

IGNACIO FERRERO

MONOGRAFÍA DE GRADO

PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS COMO
ALTERNATIVA A LOS CULTIVOS CLÁSICOS

Monografía presentada a Eco_Lógicas: Concurso
Mercosur de Monografías sobre Energías Renovables y
Eficiencia Energética, promovido por el Instituto IDEAL.
Director: Dr. Alejandro R. Trombert

CARRERA: LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTA FE (3000), ARGENTINA
2011

Contacto: ferreroignacio@live.com.ar

RESUMEN

La Argentina se establece como un importante exportador dentro del mercado global de biocombustibles. Según las estimaciones dadas, en los próximos años puede esperarse que su participación como productor mundial se encuentre dentro de los primeros cinco puestos. Además, el país se encuentra entre los principales países productores y procesadores de soja y sus derivados y la industria de aceites y grasas vegetales, proveedora del principal insumo para la fabricación de biodiesel en la actualidad, se encuentra en pleno auge y desarrollo. Sin embargo, el aprovechamiento integral de la biomasa con fines energéticos ejerce una fuerte y creciente presión sobre el recurso tierra, compitiendo con la provisión de alimentos y expandiendo zonas de cultivo hacia áreas de mayor fragilidad medioambiental. La producción de biocombustible sin comprometer tierra fértil permitirá su disposición para la producción de alimentos y el aprovechamiento de las zonas marginales (no cultivables e inundables) que abundan en nuestro país, sin comprometer nuestro liderazgo como exportadores de biodiesel. Es en este contexto donde cobran importancia las microalgas, organismos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza, productores naturales de grandes cantidades de lípidos y numerosos otros metabolitos de interés ecológico e industrial. Su elevado rendimiento de aceite por hectárea en comparación con las oleaginosas y su rápida reproducción parece indicar que quien desarrolle el método para producir biodiesel a partir del aceite de microalgas a gran escala y en forma sustentable, tendrá el dominio sobre el mercado futuro del combustible. Se presentan aquí algunos esfuerzos realizados hacia el desarrollo de innovadoras herramientas que permitan diseñar una metodología lógica para el escalado de foto-bio-reactores para el cultivo de algas microscópicas productoras de aceite.

PALABRAS CLAVE: biodiesel, microalgas, foto-bio-reactores.

ABSTRACT

Argentina arises as an important exporter of bio-fuels within global market. As estimated, the country will set as one of the five best producers in the coming years. Moreover, Argentina is one of the main producer and processor of soybean and its derivatives, and the industry of oil and animal fat – the actual main raw material for making biodiesel – is in continuous development. However, using biomass for energy implies a strong pressure on the land, competing with food provision and expanding culture areas to more environmentally fragile zones. Production of bio-fuels needs to be independent of fertile ground in order to allow its disposal for food cultivation and also to take advantage of none cultivable and floodable areas that predominate in our country. This approach will also ensure the country leadership as biodiesel exporter. Is in this context where microalgae gain prominence. Such a unicellular organism is largely distributed in nature and is a natural producer of a great variety and large amount of lipids and several other metabolites of major importance in industry and ecology. Microalgae have shown a superior oil yield per hectare and a far less doubling time related to conventional oil crops. Thus, it is said that whoever develops a sustainable method to allow large-scale production will get domain over global market of biodiesel. Here, we describe some efforts made in development of novel tools to allow the design of a logical methodology for scaling-up of photo-bio-reactors for culture of oil-producing-microalgae.

KEY WORDS: biodiesel, microalgae, photo-bio-reactors.

ÍNDICE

Resumen/Abstract	iv
Introducción	1
Metodología	6
Resultados	11
Conclusión y perspectivas a futuro	15
Referencias Bibliográficas	17

INTRODUCCIÓN

La Ley nacional 26.093 (Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles) sancionada en el año 2006, establece que a partir del 2010 el gasoil para consumo debe contener al menos un 5% de biodiesel.

En Argentina, la fabricación de biodiesel a gran escala es un fenómeno reciente. Durante el 2004 y el 2007, la capacidad productiva se expandió en más de 400%, alcanzando durante el último año valores cercanos a las 2,5 millones de toneladas. Este importante incremento es producto de significativos flujos de inversión realizados por el sector en el último trienio. En última instancia, dicho fenómeno responde en gran medida —aunque no exclusivamente— a las posibilidades intrínsecas de agregación de eslabonamientos y diversificación exportadora que posee el complejo oleaginoso, el cual se encuentra principalmente radicado en la provincia de Santa Fe ([Rozenberg, 2008](#)).

Sin embargo, el desarrollo de los biocombustibles apunta actualmente al desarrollo de tecnologías que eviten la restricción de tierras y permitan el reemplazo de combustibles fósiles por una alternativa sustentable. La utilización de grandes extensiones de terreno fértil para tal fin entra en conflicto con la creciente necesidad de tierras a ser destinadas a la producción de alimentos. Según la ONU, el precio mundial de los alimentos bate records y seguirá aumentando. Un crudo más caro vuelve más competitivos a los biocombustibles extraídos de plantaciones, lo cual restringe la parte de la producción agrícola que se destina a alimentación. Y al mismo tiempo, la suba del combustible para tractores y de los fertilizantes se hace sentir sobre los precios agrícolas ([Clarín, 2011](#)). Esta situación se ve agravada en países en vía de desarrollo con fuerte dependencia del sistema agrícola como es Argentina y, particularmente, nuestra región (principal polo sojero del país).

Resulta imperativo invertir en la investigación de biocombustibles a partir de materias primas capaces de crecer en suelos marginales y desarrollarlas nacionalmente con éxito. El futuro de la Argentina reside en administrar eficientemente el uso de suelos y maximizar su potencial para la producción de alimento y también de energías sin comprometer la de alimentos ([James, 2009](#)).

En este contexto cobran importancia las oleaginosas no tradicionales como la jatropha. Su aceite puede llegar a ser una materia prima mucho más económica y por lo tanto más deseable que un aceite comestible. Desafortunadamente, presenta dificultad en cosecharla

(manualmente, requiriendo de mucha mano de obra), la pulpa excedente después de extraer el aceite no posee mucho valor comercial, por su toxicidad no puede molerse en las mismas instalaciones que se usan para oleaginosas comestibles, y sus frutos no maduran en una misma temporada sino a lo largo del año, complicando la logística y aumentando los costos laborales (James, 2009).

Las algas microscópicas con un gran rendimiento y productividad en aceite y otros metabolitos, independencia estacional y capacidad de crecer en suelos marginales parece ser la materia prima ideal. Actualmente, un cierto número de agencias gubernamentales, organismos públicos y privados, centros de investigación y casas de estudio se encuentran llevando a cabo investigaciones, desarrollos tecnológicos e inversiones sobre el cultivo de microalgas a gran escala para producción de biocombustibles. A nivel mundial se estima que son 200 las compañías que llevan adelante esta tecnología, destinando la producción de algas directamente a la obtención de energía.

Las microalgas tienen una gran importancia económica y ecológica. Son microorganismos sumamente valiosos ya que son los primeros intercambiadores biológicos de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno (O₂) en este planeta. Constituyen el grupo productor primario de biomasa más importante y son uno de los grupos ecológicos más diversos de organismos. La biomasa proveniente de algas se ha empleado históricamente como fertilizante y como fuente de alimento tanto para animales como para humanos. Las microalgas también son empleadas en algunos procesos de la ingeniería ambiental como el tratamiento biológico de efluentes y la bio-remediación. Algunas especies producen compuestos químicos muy útiles como aminoácidos, vitaminas, carotenoides, ácidos grasos, polisacáridos y antibióticos. Los avances técnicos y biotecnológicos han permitido, y permitirán aún más en el futuro, el empleo de las microalgas en áreas tan diversas como la alimentación, la industria cosmética, la industria farmacéutica (descubrimiento de metabolitos secundarios con potencialidad farmacológica), la agricultura, la acuicultura y la remediación del medio ambiente (Richmond, 2004). En cuanto a su aplicación energética, no sólo son utilizadas como materia prima para la producción de biodiesel, también para la producción de biometano (Spolaore, 2005), biohidrógeno (Melis, 2000) y bioetanol (Greenwell, 2011).

Particularmente, la producción de aceites con destino a biodiesel a partir de microalgas presenta una numerosa serie de ventajas sobre los cultivos clásicos, a saber:

i) No necesitan del suelo fértil para desarrollarse y algunas especies crecen en agua marina o salobre. Por lo tanto, su cultivo a escala industrial no compite ni por el suelo ni por el agua de riego con las agriculturas tradicionales.

ii) El cultivo de las microalgas puede realizarse en grandes volúmenes de agua, como lagunas y piletones, lo que permite sembrarlas y cosecharlas desde un punto de bombeo único.

iii) Las microalgas crecen sin fuertes restricciones climáticas o estacionarias y permiten un aprovechamiento permanente de las áreas afectadas al cultivo.

iv) Las microalgas muestran tener mayor actividad fotosintética y capacidad de fijación de dióxido de carbono (CO₂) que las plantas terrestres (Scrugg, 2002). Esto las hace potencialmente propicias para fijar el CO₂ generado por fuentes contaminantes como por ejemplo las usinas térmicas (Zeilert, 1995).

v) En su estructura presentan un alto contenido de lípidos, llegando en algunas cepas a más del 80% del peso seco, y en promedio entre el 20% y 50% (Chisti, 2007; Hu et. al, 2008). Sin embargo, esta cantidad disminuye notablemente si se considera el alto contenido de agua en la pasta de algas obtenida tras su cosecha, por lo que se necesitarán nuevas tecnologías de cosecha, extracción y transesterificación para lograr el éxito de esta aplicación.

vi) El tiempo de duplicación promedio de un cultivo de microalgas es de 24 hs, significativamente menor al correspondiente para los cultivos clásicos.

vii) Además del crecimiento autótrofo, en determinadas condiciones de cultivo algunas cepas pueden utilizar para su desarrollo fuentes de carbono orgánicas (cultivo mixotrófico) tales como el glicerol.

Este último punto merece una distinción particular, el glicerol es un subproducto de la transesterificación de los aceites vegetales y su volumen de producción es aproximadamente 100 kg de glicerol por cada tonelada de biodiesel producido. Su utilización (o comercialización) es una parte importante de la rentabilidad en la producción del biocombustible.

Aunque la producción de biodiesel utilizando aceites obtenidos a partir de microalgas se identifica como una opción tangible al problema de la escasez de combustibles, sin comprometer la provisión mundial de alimentos, es importante remarcar que hay ciertos

aspectos biológicos, técnicos y económicos que aún no están resueltos y que se necesitan descifrar e interpretar para lograr un proceso de producción eficiente y sustentable desde el punto de vista ambiental, energético y económico.

Actualmente existen sólo dos métodos prácticos de producción de microalgas a gran escala, los estanques raceway (Terry, 1985; Molina Grima, 1999) y los foto-bio-reactores (FBRs) tubulares (Molina Grima et al., 1999; Tredici, 1999; Sánchez Mirón et al., 1999). Sin embargo, las metodologías del diseño y escalamiento para FBRs están poco desarrolladas. No existe mucha información sobre las variables de diseño y operación de este tipo de reactores.

Creemos que el éxito de la aplicación de las microalgas en la producción de biodiesel requiere una correcta comprensión del complejo conjunto de variables que afectan el crecimiento celular y la producción de aceites, y de la forma en que estas se relacionan. Para ello, en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos de esta Facultad se decidió dar comienzo en el año 2008 a un proyecto grupal e interdisciplinario con el objetivo de desarrollar herramientas de simulación para el diseño, construcción y optimización de FBRs para la propagación de microalgas a escalas laboratorio y piloto. A continuación, durante el año 2011, se creó en la misma Facultad, el Grupo de Innovación en Ingeniería de Bioprocesos (GIIB) que otorga identidad a aquel proyecto. Como estudiante de la Licenciatura en Biotecnología y miembro del GIIB, me encuentro realizando la tesina -en el tema de la actual monografía- para optar por el título de grado correspondiente.

En la presente se expondrán algunos resultados obtenidos por el grupo a nivel de laboratorio como así también las proyecciones en cuanto a producción a escalas mayores, desde una perspectiva racional y aplicando metodologías técnica y económicamente sustentables.

El diagrama a continuación (Figura 1) conjuga el proceso de escalado racional (basado en herramientas computacionales de simulación de como se desarrollará), con el clásico sistema de producción de biodiesel (etapas del *downstream processing*, adaptado de Chisti, 2007).

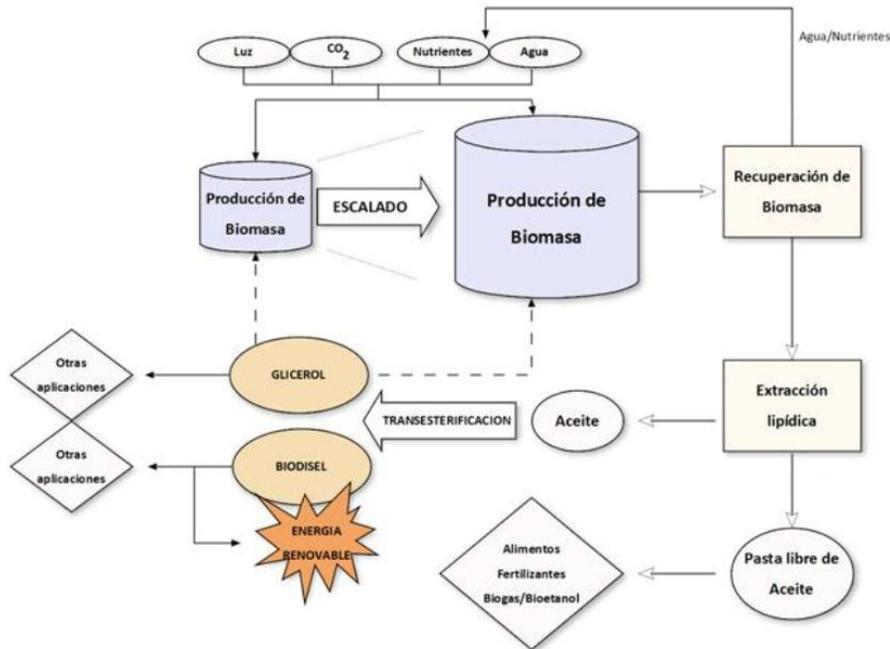


Figura 1: Diagrama del proceso de producción de biodiesel y otros productos de interés industrial a partir de microalgas.

El agua, los nutrientes, el CO₂ y la luz, son proporcionados a los sistemas de cultivo (abiertos, cerrados o híbridos) para la producción de biomasa de microalgas rica en lípidos. El CO₂ puede provenir del aire ambiente, o bien, los sistemas de cultivo pueden ser acoplados a flujos ricos en este gas procedente de emisiones industriales, tales como las de las plantas generadoras de energía eléctrica. La luz por su parte puede ser suministrada artificialmente o bien, para escalas mayores, puede aprovecharse la energía solar. La biomasa producida se separa del agua y los nutrientes residuales se recirculan hacia la etapa inicial de producción de biomasa. Los aceites se extraen a partir de la pasta de microalgas, para después transformarse en biodiesel y glicerol, mediante la reacción de transesterificación. Este esquema conceptual incluye etapas adicionales que posibilitan acoplar la producción de biodiesel al aprovechamiento de los co-productos de manera de asegurar la rentabilidad global del proceso. Es decir, del glicerol y de la biomasa microalgal libre de lípidos, ya sea directamente como insumos industriales, en la alimentación humana, animal y/o acuícola, o indirectamente a través de su transformación en productos alternos tales como biogas (por digestión anaeróbica), entre otros. La energía del biogas se puede aprovechar para la producción de biomasa en el reactor (no se muestra en la figura). La flecha cortada representa la potencial aplicación del glicerol obtenido como sustrato para la

producción de biomasa en el mismo reactor. El biodiesel puede aprovecharse directamente como fuente de energía o en forma alternativa, por ejemplo, como adyuvante en agroquímicos; una innovadora aplicación que será investigada a futuro.

METODOLOGÍA

En primera instancia se comenzó trabajando con cepas de microalgas consideradas modelo de investigación, tales como *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.* La primera fue aislada desde una laguna de la zona de la ciudad Universitaria (Santa Fe, Argentina). Teniendo en cuenta el objetivo perseguido, recientemente se adquirió una nueva cepa, *Chlorella vulgaris*, de fácil crecimiento y capaz de acumular mayores cantidades de aceite.

Para su crecimiento y propagación se diseñó y construyó un FBR anular (Figura 2). Se eligió esta geometría para maximizar el aprovechamiento de la radiación generada por la fuente de luz artificial. En el interior se ubica una lámpara fluorescente PHILIPS DAY LIGHT de 20W. Los instrumentos de medición y control están conectados a un controlador de un reactor de mesada Labforce que permite, por medio de un software computacional, registrar y controlar la temperatura, pH, presión parcial de oxígeno, y caudales de aire suministrado y de alimentación y toma de muestra.



Figura 2: FBR anular conectado al controlador Labforce para el cultivo de microalgas

Un primer paso hacia la producción sustentable y comercialización lo constituye la identificación del sistema de variables que afectan el proceso productivo y la comprensión integral de su interrelación. Se propone desarrollar innovadoras tecnologías que permitan la total comprensión del fenómeno, desde su inicio en el cultivo en FBRs, su modelado y seguimiento, hasta el final, con su escalado, producción y procesamiento; optimizando cada etapa a nivel técnico y económico.

UPSTREAM PROCESSING: OPERACIÓN DEL FBR Y CRECIMIENTO CELULAR.

Densidad Óptica (DO). Con la finalidad de poder seguir la evolución de los cultivos, suele emplearse como parámetro de referencia la DO de los cultivos, debido a su fácil y rápida determinación y a que se utilizan pequeños volúmenes de muestra lo cual permite no alterar en forma significativa el volumen de los FBRs operados en forma discontinua. Debido a la proporcionalidad de la medida de DO con otros parámetros de interés, como la biomasa y el número de individuos, será posible correlacionar estas últimas magnitudes con sus DO correspondientes, a través de la obtención de curvas de calibrado que los relacionen. Si bien es cierto que los espectros de absorción de los pigmentos que poseen las microalgas tienen sus máximos de intensidad de absorción alrededor de los 430 y 660 nm (clorofila-a) y 450 y 640 (clorofila-b), deberán elegirse longitudes de onda no necesariamente situadas sobre los picos de absorción. Esto se debe a que las concentraciones de los pigmentos varían marcadamente en función de las condiciones de cultivo, haciendo que la proporcionalidad entre la biomasa y la DO sea muy fluctuante al realizar las mediciones en las longitudes de onda correspondientes a los picos de absorción de las clorofilas (Rocha et al, 2003). Para las determinaciones aquí presentadas, la longitud de onda seleccionada fue 540 nm.

Biomasa total. Teniendo en cuenta la finalidad científica y tecnológica del proyecto, un parámetro sumamente relevante para el seguimiento de las experiencias lo constituye la determinación de biomasa. Se optó por la utilización de una técnica gravimétrica, debido a la simplicidad y exactitud del método, que consiste básicamente en el filtrado de volúmenes exactos y conocidos de suspensiones de microalgas a las cuales se les desea determinar su biomasa. Así, se busca retener los sólidos suspendidos totales (SST), y luego a través de secados sucesivos, en estufa primero y mufla después, determinar los sólidos suspendidos fijos (SSF) y los volátiles (SSV). Entre las desventajas que podemos reseñar de estas técnicas están la elevada demanda de tiempo y el alto volumen de muestra que se requiere para el procesado de réplicas. Por esta razón también es muy útil realizar curvas de calibrado que relacionen la biomasa con otro parámetro más simple de determinar como la DO.

Medio de cultivo. Una de las variables más complejas en este sistema productivo es la composición del medio de cultivo (generalmente salino). Se encuentra íntimamente

relacionada con otras variables operativas y fisicoquímicas importantes: pH, temperatura y concentración de CO₂.

Varios estudios demuestran la importancia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento celular; regulando tanto la velocidad de propagación como la composición final de la biomasa. Dos variables de gran trascendencia son la concentración de CO₂ y el pH del medio de cultivo. Ambas variables afectan particularmente al crecimiento celular, el primero por ser la fundamental fuente de carbono y el segundo limitando el desarrollo microbiano a un rango óptimo. Sin embargo, el tratamiento de estas variables no puede realizarse de manera independiente: el CO₂ disuelto en agua participa de equilibrios ácido-base, capaces de influir sobre el pH del medio de cultivo. En este contexto, es importante tener una herramienta que permita predecir la influencia en el desarrollo del cultivo de las variables anteriormente citadas. Para eso, desarrollamos un modelo de simulación computacional que permite conocer, *a priori*, la composición de medios de cultivos (variable dinámica) en función de su formulación original.

Contar con un método de simulación y predicción permite analizar cada variable en forma individual, y controlar cuáles y en qué magnitud se modifican en cada una de las condiciones de cultivo propuestas; transformándose en este caso, en una herramienta útil al diseñar racionalmente el medio de cultivo adecuado según el objetivo perseguido.

Para las diferentes simulaciones, se recurrió al empleo de Algoritmos Genéticos (AGs). Los AGs son métodos matemáticos estocásticos de optimización y búsqueda global. En contraste con los métodos determinísticos tradicionalmente usados, no requieren excesiva manipulación matemática de la estructura de la función objetivo ni de las condiciones de contorno y representan una herramienta muy útil en sistemas no lineales.

A partir de los equilibrios involucrados en la solución que constituye un medio típico de propagación de microalgas como el BG-11 (medio salino), el cual constituye un sistema complejo bifásico (fases gaseosa y líquida) multicomponente (38 especies iónicas y moleculares), y de sus respectivas constantes de equilibrio, se planteó un sistema de ecuaciones (algebraicas y diferenciales) para describir la distribución de concentraciones de cada especie presente. Para las diversas reacciones de equilibrio ácido-base de la forma $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$, con $K_{ac} = a_{A^-} a_{H^+} / a_{AH}$; el AG se utilizó para obtener los valores de concentración de cada especie presente en el medio de cultivo. Para el cálculo del error asociado a cada

conjunto de valores se plantearon las siguientes restricciones: $K_{ac} - (a_A \cdot a_{H^+} / a_{AH}) = 0$ y $C_{AH}^T - [A^-] - [AH] = 0$ (donde C_{AH}^T es la concentración formal del AH); las reacciones de formación de complejos fueron tratadas de manera equivalente. El cálculo de la concentración de $CO_2(aq)$ se basó en la ley de Henry suponiendo comportamiento ideal. Por último, los coeficientes de actividad se obtuvieron mediante la aplicación de la ecuación de Debye-Hückel. La fidelidad de los resultados del modelo se verificó experimentalmente mediante comparación con medidas de pH.

Luz. Otra variable de elevada relevancia y complejidad es la intensidad y la calidad de la luz. En cultivos densos de microalgas, la penetración de la luz se dificulta por el *self shading* y por la absorción de la luz. En el primer caso, las mismas algas se “eclipsan” unas a otras dificultando la posibilidad de que todas estén expuestas a una misma intensidad de radiación. En el segundo caso, las algas, a través de sus pigmentos (principalmente las clorofilas) absorben parte de la radiación recibida. En consecuencia, dentro del reactor existen zonas con diferentes niveles de iluminación. Debido a esta razón, es necesario asegurar una disponibilidad de luz uniforme en todo el medio, brindándoles a las microalgas una intensidad de luz suficiente como para evitar estos fenómenos. Para lograr esto, es necesario lograr una mezcla perfecta dentro del reactor a través de una agitación eficiente, permitiendo así que todas las microalgas tengan la misma probabilidad de encontrar un fotón en cualquier punto del reactor. Existe también un límite superior de intensidad de radiación, por encima del cual aparece el efecto de la fotoinhibición, el cual disminuye la productividad de los cultivos, debido a la saturación y daño provocado en el foto-sistema II, uno de los componentes principales que intervienen en la fotosíntesis (Richmond, A., 2004).

Para el análisis de esta variable se propusieron cuatro condiciones experimentales: 24 hs luz con la lámpara desnuda, 24 hs luz con la lámpara recubierta con un filtro, 12 hs luz/12hs oscuridad con la lámpara desnuda, 12 hs luz/12hs oscuridad con la lámpara recubierta con un filtro. La selección de estos fotoperíodos se hizo pensando en un futuro escalamiento del reactor, en el cual la fuente de radiación utilizada fuera el sol y en función de los períodos de luz/oscuridad típicos de nuestra región.

El filtro al que se hace mención es de densidad neutra y rodea a la lámpara. El filtro de densidad neutra no altera la distribución espectral de la radiación emitida, sino que sólo disminuye la intensidad de la radiación que pasa a través del mismo.

DOWNSTREAM PROCESSING: EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE

Contenido de lípidos. Para la determinación de lípidos se comenzó a trabajar primeramente con el método de Bligh y Dyer ([Bligh y Dyer, 1959](#)), que es uno de los métodos más utilizados para la determinación de lípidos en una gran variedad de tipos de muestras incluyendo las microalgas ([Chan et al, 2010](#)). Sin embargo, de acuerdo con nuestra experiencia y con lo visto en la literatura, el principal inconveniente que presentan las muestras provenientes de estos microorganismos es el pre-tratamiento necesario para poder liberar los lípidos de las células, lo cual implica alguna metodología de disrupción celular ([Yon et al., 2010](#); [Ranjan et al, 2010](#)). Nuevamente aquí nuestro enfoque de trabajo no sólo está planteado desde el diseño de FBRs, sino desde la Ingeniería de Bioprocesos, que interviene no sólo en el binomio reacción-reactor sino que también en lo que se refiere al procesamiento *downstream*, contemplando las diferentes operaciones y bioseparaciones a las que será sometido el material. Para las operaciones de extracción de los lípidos, las muestras a tratar se obtienen luego de centrifugar (o decantar) las suspensiones de microalgas obtenidas al finalizar las distintas corridas experimentales. Lo que se obtiene es una especie de “pasta” de algas con la cual se ensayarán distintos métodos para lograr la disrupción celular. Se probaron primeramente los siguientes métodos: ultrasonido (a bajas frecuencias, 18-40kHz), esterilización en autoclave (121°C, 1 atmósfera, durante 20 minutos), congelamiento (-80°C en freezer por 48 horas, y a -20°C durante 48 horas, en ciclos alternados) e hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 1M, y calentando en baño con agua a 100°C durante 30 minutos). Luego de realizar los correspondientes pre-tratamientos, se procedió a la determinación de los lípidos totales en base seca a través del método mencionado anteriormente, comparando los rendimientos obtenidos en cada caso.

El método de procesamiento previo “húmedo” consiste en centrifugar las muestras en un mismo tubo, a 2500 rpm durante 10 minutos. Luego se resuspende el centrifugado en agua destilada hasta un volumen exacto, y se fragmenta en volúmenes iguales para obtener las

alícuotas deseadas. A partir de este volumen de agua se agregan las fracciones de metanol y cloroformo correspondientes según la técnica de Bligh & Dyer.

El método de procesamiento previo “seco” consiste en centrifugar toda la muestra, a 2500 rpm durante 10 minutos, y luego secar totalmente en estufa a 100°C durante 6 horas. La muestra seca se pulveriza exhaustivamente en mortero y luego se fracciona gravimétricamente en balanza analítica para obtener muestras iguales. A partir de esta muestra sólida se agregan los volúmenes de agua destilada, metanol y cloroformo correspondientes según la técnica de Bligh & Dyer.

Para obtener una referencia empírica de la capacidad disruptiva de cada método, se recurrió al Ensayo de exclusión del Azul Tripán. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas intactas que impiden el acceso de colorantes como el Azul Tripán, mientras las células muertas no.

También se están poniendo a punto otras metodologías para la determinación de lípidos (Por ejemplo, Tinción por Rojo de Nilo).

RESULTADOS

UPSTREAM PROCESSING: OPERACIÓN DEL FBR Y CRECIMIENTO CELULAR.

Simulación de la variación del pH de medios de cultivos típicos para cultivo de microalgas.

Se analizó la influencia de dos variables sobre el pH del medio: presión de CO₂ y concentración inicial de Na₂CO₃ en el medio de cultivo. Los gráficos 1 y 2 muestran, para dos niveles de presión de CO₂ (atmosférica: 0.25 mmHg y enriquecida en 0,5%: 3,8 mmHg), la variación del pH en función de concentraciones crecientes de Na₂CO₃. El gráfico 3 relaciona el pH del medio BG-11 (respetando la concentración original de Na₂CO₃) con el aumento de la concentración de CO₂ en la fase gaseosa, variando su presión parcial entre 0 y 128 mmHg. Finalmente, en el gráfico restante se construyeron isolíneas de pH, donde se muestran las combinaciones de Na₂CO₃ y pCO₂ necesarias para obtener distintos valores de pH (6,5; 7,5 y 8,5).

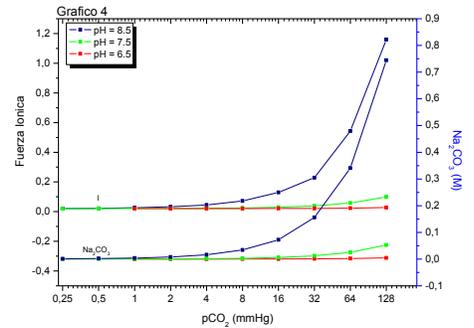
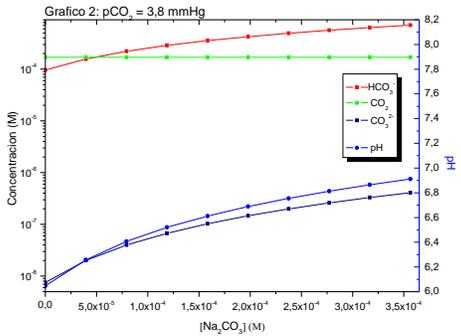
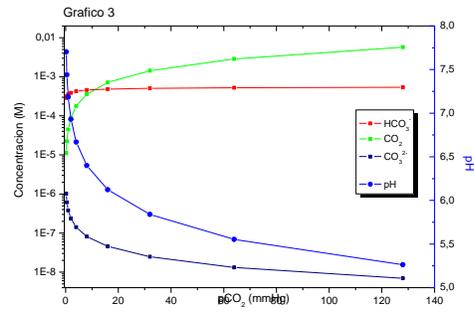
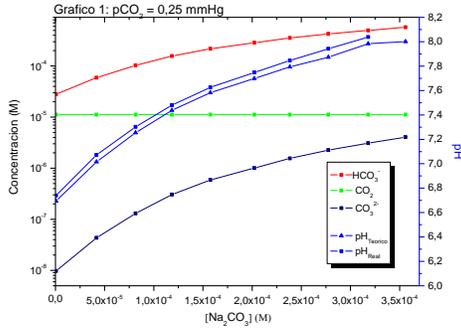


Gráfico 1 y 2: Variación del pH con la concentración de Na_2CO_3 para diferentes concentraciones de CO_2 en la corriente gaseosa de entrada.

Gráfico 3: Variación del pH con la concentración de CO_2 en la fase gaseosa.

Gráfico 4: Concentración de Na_2CO_3 y presión de CO_2 necesarios para ajustar el pH.

La importancia de estos resultados radica en que son la base para el diseño racional de medios de cultivos, además un simulador de este tipo es una herramienta fundamental al seleccionar las variables operativas y fisicoquímicas más convenientes en función del objetivo perseguido. Es importante a la vez, en el momento de diseñar experiencias tales como la determinación del coeficiente de transferencia del CO_2 , parámetro fundamental que se debe medir para la determinación de una cinética de crecimiento adecuada.

Efecto de la intensidad de luz y del fotoperiodo sobre el crecimiento celular

A continuación se muestran las gráficas resultantes de las corridas experimentales según: 24 horas de luz continua con la lámpara desnuda (gráfico a); 24 horas de luz continua con la lámpara cubierta por el filtro de densidad neutra (gráfico b), 12hs luz/12hs oscuridad con lámpara desnuda (gráfico c) y 12hs luz/12hs oscuridad con la lámpara cubierta por el filtro de densidad neutra (gráfico d).

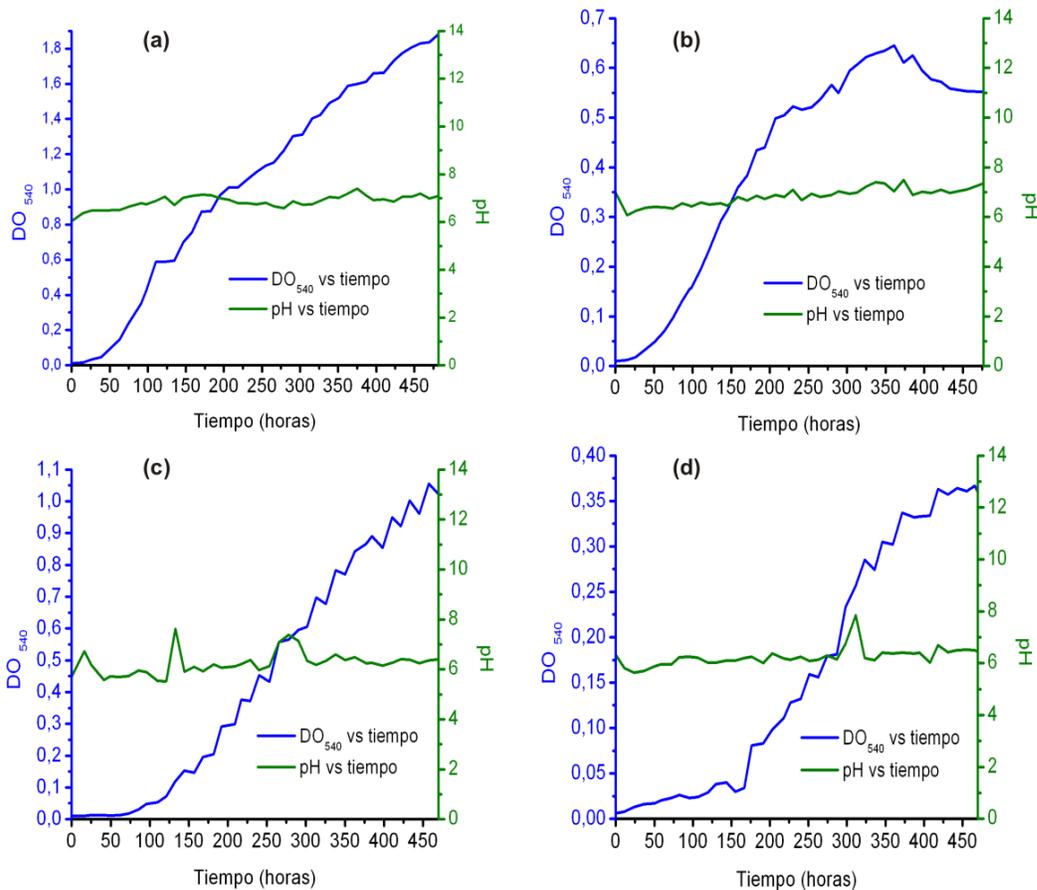


Figura 3: Gráficos de las corridas experimentales: (a) 24 hs luz con lámpara desnuda; (b) 24 hs luz con lámpara cubierta con el filtro; (c) 12hs luz/12hs oscuridad con lámpara desnuda; (d) 12hs luz/12hs oscuridad con lámpara cubierta con el filtro.

El estudio de la influencia de la intensidad de radiación incidente demostró la importancia de la misma sobre el crecimiento de las microalgas. La atenuación de la intensidad de la lámpara utilizada en el FBR a través del uso del filtro de densidad neutra, produjo disminuciones significativas en la velocidad de crecimiento de las algas y en consecuencia, en la producción de biomasa. Se observó que la disminución de la intensidad de luz aceleró la entrada de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento -a pesar de las bajas densidades celulares alcanzadas-, demostrándose la importancia de la calidad de luz para el mantenimiento del cultivo en un estado activo (fase exponencial).

El análisis de la influencia del fotoperiodo arrojó que la velocidad de crecimiento de las microalgas se reduce sustancialmente en ciclos de 12 hs luz/12 hs oscuridad, con producciones de biomasa significativamente menores respecto a los controles (cultivos con

irradiación continua). Prácticamente la totalidad de la biomasa producida se genera durante las horas de irradiación, mientras que durante los periodos de oscuridad el crecimiento es mínimo e incluso existe desaparición (consumo por respiración celular) de la masa celular producida durante el período de luz. Además, tanto el aumento de la intensidad de la radiación incidente sobre los cultivos durante los períodos de luz como la disminución de la temperatura durante los ciclos oscuros (debido al apagamiento de la lámpara) favorecen la disminución de la biomasa formada y de la actividad de las microalgas durante las horas de oscuridad posteriores a un ciclo de luz.

Se concluye que la intensidad de radiación a la cual se someten las microalgas durante su crecimiento es uno de los principales factores que afectan su desarrollo. A lo largo de 19 días de cultivo la reducción de la intensidad de la radiación incidente en 40% produjo una disminución en la biomasa producida del orden del 75% con irradiación continua y del 65% con foto-períodos. Uno de los fenómenos que explicaría este hecho es el *self-shading*.

DOWNSTREAM PROCCESING: EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE

Selección del método de disrupción celular para determinación de lípidos.

Los tratamientos de esterilización en autoclave y de ultrasonido con sonicador presentaron los niveles más altos de disrupción celular (44,9 y 56,5%). La muestra tratada por hidrólisis ácida resultó en la rotura celular total, impidiendo el recuento. El tratamiento de congelación en freezer fue descartado por su bajo rendimiento y largo tiempo requerido.

El método húmedo o volumétrico demostró ser más eficiente, al obtenerse según esta metodología mayor cantidad de lípidos por unidad de biomasa para muestras originadas de una misma cosecha.

El mayor rendimiento en lípidos se obtuvo tratando la muestra en húmedo mediante el método de hidrólisis ácida.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS A FUTURO

El modelo del medio de cultivo presentado representa un primer paso en el análisis de FBRs. A través de este algoritmo de cálculo se puede predecir el efecto de la modificación de algún componente del medio (ej.: $p\text{CO}_2$, concentración inicial de Na_2CO_3 o cualquier otro componente de la formulación) sobre las demás variables (ej.: concentración de $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, HCO_3^- , pH, fuerza iónica, etc.). Como se observa en los gráficos 1, 2 y 3, el aumento de la $p\text{CO}_2$ deriva en el aumento del $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, fuente exclusiva de carbono para la síntesis de biomasa pero disminuye el valor del pH, lo cual afectará la cinética de crecimiento. En el gráfico 4, se observa cómo la corrección del pH mediante el agregado de base (Na_2CO_3) conduce a un aumento de la fuerza iónica aumentando la presión osmótica, variable fisicoquímica que también influye en la velocidad de crecimiento. Un análisis adecuado de la influencia de la $p\text{CO}_2$ sobre el crecimiento celular requiere mantener constantes otras variables, entre ellas pH e I. Incrementar la concentración de CO_2 en la fase gaseosa a pH constante permite aumentar el $\text{CO}_{2(\text{aq})}$, manteniendo, dentro de un cierto rango, la fuerza iónica constante. De la comparación de los valores arrojados por el modelo y los obtenidos experimentalmente puede concluirse que el modelo predice con fidelidad el comportamiento del sistema.

Actualmente, se está trabajando en un modelo que permita predecir cómo reaccionará el cultivo de microalgas frente a determinada alteración en la formulación del medio de cultivo, de manera que permita analizar como un todo y en diferentes contextos definidos operativamente, cada sistema dinámico “medio de cultivo-cultivo de microalgas”. Para ello, se están teniendo en cuenta procesos metabólicos tales como mecanismos de concentración de CO_2 , el transporte a través de las membranas y la fotosíntesis, como así también el efecto de variables operativas y fisicoquímicas como la fuerza iónica y la presión osmótica. Los resultados de las experiencias con diferentes intensidades de luz y fotoperiodos aquí presentados, como así nuevos estudios con diferentes tipos de luz (ej. lámparas LED) que ya iniciaron, también serán incorporados al modelo.

Se está trabajando en la obtención de modelos cinéticos que expresen la velocidad de reacción como una función de las concentraciones de los reactivos y de las variables relevantes del sistema. Para que la expresión cinética pueda utilizarse para el diseño y

cambio de escala, los valores de sus parámetros y la funcionalidad con las diferentes variables deberían ser invariantes, independientemente del tipo y configuración de reactor utilizado. Existen escasas contribuciones dedicadas a la obtención de expresiones cinéticas intrínsecas para estos procesos, es decir, independientes del dispositivo utilizado y de las condiciones experimentales.

Disponer de este tipo de herramientas a la hora de diseñar una planta, un equipo o un método de producción permite conocer la influencia de cada una de las variables de diseño en el proceso, desarrollando criterios de construcción u operación con una base sólida y garantizando la máxima eficiencia en términos económicos y de producción.

Un modelado riguroso que considere las variables significativamente relevantes que intervienen en el proceso proporciona las herramientas necesarias para el diseño racional de FBRs, la optimización de su funcionamiento y la realización de cambios de escala.

Dentro del reactor, el conjunto de materias primas desencadena una serie de fenómenos (asociados con la absorción y dispersión de la energía radiante; los equilibrios químicos de las especies en solución y las alteraciones en el pH, la fuerza iónica y la presión osmótica que éstas provocan; la transferencia de gases; entre otros) que definen la *fisiología* del equipo, cuyo análisis, control y optimización son necesarios para su operación en las condiciones de máxima eficiencia y/o productividad. La aplicación de métodos y herramientas computacionales de última generación (Fluence, Algoritmos genéticos y Monte Carlo) constituirá la base para la comprensión de dichos fenómenos.

De esta manera, la conjugación de los resultados y modelos cinéticos obtenidos a futuro convergen en la creación de un módulo de simulación computacional con capacidad simultánea de *diseñar* y *optimizar* un foto-bio-reactor de mayor tamaño, de diferente geometría y modo de operación. Esto requiere un grado de comprensión tal de la *fisiología* del reactor en cuanto a la optimización de las materias primas, del balance de energía y de la productividad global del proceso que permita la construcción de un módulo digital lo más eficiente posible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, R. A. **Algal Culturing Techniques**. First Edition. Elsevier Academic Press, (2005).
- Chan Y.; So-Young J.; Jae-Yon L.; Chi-Yong A.; Hee-Mock O. **Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide**. Bioresource Technology. 101, 1, 1, S71-S74 (2010).
- Chisti, Y. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol** (2008). Trends Biotechnol. 26, 126–131.
- Chisti, Y. **Biodiesel from microalgae**. Biotechnology Advances 25, 294–306, (2007).
- Cornet, J.-F.; Dussap, C.G.; Gros, J.-B. **Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors: Application to Spirulina growth**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 59. Springer Berlin Heidelberg, (1998).
- Heinrich J.M.; Trombert A. R.; Botta F. A.; Niizawa I.; Irazoqui H.A. **Experimental Method to Evaluate the Optical Properties of Microalgae Suspensions**. Aceptado para el 19 International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2010 and the 7 European Congress of Chemical Engineering ECCE-7. Praga, República Checa (2010).
- Heinrich, J. M.; Botta, F. A.; Niizawa, I. **Metodología experimental para la determinación de las propiedades ópticas de las suspensiones de algas microscópicas**. XIII E.J.I. de la UNL. IV E.J.I. de Universidades de Santa Fe (2009).
- James C. **La Argentina y los biocombustibles de segunda y tercera generación** (2009).
- Melis A. **Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects** (2002). Int J Hydrogen Energy; 27:1217.
- Molina Grima, E.; Ación Fernández, F. G.; García Camacho, F.; Chisti, Y. **Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup**. Journal of Biotechnology, 70, 1-3, 231-247 (1999).
- Molina, E.; Fernández, J.; Ación, F.G., Chisti, Y. **Tubular photobioreactor design for algal cultures**. Journal of Biotechnology 92, 113–131, (2001).
- Niizawa I.; Trombert A. R.; Heinrich J.M.; Botta, F.A; Irazoqui H.A.. **Exploratory analysis of a photobioreactor for microalgae culture for different biotechnological applications**. Aceptado para el 19 International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2010 and the 7 European Congress of Chemical Engineering ECCE-7. Praga, República Checa (2010).
- Niizawa, I.; Botta F. A.; Heinrich, J. M. **Construcción y análisis exploratorio de un Fotobiorreactor destinado al cultivo de algas microscópicas para diferentes aplicaciones biotecnológicas**. XIII E.J.I. de la UNL. IV E.J.I. de Universidades de Santa Fe (2009).

- Richmond, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. First Edition. Blackwell Publishing company, (2004).
- Rocha, J. M. S.; García, J. E. C.; Henriques, M. H. F. **Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana***. Biomolecular Engineering 20, 237-242, (2003).
- Rodolfi, L.; Zittelli, G. C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M. R. **Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor** (2009). Biotechnol. Bioeng. 102: 100-112.
- Rozemberg, R.; Saslavsky, D.; Svarzman, G. **La industria de biocombustibles en Argentina** (2008). Disponible en <http://www.iadb.org/intal/intalcdi/PE/2009/02810a03.pdf>
Acceso en 22 nov. 2011.
- Scragg A. H.; Illman A. M.; Carden A.; Shales S. W.;. **Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor**. Biomass and Bioenergy, Volume 23, Issue 1, 67-73 (2002)
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. **Commercial applications of microalgae**. J Biosci Bioeng; 101:87–96. (2006)