



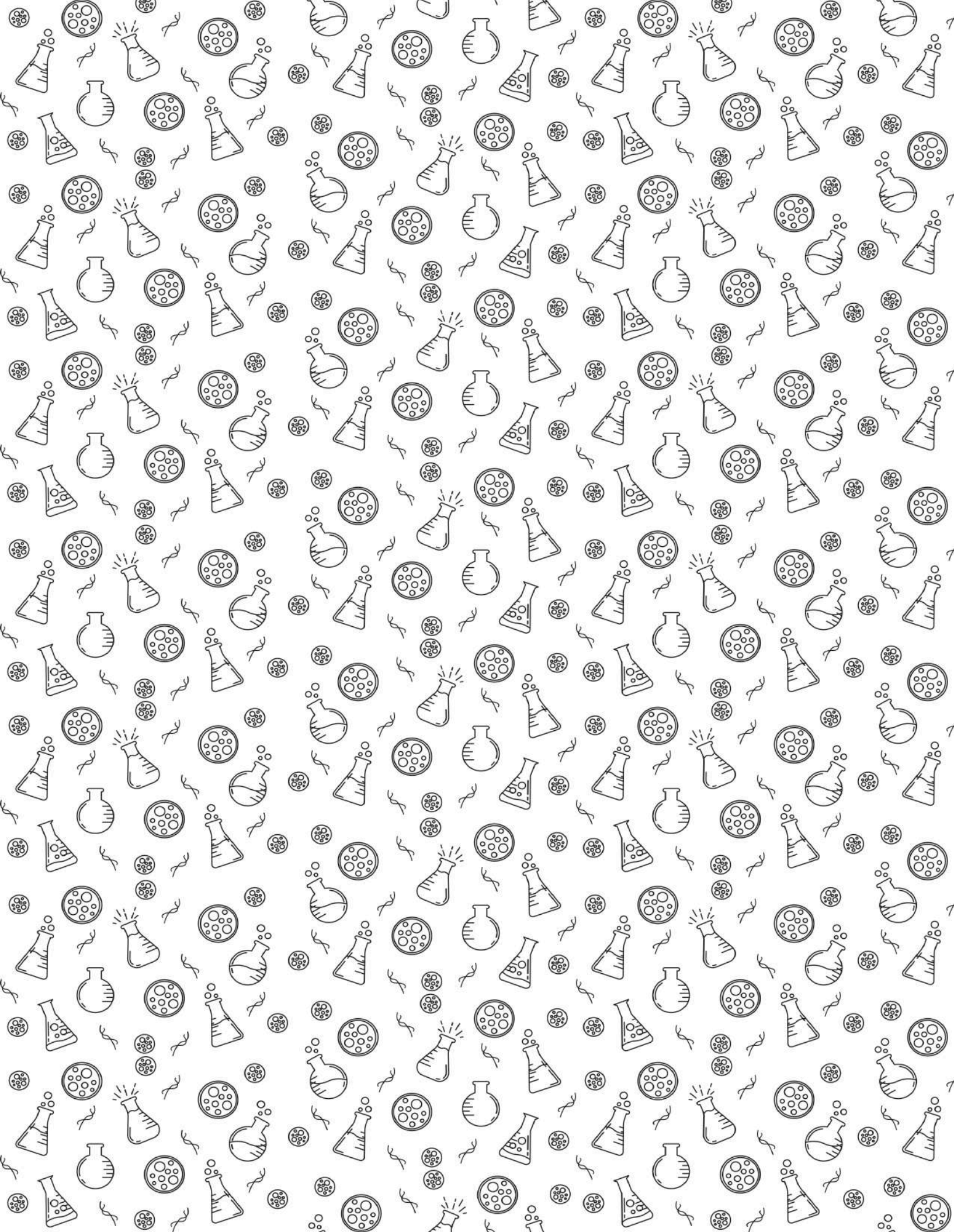
PLANTA PILOTO DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

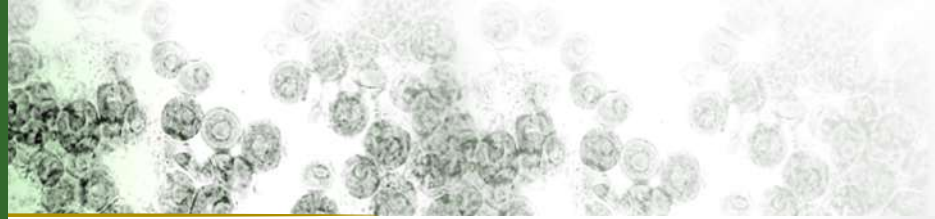
MANUAL DE PROCESOS MICROBIOLÓGICOS



FACULTAD DE
CIENCIAS DEL MAR
Y RECURSOS BIOLÓGICOS





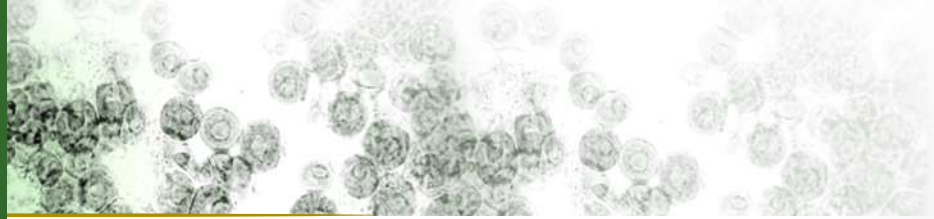


INDICE

Introducción	1
Diseño productivo de la planta piloto	4
Plano de la Unidad de Microbiología aplicada	5
Descripción Unidad de Microbiología Aplicada	6
Oficina Investigadores	6
Sala 20	6
Laboratorio Análisis	7
Sala Automatización	7
Lavado y esterilización del material de laboratorio	8
Mantenimiento del cepario	9
Preparación de Medios de Cultivo	10
Medio de cultivo en estado líquido	10
Medio de cultivo semisólido	11
Cultivos Microalgales a Escala de Laboratorio	12
Cultivos en matraces de Erlenmeyer de 250 mL	12
Cultivos en balones de 2000 mL	13
Cultivos en Botellones de 20 L	14
Producción de inóculos a escala de laboratorio	15
Preparación de Materiales de cultivo	17
Filtración de Agua de Mar	17
Desinfección de Agua de Mar	17
Desinfección de Difusores de Aireación	18
Medio de Cultivo	18
Escalamiento de Inóculo Microalgal	19
Cultivo en Sistemas Cerrados de 400 L (B400)	19
Cultivo en Sistemas Cerrados de 1000 L (B1000)	21
Suplementación de Medios de Cultivo	23
Cultivo a Escala Piloto	23
Desinfección de Sistema de Cultivo Abierto	26

Inoculación de Cultivo a Escala Piloto (raceway)	26
Descripción del Proceso de Producción	28
Cultivo Discontinuo (Batch)	28
Cultivo Semicontinuo	28
Obtención de Producto “Harina Microalgal”	30
Diagrama de Flujo	30
Centrifugación	30
Secado Spray Dryer	32
Embalaje y Almacenamiento del Producto Harina Microalgal	33
Descripción de Planta Piloto	34
Unidad de Microbiología Aplicada (UMA):	34
Línea de Agua de Mar	34
Línea de Cosecha/Inoculación	34
Sala de Centrifugación	34
Sala de Secador Solar	35
Sala Secador Spray Dryer	35
Sala Bomba y Filtración	35
Planta Piloto UMA	36
Anexo I: Análisis de Monitoreo	37
Método de conteo directo de microalgas	37
Método gravimétrico de sólidos totales	39
Registro de parámetros de cultivo	41
Eficiencia fotosintética	41
Radiación solar incidente	41
Temperatura y pH del Cultivo	41
Calidad de la biomasa	42
Lípidos totales: Gravimetría de lípidos	42
Proteínas Totales: Metodología Lowry 1951, modificada por Herbert, D 1971.	43
Pigmentos fotosintéticos: Clorofilas a, b y carotenoides totales por espectrofotometría.	45
Determinación de Carotenoides por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	45
Preparación de viales para HPLC	46
Cálculo de Carotenoides	46
Análisis de agua	47

Registro de la Concentración de Macronutrientes	47
Obtención de Clarificado para Análisis	47
Determinación Fosfato	47
Preparación de reactivos	47
Procedimiento de determinación de la curva de calibración	48
Análisis Fosfato	49
Determinación de Nitrato	49
Procedimiento de determinación de la curva de calibración	49
Análisis Nitrato	50
Anexo II: Operación Planta Piloto Centro de Bioinnovación	52
Llenado de Estanques Reservorios TK1 y TK5	52
Distribución de Agua de Mar	53
Procedimiento Galpón UMA	53
Procedimiento TK2, raceway invernadero, B400 y B1000.	54
Recuperación de Pasta y Pulpa Microalgal	55
Cosecha	55
Centrífuga discontinua LIAONING ($2.2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$).	55
Centrífuga Continua Westfalia, modelo AS 1936076 (flujo $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$).	56
Recuperación de Producto Harina Microalgal	59
Secador Spray Dryer Naichikeji, modelo Speed centrifuge atomizing dryer LPG-5.	59
Mantenimiento Equipos Planta Piloto	60
Sistemas de Aireación para Cultivos Microalgales	60
Línea de Aireación	62
Elementos filtrantes de 30"	62
Sistema de Control de pH	63
Mantenimiento de sensores de pH	64
Calibrado de sensores	64
Anexo III: Glosario Manual Planta Piloto	66
Equipo de Trabajo	68



INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fundamentales en la producción primaria de los ecosistemas marinos y dulceacuícolas. Actualmente hay miles de especies conocidas de microalgas, sin embargo no son más de veinte las especies que tienen potencialidad de ser implementadas en cultivos a escala comercial. En las últimas décadas ha habido un creciente interés e investigaciones en el uso de microalgas para diferentes usos, como desarrollo de biocombustibles, abatimiento de CO₂ o producción de nutraceuticos y pigmentos para la industria alimentaria. Dentro de los pigmentos de interés, los carotenoides son los más requeridos por la industria, existe una demanda estimada en US\$2000 millones para el 2020, siendo la luteína uno de los más solicitados con una demanda del 23% del mercado (Ochoa et al., 2020). A modo de antecedente, la explotación de pigmentos naturales como la luteína, surge actualmente de la conciencia de los efectos nocivos de compuestos sintéticos y los beneficios demostrables de estas sustancias para la salud en la industria de nutraceutico, cosmética y farmacia.

Existen diversas tecnologías de cultivo ya desarrolladas que pueden ser clasificadas en sistemas abiertos como tanques tipo raceway, y en sistemas cerrados, como por ejemplo diferentes tipos de fotobiorreactores (Dasgupta et al., 2010; Kochem, 2010). Sin embargo, aún falta por investigar el desarrollo de cultivos microalgales estandarizados y estables en el tiempo. Existen numerosas variables que inciden en el éxito de estos cultivos, desde aspectos biológicos como la microbiota acompañante, selección de clones con alta capacidad de adaptación a diferentes estresores ambientales, control de predadores etc.; hasta variables abióticas como optimización de parámetros de cultivo y optimización de los aspectos ingenieriles de los sistemas de cultivo masivos. El Desierto de Atacama, donde se encuentra ubicado nuestro Centro, tiene alta potencialidad y ventajas comparativas para el desarrollo de la industria biotecnológica basada en microalgas. Esto se debe a que la mayor parte del año se encuentra con cielos despejados, es decir, alta luminosidad;

y también a la disponibilidad de terrenos para **emprendimientos** de cultivos masivos. Sin embargo, una de las dificultades es la escasa disponibilidad de recursos hídricos, lo cual se está solucionando con el auge de plantas desalinizadoras en la zona costera del desierto, lo que podría disminuir los costos involucrados en el proceso. Además, nuestro Centro ha sido **pionero** en adaptar cepas microalgales de interés biotecnológico a crecer en óptimas condiciones utilizando agua de mar, recurso abundante en nuestra zona costera.

En el Centro de Bioinnovación de la Universidad de Antofagasta contamos con varias especies nativas con potencialidades para desarrollos biotecnológicos. Una de estas es la cepa MCH (***Muriellopsis sp.***), nativa de la región de Antofagasta, con la cual hemos logrado una de las más altas producciones de luteína, en comparación con lo reportado a nivel mundial, no obstante, aún se requiere más investigaciones para desarrollar una tecnología de producción masiva en forma estandarizada.

En el presente manual se entregan antecedentes técnicos que abarcan desde la etapa de aislamiento y cultivo en laboratorio de especies microalgales, hasta la etapa de cultivos masivos en **photobiorreactores** y sistemas de raceway. Pudiendo utilizarse para diferentes aplicaciones como producción de pigmentos y otros bioactivos, hasta tratamiento de aguas residuales.

1. Becerra, M. O., Contreras, L. M., Lo, M. H., Díaz, J. M., & Herrera, G. C. (2020). Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 66, 103771.
2. Dasgupta, C. N., Gilbert, J. J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S. A., Skjanes, K., & Das, D. (2010). Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10218-10238.
3. Kochem, L. H. (2010). Caracterização de fotobiorreator air-lift para cultivo de microalgas.

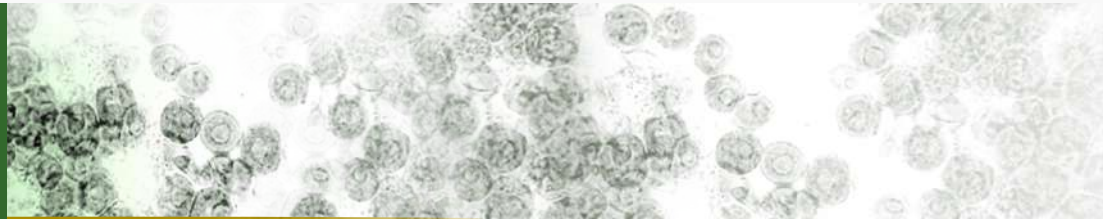


Este manual puede ser de utilidad para estudiantes y profesionales que desean incursionar en el cultivo de microalgas. Los invitamos cordialmente a conocer nuestro quehacer.



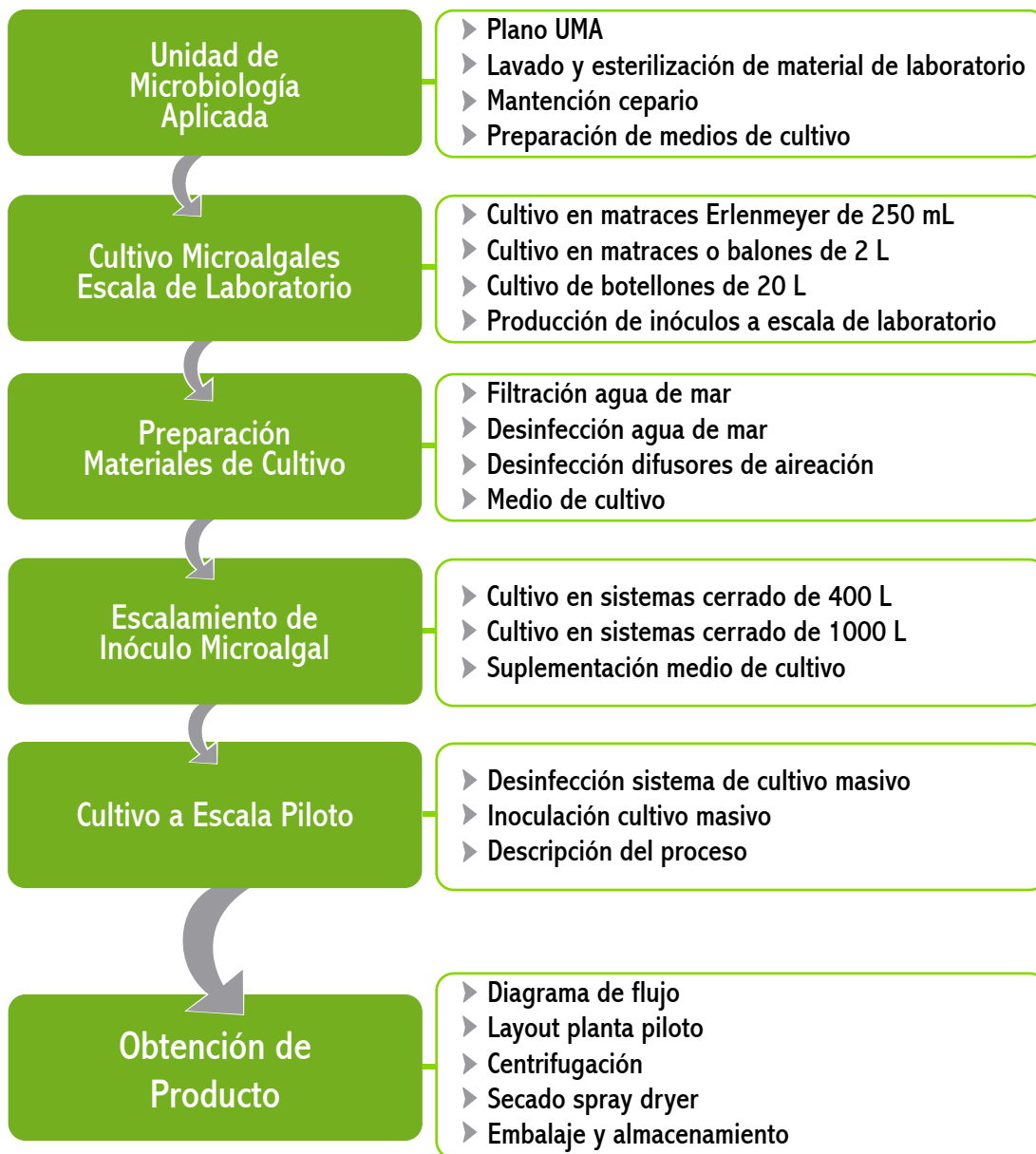
El Centro de Bioinnovación de la Facultad de Recursos del Mar y Recursos Biológicos basa su quehacer en investigación, diseño y desarrollo tecnológico, sustentabilidad e innovación estratégica en economía circular.





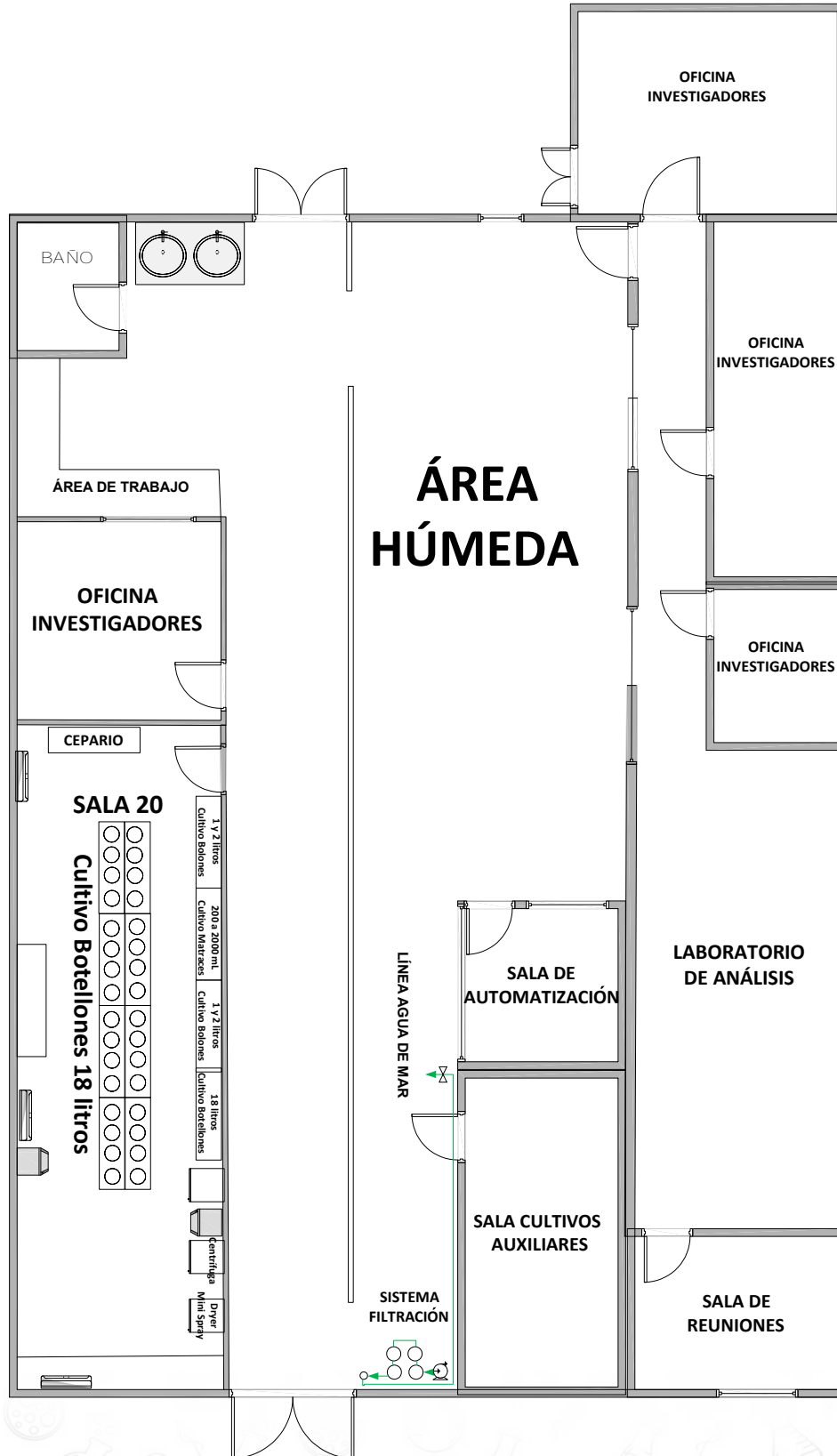
DISEÑO PRODUCTIVO DE LA PLANTA PILOTO

Los procesos dentro de la planta piloto se enmarcan en el siguiente diseño:



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

Plano UMA



DESCRIPCIÓN UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA APLICADA (UMA)

El galpón UMA cuenta con un área seca que incluye: Oficina de los investigadores, sala de reuniones, sala 20, área de trabajo y laboratorio de análisis. Además de un área húmeda en donde están ubicadas la sala de automatización, sala de cultivos auxiliares y sistema de filtración de agua de mar. Principalmente es un sector destinado al trabajo con agua de mar, lavado de botellones, estanques de cultivo, etc.

Oficina Investigadores

La Unidad cuenta con 4 oficinas destinadas a el trabajo de los investigadores y ubicación de estudiantes de pre y post grado que realizan sus trabajos de tesis en la unidad.

Sala 20

Sala acondicionada a temperatura ambiental (20°C), líneas de aireación y equipamiento necesario para la mantención del cepario y cultivo microalgal desde 200 mL a 18 L. La sala cuenta con 4 rack para el cultivo en matraces y botones con capacidad de generar un máximo 108 L de cultivo microalgal. Respecto a la producción de inóculos en botellones de 18 L, La sala cuenta con un sector de cultivo ubicado en el rack central, con una capacidad máxima de 96 botellones correspondiente a 864 L de inóculo para el escalamiento a condiciones outdoor (Figura 1).



Figura 1. Laboratorio sala 20

Laboratorio Análisis

Sala habilitada con el equipo necesario para procesar muestras de ensayos de cultivos microalgales a escala de laboratorio y piloto. Los seguimientos de los ensayos desarrollados en los proyectos de investigación científica, van orientados a optimizar las condiciones de cultivo a escala de laboratorio para posteriormente validar dichas condiciones a escala piloto. Con ello se estima la productividad real de las cepas microalgales en estudio. El monitoreo de los cultivos incluye: Conteo directo de microalgas, determinación gravimétrica de sólidos totales, calidad de la biomasa (lípidos y proteínas totales, clorofila a y b, carotenoides totales, luteína, β -caroteno, zeaxantina, astaxantina y violaxantina) y análisis del contenido de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) (Figura 2).



Figura 2. Laboratorio de análisis

Sala Automatización

Sala acondicionada para realizar ensayos en la optimización del cultivo microalgal a escala de laboratorio, cuenta con reactores cilíndricos de 250 mL de capacidad y control de parámetros de cultivo: Simulación de iluminación circadiana, intensidad de iluminación, control del flujo de aireación, control de pH mediante inyección automática de CO_2 y registro automático de temperatura, pH y flujo de CO_2 (Figura 3).



Figura 3. Implementación Sala de control automatizado de parámetros de cultivo.

Lavado y esterilización del material de laboratorio

El material para cultivar microalgas debe ser lavado cuidadosamente con detergente neutro empleando hisopos (escobillas) y esponja, en algunos casos se puede emplear cloro y/o ácido muriático para suciedad difícil, enjuagados varias veces con agua potable y agua destilada al finalizar, para luego empaquetar y esterilizar si es necesario.

- ✓ Agregar 2 gramos por litro de hipoclorito de sodio a un volumen de 15 litros de agua potable, agitar hasta que se disuelva.
- ✓ Incorporar detergente neutro y utilizar la solución para lavar matraces, cánulas, tapones de goma, pipetas de vidrio, puntas de pipetas, etc.
- ✓ Emplear hisopos para limpiar el interior de matraces, balones y botellas.
- ✓ Eliminar los rótulos de las superficies del material de vidrio con ayuda de una esponja y un poco de etanol.
- ✓ Dejar las cánulas en un recipiente con ácido muriático para eliminar sales y materia orgánica.
- ✓ Si es necesario, esterilizar a través de calor húmedo empleando autoclave durante 15 minutos a 121°C , este equipo permite la entrada de vapor de agua a presión. El uso de calor húmedo facilita la muerte de todos los microorganismos. Este es el método utilizado ampliamente y es aplicado tanto para recipientes donde se llevarán a cabo los cultivos como para los medios de cultivo. También se puede esterilizar por calor seco, solo para el caso de material de vidrio o metálico, ya que requiere temperaturas mayores a las usadas en autoclave. El procedimiento usual es calentar el material durante dos horas a 160°C en una estufa. Aunque el calor es el

método más común y eficaz para esterilizar líquidos, esta no puede utilizarse para esterilizar compuestos sensibles al calor como por ejemplo las vitaminas del medio de cultivo por lo que se emplea filtración a $0.22\ \mu\text{m}$ (Figura 4).



Figura 4. Métodos de esterilización.

Mantenimiento del cepario

El cepario se encuentra en una sala con temperatura controlada a 20°C , acondicionada con estantes iluminados por tubos fluorescentes que deben ser limpiados constantemente. En general, los tubos fluorescentes que se utilizan para el cultivo de microalgas son de luz fría o luz día, ya que estos simulan mejor el rango de longitudes de onda necesarias para su crecimiento (300-700 nm). La mantención y cultivo de las microalgas de la colección, se realiza en recipientes de vidrio de borosilicato: placas de Petri y tubos con tapa rosca, y en matraces de 100mL de capacidad (Figura 5).

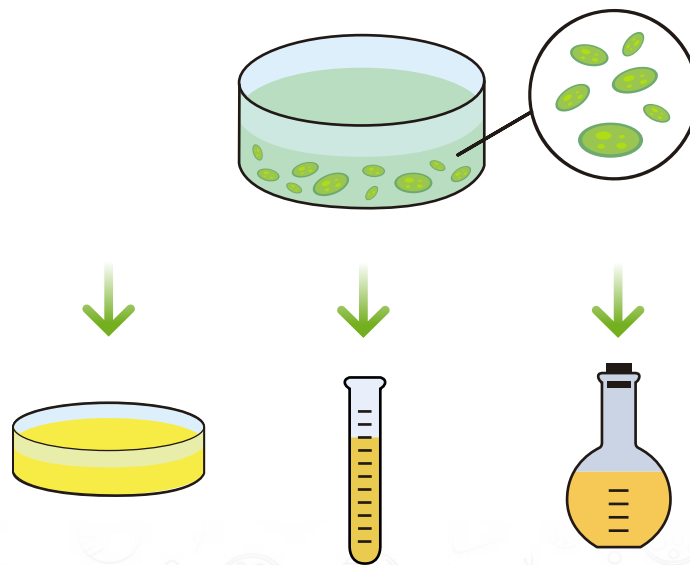


Figura 5. Mantención de cepario.

Preparación de Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es generalmente preparado a partir de soluciones stock. Los volúmenes de estos stocks son medidos y agregados a un volumen dado de agua, ya sea, agua dulce o agua de mar. En algunos casos los componentes son agregados directamente. Se debe tener en consideración que el no seguir el orden de la incorporación de las soluciones stocks, pueden causar problemas como precipitación en los reactivos. Las soluciones stock deben guardarse en frío o en recipientes de vidrio bien sellados para evitar evaporaciones. Además, todas estas soluciones deben prepararse con agua destilada. Los medios de cultivo se preparan para ser usados en estado líquido o geles semisólidos. Estos proveen los nutrientes requeridos para el crecimiento de las microalgas, en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos altamente purificados en concentraciones conocidas.

Medio de cultivo en estado líquido

A continuación, se describe el procedimiento para preparar el medio de cultivo utilizado en la **Unidad de Microbiología Aplicada** para el cultivo de la cepa MCH35 (microalga *Muriellopsis* sp. adaptada al cultivo en agua de mar).

Para preparar el medio de cultivo se deben preparar primero las soluciones stock de macronutrientes y micronutrientes.

Solución de nitrato de sodio (solución 1): Pesar 195.25 g de nitrato de sodio (NaNO_3) y llevar a 1 L de agua destilada, esta solución queda a una concentración de 2.25 M.

Solución de fosfato monosódico dihidratado (solución 2): Pesar 16.5 g de fosfato monosódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y llevar a 1 L de agua destilada, esta solución queda a una concentración de 0.12 M.

Solución de bicarbonato (solución 3): Pesar 84 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y llevar a 1 L de agua destilada, esta solución queda a una concentración de 1 M.

Solución de micronutrientes (solución 4): Preparar primero una solución llamada stock A: En una botella de 100 mL, agregar los siguientes componentes: 0.018 (g); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.0022 (g) de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.001 (g) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.0006 (g) de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.001 (g) de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Enrasar con agua destilada a 100 mL y mezclar bien.

- ✓ En otro matraz de aforo de 1000 mL agregar 4.36 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, agregar 900 mL de agua destilada y disolver.
- ✓ Agregar 3.15 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y luego agregar 1 mL de la solución stock A. Enrasar a un litro con agua destilada.

Solución de vitaminas (solución 5): Preparar una solución stock de biotina $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparar otra solución stock con cianocobalamina $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pesar 0.2 g de tiamina y agregar 100 μL de la solución stock de biotina y 100 μL de la solución de cianocobalamina, enrasar a 100 mL en matraz de aforo con agua destilada.

Solución de tiosulfato (solución 6): Pesar 100 g de tiosulfato y agregar 100 mL de agua destilada, esta solución queda en proporción de 1:1.

NOTA: Autoclavar las soluciones antes de utilizar. Excepto la solución 5 que debe ser filtrada a $0,22 \mu\text{m}$.

Medio de cultivo semisólido

- ✓ Agregar, además de las soluciones stock 1, 2, 3 y 4, $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, una vez esterilizado el medio de cultivo en autoclave y este se encuentre a una temperatura aproximada de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, en forma aséptica, agregar solución 5 y distribuir cuidadosamente en placas de Petri (aproximadamente 15 mL/placa) (Figura 6).
- ✓ Rotular y esperar que se sequen las placas a temperatura ambiente.
- ✓ Posteriormente al secado, verificar la posible contaminación del medio de cultivo, en caso de placas contaminadas estas deben ser descartadas inmediatamente. En caso de contaminación con hongos, las placas no deben abrirse dentro del laboratorio, para evitar la diseminación de las esporas.
- ✓ Por último, almacenar las placas rotuladas y debidamente empaquetadas, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.



Figura 6. Preparación de soluciones stock.

CULTIVO MICROALGALES ESCALA DE LABORATORIO

Cultivo en matraces de Erlenmeyer de 250 mL



Figura 7. Cultivo de *Muriellopsis* sp. en matraces de Erlenmeyer de 250 mL.

- ✓ Llenar con 900 mL de agua de mar, un matraz de aforo de 1000 mL de capacidad.
- ✓ Agregar 2 mL de cada solución stock de los medios de cultivo: NaNO_3 (1), NaH_2PO_4 (2), NaHCO_3 (3) y 1 mL de solución de micronutrientes (4) y 0.5 mL de solución de vitaminas (5). Cada solución debe ser agregada con su respectiva pipeta, si es de vidrio, o puntas de plástico si es con micropipeta.
- ✓ Enrasar a 1000 mL con agua de mar.
- ✓ Distribuir 100 mL de medio de cultivo en matraces de 100 o 200 mL de capacidad.
- ✓ Poner tapón de gasa o de goma y cubrir con papel craft o papel aluminio.
- ✓ Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- ✓ Para la inoculación, limpiar la campana de flujo laminar minuciosamente.
- ✓ Introducir en la campana las placas de Petri y/o los matraces que contienen los cultivos de microalgas que se emplean como inóculo.
- ✓ Abrir los matraces sacando el tapón de gasa o goma y flamear la boca del matraz del inóculo en la llama del mechero.
- ✓ En el caso de que el inóculo provenga de una placa de Petri con ayuda de un asa de inoculación tomar una o unas colonias del cultivo que se requiere escalar, en el caso de cultivos líquidos, tome uno o dos ml del cultivo de microalgas a inocular a través de una micropipeta, evitando el contacto con la superficie del matraz.
- ✓ Flamear nuevamente la boca del matraz y cubrir con el tapón.
- ✓ Una vez fríos los bordes de la boca cubrir con parafilm.



Figura 8. Cultivo de Microalgas en balones de 2000 mL.

- ✓ Medir 1900 mL de agua de mar con una probeta de 2000 mL.
- ✓ Trasvasar el volumen a un balón de 2000 mL, dependiendo del número balones requeridos, repetir esta operación las veces que sea necesario.
- ✓ Poner tapón de gasa o de goma y cubrir con papel craft o papel aluminio.
- ✓ Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- ✓ Una vez que estén a temperatura ambiente, proceder a inocular.
- ✓ Limpiar la campana de flujo laminar minuciosamente.
- ✓ Introducir en la campana los matraces que contienen los cultivos de inóculo y los balones de 2000 mL a inocular.
- ✓ Quitar el parafilm de los matraces con las microalgas a inocular.
- ✓ Sacar el tapón de gasa o goma y flamear en el mechero la boca del matraz que contiene las microalgas para inóculo.
- ✓ Sacar el tapón del balón a inocular (2000 mL) y flamear la boca.
- ✓ Agregar 4 mL de cada solución stock: NaNO_3 (1), NaH_2PO_4 (2), NaHCO_3 (3) y 2 mL de micronutrientes (4) y 1 mL de solución de vitaminas (5).
- ✓ Inocular el balón de 2000 mL con aproximadamente 100 mL de cultivo.
- ✓ Flamear la boca del balón de 2000 mL, cubrir con el tapón, una vez fríos los bordes cubrir con una cinta de parafilm.
- ✓ Colocar una varilla de vidrio para luego poder suministrar aireación.
- ✓ Ubicar en el estante de cultivo, ubicado en la sala 20 (Figura 8).

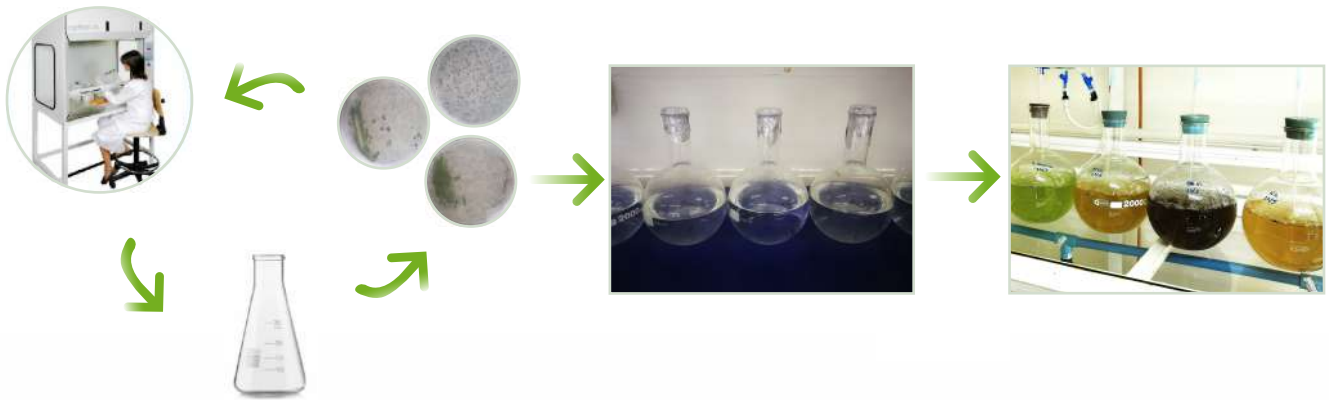


Figura 9. Inoculación cultivos intermedios 2 L.

Cultivo en Botellones de 20 L



Figura 10. Cultivo microalgal en botellones de policarbonato de 20 L.

- ✓ Llenar los botellones con un volumen de 16 L de agua de mar.
- ✓ Desinfectar agua de mar con la adición de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hipoclorito de sodio.
- ✓ Cubrir la boca del botellón con parafilm y agitar hasta disolver el cloro.
- ✓ Tiempo mínimo de cloración 12 horas, usualmente por seguridad se deja 24 horas.
- ✓ Transcurrido este tiempo neutralizar el cloro con 6 mL de solución de tiosulfato (1:1) autoclavada.
- ✓ Tiempo mínimo de neutralización 2 horas (solución 5).

- ✓ Transcurrido este tiempo el agua está lista para agregar los nutrientes y el inóculo de microalgas.
- ✓ Eliminar el parafilm que cubre la boca de cada botellón.
- ✓ Adicionar los nutrientes 36 mL de cada solución stock: NaNO_3 (1), NaH_2PO_4 (2) y NaHCO_3 (3), 3.6 mL micronutrientes (4) y 9 mL de solución de vitaminas (5). Cada solución debe ser agregada con su respectiva punta de micropipeta de 10 mL o pipeta desechable del volumen que corresponda.
- ✓ Poner el tapón de goma y agitar.
- ✓ Sacar el tapón y a continuación, agregar 2 L de inóculo de microalgas.
- ✓ Volver a colocar el tapón y una cánula (varilla) de vidrio para luego suministrar aireación.
- ✓ Ubicar el o los botellones en el estante de cultivo al interior de la sala 20 (Figura 10).

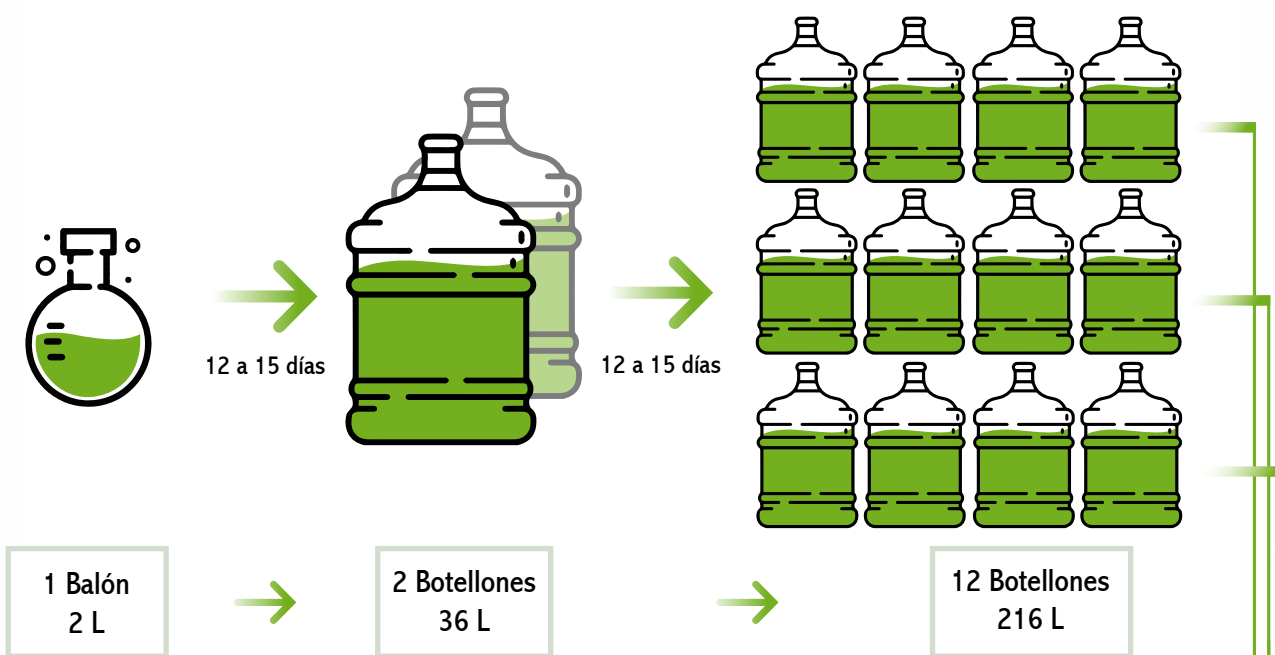
Producción de inóculos a escala de laboratorio

Los inóculos microalgales para iniciar los cultivos en condiciones outdoor a una escala de 400 L se realizan en botellones de 20 L. Para ello:

- ✓ Utilizar matraz o balón de 2 L con cultivo en fase exponencial (entre 12 a 15 días de cultivo).
- ✓ Inocular 1 botellón de acuerdo a lo descrito anteriormente y mantener en cultivo durante 12 a 15 días.
- ✓ Luego obtener el crecimiento deseado en el botellón, escalar su producción a 12 botellones, agregando un volumen de 1.4 L de inóculo a cada botellón.
- ✓ Disponer botellones con abundante aireación, cuidando su decantación diariamente y después de 12 a 15 días 204 L de inóculo estarán listos para su escalamiento a condiciones outdoor a sistemas de cultivo cerrado de 400 L (Figura 11).



ESCALAMIENTO LABORATORIO



OUTDOOR B400

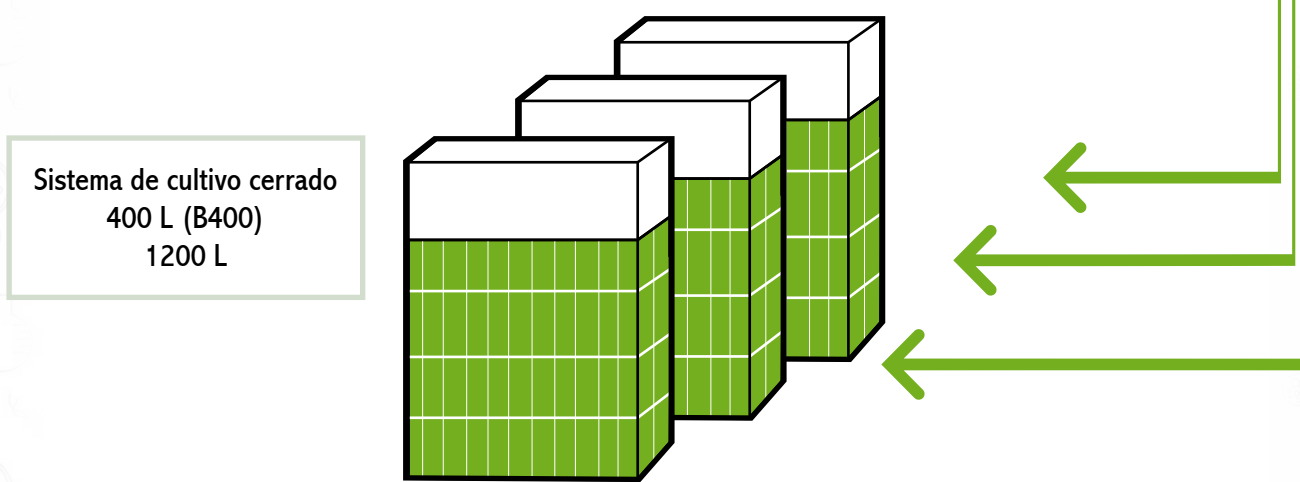


Figura 11. Secuencia de producción de inóculos a escala de laboratorio para escalamiento y producción de inóculos microalgales a cultivos outdoor (400 L).

PREPARACIÓN DE MATERIALES DE CULTIVO

Filtración de Agua de Mar

El agua de mar utilizada para los cultivos a escala piloto es tratada por filtración mecánica. Antes de ingresar a los reservorios de la planta piloto, dos filtros de arena instalados en serie filtran el agua a $200\ \mu\text{m}$. Luego se aplica una filtración adicional mediante cartuchos en serie de $20\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m}$ y $1\ \mu\text{m}$, distribuyendo finalmente el agua hacia los sistemas de cultivo (Figura 12).

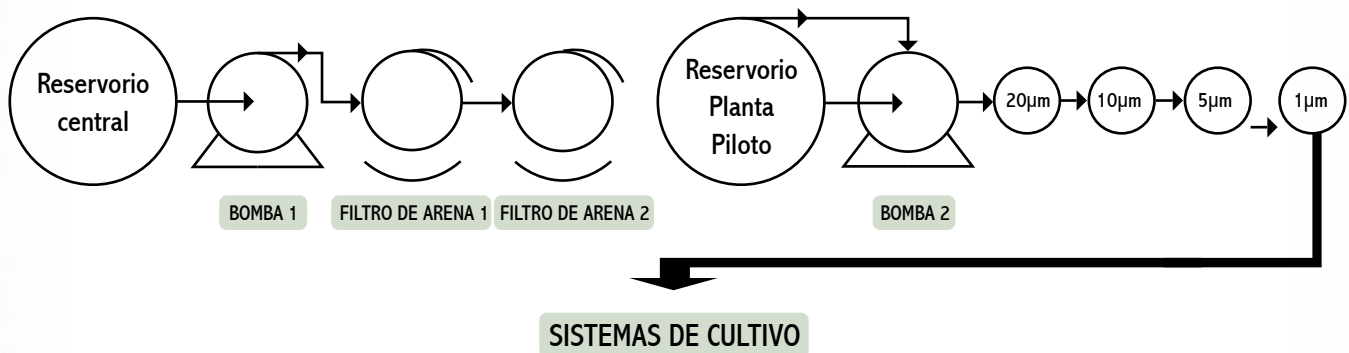


Figura 12. Diagrama de filtración de agua de mar para cultivos microalgales.

Desinfección de Agua de Mar

El agua de mar después de la filtración mecánica se desinfecta una vez dispuesta en los sistemas de cultivo correspondientes, con $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hipoclorito de sodio durante 12 horas y aireación para su correcta homogenización. Una vez transcurrido el tiempo de desinfección neutralizar con $0.3\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ hipoclorito de sodio, esperar 2 horas y el agua de mar estará lista para la inoculación de los cultivos de microalgas.

Desinfección de Difusores de Aireación

Es primordial mantener todos los materiales desinfectados antes de iniciar la inoculación, con ello mantendremos los cultivos unialgales y evitaremos la presencia de microorganismos no deseados que afectan la productividad de biomasa. Mantener un estanque de desinfección con una solución de hipoclorito de sodio ($0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), y disponer los difusores de aire, mangueras de nivel, varillas de acero inoxidable, embudos y material de pvc general de cultivo. Antes de utilizar enjuagar con abundante agua potable y montar en los sistemas de cultivo.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento en los sistemas a escala piloto corresponde al medio UMA5 (Riveros et al., 2015), modificando al doble la dosis de fosfato monosódico (NaH_2PO_4). Estas condiciones muestran los mejores resultados en crecimiento celular y contenido de luteína. El medio de cultivo utilizado para las cosechas parciales durante la obtención del producto se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo UMA5 utilizado en cultivos a escala piloto de *Muriellopsis* sp.

Nutrientes	Nomenclatura	Concentración	Unidad
Macronutrientes	NaNO_3	0.38	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
	NaH_2PO_4	0.068	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
	NaHCO_3	0.168	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Micronutrientes (f/2, Guillard 1975)	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.9	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Vitaminas (f/2, Guillard 1975)	Biotina	0.000001	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	Cianocobalamina	0.000001	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	Tiamina	0.0002	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

ESCALAMIENTO DE INÓCULO MICROALGAL

Cultivo en Sistemas Cerrados de 400 L (B400)

El escalamiento a escala piloto inicia en sistemas de cultivo cerrado tipo panel de 400 L de capacidad, bolsas de polipropileno de baja densidad (200 μm) con filtro UV, son utilizadas para contener el cultivo (Tabla 2).

Tabla 2: Descripción de sistema de cultivo cerrado B400.

Dimensiones	cantidad
Ancho (m)	0.3
Largo (m)	1.2
Alto (m)	1.8
Área (m^2)	2.52



Figura 13: Fotografías de sistemas de cultivo cerrado B400.

Procedimiento

- ✓ Disponer una bolsa de polipropileno en la estructura del sistema de cultivo.
- Conectar manguera de nivel a red de aireación.
- ✓ Abrir un extremo de la bolsa.
- Poner dentro una manguera conectada con la red de aire y abrir la válvula.
- ✓ Una vez la bolsa esté completamente inflada, doblar esquinas inferiores de la bolsa hacia al interior y acomodar para evitar pliegues.

- ✓ Retirar la manguera de aireación e ingresar una manguera para incorporar agua de mar filtrada, con un volumen de 330 L.
 - ✓ Verificar posibles filtraciones de agua causada por bolsas dañadas, en caso de encontrar filtraciones visuales, selle la bolsa con la ayuda de una pistola de silicona caliente. Para ello: humedezca la zona perforada, a un costado del orificio, aplique una pequeña cantidad de silicona caliente y desplace la silicona sobre el orificio.
 - ✓ Disponer un difusor de aire: ingresar varilla de acero inoxidable al interior de un tubo de pvc de 20 mm de diámetro, conectar manguera de nivel e ingresar al sistema de cultivo, luego conectar sistema de aireación a la red de aire.
 - ✓ Desinfectar el agua de mar durante 12 horas con $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hipoclorito de sodio.
 - ✓ Neutralizar el hipoclorito de sodio con la adición $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, después de 2 horas el agua de mar estará lista para agregar los medios de cultivo.
 - ✓ Suplementar medios de cultivo de acuerdo a dosificación de Tabla 1.
 - ✓ Esperar 15 minutos para su homogenización y medir pH, en caso que se encuentre $\leq 6,5$ corregir adicionando bicarbonato de sodio ($0.168 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$), una vez estable el pH del medio de cultivo, agregar inóculos microalgales provenientes de 4 botellones de cultivo desde la sala 20 ubicada en el laboratorio.
 - ✓ Agregar inóculos: Antes de iniciar la inoculación desinfectar boquilla de botellones, embudo, mangueras y manos con alcohol al 70%. La cantidad de inóculo corresponde a 72 L.
 - ✓ Finalmente verificar que la aireación del cultivo sea a $135 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Los cultivos en sistemas B400 deben ser mantenidos por un periodo de tiempo no superior a 15 días, para luego ser utilizados en el siguiente escalamiento (sistemas de cultivo cerrado de 1000 L).

Nota: si se requiere suplementación de medio de cultivo, seguir el protocolo utilizado en B1000(pag. 23)

4. Riveros, K., Sepúlveda, C., Bazaes, J., Marticorena, P., Riquelme, C., & Acien, G. (2018). Overall development of a bioprocess for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture. *Aquaculture Research*, 49, 165–176

Cultivo en Sistemas Cerrados de 1000 L (B1000)

El escalamiento a escala piloto continúa en sistemas de cultivo cerrado tipo panel de 1000 L de capacidad, en donde se utilizan bolsas de polipropileno de baja densidad (200 μm) con filtro UV, para contener el cultivo.

Tabla 3: Descripción de sistema de cultivo cerrado B1000.

Dimensiones	cantidad
Ancho (m)	0.15
Largo (m)	7
Alto (m)	1.2
Área (m^2)	9.45



Figura 14: Fotografías de sistemas de cultivo cerrado B1000.

Procedimiento

- ✓ Disponer una bolsa de polipropileno en la estructura por un extremo del sistema.
- ✓ Acomodar por todo el sistema de cultivo la bolsa y conectar manguera de nivel a red de aireación.
- ✓ Abrir ambos extremos de la bolsa y poner dentro una manguera conectada con la red de aire y abrir la válvula.
- ✓ Una vez que la bolsa esté completamente inflada, doblar esquinas inferiores de la bolsa hacia el interior y acomodar para evitar pliegues.
- ✓ Retirar la manguera de aireación e ingresar una manguera para incorporar agua de mar filtrada, 700 L.
- ✓ Verificar posibles filtraciones de agua causada por bolsas rotas, en caso de encontrar

- ✓ filtraciones visuales, selle la bolsa con la ayuda de una pistola de silicona caliente (descrito en pag. 20)
- ✓ Disponer un difusor de aire: Ingresar varilla de acero inoxidable al interior del tubo de pvc de 20 mm de diámetro, conectar manguera de nivel a cada extremo del difusor e ingresar al sistema de cultivo, luego conectar sistema de aireación a la red de aire.
- ✓ Esperar 15 minutos para su homogenización y medir pH, en caso que se encuentre ≤ 6.5 corregir adicionando bicarbonato de sodio ($0.168 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$). Una vez estable el pH del medio de cultivo, agregar inóculos microalgales provenientes de una B400.
- ✓ Agregar inóculos: Antes de iniciar la inoculación desinfectar extremo de bolsas de B400, B1000, embudo, mangueras y manos con alcohol al 70%. La cantidad de inóculo corresponde a 300 L.
- ✓ Finalmente verificar que la aireación del cultivo sea a $65 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ en cada ingreso de aire al sistema de cultivo (4 entradas de aire).
- ✓ Los cultivos en sistemas B1000 deben ser mantenidos por un periodo no superior a 15 días, cumplido el tiempo, estarán en condiciones de ser utilizados como inóculos para sistemas de cultivo a escala piloto (sistemas tipo raceway), o ser cosechados según cronograma.

Nota: Para evitar la decantación del cultivo, diariamente los sistemas cerrados de 400 y 1000 L deben ser golpeados con un martillo de goma en la base, esto ayudará a resuspender las células que decanten al fondo del sistema.

Suplementación de Medios de Cultivo

Una vez iniciado el cultivo discontinuo cada 3 días suplementar la fuente de fósforo en el medio de cultivo. Para ello:

- ✓ Recolectar muestra de 100 mL desde el sistema de cultivo y filtrar para recuperar clarificado.
- ✓ Realizar análisis de contenido de fosfato de acuerdo a metodología en el anexo de metodología de monitoreo.
- ✓ Calcular la cantidad de fosfato faltante en el medio de cultivo para ajustar a una relación nitrógeno: fósforo de 10:5.
- ✓ Disolver fosfato en agua potable y agregar al cultivo.

CULTIVO A ESCALA PILOTO

La cepa *Muriellopsis* sp., microalga dulceacuícola adaptada al crecimiento en agua de mar, es cultivada en la Planta Piloto del Centro de Bioinnovación de la Universidad de Antofagasta, la planta cuenta con tres tipos de reactores en condiciones outdoor: dos tipos de sistemas de cultivo cerrado, uno de 400 L (B400) y otro de 1000 L (B1000). Ambos sistemas suman una capacidad de 22.6 m³ y forman parte del escalamiento y producción de inóculos microalgales para el cultivo a escala piloto (Tabla 4).

La producción de biomasa a escala piloto se realiza en 8 sistemas de cultivo abierto denominados “raceway”, los cuales son impulsados por paletas rotatorias conectadas a motorreductores que mantienen en agitación constante el cultivo, con el fin de proveer las mejores condiciones de crecimiento al interior del cultivo. Los sistemas de cultivo raceway tienen distintas capacidades, a continuación, en la Tabla 5 se detallan los volúmenes de cada reactor con sus respectivas nomenclaturas. Los volúmenes fueron estimados de acuerdo a la geometría, y considerando una altura de cultivo de 15 cm. La Planta Piloto cuenta con una capacidad total de 32 m³ de cultivo productivo.

Tabla 4: Capacidad volumétrica de sistemas de cultivo cerrado (B400 y B1000) y sistemas de cultivo abierto "raceway".

Sistema de Cultivo	Inóculo Outdoor		Cultivo Escala Piloto				
	B400	B1000	Rw1 y Rw2	Rw3	Rw4	Rw5	Rw6, 7 y 8
volumen m ³ /cantidad	0.4/24	1/13	3.8/2	6.6/1	10.8/1	5.4/1	0.57/3
Volumen Total (m ³)	9.6	13	7.6	6.6	10.8	5.4	1.71
Capacidad Planta (m ³)	22.6		32				

Tabla 5: Dimensiones y estimación de capacidad volumétrica de sistemas de cultivo a escala piloto.

Dimensiones	Rw 1 y 2	Rw 3	Rw 4	Rw 5	Rw 6, 7 y 8
Ancho (m)	2.0	4.1	3.8	3.0	1.0
Largo (m)	11.2	7,4	15.8	9,6	3.0
Altura cultivo (m)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Volumen Total (m ³)	3.8	6.6	10.8	5.4	0.57
Área (m ²)	25	44	72	36	4



Figura 15: Sistemas de cultivo abierto tipo raceway entre 570 a 10800 L.

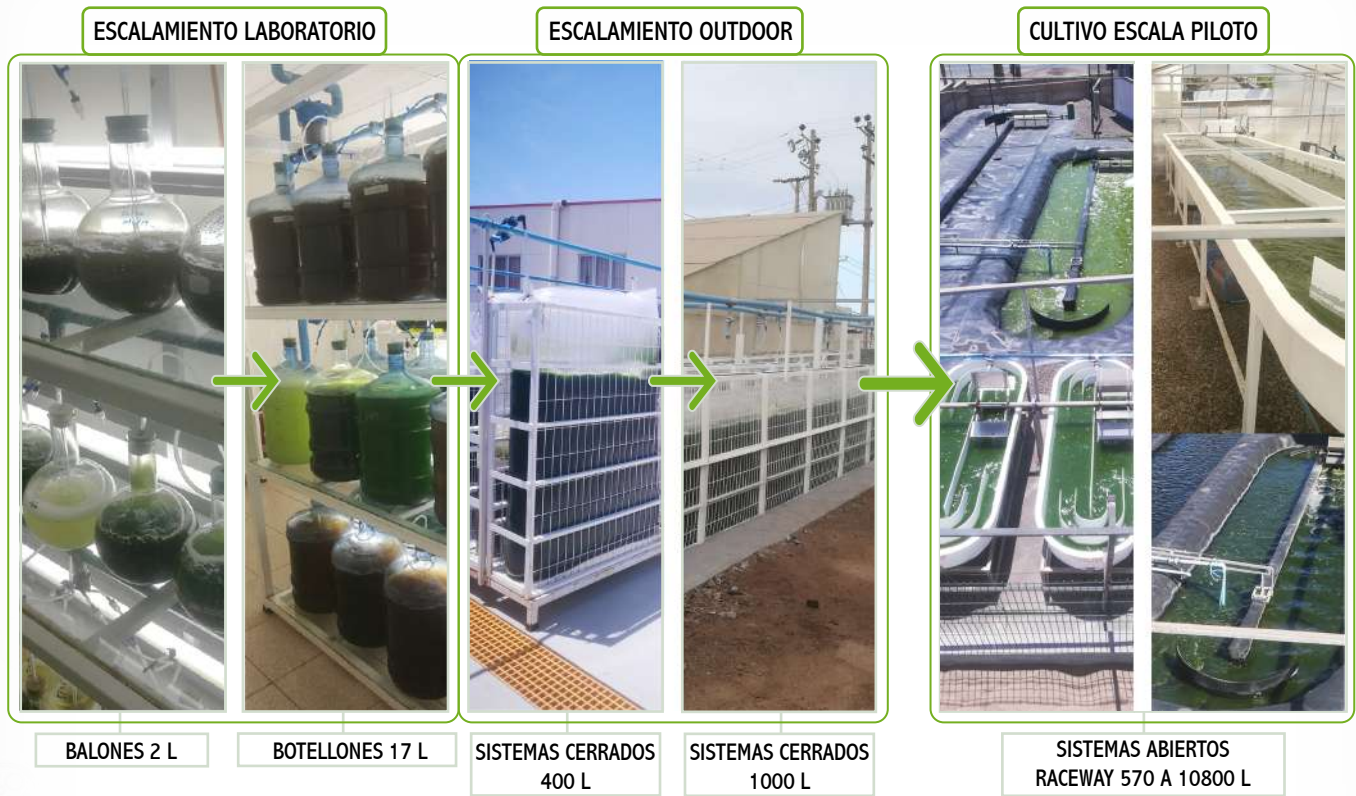


Figura 16: Fotografías de escalamiento de cultivo y cultivo a escala piloto.

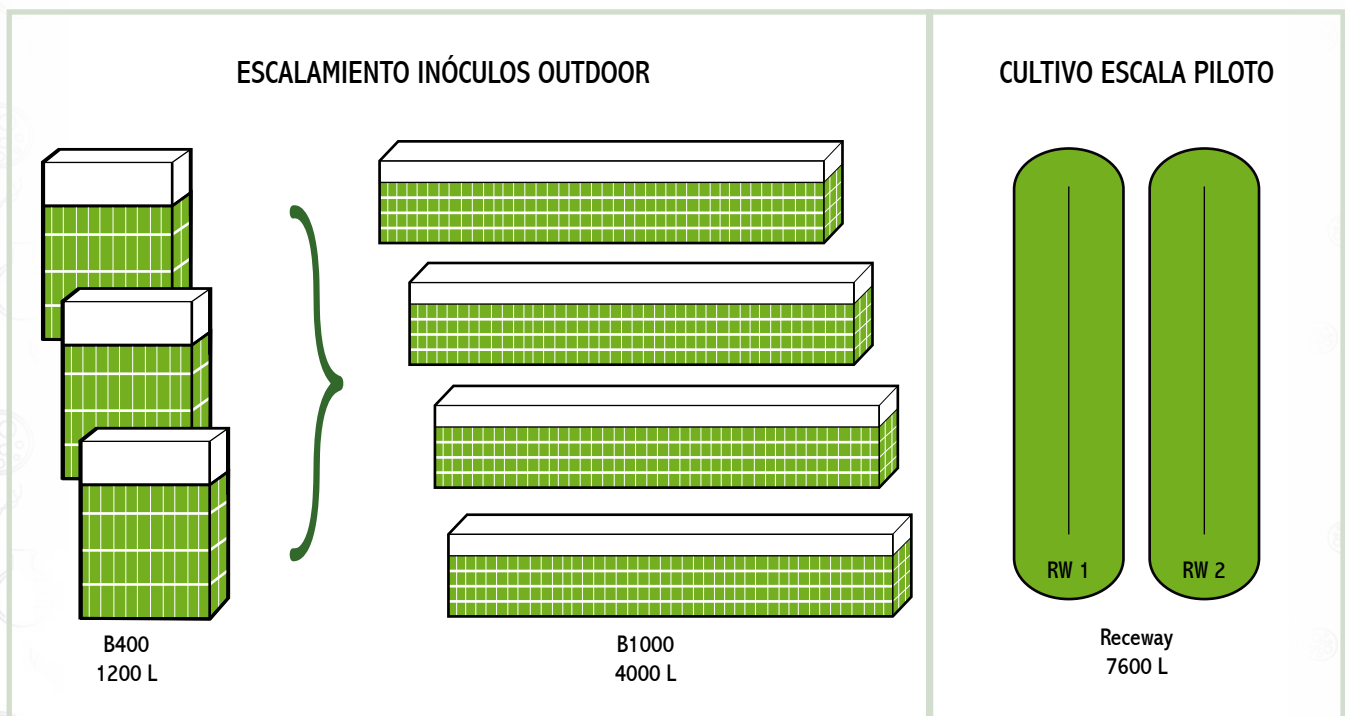


Figura 17: Diagrama de escalamiento de cultivo y cultivo a escala piloto.

Desinfección de Sistema de Cultivo Abierto

La limpieza y desinfección de los sistema de cultivo abierto se realizan eliminando el polvo, luego utilizar ácido muriático para remover restos de microalgas desde pliegues y paletas rotatorias, finalmente enjuagar con abundante agua. Para la preparación del sistema de cultivo:

- ✓ Agregar agua de mar previamente filtrada, hasta 15 cm de altura.
- ✓ Desinfectar agua de mar mediante la adición de hipoclorito de sodio a $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y dejar el sistema en agitación durante 12 horas.
- ✓ Neutralizar el hipoclorito de sodio con $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiosulfato de sodio y dejar en agitación por un mínimo de 2 horas.

Nota: Pesar tiosulfato de sodio y disolver con agua caliente para facilitar su disolución antes de agregar al sistema de cultivo.

Inoculación de Cultivo a Escala Piloto (raceway)

La cantidad de inóculo a utilizar se estima determinando la concentración de biomasa de los inóculos y luego con la Ecuación 1 se calcula el volumen a utilizar. Para iniciar cultivos a escala piloto se recomienda partir a una concentración de biomasa entre $0.3 - 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ecuación 1: Estimación del volumen a utilizar durante la inoculación de cultivos a escala piloto.

$$V \text{ inóculo} = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

Donde V inóculo representa el volumen del inóculo necesario para iniciar el cultivo a escala piloto.

C_i Representa la concentración inicial del inóculo (sistemas de cultivo cerrado).

C_f Representa la concentración final deseada en el cultivo a escala piloto ($0.3 - 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

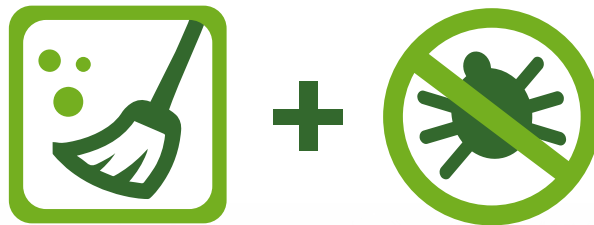
V_f Representa el volumen total del cultivo a escala piloto a inocular.

Procedimiento

- ✓ Una vez determinado el volumen a utilizar de inóculo, eliminar el volumen equivalente desde el sistema de cultivo a escala piloto.
- ✓ Agregar medios de cultivo de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1, esperar 15 minutos para su correcta homogenización.
- ✓ Verificar pH antes de realizar la inoculación. Si el $\text{pH} \leq 6.5$, corregir con la suplementación adicional de $0.168 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 .
- ✓ Agregar el volumen estimado de inóculo y mantener el cultivo en agitación constante con la ayuda de paletas rotatorias instaladas a un extremo del sistema.
- ✓ Programar control de pH (8.2) mediante la inyección automática de CO_2 (ver anexo manual).

Recomendaciones:

- ✓ Barrer sistema de cultivo y foso tres veces por semana, ello mejora la homogenización del cultivo.
- ✓ Tres veces por semana elimine insectos y otros contaminantes del cultivo con la ayuda de un tamiz de piscina.



DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

Cultivo Discontinuo (Batch)

Una vez inoculado el sistema de cultivo raceway, a una concentración inicial de biomasa entre 0.3 a 0.4 g·L⁻¹, se deja crecer durante 15 días (etapa batch) con el fin de permitir el mayor crecimiento celular, la concentración inicial a inocular y la concentración de biomasa al finalizar el batch varía dependiendo de la estacionalidad del año. Una vez iniciado el cultivo discontinuo cada 3 días suplementar la fuente de fósforo en el medio de cultivo. Recolectando una muestra de 100 mL desde el sistema de cultivo y filtrar para recuperar clarificado, luego medir el contenido de fosfato de acuerdo a metodología en el anexo de metodología de monitoreo y calcular la suplementación del medio.

Cultivo Semicontinuo

Una vez alcanzada la concentración máxima de biomasa entre 0.8 a 1 g·L⁻¹ se inicia el cultivo semicontinuo con las cosechas parciales. El volumen estimado a cosechar corresponde al 50% del volumen total de cada sistema de cultivo, cada 7 días. La etapa semicontinua corresponde a 3 cosechas parciales y una última cosecha por el total del volumen, para iniciar un nuevo ciclo, donde se comienza con un inóculo nuevo (Figura 18). El proceso de producción de biomasa microalgal en esta cepa tiene una duración máxima de 36 días, con una producción estimada entre 45 a 56 Kg mes⁻¹ (Tabla 6).

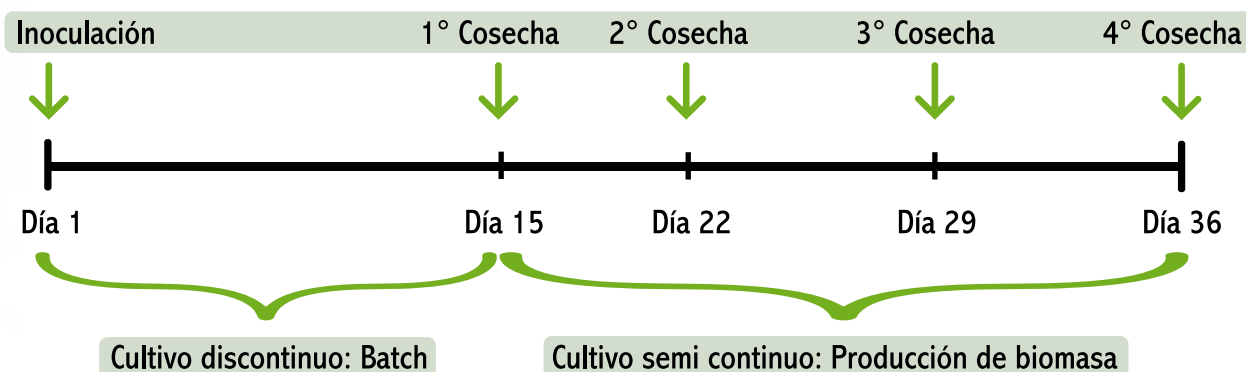


Figura 18: Esquema secuencial de los modos de operación del ciclo y la duración de cada uno.

Tabla 6: Producción de biomasa en modo semicontinuo de *Muriellopsis* sp. en condiciones outdoor.

Planta Piloto	Escala Piloto "raceway"
Cultivo (m ³)	32
Cosecha 50% (m ³ ·cosecha ⁻¹)	16.1
Concentración cultivo (Kg·m ⁻³)	0.8 - 1.0
Producto obtenido (Kg·cosecha ⁻¹)	12.8 - 16
Pérdida asociada a cosecha y secado 30% (Kg·cosecha ⁻¹)	9.0 - 11.2
N°Cosechas parciales	3.0
N°cosechas Total	1
Producción obtenida (Kg·mes ⁻¹)	45 - 56
Contenido de luteína (%)	0.5
Producción Luteína (g·mes ⁻¹)	225 - 281

OBTENCIÓN DE PRODUCTO “HARINA MICROALGAL”

Diagrama de Flujo

El diagrama de flujo es una importante herramienta visual que se utiliza para identificar y describir el proceso, es importante incluir todos los pasos del proceso que están bajo control de la planta procesadora desde el cultivo hasta su almacenamiento final (Figura 19).

Centrifugación

El proceso de obtención del producto “Harina de Microalga” comienza con el cosechado de *Muriellopsis* sp., traslado del caldo de cultivo a través de una bomba centrífuga conectada al sistema raceway y dirigido por las líneas de cosecha hasta el reservorio de centrifugación (figura 19A). La concentración del cultivo se realiza mediante centrifugación continua, el producto a obtener es una “pulpa microalgal”, caracterizada por un contenido de humedad entre 8 a 12%. Otra alternativa es realizar una centrifugación discontinua obteniendo un producto denominado “pasta microalgal”, con un contenido de sólidos entre 27 a 30%, en este caso dicha pasta microalgal debe pasar por un proceso de dilución para continuar a la siguiente etapa de secado (Figura 19B).

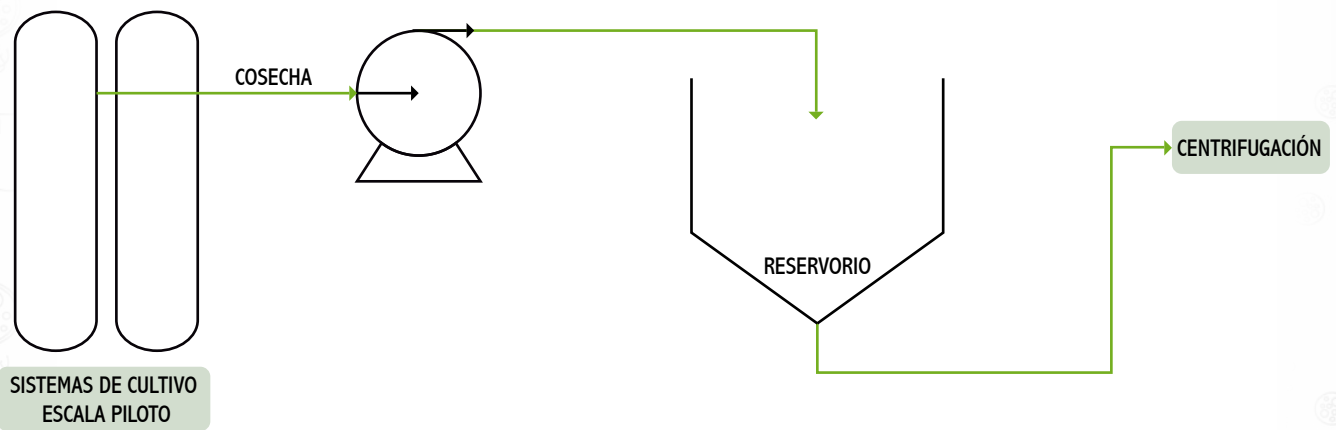


Figura 19A: Diagrama de Flujo del proceso de la obtención del producto final “Harina de Microalga”.

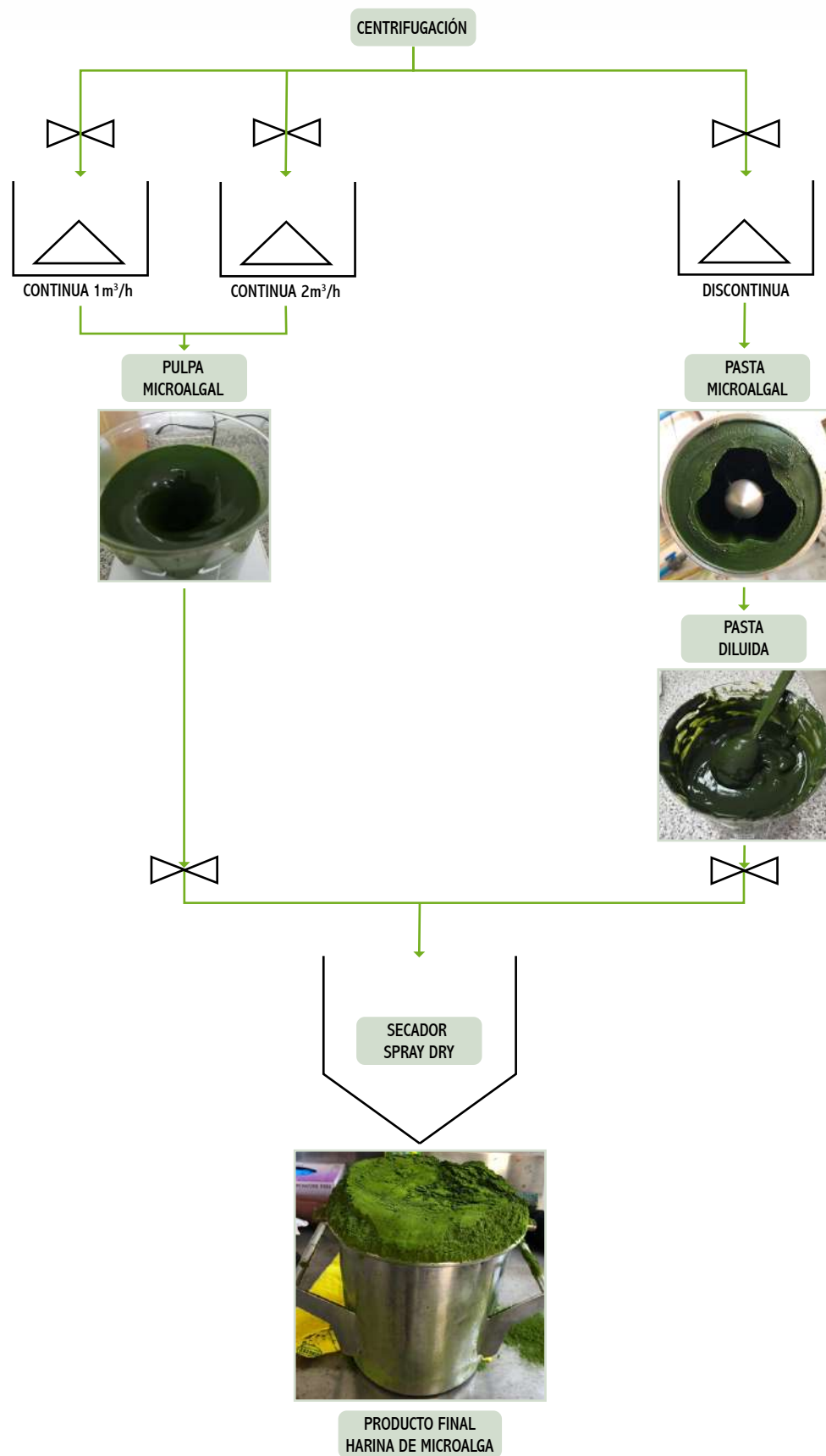


Figura 19B : Diagrama de Flujo del proceso de la obtención del producto final "Harina de Microalga".



Figura 20: Fotografías de centrifugas discontinua y continuas utilizadas para el proceso de obtención de producto.

Secado Spray Dryer

La última etapa del proceso de obtención de la harina microalgal, es la deshidratación de la pulpa microalgal, el cual se extrae la humedad restante. El proceso de secado se realiza a un caudal de $4 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, a una temperatura de entrada de 185°C y a una temperatura de salida de 80°C (Figura 19B). Finalmente se obtiene la “harina de microalgas” caracterizada con un contenido de humedad entre 3 a 5% (Figura 21).



Figura 21: Secador Spray Dryer Naichikeji, modelo Speed centrifuge atomizing dryer LPG-5.

Embalaje y Almacenamiento del Producto Harina Microalgal

La harina de microalgas envasada al vacío (figura 22), protegida de la luz y almacenada a 4 °C, es la condición ideal para mantener el contenido de luteína inalterable durante los primeros 30 días de almacenamiento. Posterior a ello experimenta una disminución gradual, sin embargo, a los 6 meses de almacenamiento sólo hay una disminución de un 20% del contenido total.

- ✓ Recolectar una muestra de 5 g de harina, sellar al vacío, rotular y almacenar a 4 °C para su posterior análisis.
- ✓ Sellar al vacío el resto de la harina de microalga, protegiéndola de la luz.
- ✓ Registrar su peso y rotular, incluyendo en la etiqueta nombre de la cepa, fecha de cosecha, gramos obtenidos y N° de lote.



Figura 22: Producto harina de microalgas envasada al vacío.

DESCRIPCIÓN DE PLANTA PILOTO

Unidad de Microbiología Aplicada (UMA)

El Centro de Bioinnovación, dependiente de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos de la Universidad de Antofagasta, está compuesta por distintas unidades y tiene como finalidad la investigación aplicada. La Unidad de Microbiología Aplicada, por medio de proyectos, estudia la optimización de las condiciones de cultivo para la producción estandarizada de biomasa microalgal con interés biotecnológico. Cuenta con laboratorios de análisis y condiciones controladas para el cultivo microalgal en condiciones de laboratorio. Además de una planta piloto para la producción de biomasa microalgal con una capacidad de 32 m³.

Línea de Agua de Mar

La planta piloto se abastece de agua de mar proveniente del reservorio central de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos. El flujo de agua a través de una bomba centrífuga de 2 HP a dos destinos; Estanque reservorio (TK1) ubicado a un costado del Galpón del UMA, o bien puede seguir directo al estanque reservorio TK2 y TK5, encargado de abastecer los sistemas de cultivo B1000 y raceway. Independiente de los destinos antes de ingresar a los reservorios, el agua es tratada mediante dos filtros de arena instalados en serie (200 µm). Posterior a ellos cada reservorio cuenta con un sistema de filtración de cartuchos de 30", instalados en serie distribuyendo el agua filtrada a 20, 10, 5 µm hacia los sistemas de cultivo a escala piloto.

Línea de Cosecha/Inoculación:

La planta piloto cuenta con líneas interconectadas de cosecha e inoculación distribuidas a lo largo de toda la planta, para recuperar los cultivos y dirigirlos hacia otros sistemas de cultivo a ser inoculados o bien al estanque reservorio de cosecha (TK4).

Sala de Centrifugación

La sala de centrifugación es el área destinada a procesar los cultivos microalgales. Se encuentra interconectada con la línea de cosecha y el reservorio de cosecha (TK4) y en su interior se encuentran: Centrífuga discontinua y las dos centrífugas continuas.

Sala de Secador Solar

La sala alberga el secador de energía termo solar para la deshidratación de pasta microalgal entre 27 a 30% de sólidos. La capacidad de evaporación máxima del equipo es de $250 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ en las horas centrales del día, pero se reduce notablemente por la tarde-noche hasta valores de $100 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ a una temperatura estable de $45\text{-}50^\circ\text{C}$. La biomasa seca obtenida queda en forma de hojuelas de microalgas deshidratadas con un porcentaje de humedad entre 4 a 6%.

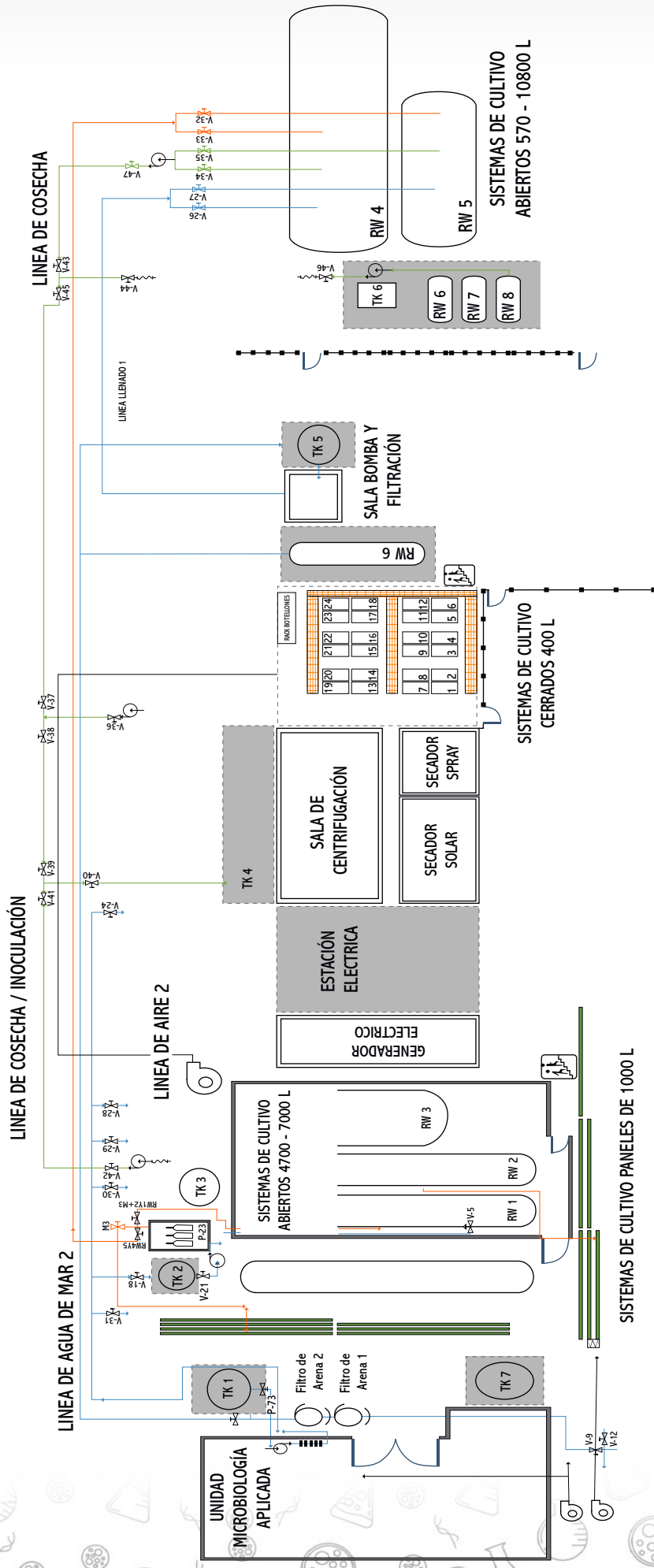
Sala Secador Spray Dryer

Etapa del proceso para la obtención del producto “Harina microalgal”. Se encuentra instalado un secador Spray Dryer que opera $4\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, a una temperatura de entrada de 185°C y a una temperatura de salida de 80°C .

Sala Bomba y Filtración

La planta piloto cuenta con una sala de bombeo y filtración adicional a la ubicada en el galpón UMA, ésta sala se ubica cercana a los sistemas de cultivo raceway desde el N° 4 al 8 y está conectada a el estanque reservorio TK4. La sala está habilitada con una bomba centrífuga de 1.5 HP conectada al reservorio TK4, un filtro de arena de $200 \mu\text{m}$ y un sistema de filtración de cartucho de 30”.

PLANTA PILOTO UMA



ANEXOS



ANEXO I

Análisis de Monitoreo

En la Unidad de Microbiología Aplicada se deben realizar monitoreos constantes de distintos parámetros fisicoquímicos que aseguran el correcto desarrollo de los cultivos microalgales tanto en condiciones indoor como outdoor.

Método de conteo directo de microalgas

El método empleado para contar microalgas es sencillo, utilizando un hemocitómetro o también llamado cámara de Neubauer. Este método consiste en el recuento directo del número de células microalgales presentes en un volumen determinado de muestra, por medio de una observación en un microscopio.



Figura 23. Cámara Neubauer

- ✓ Poner un cubreobjeto limpio sobre los pilares de soporte de la cámara.
- ✓ Usando una micropipeta agregar 10 μl de muestra de microalgas, en ángulo de 45°, poner una gota en cada ranura del hemocitómetro para llenar el espacio correspondiente. Es conveniente esperar tres minutos antes de proceder al conteo en el microscopio, de esta forma las unidades microalgales se asientan debidamente. Usar objetivos de 20X o 40X según el tamaño de la microalga observada.
- ✓ Con la ayuda de un contador manual, contar todas las microalgas presentes en los cuadrantes (L, figura 24). Mantener un orden en la secuencia del conteo para evitar errores de suma. No considere las células que están asentadas justo en medio de cualquier línea de los cuadros, sean de las internas o de los laterales, aunque este criterio no se aplica cuando apenas es un 25% del cuerpo de la célula el que esté topando la línea.

- ✓ Cada muestra de cultivo microalgal debe ser contada por triplicado, calculando el promedio entre ellos que sera el valor de $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la muestra (ecuación 2).

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

Ecuación 2: cálculo de densidad de microalgas ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) por medio de una cámara de Neubauer.

$$\text{Concentración celular} \frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\Sigma n^{\circ} \text{ celular en cada cuadrante}}{n \text{ de cuadrantes}} \times 10.000$$

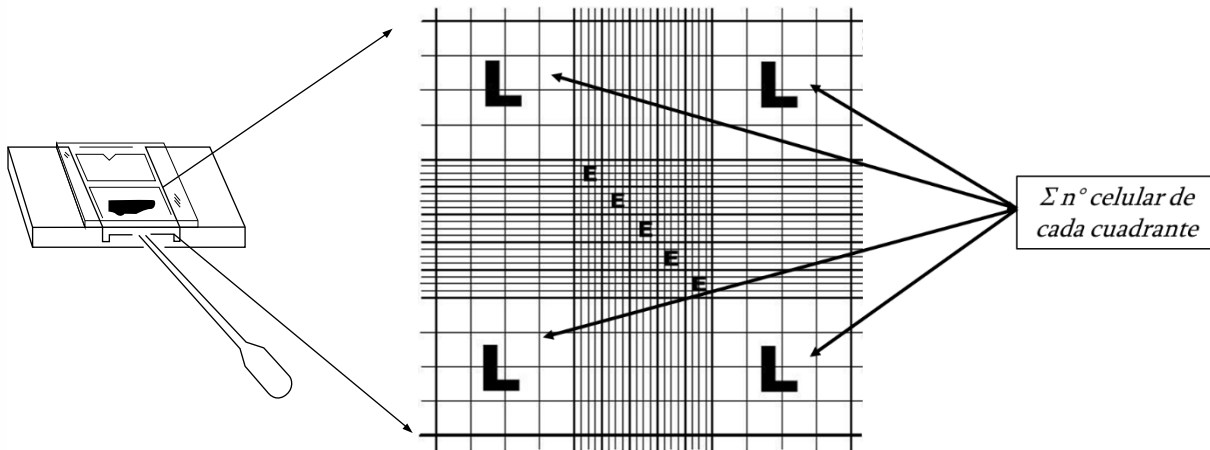


Figura 24: Esquema de cuadrantes de cámara de Neubauer.

Método gravimétrico de sólidos totales

Determinación de la concentración, productividad de biomasa y tasa de crecimiento del cultivo:

La cantidad de biomasa total presente en un cultivo se calcula como la diferencia entre el peso inicial y final, (ecuación 3). Es importante considerar que especialmente, pero no exclusivamente, en el caso de microalgas marinas, esta determinación se verá afectada por la cantidad de sales presentes en el filtro, en los espacios intercelulares y en la superficie celular, por lo cual es indispensable eliminarlos mediante un procedimiento de lavado.



Figura 25. Procedimiento método gravimétrico de sólidos totales

- ✓ Montar aparato de filtración y filtro de fibra de vidrio (Glass-Microfibre discs, grade MGA de 90 mm), lavar con agua destilada y secar en estufa por 1 hora a 105°C.
- ✓ Enfriar en desecadora a temperatura ambiente y registrar peso del filtro (P. inicial).
- ✓ Montar aparato de filtrado.
- ✓ Montar filtro en el sistema, humedecer para asentarlos e iniciar la filtración de la muestra.
- ✓ Agitar muestra (200 mL), encender bomba de vacío y filtrar muestra, repetir si es necesario. Idealmente el filtro debe quedar como se muestra en la última fotografía (figura 25).
- ✓ Luego de filtrar la muestra, lavar dos veces con agua destilada (20 mL) y remover cuidadosamente el filtro con la ayuda de una pinza. Disponer en contenedor y dejar secar en estufa por 2 h a 105°C.

- ✓ Una vez transcurrido el tiempo de secado, retirar de la estufa y dejar en desecadora a temperatura ambiente.
- ✓ Registrar peso del filtro (peso final), la diferencia del peso entre los filtros da como resultado la concentración de biomasa del cultivo (Ecuación 3)

Ecuación 3: Cálculo sólidos totales en el cultivo microalgal ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

$$\text{Sólidos Totales} = \frac{(p. \text{ final} - p. \text{ inicial}) \times 1000}{\text{Muestra filtrada (ml)}}$$

Ecuación 4: Cálculo de productividad de biomasa se en términos volumétricos (P_b) y por el área ocupada (P_A) en modo de cultivo batch:

$$P_b = \frac{C_f - C_i}{t_f - t_0} \quad P_A = \frac{(C * V)/t}{A}$$

Donde C_f y C_0 es la concentración de biomasa que tiene t_f y t_i (tiempo inicial 0 y final f), V es volumen de cultivo en litros; A es el área del sistema de cultivo (m^2).

Ecuación 5: La tasa de crecimiento específica (μ) se estima dividiendo la pendiente del perfil de concentración de biomasa por la concentración de biomasa promedio durante la fase de crecimiento exponencial.

$$\mu = \frac{1}{C} * \frac{dC}{dt}$$

REGISTRO DE PARÁMETROS DE CULTIVO

Eficiencia fotosintética

La fluorescencia de la clorofila se determina para evaluar la actividad del fotosistema II. La cual se ha demostrado que se ve influenciada por las condiciones de cultivo e indica un grado de estrés fisiológico de las células. Se monitorea mediante un equipo denominado Aquapen (Photon Systems Instruments, República Checa).

- ✓ Encender el equipo y escoger en el menú la opción QY, de esta manera el equipo queda listo para el procedimiento.
- ✓ Para la medición, recolectar una muestra de cultivo y homogenizar, luego depositar 1 mL en cubetas de plástico y poner en oscuridad durante 3 minutos.
- ✓ Introducir la cubeta en el equipo y se procede a medir la muestra por triplicado.

Radiación solar incidente

Registrar la radiación solar incidente durante el tiempo que dura el ensayo, utilizando un medidor portátil (Light Meter Li-250 A), habilitado con un sensor cuántico esférico PAR (Li-COR SPQA 5219).

Temperatura y pH del Cultivo

La temperatura óptima de un cultivo varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C. Como en otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo pH 8.2 el más indicado para mantener el control en los sistemas de cultivo abierto, mediante inyección automática de CO₂. El registro de estos dos parámetros se realiza con una frecuencia entre 48 a 72 h utilizando un sensor multiparámetro de HANNA Instruments code HI98194, el cual se calibra previamente para luego ser introducido en la muestra de cultivo a monitorear.

CALIDAD DE LA BIOMASA

Lípidos totales: Gravimetría de lípidos

Para cada muestra liofilizada, usar alúmina, 3 microtubos de plástico de 2 mL y perlas de 1 mm. Además, nueve tubos de vidrio, seis para centrifugar y tres que deben ponerse en estufa y posteriormente deben pesarse.

- ✓ Poner 3 microtubos (triplicado) para cada muestra, con 7 perlas de 2.3 mm en su interior.
- ✓ Pesar 100 mg de muestra de microalga liofilizada, 100 mg de alúmina (ayuda en el rompimiento de la pared) y 1 mL de cloroformo: metanol (2:1).
- ✓ Poner en el bead beater a 3200 rpm durante 30 segundos, este procedimiento se repite 6 veces tomando un intervalo para que el o-ring del equipo no se caliente.
- ✓ Verter el contenido del microtubo en un tubo de vidrio y enjuagar el microtubo con 1 ml de cloroformo: metanol (2:1) . Incorporar al resto de la muestra.
- ✓ Agitar el tubo en el vórtex y centrifugar a 2800 rpm por 3 minutos.
- ✓ Verter el sobrenadante en un tubo de vidrio nuevo.
- ✓ Si ha quedado muestra, repetir los tres últimos pasos.
- ✓ Agregar 1.5 mL cloroformo: metanol (2:1) al precipitado remanente.
- ✓ Agitar el tubo en el vórtex y centrifugar a 2800 rpm por 3 minutos.
- ✓ Repetir hasta que el sobrenadante comience a perder su coloración verde a un tono muy claro. Una vez obtenido 6 - 8 mL de sobrenadante, agregar 3 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y 0.3 mL de cloruro de magnesio 0.5% p/v (0.5 g de cloruro de magnesio en 100 mL de agua destilada en matraz de aforo, en el caso de que el cloruro de magnesio este hidratado dejar a 0.5% p/p).
- ✓ Agitar invirtiendo el tubo tres veces (usar tapa con goma ya que el líquido puede escurrir por las paredes hacia fuera del tubo).
- ✓ Agitar en vortex, centrifugar a 2800 rpm por 3 min.
- ✓ En el tubo quedan dos fases, arriba una clara y abajo una oscura, separadas por un precipitado blancuzco de proteínas.

- ✓ Recuperar la fase oscura (inferior) con una pipeta Pasteur y un bulbo de goma. Esta corresponde a lípidos más cloroformo.
- ✓ Depositar en un tubo de vidrio previamente secado en la estufa y pesado.
- ✓ Secar bajo corriente de nitrógeno gaseoso, hasta que se evapore todo el cloroformo y quede un remanente color café en el fondo del tubo.
- ✓ Dejar en la estufa a 40°C por 12 horas, para evaporar completamente el cloroformo.
- ✓ Pesar el tubo con la muestra de lípidos, para determinar mediante la siguiente fórmula el porcentaje de lípidos en la muestra.

Ecuación 6: Porcentaje de lípidos totales en la biomasa microalgal.

$$\% \text{ Lípidos} = \left(\frac{(\text{Lípidos (g)})}{\text{peso biomasa (mg)}} \right) \cdot 100$$

Proteínas Totales: Metodología Lowry 1951, modificada por Herbert, D.1971

- ✓ Reactivo 1: Na_2CO_3 (5%) 5 g en 100 mL de agua destilada.
- ✓ Reactivo 2: 0.5% CuSO_4 en tartrato de sodio potasio al 1%. Pesar 1 g de tartrato de sodio potasio en 100 mL de agua destilada, usar para disolver 0.5 g de CuSO_4 . En el caso de que el reactivo esté hidratado, se debe pesar 0.78 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y en el caso de tartrato de sodio potasio tetra hidratado pesar 1.34 g. Aparecerá un precipitado de sulfato de cobre después de unas horas por lo que es conveniente dejarlo preparado y decantando durante la noche, al día siguiente tomar el sobrenadante y descartar el precipitado.
- ✓ Reactivo 3: Mezclar 50 mL de reactivo 1 con 2 mL de reactivo 2. Este reactivo debe ser preparado en el momento del análisis.
- ✓ Reactivo 4: Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con H_2O (preparar en botella ámbar).
- ✓ Estándar de BSA: Preparar una solución de 1mg·mL en agua. Guardar a -4°C.
- ✓ Pesar 15 mg de biomasa.
- ✓ Añadir 2 mL de NaOH 1N. Mezclar y colocar en un baño a 95-100 °C durante 1 h. Enfriar a temperatura ambiente 15 min. Centrifugar 5 min a 3000 rpm.

- ✓ Añadir 2 mL de NaOH 1N. Mezclar y colocar en un baño a 95-100 °C durante 1 hora. Enfriar a temperatura ambiente 15 minutos. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- ✓ Transferir 0.1 mL (o volúmenes mayores, hasta un máximo de 0.4 mL) a un nuevo tubo por triplicado. Añadir 0.3 ml de NaOH 1N.
- ✓ Si se utiliza 0.2 mL de muestra, completar con 0.2 mL de NaOH 1N. Completar un volumen total de 0.4 mL entre muestra y NaOH 1N. Y agregar 0.4 mL de agua destilada.
- ✓ Preparar un blanco: 0.4 mL de NaOH 1N más 0.4 mL de agua destilada.
- ✓ Preparar un control positivo usando 0.1 mL de solución stock de BSA ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 0.3 mL de agua destilada más 0.4 mL de NaOH 1 N.
- ✓ Añadir a todos los tubos 2 mL del reactivo 3 (solución de Cu-tartrato), mezclar y dejar reaccionar 10 minutos.
- ✓ Añadir a todos los tubos 0.4 mL del reactivo 4 (Folin-Ciocalteu diluido), mezclar inmediatamente.
- ✓ Dejar 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm contra un blanco.

Tabla 7. Preparación de disoluciones estándar para curva patrón.

Tubo	BSA (mL)	H ₂ O (mL)	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	0	0.4	0
2	0.025	0.375	0.008
3	0.05	0.35	0.016
4	0.075	0.325	0.023
5	0.1	0.3	0.031
6	0.2	0.2	0.063
7	0.4	0	0.125

- ✓ Añadir 0.4 mL de NaOH 1N a las soluciones seriadas antes de medir, para activar la reacción colorimétrica. Repetir los pasos desde la reacción con reactivo 3.

Pigmentos fotosintéticos: Clorofilas a, b y carotenoides totales por espectrofotometría

- ✓ Pesar 15 mg de biomasa liofilizada en un tubo pyrex.
- ✓ Agregar 4 mL de metanol, colocar 15 minutos en baño maría a 60 °C.
- ✓ Centrifugar el extracto por 5 minutos a 3000 rpm.
- ✓ Determinar la absorbancia del extracto tomando lecturas a 470, 653 y 666 nm en un espectrofotómetro, realizar el autozero con metanol.

Ecuación 7: Concentración de clorofilas a

$$Chl\ a\left(\frac{\mu g}{mL}\right) = (15.65 \times Abs\ 666) - (7.34 \times Abs\ 653)$$

Ecuación 8: Concentración de clorofilas b

$$Chl\ b\left(\frac{\mu g}{mL}\right) = (27.05 \times Abs\ 653) - (11.21 \times Abs\ 666)$$

Ecuación 9: Concentración de carotenoides totales

$$Car.totales\left(\frac{\mu g}{mL}\right) = \frac{(1000 \times Abs\ 470) - (2.86 \times Chl\ a - 129.2 \times Chl\ b)}{221}$$

Determinación de Carotenoides por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

- ✓ Realizar el procedimiento en condiciones de oscuridad.
- ✓ Pesar 5 mg de muestra, 5 mg de alúmina e introducirlo en un tubo para el beater, 0.6 g de perlas (1mm).
- ✓ Saponificar con 1 ml de solución A (Pesar 0,1 g de KOH y disolver en 6 ml de agua), añadir 77 ml de etanol y luego 17 ml de hexano.
- ✓ Crear atmosfera inerte: Ingresar Nitrógeno gaseoso al tubo, cerrar rápidamente y agitar en vórtex durante 30 minutos. Se introduce en el beater durante 2 min.

Preparación de viales para HPLC

- ✓ Poner los tubos en el beater durante 2 min a 3200 rpm.
- ✓ Centrifugar durante 2 minutos a 2800 rpm, quedando el pellet blanco en el fondo (alúmina, perlas y restos de biomasa).
- ✓ Trasvasar la disolución con una pipeta graduada de vidrio o pipeta Pasteur (0.75 mL), a viales ámbar para HPLC.
- ✓ Inyectar las muestras en HPLC.

Cálculo de Carotenoides

A continuación, se describen las curvas de calibración en detector diodo-array:

B-caroteno, $\mu\text{g/mL} = 0.00201267 \cdot \text{Área}$

Zeaxantina, $\mu\text{g/mL} = 0.00003387 \cdot \text{Área}$

Luteína, $\mu\text{g/mL} = 0.00001645 \cdot \text{Área}$

Astaxantina, $\mu\text{g/mL} = 0.00001789 \cdot \text{Área}$

Violaxantina, $\mu\text{g/mL} = 0.00000445 \cdot \text{Área}$

Utilizando factores de conversión y teniendo en cuenta la biomasa se calcula el porcentaje de carotenoide en peso utilizando la ecuación 10.

Ecuación 10: Porcentaje de Carotenoides en la biomasa microalgal.

$$\% \text{ Carotenoides}(d.w.) = \left[\frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}}}{\text{mg biomasa}} \right] \times 100$$

Para calcular % Total carotenoides se suma todos los carotenoides.

Muriellopsis sp. suele tener neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina y betacaroteno

ANÁLISIS DE AGUA

Registro de la Concentración de Macronutrientes

Los cultivos deben ser monitoreados para mantener el registro del consumo de los macronutrientes y además corregir la cantidad necesaria de cada uno, con la finalidad de mantener la relación N: P óptima para la cepa *Muriellopsis* sp., una relación que a escala masiva evita la limitación de los nutrientes que afectan directamente en la productividad de biomasa.

Obtención de Clarificado para Análisis

Filtrar 100 mL de muestra de cultivo a través de un filtro de fibra de vidrio (Munktell) de 90 mm de diámetro y 1.2 μm de diámetro de poro, a través de un sistema de filtración (Winkler 501030) con matraz de kitasato conectado a una bomba de vacío (Thomas, modelo N° 1636-A). El clarificado se recupera en una botella de vidrio para su análisis.

Determinación Fosfato

Se realiza mediante espectrofotometría a 882 nm en se basa en la reacción del compuesto fosforo-vanadato-molibdato.

Preparación de reactivos

- Solución 1.- Pesar 0.95 g de amonio molibdato tetra hidrato ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y llevar 10 mL con agua destilada. Almacenar refrigerado en frasco de vidrio, por un período de tiempo no mayor de 6 meses. Este reactivo puede formar un precipitado blanco con el tiempo, que no interfiere en la calidad del análisis. Agitar muy bien antes de utilizarlo.
- Solución 2.- preparar H_2SO_4 25% v/v. En un matraz de aforo de 100 mL agregar un poco de agua destilada y añadir sobre ella 25 mL de ácido sulfúrico 96% y enrasar con agua destilada a 100 mL. Esta solución es estable varios meses en botella de vidrio. Precauciones de preparación: poner unos 50 mL de agua destilada en la botella, añadir sobre ellos la mitad del

ácido, enfriar la botella bajo con agua potable (ya que se calienta mucho), añadir el resto del ácido y volver a enfriar la botella. Una vez fría enrasar a 100 mL con agua destilada.

- ✓ Solución 3.- pesar 0.7 g de ácido ascórbico y llevar a 10 mL de agua destilada. Calcular el volumen que se requiere según cantidad de muestras analizar.
- ✓ Solución 4.- pesar 0.32 g de antimonio potasio tartrato hidrato ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$) y enrasar con agua destilada a 10 mL. Esta solución es estable varios meses en botella de vidrio.
- ✓ Reactivo A.- Poner en una botella 2.25 mL de la solución 1, añadir 10 mL de la solución 2 y añadir 0.25 mL de la solución 4. Esta solución ha de prepararse en el momento de usarse, no debe ser guardarla. Esto alcanza para 12 muestras.

Procedimiento de determinación de la curva de calibración

- ✓ Solución stock: Pesar 0.2196 g de KH_2PO_4 anhidro y enrasar con agua destilada a 0.5 L o 500 mL. Se puede preparar menos, ya que, de esta solución luego se usan solo 10 mL.
Nota: Puesto que ha de ser anhidro, secar previamente en estufa (105°C durante 2 h). Esta solución es estable varios meses si se conserva en oscuridad y se añade 1 mL de cloroformo.
- ✓ Solución estándar: tomar 10 mL de la solución stock y llevar a 100 mL con agua destilada en un matraz de aforo. Transferir alícuotas de esta solución stock para preparar las distintas concentraciones de fosfato: 0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 2.4 y 3 mL, enumerando desde el 1 al 8 y enrasar a 25 mL con agua destilada en matraz de aforo de 25 mL.
- ✓ Hacer un blanco con agua destilada, llenar matraz de aforo con 25 mL con agua destilada.
- ✓ Ordenar 9 matraces y agregar a cada uno 0.75 mL de reactivo A y 0.75 mL de solución 3.
- ✓ Esperar 30 minutos y leer absorbancia a 882 nm en cubeta de cuarzo, hacer cero en el espectrofotómetro con agua destilada.
- ✓ Medir el blanco y luego las muestras, aplicar la ecuación 11 a los valores obtenidos.
- ✓ Graficar absorbancia 882 nm versus concentración $mg \cdot L^{-1}$ de PO_4 .
- ✓ Agregar línea de tendencia, presentar ecuación y el valor R cuadrado en el gráfico.

- ✓ Siempre utilizar un control positivo para verificar procedimiento.

IMPORTANTE: Las muestras con bajas concentraciones de fósforo no se deben almacenar en botellas plásticas a menos que se congelen, debido a que los fosfatos se pueden adsorber en las paredes del plástico.

Análisis Fosfato

- ✓ Utilizar 2 mL de muestra, el valor de absorbancia debe estar dentro de la curva de calibrado (0.1 – 0.8). El resto se lleva a 25 mL con agua destilada en un matraz de aforo de 25 mL.
- ✓ Agregar 0.75 mL del reactivo A y 0.75 mL de la solución 3.
- ✓ Esperar 30 minutos y leer absorbancia a 882 nm, hacer cero con agua destilada.
- ✓ Medir el blanco y luego las muestras, aplicar la ecuación 11 a los valores obtenidos.

Ecuación 11: Cálculo de la concentración de fosfato

$$P04, \frac{mg}{l} = \frac{Abs\ 882nm - Abs\ 882\ blanco}{pendiente\ (curva\ de\ calibrado)} \times dilución$$

Determinación de Nitrato

Los nitratos son medidos espectrofotométricamente por ultravioleta a una longitud de onda de 220 nm y 275 nm.

Procedimiento de determinación de la curva de calibración

- ✓ Solución stock 1. Pesar 0.8145 g de KNO_3 y llevar a 50 mL.
- ✓ Transferir alícuotas de la solución stock 1 a matraces de aforo de 25 mL enumerando desde el 1 al 9 para preparar distintas concentraciones de nitrato y enrasar a 25 mL con agua destilada.
- ✓ De estas soluciones tomar 0.25 mL de cada una y agregar en un matraz de aforo de 25 mL, realizar esto por duplicado.

- ✓ Preparar un blanco agregando 0.25 mL de agua destilada en un matraz de aforo de 25 mL.
- ✓ Preparar una muestra con concentración conocida, por ejemplo 0.3825 g de nitrato de sodio en 1 litro de agua destilada. De esta muestra agregar 0.25 mL a un matraz de aforo de 25 mL.
- ✓ Luego agregar 0.25 mL de HCl 1N a todos los matraces.
- ✓ Enrasar a 25 mL con agua destilada y agitar.
- ✓ Programar el espectrofotómetro para leer la absorbancia a 220 y 275 nm en cubetas de cuarzo.
- ✓ Usar agua destilada para hacer cero en el espectrofotómetro.
- ✓ Medir el blanco y luego las muestras.
- ✓ Aplicar la ecuación 12 a los valores obtenidos.
- ✓ Graficar Concentración $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NO_3 versus absorbancia final de absorbancia que nos de la siguiente.
- ✓ En el gráfico agregar línea de tendencia, presentar ecuación y el valor R cuadrado en el gráfico.

Análisis Nitrato

- ✓ Tomar 1 mL de la muestra desconocida y agregar en un matraz de aforo de 25 mL, realizar por duplicado.
- ✓ Preparar un blanco, agregar 0.25 mL de agua destilada a un matraz de 25 mL.
- ✓ Preparar un control positivo con una concentración conocida de nitrato de sodio e incluirla en las mediciones para verificar procedimientos.
- ✓ Agregar 0.25 mL de HCl 1N a todos los matraces.
- ✓ Luego enrasar a 25 mL y agitar.
- ✓ Programar el espectrofotómetro para leer la absorbancia a 220 y 275 nm en cubetas de cuarzo.
- ✓ Hacer cero con agua destilada, medir el blanco y luego las muestras.
- ✓ La concentración de nitrato se determinará al aplicar la ecuación 12. Si la absorbancia nos da fuera del rango lineal, habría que diluir previamente la muestra y multiplicar el resultado obtenido por la dilución aplicada.

Ecuación 12: Cálculo de la concentración de nitrato.

$$NO_3, \frac{mg}{l} = \frac{(Abs\ 220 - Abs\ 220\ blanco) - (2x(Abs\ 275 - Abs\ 275\ blanco))}{pendiente\ x\ dilución}$$

- ✓ Si se obtiene un valor de absorbancia 0 o menor a 0.099, se debe agregar mayor cantidad de muestra. Si se utilizó 1 mL de muestra y el valor de absorbancia fue bajo, agregar 2 o 5 mL se puede agregar hasta 24.75 mL de muestra desconocida.

ANEXO II: OPERACIÓN PLANTA PILOTO CENTRO DE BIOINNOVACIÓN

Llenado de Estanques Reservorios TK1 y TK5

Se utiliza un filtro de arena para una filtración previa al ingreso de agua de mar a los estanques reservorios de la planta (TK1 y TK3). Desde los reservorios, el agua es nuevamente filtrada antes de ser distribuida a los sistemas de cultivo.

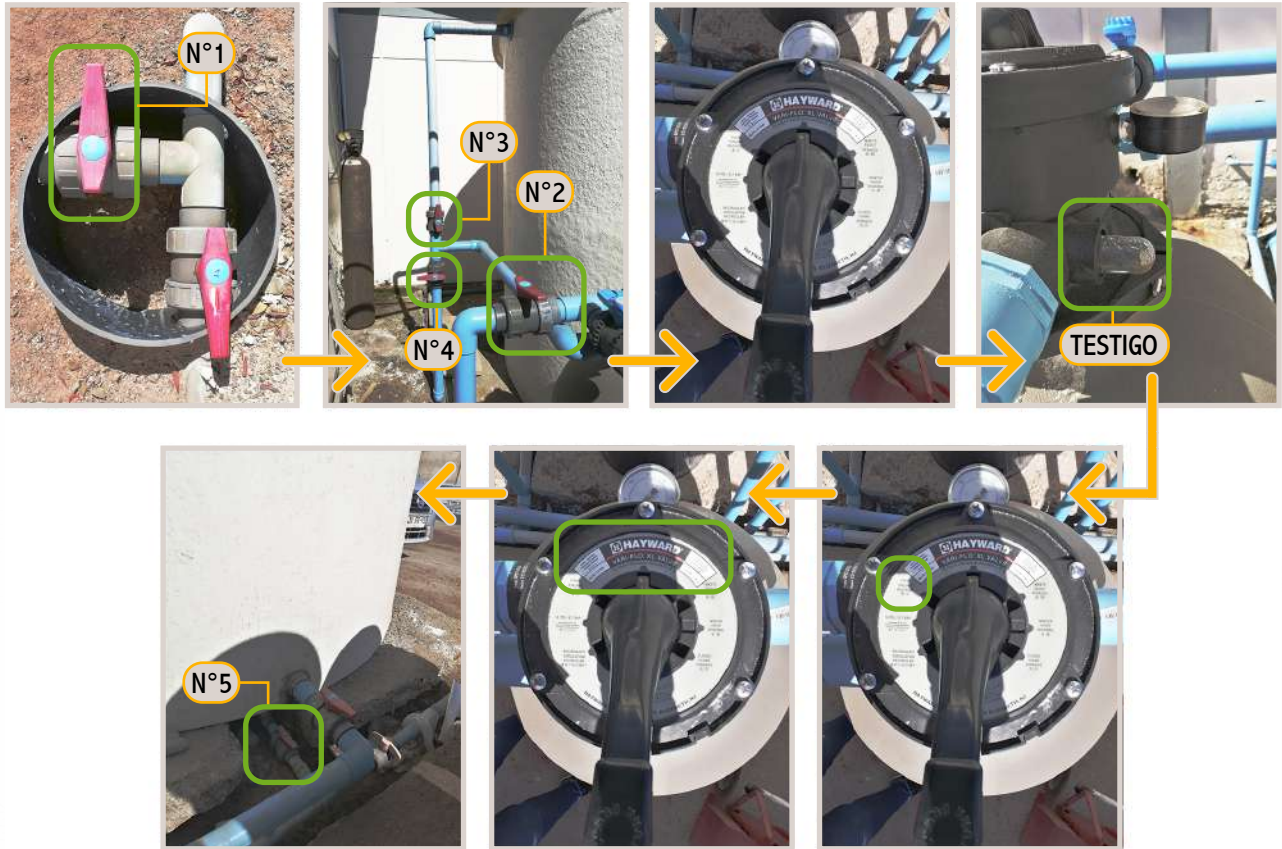


Figura 26. Procedimiento para el llenado de estanques Reservorios TK1 y TK5.

- ✓ Antes de llenar el reservorio y lavar filtro de arena fijarse que las válvula 1 y 2 estén abiertas (figura 26).
- ✓ Ubicar la palanca del filtro de arena en “BACKWASH/LAVAGE/LAVADO”.
- ✓ Encender la bomba general ubicada en sala bombas central y dejar el filtro de arena en LAVADO durante 10 minutos o hasta que el testigo que está por detrás del filtro de arena se observe limpio.

- ✓ Luego realizar enjuague moviendo palanca del filtro de arena a posición RINSE/ENJUAGE, cerrar rápidamente la válvula N° 2 y después de 2 minutos abrirla nuevamente.
- ✓ Para llenar el estanque reservorio TK1 o TK5, cerrar la válvula N° 2, mover la palanca a FILTRACIÓN y volver abrir la válvula N°2 (maniobra rápida).
- ✓ Para llenar TK1 abrir válvula N°3 y cerrar válvula N°4.
- ✓ Para llenar TK5 abrir válvula N°4 y cerrar válvula N°3.
- ✓ Abrir válvula N°5 del desagüe del reservorio TK1 5 minutos, para eliminar agua y cerrar para su llenado.

Distribución de Agua de Mar

Antes de ser distribuida el agua de mar es tratada mediante una filtración adicional de 20,10, 5 y 1 μm . Desde el Reservorio TK1 se conduce el agua de mar directamente al galpón UMA para abastecer el cultivo de microalgas a escala de laboratorio (sala 20), la sala de automatización y la sala de cultivos auxiliares. Además, con este sistema se pueden abastecer el reservorio TK2 y sistemas de cultivo B400 y B1000.

Procedimiento Galpón UMA



Figura 27. Procedimiento distribución de agua de mar en el galpón UMA.

- ✓ Enjuagar con abundante agua potable e instalar elementos filtrantes (cartuchos de 20, 10, 5 y 1 μm) en el sistema de filtración que se encuentra al interior del galpón UMA.
- ✓ Cerrar válvula N°8 y 10.
- ✓ Abrir válvula N°6 conectada al estanque reservorio TK1, abrir válvula N°7 conectada a bomba centrífuga N°9, 11 y 12.
- ✓ Encender filtro UV y bomba centrífuga.
- ✓ Dejar correr el agua durante 2 minutos para el lavado de filtros y cañerías.
- ✓ Una vez utilizado el sistema de filtración, retirar elementos filtrantes, lavar con abundante agua a presión y disponerlos en recipiente con agua clorada.

Procedimiento TK2, raceway invernadero, B400 y B1000.



Figura 28. Procedimiento de distribución de agua de mar a TK2, raceway invernadero, B400 y B1000

- ✓ Enjuagar con abundante agua potable e instalar elementos filtrantes (cartuchos de 20, 10, 5 y 1 μm) en el sistema de filtración que se encuentra al interior del galpón UMA.
- ✓ Cerrar válvula N°8, 9 y 11.
- ✓ Abrir válvula N°6 conectada al estanque reservorio TK1, N°7 conectada a bomba centrífuga, N°10 y 13.
- ✓ Abrir válvulas que se encuentran al exterior en la planta piloto, N°14 sector B1000 y N°15 conectada al reservorio TK2.

- ✓ Encender bomba centrífuga y dejar correr el agua 2 minutos por válvula N°14 para limpiar cañerías.
- ✓ Cerrar válvula N°14 para iniciar llenado del estaque TK2.
- ✓ Para llenado en sector de raceway del invernadero: Cerrar válvulas N°14,15 y 16, abrir válvulas N°17 o 18.
- ✓ Para llenado de B400: Cerrar válvulas N°14, 15, 16, 17, 18 y abrir válvula N°19.

RECUPERACIÓN DE PASTA Y PULPA

Cosecha

- ✓ Llenar reservorio TK4 con la microalga que se cultivará. Recolectar a través de una manguera conectada a una bomba centrífuga de 1 HP, encargada de llevar la microalga a un estanque reservorio de 3000 litros de capacidad.
- ✓ Se deberá usar un tipo de centrífuga dependiendo del producto requerido; pulpa o pasta de microalga.
- ✓ Abrir la llave de paso del cultivo microalgal con la centrífuga encendida.

Centrífuga discontinua LIAONING (2,2 m³·h⁻¹).

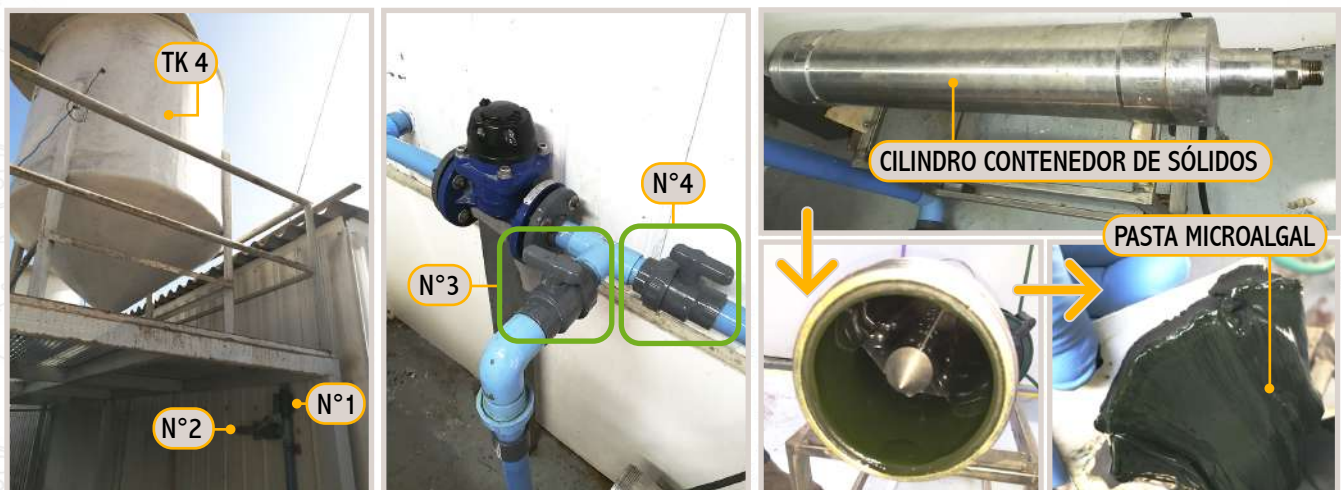


Figura 29. Procedimiento para centrifugación y obtener pasta microalgal.

- ✓ Cosechar el cultivo microalgal a través de una manguera conectada a una bomba centrífuga de 1 HP y dirigir hacia el reservorio de cosecha TK4, ubicado a un costado de la sala de centrifugación.
- ✓ Cerrar válvula N°2, 3 y 4.
- ✓ Abrir válvulas N°1 conectadas al reservorio de cosecha TK4.
- ✓ Encender la centrífuga subiendo los switch ubicados a un costado del equipo.
- ✓ Una vez que la centrífuga esté encendida, esperar 3 minutos y abrir válvula N°3 (paso del cultivo microalgal).
- ✓ Regular válvula de paso N°3 verificando que el calificado salga transparente.
- ✓ Una vez que la microalga haya pasado por completo por la centrífuga, apagar bajando los switch, esperar 20 minutos hasta que se detenga por completo.
- ✓ Al terminar este proceso abrir la centrífuga y retirar el cilindro contenedor de sólidos principal.
- ✓ Transferir el producto (pasta microalgal) a bolsas plásticas estériles, registrar su peso, sellar al vacío, rotular y congelar.
- ✓ Lavar los componentes de la centrífuga y el estanque de almacenamiento para ser usados nuevamente.

Centrífuga Continua Westfalia, modelo AS 1936076 (flujo $2.2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)

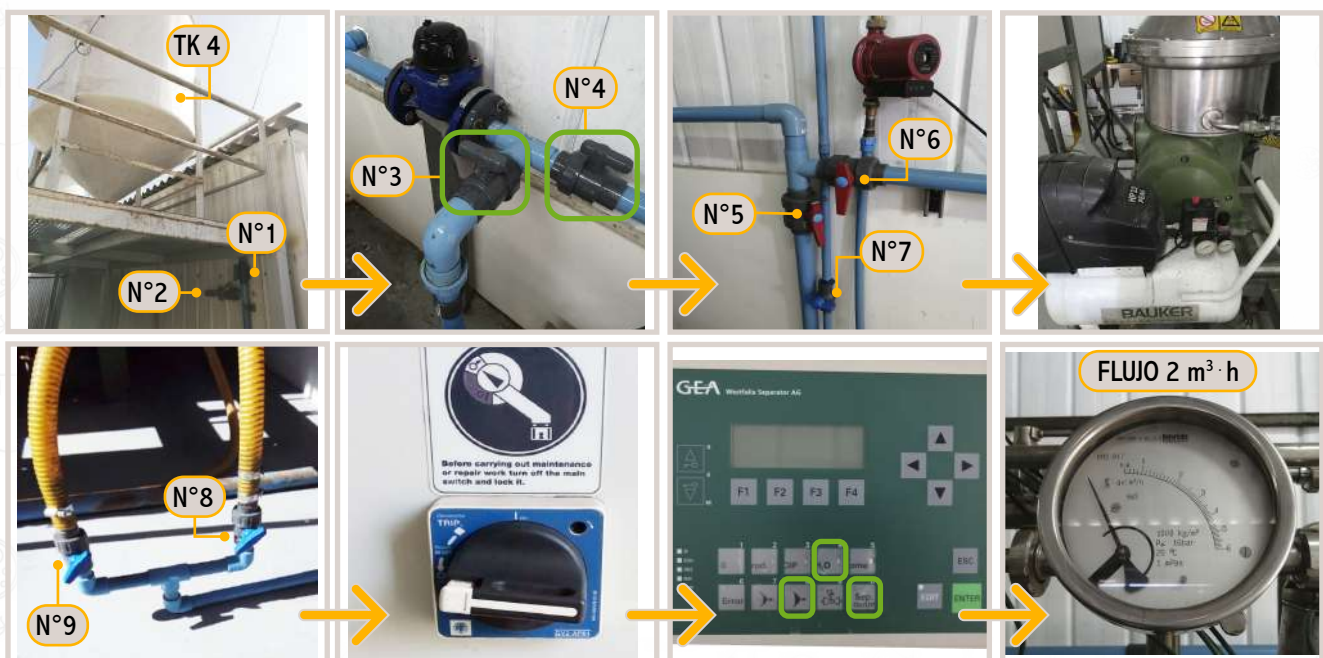




Figura 30. Procedimiento para centrifugación y obtener pulpa microalgal.

- ✓ Una vez que la microalga cosechada está en el reservorio, cerrar válvulas N°2, 3 y 6.
- ✓ Encender compresor de aire (subir botón rojo).
- ✓ Ingresar agua potable abriendo completa la válvula N°7 y válvulas N°8 y 9 a la mitad.
- ✓ Encender centrifuga, perilla general ON, para energizar el panel de control.
- ✓ Encender el panel de control con el botón ON/OFF.
- ✓ Esperar a que transcurran 285 segundos indicados por el panel para empezar a maniobrar con la centrifuga.
- ✓ Una vez transcurrido el tiempo, ingresar agua a la centrifuga presionando la tecla H_2O , esperar 15 segundos realizar una descarga total. Repetir ingreso de agua y descarga.
- ✓ Cuando el agua comienza a entrar en la centrifuga se marcan los relojes de flujo ($2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) y presión, regular la presión (4 - 6 bar).
- ✓ Una vez ajustado el flujo y presión de operación, iniciar ingreso del producto: Abrir válvulas N°1 y 5.
- ✓ Presionar botón PROD en panel de control, cada 3600 segundos, hacer una descarga total para recuperar el producto (Pulpa Microalgal). Esto dependerá de la cantidad de microalga a centrifugar y de la concentración del cultivo. Se debe estar atento a la salida del clarificado. Para verificar de no perder microalga, se debe disminuir el flujo de la entrada del producto.

Lavado de centrifuga

- ✓ Una vez concluida la maniobra de cosecha, lavar y enjuagar la centrifuga ingresando H₂O al equipo, presionado el botón correspondiente en panel de control.
- ✓ Ingresar agua durante 20 segundos y realizar descargas totales, repetir hasta verificar que las descargas salgan clarificadas.
- ✓ Apagar centrifuga presionando la tecla ON/OFF, apagar el panel de control y cerrar llaves de agua.

Centrifuga Continua Alfa Laval (flujo 0.2-0.8 m³·h⁻¹)



Figura 31. Procedimiento de centrifugación para obtener pulpa microalgal.

- ✓ Una vez que la microalga cosechada está en el reservorio TK4, cerrar válvulas N°2, 3, 5 y 7.
- ✓ Subir los switches de la energía eléctrica.
- ✓ Encender centrífuga pulsando botón verde en el tablero (SEPARATOR START).
- ✓ Abrir válvulas de paso N°6 y 10 de la cosecha microalgal.
- ✓ Regular flujo entrada del cultivo con la llave negra, ajustando en panel el flujo de entrada ($\leq 1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) y verificando que el clarificado sea transparente.
- ✓ Verificar presión de trabajo ($> 2 \text{ bar}$).
- ✓ La centrífuga está programada para descargas cada 40 minutos, si el volumen de cosecha se procesa antes de este tiempo, realizar una descarga manual. Si el cultivo termina de pasar antes los 40 minutos, hacer una descarga manual.
- ✓ Al finalizar, lavar centrífuga incorporando agua a la centrífuga y realizar descargas manuales hasta que los el agua salga sin residuos de cultivo.
- ✓ Apagar la centrífuga con el botón rojo Separator Stop y bajar los interruptores.

RECUPERACIÓN DE PRODUCTO HARINA MICROALGAL

Secador Spray Dryer Naichikeji, modelo Speed centrifuge atomizing dryer LPG-5.

Una vez obtenida la pulpa microalgal, llevar a la siguiente etapa de proceso de deshidratación para obtener harina de microalgas.

Preparación de la pulpa previo secado

- ✓ Tamizar pulpa microalgal para eliminar impurezas.
- ✓ En el caso que el producto sea pasta microalgal, disolver y homogenizar para evitar obstrucción de la manguera que lleva la pulpa al secador.
- ✓ Disponer la pulpa microalgal en un recipiente graduado de 20 litros y cuantificar la cantidad a procesar.

- ✓ Encender todos los switch que se encuentran dentro del tablero eléctrico.
- ✓ Presionar el botón ON/OF y gire la perilla de calor.
- ✓ Esperar alrededor de 20 minutos que el calefactor llegue a 200 °C para empezar a secar.
- ✓ Encender nebulizador presionando botón verde y variador presionando botón RUN, (verificar que suba a 540 rpm).
- ✓ Encender la bomba peristáltica, encargada de ingresar la pulpa microalgal al secador mediante una manguera que va desde el recipiente contenedor de la pulpa hasta la entrada del nebulizador.
- ✓ Ajustar con perilla negra a 25 rpm que corresponden a $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.
- ✓ Una vez procesada toda la pulpa microalgal, disponer la manguera de succión en agua destilada, para desplazar el producto y enjuagar la entrada del nebulizador por 1 minuto.
- ✓ Apagar la bomba peristáltica, el nebulizador y la fuente de calor.
- ✓ Dejar encendido ON/OF (blower) para el enfriamiento del equipo y recuperar Producto final (Harina Microalgal).
- ✓ 20 minutos después y cuando el equipo esté a una temperatura de 40°C, se puede abrir para lavar su interior.
- ✓ Retirar el nebulizador para limpiar sus partes por separado.



Figura 32. Procedimiento para obtener harina microalgal.

MANTENCIÓN EQUIPOS PLANTA PILOTO

Sistemas de Aireación para Cultivos Microalgales

La Planta Piloto cuenta con 3 aireadores (Blower) que cumplen la función de mantener en agitación constante los cultivos microalgales y así asegurar el aprovechamiento de la luz y homogenización de los medios de cultivo. La distribución alimenta la sala 20 de preparación de inóculos para bolones y botellones, sala de automatización, sala de cultivos auxiliares y planta piloto.



Figura 33: Blower Baldor 5 HP

Procedimiento

- ✓ Realizar 1 vez por mes.
- ✓ Apagar equipo y desconectar la cañería de PVC que contiene ambos filtros.
- ✓ Remover el polvo, lavar con abundante agua potable y dejar secar por 15 minutos al sol.
- ✓ Instalar cañería y encender soplador.
- ✓ El ambiente en el cual se encuentran los sopladores debe mantenerse libre de polvo, con ello se evita la saturación frecuente de los filtros de aire del equipo. Realizar limpieza del sector 1 vez al mes, eliminando el polvo acumulado de paredes, piso y cañerías.

Línea de Aireación

El sistema de distribución de aire para los cultivos microalgales cuenta con filtración mecánica mediante filtros de polipropileno de 5 μm . Insertos en la línea se encuentran la porta filtros de 10". La mantención de los filtros consiste en el cambio de ellos por unidades nuevas, para ello apagar sopladores de aire y realizar el cambio cada 3 meses.



Figura 34. Porta y filtro de aire utilizado en las líneas de aireación de la planta piloto.

Elementos filtrantes de 30"

La Planta Piloto cuenta con dos unidades de filtración de cartucho de 30", tratando el agua de mar desde 20 a 1 μm de porosidad. La primera está ubicada en galpón UMA conectado al reservorio TK1 y el otro en sector outdoor conectado al reservorio TK5.



Figura 35. Sistemas de filtración de agua de mar

Procedimiento

- ✓ Después de utilizar sistemas de filtración retirar elementos filtrantes y lavar con abundante agua a presión.
- ✓ Cuando no están siendo utilizados mantener elementos filtrantes en un recipiente con hipoclorito de sodio a una concentración de $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Nota: No dejar elementos filtrantes instalados debido a que el agua retenida favorece el crecimiento de microorganismos que puedan contaminar el cultivo.



Figura 36. Filtros plegables y acordonados de 30" para el tratamiento de agua de mar.

Sistema de Control de pH

Los sistemas de cultivo en condiciones outdoor (B1000 y raceways) se encuentran habilitados para el control de pH mediante la inyección automática de CO_2 , para ello electrodos de pH son sumergidos en los cultivos y mediante el panel de control el pH es fijado a mantenerse en un $\text{pH} \leq 8.2$. Un disco poroso es instalado en un foso intercambiador de gases en donde es inyectado el CO_2 a los cultivos cuando el pH supera el valor establecido.



Figura 37. Estación y distribución de línea de CO_2

Mantenimiento de sensores de pH

- ✓ Los sensores en uso, deben ser lavados 1 vez por semana con abundante agua destilada para retirar acumulación de microalga.
- ✓ Una vez utilizados los sensores de pH, lavar con abundante agua destilada y disponer en tubos con la solución de almacenamiento.
- ✓ Verificar nivel adecuado del líquido de almacenamiento, debido a que la evaporación puede dejar el sensor sin protección.



Figura 38. Sistema de control de pH mediante inyección automática de CO₂

Calibrado de sensores

- ✓ El procedimiento se debe realizar con dos personas, el primero ubicado en el panel de control y el otro encargado de manipular el sensor de pH sumergido en los cultivos.
- ✓ Utilizar buffers pH 4, 7 y 10.
- ✓ En panel de control presionar tecla ESC e introducir el número 100 como clave de acceso.
- ✓ Seleccionar calibrar sensor y después calibrar con los patrones.
- ✓ Introducir el primer patrón e instalar el sensor en el buffer 4. Esperar el tiempo de calibración.

✓ Introducir el segundo patrón e instalar el sensor en buffer 7. Esperar tiempo de calibración.

Introducir tercer patrón e instalar sensor en buffer 10. Esperar tiempo de calibración.

Nota: Cada vez que se cambie de buffer, se debe enjuagar el sensor con agua destilada.

Después de terminar calibración, devolver con el botón ESC y la pantalla mostrará las mediciones de pH.

✓ Finalmente introduzca sensor en el cultivo.

ANEXO III: GLOSARIO MANUAL PLANTA PILOTO

Balón /bolón: Matraz o frasco de vidrio de cuello largo y cuerpo esférico.

Botellones: Botella de 20 litros de capacidad, fabricada en material transparente como policarbonato, PET o PVC y que comúnmente son utilizadas para transportar agua.

Cepario: Colección de microorganismos de interés para la docencia, investigación o producción. Las instalaciones deben estar adaptadas a asegurar la mantención, conservación a largo plazo, aislamiento, identificación de cepas, preparación de medios de cultivo específicos, etc.

Cultivo discontinuo o batch: Cultivo en lote, donde las microalgas se inoculan y se mantienen hasta alcanzar su máximo crecimiento celular (generalmente 15 días).

Cultivo semi continuo: Precedido del cultivo discontinuo. Una vez alcanzada la concentración de biomasa, se cosecha una porción del total y se reemplaza por medio nuevo.

Cultivo unialgal: Cultivo preparado con el medio específico para la inoculación de una sola cepa.

Desinfección: Eliminación de microorganismos mediante el uso de agentes físicos o químicos.

Escalamiento: Incrementar el volumen de un proceso.

Fitineria: Accesorios para conexiones de sistemas donde se transportan fluidos de alta o baja presión.

Harina microalgal: Polvo que resulta del secado de biomasa microalgal.

Inoculación: En microbiología es la acción de introducir una cantidad inicial de células o microorganismos en un medio de cultivo.

Macronutrientes: Sustancias químicas, requeridas y consumidas en grandes cantidades, para proveer al organismo con la materia y energía que mantiene su estructura. Se pueden clasificar como lípidos, carbohidratos y proteínas incluyendo también el agua y materia orgánica como la fibra.

Medio de cultivo: Solución que contiene los nutrientes necesarios y las condiciones de pH específicas para el crecimiento y mantención celular (microorganismos). Puede prepararse como sólido, semisólido o líquido.

Microalga: Grupo diverso de organismos unicelulares comprendido por protistas eucariontes cianobacterias procariontes y algas azul-verde. Necesitan luz, dióxido de carbono, agua y nutrientes, para crecer por medio del proceso de fotosíntesis. Son capaces de crecer en diversos ambientes y

para crecer por medio del proceso de fotosíntesis. Son capaces de crecer en diversos ambientes y presentan tasas de crecimiento más altas que plantas terrestres. Su constitución ha permitido la creación de procesos biotecnológicos para obtener productos como alimentos, extractos nutritivos y pigmentos, agua depurada, biomasa para biocombustibles, etc.

Micronutrientes: Compuestos presentes en pequeñas cantidades que son esenciales para el crecimiento y el funcionamiento correcto de los organismos, entre ellos se encuentran las vitaminas y los minerales.

Micropipeta: Instrumento de laboratorio de alta precisión, que se emplea para transferir pequeños volúmenes de líquidos en numerosas técnicas analíticas.

Nutracéutico: nutrientes derivados principalmente de vegetales, de grado farmacéutico, como vitaminas, minerales, hierbas, extractos y pigmentos y utilizados en formato medicinal como píldoras, cápsulas, pociones y líquidos, que se consumen y entregan beneficios demostrables a la salud del que los consume.

Paleta rotatoria: Paletas dispuestas como aspas que, al girar, impulsan el movimiento dentro del cultivo, permitiendo agitación y mezcla.

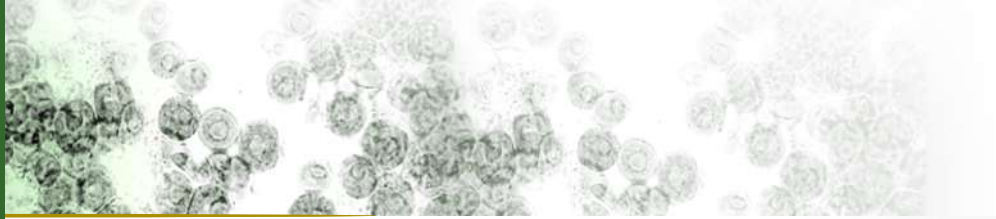
Pasta microalgal: Masa de biomasa microalgal con un porcentaje entre 27 a 30% sólidos totales.

Pulpa microalgal: Masa de biomasa microalgal con un porcentaje entre 8 a 12 % de sólidos totales.

Pigmento: Compuestos que reflejan una longitud de onda específica, lo cual permite percibirlo con un color en particular. Los pigmentos producidos por organismos fotosintéticos incluyen, la clorofila a, b y c, betacarotenos, astaxantina, xantofilas y ficobiliproteínas. Su extracción permite la obtención de colorantes naturales con numerosas aplicaciones en industrias como la alimenticia, cosmética, nutraceutica y farmacéutica.











Raceway: Sistema de cultivo abierto rectangular alargada con extremos cortos semicirculares que permiten el movimiento del agua a través de paletas rotatorias, maximizando la mezcla e impidiendo la decantación en el cultivo microalgal.

Solución stock: Solución concentrada que mantiene la proporción de sus componentes y permite preparar diluciones adecuadas a partir de esta.












EQUIPO DE TRABAJO

Unidad de Microbiología Aplicada del Centro de Bioinnovación de la Facultad de Ciencias del Mar y Recursos hídricos de la Universidad de Antofagasta (UMA-CBIA-UA)

-  Claudia Sepulveda Vega. Ph.D. Investigadora a cargo de la Unidad.
-  Paola Marticorena de la Rosa. Investigadora.
-  Jazmín Bazaes Donoso. Investigadora.
-  Karina Riveros Gahona. Investigadora
-  Loreto Cavieres Sena. MSc. Investigadora.
-  Paula Medina Henríquez. Ph.D. Investigadora.
-  Jocelyn Bazaes Donoso. Técnico especialista en cultivos de microalgas.
-  Yessenia Vega Cortés. Técnico especialista en cultivos de microalgas.
-  Jimmy Tabalí López. Técnico especialista en cultivos de microalgas.
-  Carlos Riquelme Salamanca. Ph.D. Director del Centro

Agradecemos el valioso aporte de nuestros colaboradores

-  Fondo de Innovación para la Competitividad Regional (FIC R)
-  Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondef)
-  Corporación de Fomento de la Producción (Corfo)
-  Prodalmar
-  Paisaje Antofagasta
-  Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)
-  Universidad de Almería
-  Aguas Antofagasta
-  Ilustre Municipalidad de Taltal

REGISTRO DE PROPIEDAD INTELECTUAL

ISBN: 978-956-8293-68-0

FOTOGRAFÍAS

RECOPILADAS POR UMA-CBIA

DISEÑO E IMPRESIÓN

"INGENIA"
IGNACIO AMAS MORALES
IVANIA MELIN FALCÓN
TANYA RIQUELME ARAYA
TANYA.RIQUELME.DG@GMAIL.COM





ISBN: 978-956-8293-68-0



FACULTAD DE
CIENCIAS DEL MAR
Y RECURSOS BIOLÓGICOS

