto, aunque baratos y sencillos, son sumamente vulnerables a la contaminación con microdepredadores e incluso con algas oportunistas, también resultan sumamente sensibles a las variaciones de las condiciones ambientales. Esto dificulta el control y la estabilidad de los cultivos a gran escala en este tipo de sistemas, reduciendo a un escaso número las especies cultivables, aquellas altamente adaptadas a condiciones de cultivo extremas que dificultan la contaminación con organismos competidores o depredadores.
- Los sistemas de cultivos cerrados (fotobiorreactores) aunque permiten alcanzar mayores producciones resultan costosos y complejos. A la larga ven mermada su eficiencia productiva por contaminación o perdida de superficie iluminada, por efectos de adherencias orgánicas, precipitados, astillados

o arañazos o la existencia de espacios muertos de baja turbulencia o de renovación.

Para el cultivo de microalgas es necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento de cada especie en un determinado volumen. Independientemente de cada especie y el volumen al que se cultiva se puede reconocer el patrón estándar de crecimiento (fases: lag o fase de adaptación, exponencial, declinación relativa de crecimiento, estacionaria y de muerte). Además, tener en consideración lo siguiente:

SISTEMAS DE CULTIVO

Existen dos tipos básicos para la producción a gran escala de microalgas. Un tipo, son aquellos denominados sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a las condiciones ambientales externas y otros son los sistemas cerrados en los cuales los cultivos microalgaes tienen escasa o nula interacción con las condiciones ambientales externas.

Sistemas cerrados.- Los sistemas cerrados gracias a su diseño presentan una serie de ventajas respecto de los sistemas abiertos, así por ejemplo se reduce al mínimo la contaminación biológica garantizando monocultivos, permiten un mejor control sobre los parámetros físicos químicos, reducción de pérdidas de CO₂, presentan mayores productividades y además permiten producción de metabólitos complejos (PALOMINO ET AL. 2010; SHING y SHARMA 2012). Como ejemplos de sistemas de cultivos cerrados tenemos: Fotobiorreactor tubular vertical, fotobiorreactor tubular horizontal y fotobiorreactor de columna vertical (UGWU et al. 2008) (Figura 1).

Sistemas Abiertos.- Son en general los de mayor demanda en la realización de cultivos comerciales así por ejemplo tenemos lagos, lagunas y estanques tanto naturales como artificiales, la razón de su mayor empleo radica en que son menos costosos y más prácticos de construir y operar, su diseño generalmente está ligado a las condiciones y disposición de materiales locales (RICHMOND 1999; BECKER 1994; SUH y LEE 2003) (Figura 2).

PARÁMETROS DE CULTIVO:

Luz.- La luz ejerce influencia en la composición



Figura 1. Sistemas de cultivos cerrados; i) Biorreactor tubular horizontal; ii) Biorreactor tubular vertical.



Figura 2. Sistemas de cultivos abiertos; i) Estanques circular; ii) Estanques Raceways.

bioquímica, celular de las algas fotosintéticas, además promueve cambios en las propiedades ultraestructurales, biofísicas y fisiológicas, buscando aumentar el crecimiento y fotosíntesis de las microalgas (DUBINSKY et al. 1995).

El nivel de lípidos de ácidos poliinsaturados presenta una relación inversamente proporcional con el nivel de la intensidad de luz (COHEN 1999).

Temperatura.- La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes a nivel de las reacciones bioquímicas (Richmond 2003). Ejerce influencia en el grado de instauración de los lípidos, por tanto una disminución de la temperatura de crecimiento óptimo, aumenta el grado de instauración de los lípidos (NISHIDA y MURATA 1996).

pH.- Es importante para el crecimiento de las microalgas, el rango óptimo para el cultivo de las microalgas oscila entre 7 y 9 (Ho et al. 2011). Los valores de pH generan disociación de ciertas sales pudiendo tener efecto tóxico o inhibitorio para el desarrollo de las microalgas (RICHMOND 1986).

Salinidad.- La salinidad puede causar efectos negativos en el crecimiento de microalgas, una salinidad de 35% o superior puede conducir a una reducción en la tasa de crecimiento, la eficiencia de la fotosíntesis y la respiración oscura (JACOB et al. 1991). La salinidad regula el crecimiento mediante la osmosis, siendo muy variable entre microalgas, pudiendo promover efectos letales en el cultivo (BONEY 1989).

Aireación.- La aireación asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, de esta manera se generará un mayor aprovechamiento mejorando la distribución de la luz asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que sedimenten (RICHMOND 1986).

Nutrientes.- Los nutrientes son importantes para el crecimiento de las microalgas, el más importante es el carbono, cuya fuente principal es el dióxido de carbono, que representa aproxima-

damente el 50% en peso seco (CHISTI 2007); el nitrógeno representa entre 7 a 10%, en peso seco constituyendo proteínas, clorofila entre otros; el fosforo constituye el 1% en peso seco, e interviene en procesos metabólicos en las microalgas (RICHMOND 1986).

TÉCNICAS DE COSECHA DE MICROALGAS:

Las microalgas presentan diferentes tamaños, densidad y diferentes fines comerciales, por tanto la elección del método de cosecha depende de las características mencionadas anteriormente (OLAIZOLA 2003). Se cuenta con los siguientes métodos de cosecha:

Centrifugación.- Método de cosecha probablemente el más eficaz, pero a su vez el más costoso, ya que requiere de gran consumo energético (MOLINA et al. 2003; RICHMOND y BECKER 1996).

Filtración.- Es un método que precisa de abundante mano de obra y constante cambio de filtros (BECKER y VENKATARAMAN 1982)

Flotación.- Proceso de separación por gravedad, consiste en la captura de partículas mediante burbujas de aire o de gas, que luego son transportados a la superficie del líquido (ÁLVAREZ y GALLARDO 1989). CHEN et al. (1998) indican que la flotación es una técnica más beneficiosa y efectiva que la sedimentación.

Sedimentación.- Enfocada para cosecha de diatomeas, ya que para microalgas con diámetros menores que las diatomeas, la sedimentación no es rápida por tanto resulta ser poco eficaz (RICHMOND y BECKER 1986; REYNOLDS 1984).

PROCESAMIENTO DE LA BIOMASA:

Obtención de biomasa húmeda.- La concentración de las microalgas o también llamada cosecha, es una de las etapas claves para la viabilidad del proceso, pues los cultivos de microalgas son muy diluidos, del orden de 0.5 – 1 g/L, lo que dificulta mucho la recuperación de la biomasa. La elección de la técnica de cosecha depende de las características de las mi-

croalgas, por ejemplo, tamaño, densidad, y el valor de los productos de destino (OLAIZOLA 2003).

Existen diversos procesos de recolección, pasando desde procesos completamente mecánicos como la centrifugación a otros netamente biológicos como la biofloculación, además de flotación por surfactantes o floculación con polielectrolitos artificiales o naturales como el quitosano. El éxito de esta etapa depende de varios factores, entre ellos el tipo de alga, el proceso productivo, la presencia de otras algas, la velocidad de producción, etc. (OSORIO 2008). No existe un solo método genérico aplicable a todos los tipos de cultivo, sin embargo es posible afirmar que los procesos tradicionales como la centrifugación o la floculación química son recomendables si el producto que se generará es de un alto valor comercial, o si hay etapas previas de concentración (OSORIO 2008). La biomasa húmeda, puede usarse sin necesidad de secarla para obtener concentrados de aminoácidos y bioetanol, lo que repercute en una notable reducción de costos (GARCÍA et al. 2012).

Otra técnica de obtención de biomasa húmeda es por medio del método de la Separación fototáctica, la cual se basa en la capacidad que tienen algunas microalgas móviles de desplazarse hacia una fuente de luz de una determinada longitud de onda, este sistema sólo se ha realizado en tanques de pequeña superficie y algunos autores consideran que no es aplicable a mayor escala debido a la alta viscosidad del material a filtrar y por la presencia de otras partículas en el cultivo que contaminan la biomasa recogida (REDDY 2001). Un método alternativo de carácter simple y económico es la filtración por gravedad, el cual se realiza empleando filtros de arena fina, tierra de diatomeas y fibras de celulosa. El medio obtenido tras la filtración puede ser reutilizado de nuevo, cabe resaltar que las algas colapsan rápidamente el filtro, siendo necesario lavarlo con frecuencia, el coste relativo de este sistema de cosecha de células es magnitud mayor que el de la centrifugación (NURDOGAN y OSWALD 1996).

Obtención de biomasa seca.- La biomasa cosechada es un producto perecedero y debe tratarse con rapidez, para evitar su deterioro, las técnicas de la deshidratación o secado se suele utilizar para ampliar la viabilidad en función del producto final requerido.

Los métodos que han sido adaptados y desarrollados, además de ser los más utilizados son; el secado al sol que permite obtener biomasa seca con menos de 10% de humedad y biológicamente es catalogada como de buena calidad, además es el método más barato, pero las principales desventajas son los largos tiempos de secado, necesidad de grandes superficies, y el riesgo de pérdida de material (PRAKASH et al. 1997) y el secado por aspersión, el cual es utilizado para la extracción de productos de alto valor, sin embargo es relativamente caro y se corre el riesgo

de causar un importante deterioro de algunos pigmentos (DESMORIEUX et al. 2006).

Otras técnicas utilizadas son; el secado en tambores o rodillos (PRAKASH et al. 1997), es uno de los métodos de secado más eficientes en términos de consumo de energía y es muy efectivo para secar líquidos con una alta viscosidad, consiste en esparcir una capa ligera sobre la superficie exterior de un par de tambores que se encuentran girando y que están siendo calentados por dentro mediante vapor; el secado en lecho fluido (LEACH et al. 1997), implica secado, enfriamiento, aglomeración, granulación y revestimiento de los materiales en gránulos, es ideal para una amplia gama de productos sensibles y no sensibles al calor; la tecnología de secado *Refractance Window™* (NINDO et al. 2007) esta técnica ofrece una temperatura en el interior del producto de menos de 70 °C y tiempos de secado cortos, el material a secar se coloca sobre una película de plástico que es transparente a la radiación infrarroja, la película flota en la superficie de agua caliente de modo que la energía térmica para la evaporación de humedad se transfiere desde el agua caliente para el material húmedo principalmente a través de la radiación infrarroja y otras técnicas como la liofilización, es igualmente costosa, especialmente para las operaciones a gran escala, pero facilita la extracción de aceites y que los elementos intracelulares, como los aceites son difíciles de extraer de la biomasa húmeda con disolventes sin interrupción de la célula, pero se extraen más fácilmente de la biomasa liofilizada (MOLINA et al. 1994).

PROCESOS DE CULTIVO

GESTIÓN DE CULTIVOS

Objetivo.- Establecer pautas a seguir para realizar la implementación de sistemas, transporte, sembrado y mantenimiento de cultivo de microalgas a nivel masivo y en condiciones de invernadero.

Alcance.- Este procedimiento se aplica a microalgas de origen marino y continental.

Equipos.-

- Microscopio óptico binocular Leitz
- Traspalaleta de 2 TM de capacidad.
- Bomba succionadora de agua 1 HP.
- Bomba succionadora de agua 5 HP.
- Selladora con alambre de Micrón
- Contómetro celular
- Multiparámetro de campo WTW
- Sistema de esterilización por UV (biofiltro, cuños porta filtro, lámpara UV)
- Sistema de aireación
- Blower de alta presión de 3HP.
- Luxómetro

- Sistema de inyección de CO₂
- Termómetros de máxima y mínima.
- Módulo de metal para biorreactores.

Materiales

- Hipoclorito de sodio (lejía) x 2.5 L
- Lugol
- Detergente granulado x 15 kg
- Cámara Neubauer
- Tanque de fibra de vidrio de 300 L, para transporte y acopio de cultivo.
- Tanque de fibra de vidrio para siembra
- Manguera de 1" x m
- Mangueras siliconadas de 1/8" x m
- Pipetas Pasteur caja x 1000
- Portaobjetos caja x 100
- Cubre objetos
- Vial de 10 mL
- Esponja verde lavavajilla
- Guantes industriales x 1 par
- Rollo de bolsa de polietileno x 60 kg (200 bolsas)
- Módulo de metal para biorreactores
- Piedras difusoras de aire de 2 x 1.5 cm para acuario
- Plomos cilíndricos para pesca de 50 g
- Gas carbónico CO₂ x 30 kg
- Agua destilada x 1 L
- Balde plástico de 20 L
- Malla tipo talega de 1μ
- Jarras de 1 y 2 L.

IMPLEMENTACIÓN DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO

Sistema de biorreactores tubulares de 30 L.-

- a. Cortar láminas de polietileno (de 8 μm de espesor y 25 cm de ancho) aproximadamente 2.30 m de largo (Figura 3a).
- b. Forme un ojal doblando 35cm en un extremo (Figura 3b), luego proceda a sellar, repetir el sellado tres (03) veces hasta formar un ojal resistente (Figura 3c y 3d), de manera análoga se dobla 10cm del extremo opuesto de la bolsa, el sellado de preferencia realice solo dos (02) veces, al final se obtiene una bolsa de 180cm de alto y coloque por parte de los ojales en los módulos (Figura 3e).
- c. Para la implementación de un biorreactor (Modulo de cultivo) prepare y coloque 20 bolsas, además instale mangueras siliconadas de 1/8", con una piedra difusora de aire para acuario en un extremo con un plomo cilíndrico para pesca de 50 g, la manguera permitirá el ingreso de aire y CO₂.

Sistema de tanques.-

- a. Mezcle en una jarra de dos (02) litros, 100 mL de agua potable, 200 mL Hipoclorito de sodio (lejía) 4.5% P/V y 10 g de detergente industrial granulado, homogenice toda la mezcla (Figura 4a, b y c).
- b. Vierta la mezcla al tanque (Figura 4d), colóquese guante de jebe industrial y con la ayuda de esponja lava vajilla, proceda a limpiar toda la superficie interna del tanque (Figura 4e).
- c. Finalmente, enjuague con abundante chorros de agua el interior y bordes del tanque, Para la implementación del sistema de cultivos en tanque, prepare y coloque de acuerdo al volumen a cultivar, luego instale mangueras siliconadas de 1/8", con una piedra difusora de aire para acuario en un extremo con un plomo cilíndrico para pesca de 50 g, la manguera permitirá el ingreso de aire y CO₂ (Figura 4f).

TRANSPORTE Y RECEPCIÓN DE INOCULO

- a. El inoculo es proporcionado por el Laboratorio de la Sala de Microalgas (Cultivos intermedios) en tanques tipo cilindrocónicos de 250 L, antes de iniciar con el transporte, verifique la calidad del cultivo con la ayuda de un microscopio (verificar si hay presencia de protozoarios, bacterias y/o hongos) (Figura 5a).
- b. De no presentar contaminantes, proceda con el transporte, para lo cual con la ayuda de una bomba hidráulica de 0.5 Hp, trasvase el inoculo del tanque cilindrocónico al tanque de fibra de vidrio, el cual estará sobre un carro hidráulico para facilitar el transporte (Figura 5b y c).
- c. Acopie todo el inoculo en un tanque de fibra de vidrio, con el objetivo de homogenizar el cultivo (Figura 5d), finalmente tome una alícuota del inoculo, fije en Lugol y proceda con la determinación de la densidad celular por la técnica de conteo en cámara de Neubauer (de acuerdo Anexo 2).

SIEMBRA DE INOCULO

- a. Luego del acopio del inoculo proveniente de la sala de microalgas (Cultivos intermedios), proceda con la siembra de las mismas ya sea marina o de agua dulce, en biorreactores o tanques. Inicie el cultivo, llenando las bolsas de los biorreactores o tanques al 50% con agua filtrada a una micra y pasada por radiación UV, luego iguale los otros 50% con el inoculo (Figura 6). Agregue nutriente foliar Bayfolan® en la dosis 0.07 mL/L.
- b. Encienda la bomba aireadora y el sistema de inyección de CO₂, cerciorándose que cada tanque de cultivo o biorreactor tenga una correcta aeration (Figura 6b).

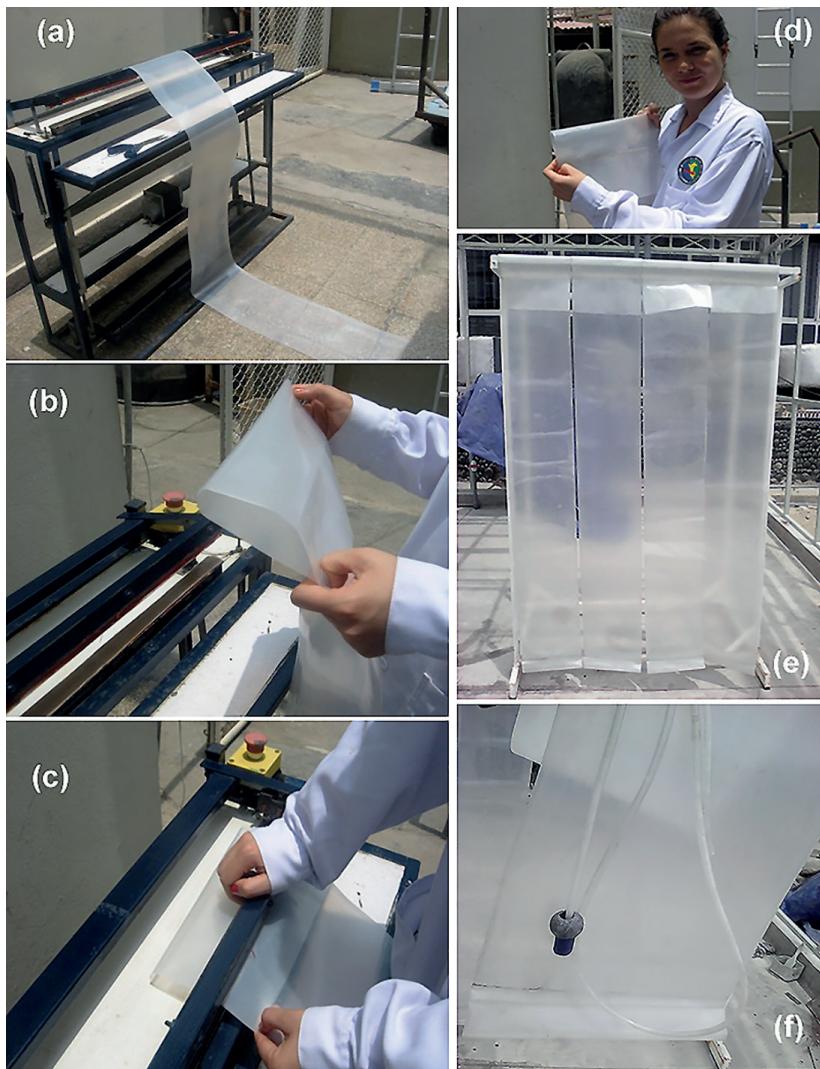


Figura 3. Implementación de biorreactores; a) Selladora y bolsa de polietileno cortada; b) Formación de ojal; c) Sellado de ojal formado; d) Forma final de ojal y sellado; e) Disposición final de los módulos, las bolsas y (f) Sistema de aireación, implementando los sistemas tipo biorreactores en condiciones de invernadero (Laboratorio de Invernadero y Sala de procesos).



Figura 4. Implementación de tanques de cultivo. a) Material necesario para realizar lavado de tanques de fibra de vidrio; b) Dilución de hipoclorito de sodio; c) Incorporación de detergente granulado; d) Vertido de solución para lavado de tanque; e y f) Lavado y enjuague de tanque de fibra de vidrio.

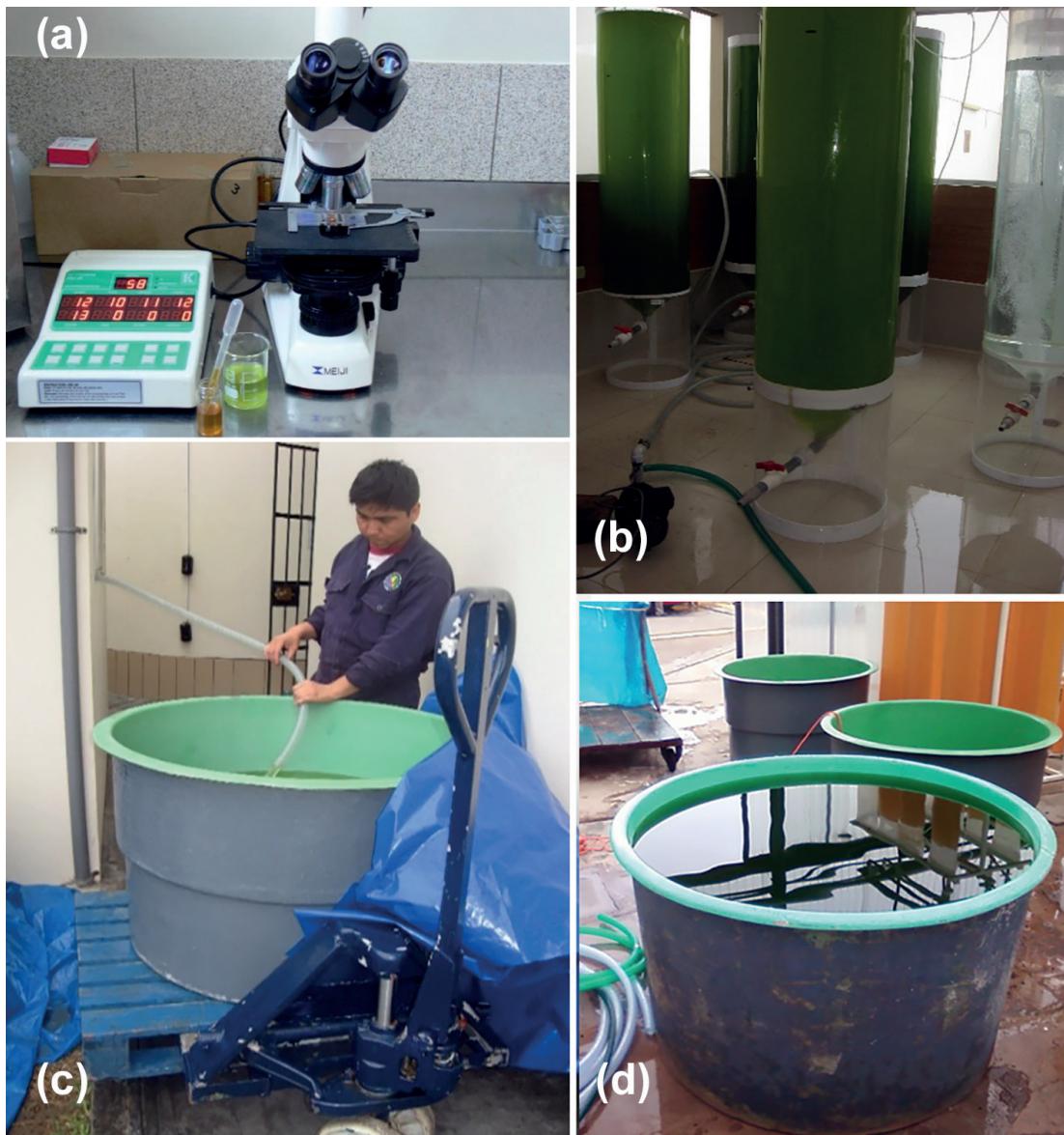


Figura 5. a) Observación microscópica y determinación de densidad celular; b) Biorreactores cilíndricos con inóculo; c) Traslado de inóculo; d) Acopio de microalgas, proveniente de la Sala de Microalgas (Cultivos intermedios) en el Laboratorio de Invernadero y Sala de procesos.

- c. Tras la siembra tome una muestra de los cultivos, fije con Lugol y proceda con el conteo celular en cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular inicial (de acuerdo Anexo 2).

MANTENIMIENTO DE CULTIVO

- a. Diariamente registre los parámetros abióticos (pH, temperatura de cultivo, oxígeno disuelto, salinidad), con el empleo de un Multiparámetro de campo WTW i305, para lo cual sumerja los sensores en el cultivo (Figura 5a y Anexo 2). Mantenga pH en 7 – 7.5 con inyección de CO₂, la temperatura no debe superar los 35 °C ni ser menor de 16 °C.
- b. También registre las condiciones medioambientales dentro de Invernadero (intensidad lumínica, radicación fotosintética activa - PAR y tem-

peratura) con el empleo de un luxómetro, un Fotómetro radiómetro y termómetros (Figura 7b, c, d y Anexo 4).

- c. Finalmente, también tome muestras del cultivo y revise parámetros bióticos (Contaminación y tamaño celular), fije con Lugol y proceda con el conteo celular en cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular diaria (de acuerdo Anexo 2).

COSECHA Y OBTENCIÓN DE BIOMASA HÚMEDA

Objetivo.-

Establecer las pautas a seguir para obtener biomasa húmeda de microalgas marinas y de agua dulce, por la técnica de centrifugación.



Figura 6. a) Siembra en los módulos de biorreactores tubulares verticales b) Siembra en los tanques de fibra de vidrio, con la adecuada aireación, cultivos realizados en condiciones del laboratorio de Invernadero y Sala de procesos.

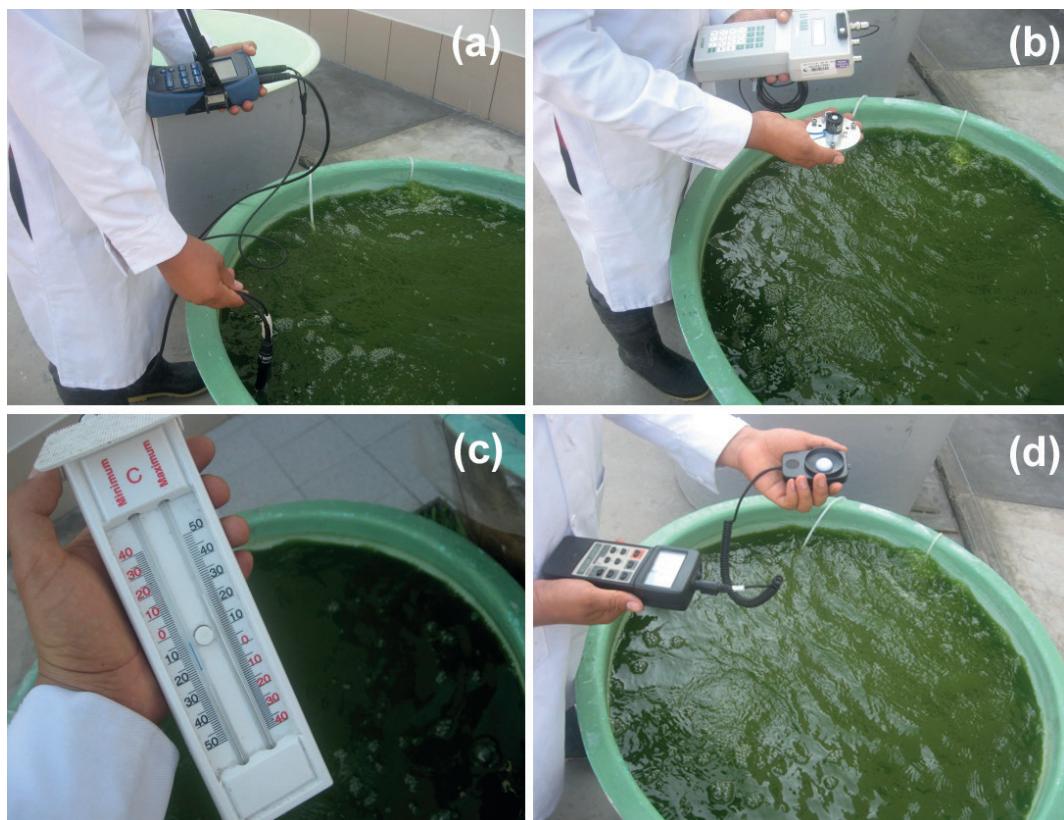


Figura 7. Medición de parámetros bióticos y abióticos; a) Medición de parámetros abióticos de cultivo; b) Medición de la radiación fotosintéticamente activa; c) Medición de la temperatura del ambiente; y d) Medición de la intensidad luminosa.

Alcance.-

Se aplica al proceso de centrifugación a cultivos microalgales marinos y continentales cultivados en condiciones de Invernadero.

Equipos y materiales

Equipos

- Centrífuga de limpieza manual GEA WESTFALIA modelo OTC2
- Bomba de succión Nemo®.
- Congeladora (Temperatura promedio -20°C).
- Balanza analítica y/o electrónica.
- Calculadora

Materiales

- Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm.
- Placa Petri de vidrio de 60 x 15; 100 x 20; 150 x 25 ó 150 x 30 mm.
- Espátula de plástico con mango de madera de 20 cm.
- Cuchara espátula de metal de 120 mm.

ACOPIO DE CULTIVOS

Acopie todo el cultivo a cosechar en un tanque de 300 ó 600 L, para lo cual puede aplicar la técnica del sifoneo (Figura 8).

ACONDICIONAMIENTO DE EQUIPO DE CENTRIFUGACIÓN

- a. Llene un recipiente de 80L de capacidad, con agua potable y coloque en las mangas de succión y de retorno de cultivo, que están conectadas a la bomba de succión Nemo ® (Figura 9), coloque la manguera de retorno en la canaleta de desagüe, encienda la bomba Nemo y empleando el variador de velocidad Allen Bardley ajústelo a una velocidad media de salida de 20 L/h, así se estará cebando y limpiando la bomba, transcurrido 3 minutos apagar.
- b. Arme la centrifuga de limpieza manual, apilando los discos en el eje del cabezal (Figura 10a), encima de ellos colocar el separador de discos y seguidamente coloque el bowl (Figura 10b).
- c. En la parte superior del bowl acople el anillo roscado (Figura 11a), para su correcto posicionamiento emplear dos llaves de gancho, con una de ellas se fija el bowl y con la segunda llave de gancho se enrosca el anillo roscado a la parte superior del bowl para lo cual se gira la llave en sentido antihorario (Figura 11b).
- d. Seguidamente coloque la campana encima del bowl (Figura 12a) y fíjela empleando las 3 tuercas de aseguramiento, para lo cual empleamos la llave de gancho, la cual presenta cuencas hexagonales (Figura 12b).

- e. En la parte superior de la campana existe una conexión empuñadora, disponer en ella la llave de gancho, la cual posee una cavidad que calza en la conexión empuñadora (Figura 13a), seguidamente introducir la llave tipo T, presione y gire la llave de gancho en sentido antihorario (Figura 13b).
- f. El armado de la centrifuga concluye al enroscar la tapa rosca en la conexión empuñadora (Figura 14).
- g. Una vez armada la centrifuga de limpieza manual, proceda a encenderla, para lo cual ubíquese en el panel electrónico de la centrifuga, gire la llave de encendido a 1 y pulse ON (Botón negro) (Figura 15a), esperar que centrifuga alcance velocidad programada (32000 rpm). Inmediatamente encienda bomba de succión, coloque manguera de succión dentro del tanque de acopio de cultivo y elimine resto de agua potable mediante recirculación por la manguera de retorno de cultivo, observe salida de cultivo, inmediatamente sumérjalo al tanque y continúe con la recirculación (Figura 15b).
- h. Coloque manguera en la llave de ingreso hacia centrifuga y abra llave de paso hacia la centrifuga.



Figura 8. Acopio de cultivos en tanques de fibra de vidrio. Flecha señala manguera de sifoneo.

ga y cierre gradualmente llave de paso de manguera de retorno de cultivo (Figura 15c), dependiendo del tipo y tamaño de las microalgas el flujo de salida de cultivo centrifugado varía entre 120 – 200 L/hora (Figura 15d).

- i. Verifique la retención de microalgas, observe la transparencia del agua de salida o tome una muestra y observe al microscopio la presencia de células.

RETIRO DE BIOMASA HÚMEDA.

- a. Prepare un envase con aproximadamente 80 L de agua potable, antes que termine de centrifugar el cultivo, cierre llave de paso de manguera que ingresa cultivo a centrifuga y realice recirculación del equipo de succión con el agua potable colectado, aproximadamente por cinco (05) minutos y apague el variador de veloci-

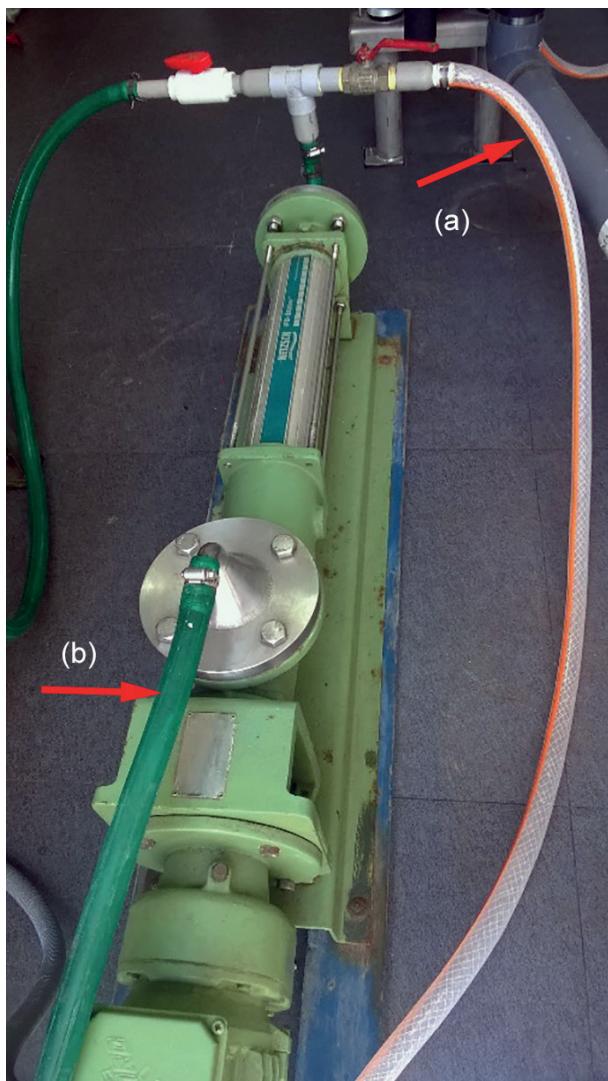


Figura 9. Disposición final de sistema de recirculación por bomba de succión. (a) Manguera de retorno de cultivo, (b) Manguera de succión centrifugación

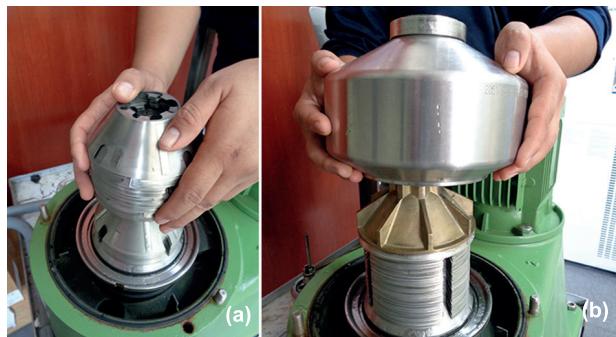


Figura 10. a) Disposición de discos sobre eje de centrifuga; b) Posición final de separador de discos y colocación de colector.

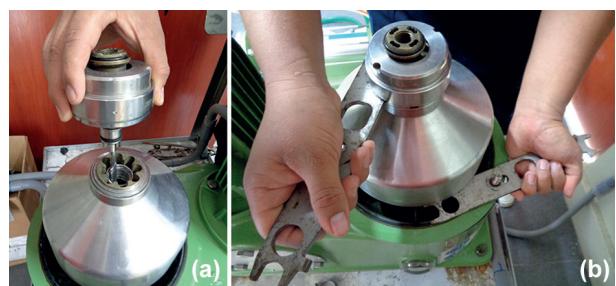


Figura 11. a) Ensamblaje de anillo enroscado a colector; b) Ajuste y posición final de colector y anillo enroscado.



Figura 12. a) Disposición de campana; b) Ajuste de tuercas de seguridad.

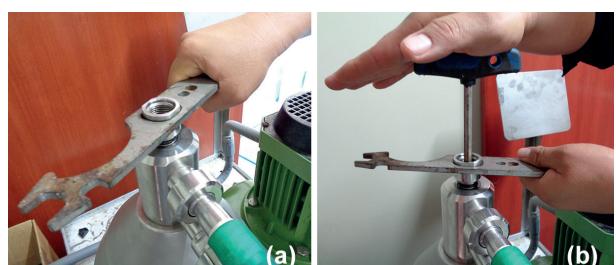


Figura 13. a) Posición correcta de llave gancho; b) Ajuste y posición final de llave gancho y llave tipo T.

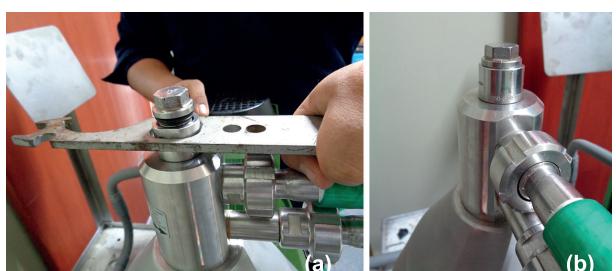


Figura 14. a) Ajuste de tapa rosca; b) Posición final de tapa rosca.



Figura 15. Proceso de centrifugación; a) A la derecha se ubica panel electrónico de la centrifuga y a la izquierda el variador de velocidad Allen Bardley; b) Sistema de recirculación de cultivo, bomba de succión Nemo® (flecha roja), tanque de acopio de cultivo para centrifugación (flecha amarilla); c) Disposición final de sistema de centrifugación, ubicación de centrifuga de limpieza manual (flecha roja), ubicación de bomba de succión (flecha amarilla), posición final de llaves de paso de sistema de recirculación e ingreso de cultivo hacia centrifuga (círculo rojo); d) Posición final de manguetas de ingreso (flecha roja) y manguetas de salida después de centrifugación (flecha amarilla).

dad, realice este procedimiento a fin de dejar limpio el equipo de succión.

- b. Cuando comience el enjuague del equipo de succión, también apague la centrifuga, pulse OFF (Botón Rojo) y gire la llave de encendido a 0, espere que el eje deje de girar. Cuando se detenga, proceda con el guardado de todas las manguetas de manera ordenada, para el desarmado de la centrifuga proceda de manera inversa al procedimiento de armado de centrifuga.

- c. Una vez realizado el desarmado, retire el *bowl* (Figura 16a), en seguida con la ayuda de una espátula retire toda la biomasa colectada (Figura 16b), esparza la biomasa colectada en recipientes, máximo espesor de 1.5 cm de altura, finalmente limpíe y lave los accesorios de la centrifuga y materiales utilizados para la colecta de la biomasa húmeda.
- d. Para terminar el proceso, pese y rotule el envase donde fue colectado la biomasa húmeda

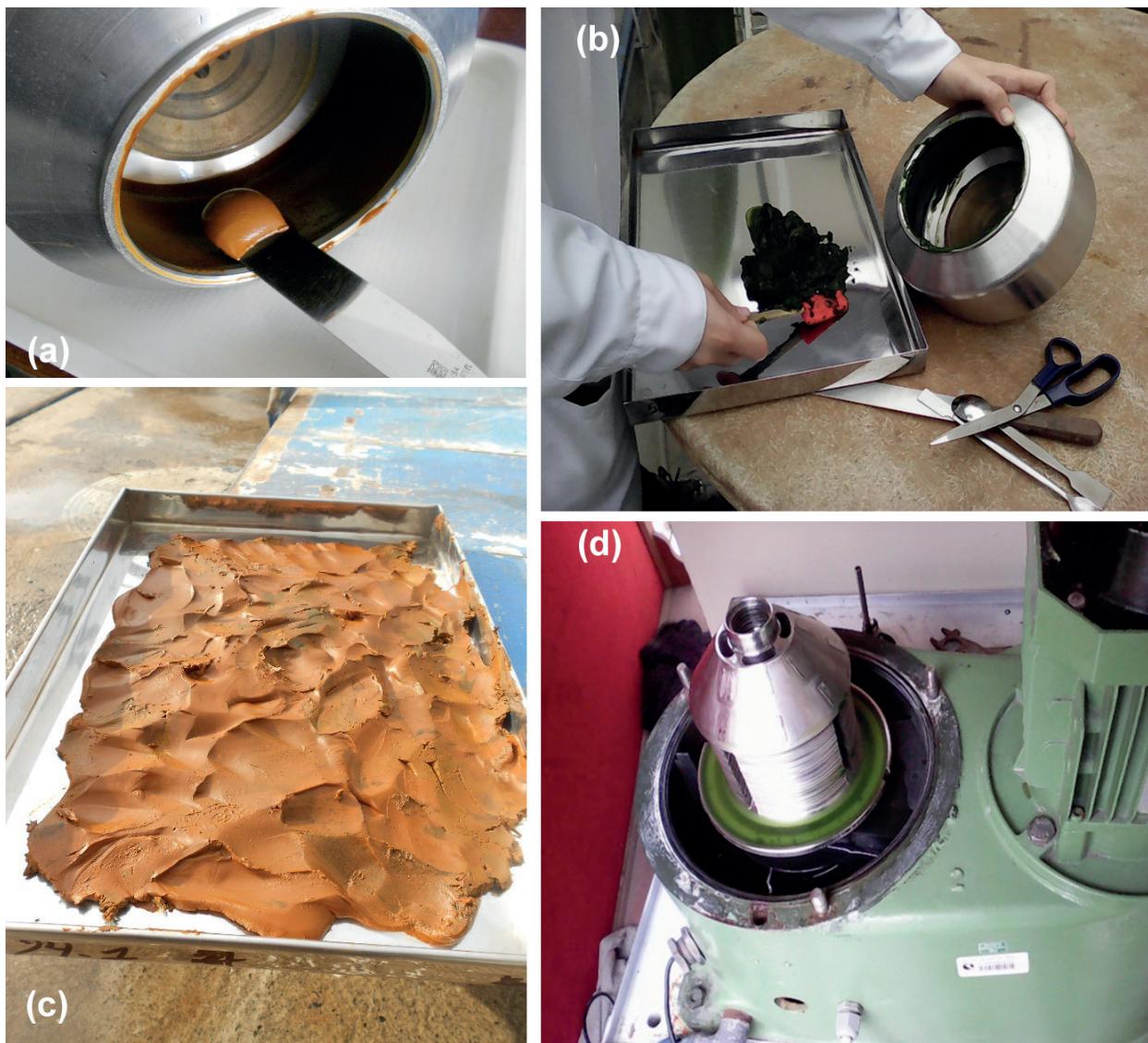


Figura 16. a) Colector *bowl* con biomasa húmeda colectado; b) Retiro de biomasa húmeda; c) Biomasa húmeda esparcida en envase (bandejas de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm); d) Limpieza de accesorios de centrifuga de limpieza manual (discos de separación).

(Anexo 5). Para su conservación y continuar con el siguiente proceso coloque el envase en una congeladora -20 °C.

SECADO Y OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA

Objetivo.-

Establecer las pautas a seguir para realizar la liofilización de la biomasa húmeda de microalgas de origen marino y continental, por el método de sublimación.

Alcance.-

Se aplica al proceso de liofilización de muestras de microalgas de origen marino y continental.

Equipos y materiales

Equipos.-

- Liofilizador LABCONCO de 18 L de capacidad (Modelo: 7755042/790480401622, incluye bomba de vacío).
- Congeladora (Temperatura promedio -20°C).
- Balanza analítica y/o electrónica.

Materiales

- Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm.
- Placa Petri de vidrio de 60 x 15; 100 x 20; 150 x 25 ó 150 x 30 mm.
- Espátula de plástico con mango de madera, 20 cm de longitud.
- Mortero C/pilón de porcelana, capacidad de 400 g.
- Bolsas plásticas con cierre hermético (De 2.5 x 2.5 a 38 x 41 cm.).

- Linterna de mano.
- Mascarilla de jebe C/Filtro para partículas.
- Guantes quirúrgicos descartables.

ACONDICIONAMIENTO DEL LIOFILIZADOR

- Antes de encender el liofilizador, limpie el cubículo del StopperingTrayDryer (Panel superior) y el colector del FreeZone (Panel inferior), con un trapo seco y suave o un pedazo de papel, asegure que las llaves (Manifolds) estén totalmente cerrados, verifique el colector, la llave central, que intercomunica ambas partes, y el sistema de vacío, de manera que no tenga ninguna fuga (Figura 17).
- Verifique que el equipo mantenga la programación establecida.
- Stoppering Tray Dryer* (Panel superior)
 - Ubíquese con DISPLAY en MANUAL.
 - LabconcoTraydry, versión 104117D
 - Modo manual, P1/Seg 1 Ramp 0.40°C/Mn, Hold -35 °C, time 12.0.

- *FreeZone ó Freeze Dry Systems 18L* (Panel inferior)
 - Presione MENU
 - LabconcoFreezdry, versión 10411E
 - Modoautomatico, Vacuum set point: 0.100 mbar, R5-232 Transmission Rate: 10 Seg.
- c. En cada proceso de liofilización, antes de iniciar, anote en formato las horas de uso tanto de *StopperingTrayDryer* y del *FreeZone* (Figura 18 y Anexo 6).
- *StopperingTrayDryer* (Panel superior): Encienda el Switch, mediante botón DISPLAY ubíquese en SET UP luego con el botón ENTER presione hasta ubicar REFRIG TOTAL HOUR y SERVICE HOUR y anote.
- *FreeZone* (Panel inferior) Encienda el Switch, presione el botón MENU hasta ubicar REFRIG TOTAL HOUR y SERVICE HOUR, presionar una vez más y anotar REFRIG TOTAL HOUR y VACUUM HOUR, las horas de VACUUM no debe exceder las 1000 horas, caso contrario reinicie conteo, presionando SELECT por 5 segundos y luego aceptar reinicio.

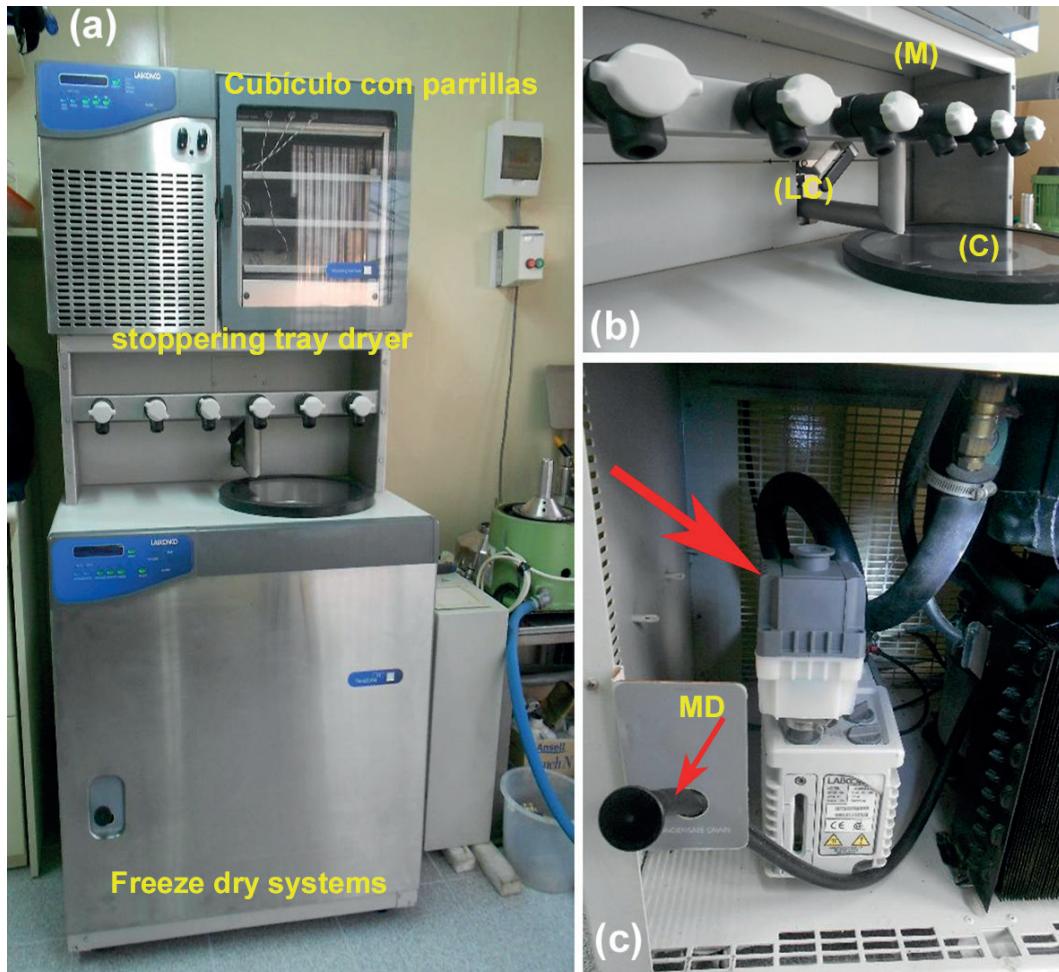


Figura 17. a) Liofilizador LABCONCO de 18 L. modelo 7755042 / 790480401622; b) Sistema de vacío, (M) Manifolds (llaves cerradas observar posición final parte lisa hacia arriba) y c) Bomba de vacío LABCONCO Modelo 195(A65412906) (M) Manguera de desagüe del colector.



Figura 18. Tableros de mando del Liofilizador LABCONCO de 18 L (Modelo 7755042/790480401622).

PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

Preparación de la muestra.-

- Es importante resaltar que el equipo tiene una capacidad máxima de dos (02) kilogramos, para procesar cualquier tipo de biomasa húmeda homogenizada, repartida entre sus tres (03) parilllas, además cada una tiene un sensor de temperatura (Figura 17a).
- Previo al proceso, registre el peso de las bandejas y/o placas Petri vacías.
- Esparsa las muestras sobre las bandejas de acero y/o placas Petri, y pese nuevamente, registre el peso obtenido.
- Verifique que el grosor de la biomasa esparsa tenga como máximo 1.5 cm de espesor (Figura 21a, b y c).
- Finalmente, congele las muestras (- 20 °C).
- Realice este proceso 24 horas antes de pasar al siguiente proceso de liofilización.

Liofilización.-

- Encienda el switch del STOPPERING TRY DRYER.
- Anote las horas de uso, y con el botón DISPLAY

ubíquese en MANUAL y con el botón PROGRAM haga descender la temperatura hasta -15°C y presione ENTER.

- Finalmente con DISPLAY ubíquese en MONITOR, observe el descenso de la temperatura. Comience con el enfriamiento presionando RUN/STOP. El modo de funcionamiento del STOPPERING TRY DRYER es manual (Led verde encendido en MAN) (Figura 19). El equipo tardará tres (03) horas hasta llegar a los -15 °C.
- Una vez encendido el panel superior, continúe con el panel inferior.
- Encienda el switch de FREEZONE, anote horas de uso, luego presione AUTO.
- Observe el descenso de la temperatura del colector, que varía entre -50 y -56 °C, luego de diez (10) minutos se activará automáticamente el vacío, VACUUM.
- Observe en el tablero el encendido de las luces ámbar y verdes, este último cuando ya todo el sistema esté con la temperatura y vacío adecuado (0.022 – 0.070 mBar).
- Todo este proceso demora treinta (30) minutos (Figura 20).

- i. Cuando la zona del STOPPERING TRY DRYER, descienda hasta -15°C, en tres (03) horas, coloque las muestras rápidamente y con mucho cuidado.
- j. Espere una (01) hora más hasta que las muestras y parrillas estén a la misma temperatura, observe el monitor.
- k. Verifique que las parrillas y muestras estén a la misma temperatura e inmediatamente abra la llave central (Abrir de derecha a izquierda), con el objetivo que comience la liofilización de las muestras, el vacío se producirá en todo el equipo (Los valores de temperatura de colector y vacío, variaran en los rangos ya descritos, durante todo el proceso) (Figura 21d).
- l. Luego de seis (06) horas, ubíquese en STOPPERING TRY DRYER, y nuevamente con el botón DISPLAY localice MANUAL y con el botón PROGRAM aumente la temperatura hasta 5 °C y presione ENTER.
- m. Finalmente con DISPLAY ubíquese en MONITOR y observe el aumento de la temperatura.
- n. Luego de catorce (14) horas, nuevamente en STOPPERING TRY DRYER y con el botón DISPLAY ubíquese en MANUAL y con el botón PROGRAM aumente la temperatura hasta 15 °C y presionar ENTER por 3 horas.
- o. Concluidas las 3 horas, aumente la temperatura (para el secado final) hasta veinticinco (25) °C por siete (07) horas.
- p. En este punto, verifique cada una (01) hora y con la ayuda de la linterna de mano, el proceso de secado la muestra.
- q. Luego de treinta y cuatro (34) horas, tiempo que demora el proceso de liofilización, inicie el apagado del equipo.
- r. En el panel inferior, FREEZONE, presione VACUUM, espere 10 segundos y presione AUTO.
- s. Abra 2 ó 3 Manifolds (Partes lisas hacia abajo) a fin de eliminar el vacío.
- t. Luego de eliminar el vacío, ubíquese en el panel superior el STOPPERING TRY DRYER y presione RUN/STOP.
- u. Con los pasos previos, se termina el proceso de liofilización de la(as) muestras.
- v. Finalmente apague ambos switch.
- w. Retire las bandejas y/o placas Petri.
- x. Con la ayuda de las espátulas remueve las muestras y páselas al mortero.
- y. En el mortero realice el homogenizado de las muestras.
- z. Pese la smuestras.
- aa. Vierta la muestra homogenizada en bolsas plásticas, con cierre hermético.
- ab. Una vez la muestra esté embolsada, pese nuevamente y anote el peso total.
- ac. Codifique y almacene la muestra para su posterior análisis.
- ad. Asegúrese que las muestras se mantengan protegidas de la humedad y la luz.
- ae. Registre los datos obtenidos en el Formato de Registro de Datos (Ver Anexo 8).



Figura 19. Tablero de mando del Stoppering TrayDryer



Figura 20. Tablero de mando del FreeZone, del Liofilizador LABCONCO DE 18 L. Modelo 7755042/790480401622.



Figura 21. a) Biomasa microalgal esparciéndose en bandeja de acero inox.; b y c) Biomasa húmeda esparcida de 2 diferentes microalgas; d) Equipo realizando proceso de liofilización (flecha roja señala la posición final de llave central, indica que vacío se realiza en todo el equipo); e) Muestras en placas Petri de 150x25 mm; f y g) Muestras liofilizadas en bandejas de acero inox de 38 x36 x3 cm; h) Homogenización mecánica de muestras; i) Muestras liofilizadas en placas Petri de 150x25 mm; j) Muestras embolsadas y rotuladas para análisis o almacenamiento y k) Colector abierto para descongelamiento del agua que fue colectado durante el proceso de liofilización (Flecha roja señala el agua captada de las muestras en estado sólido).

Control de calidad.-

- af. Verifique la calidad de la biomasa seca, realizando un análisis de humedad al liofilizado.
- ag. Emplee el método de estufa de aire caliente (50 °C) por 5 horas, hasta que el peso sea constante.
- ah. El rango de humedad aceptable para biomasa con peso superior a un (01) kilogramo, está entre 5 a 7%.
- ai. Si el porcentaje de humedad es mayor o la muestra no logre secar, proceda a congelar nuevamente y realice nuevamente la liofilización.

AGRADECIMIENTOS

El Presente trabajo se realizó dentro del financiamiento de la Asignación Presupuestal que No Resultan en Productos (APNOP 2002 – 2012), el Presupuesto por Resultados (PpR desde 2013 – 2016); también contó con el apoyo de proyectos del Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT): “Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustibles (2008); “Desarrollo de un protocolo biotecnológico para la obtención de aceite de microalgas rico en DHA utilizando biorreactores tubulares (2013)”. También, agradecemos la colaboración de Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Universidad Nacional Federico Villareal (UNFV), Universidad de la República de Uruguay (UDELAR), Universidad Nacional de Colombia. Del mismo modo a las empresas privadas GEA Westfalia S.A., Merck Millipore Corporation, INDURA Grupo AIR PRODUCTS, REFABELT EIRL., LAVAYET SAC., MAIPASAC S.R.L., SPENAFISH, quienes colaboraron en diferentes aspectos logísticos. Especial reconocimiento a la Msc. Carla Aguilar Samanamud, Directora General Científica Ejecutiva del IMARPE, por la guía y recomendaciones al trabajo. Finalmente agradecemos a Iliana Chang Ávila, Gheraldine Ynga Huaman y Claudia Illa García. Por su valiosa colaboración en los trabajos de laboratorio.

REFERENCIAS

- ÁLVAREZ COBELAS M Y GALLARDO T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las Algas. Bot. Complutensis 15: 9-60
- BECKER E. 1994. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- BECKER E. AND VENKATARAMAN L. 1982. Biotechnology and Exploitation of Algae- the Indian Approach. German Agency for Technical Cooperation, Eschborn, Germany.
- BERG J, TYMOCKO J AND STRYER L. 2002. Biochemistry. 5a Edition. W.H. Freeman. New York, 1050 pp.
- BONEY D. 1989. Phytoplankton. 2nd ed. Edward Arnold, London. 118 pp.
- BURLEW J. 1953. Algal culture, from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington.
- BRENNAN L, OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14: 557-577.
- CLARSSON A, BEILEN J, MOLLER R, CLAYTON D. 2007. Micro-and macro-algae: Utility for industrial applications. CPL Press, UK.
- CHEN M, LIU J, JU Y. 1998. Flotation removal of algae from water. Physicochemical and Engineering Aspects. 12:49-55.
- CHISTI Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. 25:294-306
- COHEN Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor Y Francis, London, 419pp.
- DESMORIEUX H, DECAEN N. 2006. Convective drying of spirulina in thin layer, Journal of Food Engineering 66 (4), pp. 497-503.
- DUBINSKY Z, MATSUKAWA R, KARUBE I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. J. Mar. Biotechnol.2, 261-265.
- GARCÍA F, JAWIARCYK N, GONZÁLEZ C, FERNÁNDEZ J, ACIEN F. 2012. Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 3(2):147-161
- JACOB A, KRIST G, WIENCKE C, LEHMANN H. 1991. Physiological-Responses of the Antarctic Green-Alga *Praisiola Crispula* Ssp *Antartica* to Salinity Stress. J. Plant Physiol. 139:57-62.
- HO S, CHEN C, LEE D, CHANG J. 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. Biotechnology Advances 29: 189-198.
- LEACH G, OLIVEIRA G, MORAIS R. 1998. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β-carotene rich powder, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20 (2) pp. 82-85.
- MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. 2004. Brock, Biología de los microorganismos. 10a Edición. Prentice Hall. 1089p.
- NINDO C, POWERS J, TANG J. 2007. Influence of Refractance Window evaporation on quality of juices from small fruits. Journal Food Science & Technology 40 (6): 1000-1007.
- NURDOGAN Y, OSWALD W. 1996. Tube settling rate of high-rate pond algae. Water Science Technology, 33: 229-241.
- MOLINA E, MEDINA A, GIMÉNEZ A, SÁNCHEZ J, CAMACHO F, GARCÍA J. 1994. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass, Journal of the American Oil Chemists' Society 71 (9) pp. 955-959.
- MOLINA E, BELARBI E, FERNÁNDEZ F, ROBLES A, CHISTI Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances. 20: 491-515.
- NISHIDA I, MURATA N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:541-568.
- NORTON T, MELKONIAN N, ANDERSEN R. 1996. Algal biodiversity. Phycologia. 35: 308-326

-
- OLAIZOLA M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomolecular Engineering*. USA 459_466.
- OSORIO P. 2008. Estudio técnico económico para la producción de biodiesel a partir de algas. Tesis de grado Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Químico. Universidad de Chile, agosto del 2008.
- PALOMINO A, ESTRADA C, LÓPEZ J. 2010. Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, PB.
- PULZ O, GROSS W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65: 635-648.
- PRAKASH J, PUSHPARAJ B, CARLOZZI P, TORZILLO, G, MONTAINI E, MATERASSI R. 1997. Microalgae drying by a simple solar device, *International Journal of Solar Energy*. 18 (4):303-311.
- REDDY S. 2001. University botany: Algae, Fungi, Bryophyta and Pteridophyta, Vol1. New Age International.
- REYNOLDS C. 1984. *Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, 184pp
- RICHMOND A. 1986. Cell response to environmental factors. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Inc., E.U.A.U.S.A. P: 69-99
- RICHMOND A. 1999. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: *Chemicals from Microalgae* (ed. Z. Cohen), pp. 353-86. Taylor & Francis, London.
- RICHMOND A. 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Ed Blackwell. Science Ltd.UK.
- RICHMOND A, BECKER E. 1986. Technological aspects of mass cultivation, a general outline. In: Richmond A, editor. *CRC handbook of microalgal mass culture*. Boca Raton: CRC Press. p. 245– 63.
- SKJANES K, REBOURS C, LINBLAND, P. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Review in Biotechnology*, 1549-7801.
- SPOLAORE P. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87-96
- SINGH R, SHARMA S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(4): 2347-2353
- SUH I, LEE C. 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(8), pp. 313-321.
- YAMAGUCHI K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*, 8, 487-502.
- UCWU C, AOYAGI H, UCHIYAMA H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.*, 99: 4021-4028.

ANEXO 1. GLOSARIO

Microalgas: Organismos microscópicos unicelulares, capaces de convertir la energía solar en energía química por medio de la fotosíntesis. Contienen numerosos compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados para usos comercial.

Biomasa: biomasa sust. (1) peso, volumen o equivalente energético total de los organismos de un área dada, (2) materiales vegetales y restos animales utilizados como fuente de combustible o de otros productos industriales; (3) en biotecnología, la materia microbiana del sistema.

Biorreactor: Son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocessos, ya sea con microorganismos, células vegetales y animales, viables o no viables. En términos generales, un Biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, concentración de oxígeno, Temperatura, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva, en función de los flujos de entrada y salida.

Densidad: Número de algas contenido en un volumen determinado de cultivo.

Inóculo: Conjunto de microorganismos que se agregan a un medio de cultivo para su crecimiento.

Centrifugación: La centrifugación separa sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza rotativa, la cual imprime a la mezcla una fuerza mayor que la de la gravedad, provocando la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad. El proceso es rápido y de gran consumo energético, la recuperación de la biomasa depende de las características de sedimentación de las células, tiempo de residencia y la solución de fondo.

Cultivo masivo: Se aplica a las especies marinas que son cultivadas en recipientes con una capacidad de volumen de 2,5; 15; 80, 1000 litros y volúmenes superiores.

Cosecha: Extracción de microalgas del recipiente de cultivo una vez que han alcanzado una densidad deseada.

Cepa: Cultivo puro de una especie determinada de microorganismos. (Manual para el cultivo de microalgas).

Siembra: Introducción de un concentrado conocido de volumen microalgal (inóculo) a recipientes con medio líquido. Esto marca el inicio de la etapa de cultivo.

Capacidad de carga: Tamaño máximo de una población de una especie biológica que el ambiente puede soportar indefinidamente en un periodo determinado.

Invernadero: Recinto cerrado, que se destina a la producción de cultivos, dotado habitualmente de una cubierta exterior translúcida de vidrio o plástico, que permite el control de la temperatura, la humedad y otros factores ambientales para favorecer el desarrollo de los organismos acuáticos de agua de mar y continental.

Bomba de succión: Encargada de proveer un caudal constante y controlado de cultivo a la centrifuga.

Liofilización: Es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

ANEXO 2. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

Para la evaluación de la densidad celular de los cultivos se emplea la técnica de conteo de Neubauer para:

Células menores a 6μ :

$$N_a = (\sum \text{Cel. } C_a / 5) * 25000$$

Células mayores a 6μ :

$$N_b = (\sum \text{Cel. } C_b / 4) * 10000$$

Dónde:

N_a y N_b = Número de células por mL (cel/mL)

$\sum \text{Cel. } C_a$ = Suma de células en la diagonal central de la cámara de Neubauer

$\sum \text{Cel. } C_b$ = Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara de Neubauer

ANEXO 3. FORMATO DE CONTROL PARÁMETROS DE LOS CULTIVOS

FECHA	Punto control (*)	HORA											
		08:00				12:00				16:00			
		pH	Oxígeno Disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	Oxígeno Disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	Oxígeno Disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)
Promedio													
	Desvest												
Promedio													
Desvest													

(*) Indica el lugar donde se toman los datos

ANEXO 4. FORMATO DE CONTROL PARÁMETROS DEL INVERNADERO

FECHA	Punto control (*)	HORA	Luminosidad (lux)	PAR ($\mu\text{mol/m}^2/\text{seg}$)	TEMPERATURA (°C)	
					Mínima	Máxima
Promedio						
	Desvest					

(*) Indica el lugar donde se toman los datos

ANEXO 5. OBTENCIÓN DEL PESO DE BIOMASA HÚMEDA

Para obtener el peso húmedo de la biomasa cosechada, emplee la siguiente formula:

$$BH = P_1 - P_2$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en gramos

P_1 = Peso total de biomasa húmeda en g (bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio+ biomasa húmeda)

P_2 = Peso de la bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio en gramos.

ANEXO 6. FORMATO DE CONTROL DE HORAS DE USO DEL LIOFILIZADOR

Fecha	FREEZONE				STOPPERING TRY DRYER		Usuario (*)	Observaciones		
	REFRIGERACIÓN		VACÍO		REFRIGERACIÓN					
	TOTAL (h)	SERVICIO(h)	TOTAL(h)	SERVICIO(h)	TOTAL(h)	SERVICIO(h)				

(*) Usuario: Persona responsable de la anotación de horas de uso del Liofilizador.

ANEXO 7. OBTENCIÓN DEL PESO DE BIOMASA SECA Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para obtener el peso seco de la biomasa húmeda, emplee las siguientes formulas:

$$BH = P_1 - P_2$$

$$BS = P_3 - P_4$$

$$T = (BS * 100 / BH)\%$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en gramos.

BS = Biomasa seca en gramos.

P_1 = Peso total de biomasa húmeda en gramos. (bandeja y/o placa petri +biomasa húmeda)

P_2 = Peso de la bandeja y/o placa petri en gramos.

P_3 = Peso total de biomasa seca en gramos. (bolsa hermética + biomasa seca)

P_4 = Peso de la bolsa hermética en gramos.

T = Porcentaje de conversión de biomasa húmeda a seca.

ANEXO 8. FORMATO DE REGISTRO DE DATOS DESPUÉS DE SECADO DE BIOMASA MICROALGAL.

Fecha de análisis	Nº de Muestra	Peso húmedo	Peso seco	% de conversión	Hora inicio liofilización	Hora fin liofilización	Usuario (**)	Observaciones

(**)Usuario: Persona responsable del encendido y/o apagado del Liofilizador.

ANEXO 9. FORMATO FINAL PARA EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO

