

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Método de Ruptura de la pared celular de ciertos tipos de algas para la obtención de productos de interés en la industria (Biomasa y Aceites).

Daniel Josue Schwartz Melgar

Guatemala

2009

Método de Ruptura de la pared celular de ciertos tipos de algas para la obtención de productos de interés en la industria (Biomasa y Aceites).

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

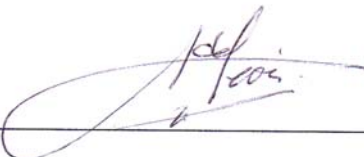
Método de Ruptura de la pared celular de ciertos tipos de algas para la obtención de productos de interés en la industria (Biomasa y Aceites).

Trabajo de investigación presentado por  
Daniel Josue Schwartz Melgar  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala

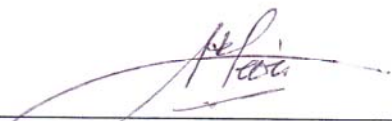
2009

Vo. Bo:

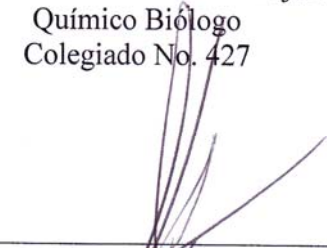
(f) 

Lic. Luis Roberto de León Fajardo  
Químico Biólogo  
Colegiado No. 427

Tribunal examinador:

(f) 

Lic. Luis Roberto de León Fajardo  
Químico Biólogo  
Colegiado No. 427

(f) 

Ing. Gamaliel Zambrano Ruano  
Ingeniero Químico  
Colegiado No. 686

(f) 

Ing. Oscar Maldonado Ordóñez  
Ingeniero Químico  
Colegiado No. 90

Fecha de Aprobación: Guatemala, 09 de Diciembre de 2009

# CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
A. Algas.....	2
B. Pared celular.....	2
C. Algas Procariotas: .....	2
1. Algas Verde Azules (Phyla: Cyanochloronta).....	2
D. Algas Eucariotas:.....	4
1. Algas Verdes (Phyla: Chlorophyta). .....	4
2. Euglenas (Phyla: Euglenophyta).....	4
3. Algas Pardas (Phyla: Phaeophyta). .....	5
4. Dinoflagelados, (Phyla: Pyrhophyta). .....	5
5. Diatomeas (Phyla: Crysophyta). .....	6
6. Algas rojas, (Phyla: Rodophyta).....	6
7. Algas doradas o algas verde-amarillas (Phyla: Cryptophyta).....	7
E. Usos.....	7
1. Alimentos.....	7
2. Fertilizantes.....	7
3. Biocombustibles y aceites. ....	8
4. Alcoholes. ....	8
5. Farmacéuticos y cosméticos. ....	8
F. Métodos para la Ruptura de la pared celular .....	9
1. Ruptura con Soluciones Hipotónicas (Osmosis).....	9
2. Ruptura enzimática.....	9

3.	Ruptura por congelamiento. ....	10
4.	Ruptura mediante oxidación y otras reacciones. ....	11
5.	Ruptura de la pared celular mediante ondas ultrasónicas.....	12
G.	Cavitación .....	14
1.	Tipos de cavitación. ....	14
2.	Cavitación acústica.....	15
III.	JUSTIFICACIÓN.....	17
IV.	OBJETIVOS .....	18
A.	Objetivo general: .....	18
B.	Objetivos específicos:.....	18
V.	PROBLEMA A RESOLVER .....	19
VI.	METODOLOGÍA.....	20
VII.	CRONOGRAMA .....	23
VIII.	RESULTADOS .....	24
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	36
X.	CONCLUSIONES.....	42
XI.	RECOMENDACIONES.....	43
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
XIII.	APÉNDICE.....	47
A.	Procedimiento .....	48
1.	Equipo utilizado .....	48
2.	Datos de los especímenes estudiados. ....	50
B.	Datos originales.....	51
C.	Cálculo de muestra .....	53
1.	Costos de operación microondas .....	53
2.	Cálculo del costo de operación del autoclave. ....	56
3.	Costos de operación limpiador Ultrasónico.....	57
4.	Costos de operación congelamiento.....	57
5.	Dimensionamiento del sistema propuesto. ....	61

6.	Cálculo del costo de operación del sistema propuesto.....	68
7.	Cálculo del costo de importación del equipo propuesto .....	70
D.	Análisis de error .....	71
1.	Análisis estadístico.....	71
2.	Propagación de error .....	71
E.	Datos calculados.....	72
XIV.	ANEXOS .....	76
	Anexo1 Cotizaciones de equipo.....	77
	Anexo 2: Sedimentación mediante ultrasonido. ....	78
	Anexo 3: Destrucción selectiva de ciertos tipos de alga medianteultrasonido. ....	79
	Anexo 4: Producción de etanol de celulosa utilizando cultivos de organismos termófilos .....	82
	Anexo 6. Medio de cultivo en agua dulce (Guillard, In: Stein, 1979) .....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Cronograma de actividades.....	23
Tabla No. 2 Resultados cualitativos de los tratamientos realizados:.....	24
Tabla No. 3 Resultados consumo energético de los equipos utilizados por tratamiento realizado.....	24
Tabla No. 4 Costo del equipo propuesto EXW.....	24
Tabla No. 5 Consumo energético del equipo propuesto.....	24
Tabla No. 6 Comparativa de precios, del método propuesto.....	24
Tabla No. 7 Detalle de equipo y materia prima para una planta que produce 100 Ton/día.....	25
Tabla No. 8 Ventajas y desventajas del método propuesto.....	25
Tabla No. 9 Métodos propuestos según producto u subproducto obtenido.....	25
Tabla No. 10 Datos de placa del equipo utilizado.....	48
Tabla No. 11 Especificaciones de las soluciones utilizadas.....	50
Tabla No. 12 datos de los pesos de las algas rojas.....	51
Tabla No. 13 datos de los pesos de la Hydrilla triturada.....	51
Tabla No. 14 concentración de biomasa en las soluciones.....	51
Tabla No. 15 concentración de biomasa en las soluciones.....	51
Tabla No. 16 concentración de biomasa en las soluciones.....	51
Tabla No. 17 Condiciones de operación del autoclave.....	52
Tabla No. 18 Datos del tratamiento con el autoclave.....	52
Tabla No. 19 Datos del congelador.....	52
Tabla No. 20 Datos del limpiador ultrasónico.....	52
Tabla No. 21 Especificaciones de la bomba a utilizar.....	66
Tabla No. 22 Especificaciones de distintos tipos de centrifugas y sus capacidades.....	66
Tabla No. 23 Especificaciones de centrífugas a utilizar.....	67
Tabla No. 24 Especificaciones de los distintos transductores de ondas ultrasónicas de LGsonic.....	68
Tabla No. 25 Datos para el tratamiento 1 microondas a 30% de potencia durante 30 segundos.....	72
Tabla No. 26 Datos para el tratamiento 1 microondas a 30% de potencia durante 30 segundos.....	72
Tabla No. 27 datos para el tratamiento 2 microondas a 50% de potencia durante 30 segundos.....	72
Tabla No. 28 datos para el tratamiento 2 microondas a 50% de potencia durante 30 segundos.....	73
Tabla No. 29 Datos para el tratamiento 3 microondas a 80% de potencia durante 30 segundos.....	73
Tabla No. 30 Datos para el tratamiento 3 microondas a 80% de potencia durante 30 segundos.....	73
Tabla No. 31 Datos para el tratamiento en autoclave a 125C , 2 bar durante 30 minutos.....	73
Tabla No. 32 datos para el tratamiento en autoclave a 125C , 2 bar durante 30 minutos.....	74
Tabla No. 33 Datos de energía a extraer para el tratamiento en congelamiento.....	74
Tabla No. 34 Datos del diseño del tanque de ultrasonido.....	74
Tabla No. 35 Datos del diseño de la tubería.....	74

Tabla No. 36 Datos del diseño de la bomba de llenado del tanque de ultrasonido .....	74
Tabla No. 37 Datos del cálculo del consumo energético del sistema propuesto .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Paredes celulares de distintos tipos de cianobacterias .....	3
Figura No. 2 Pared celular en medios Isotónicos .....	9
Figura No. 3 Efectos de las ondas ultrasónicas en distintos tipos de algas. ....	13
Figura No. 4. Efectos de las ondas ultrasónicas en distintos tipos de algas .....	15
Figura No. 5. Comparación de tejido de hydrilla antes y después de los tratamientos .....	26
Figura No. 6. Comparación de tejido del phytoplankton utilizado mediante los distintos tratamientos. ....	27
Figura No. 7. Diseño del sistema propuesto .....	28
Figura No. 8. Balance de masa.....	29
Figura No. 9. Detalle del tanque propuesto para el tratamiento ultrasónico.....	30
Figura No. 10. Dimensiones del tanque para el tratamiento ultrasónico .....	31
Figura No. 11. Detalle del decantador centrifuga .....	32
Figura No. 12. Dimensiones del decantador centrifugo .....	33
Figura No. 13. Detalle de las bombas centrifugas a utilizar .....	34
Figura No. 14. Detalle del equipo de ultrasonido a utilizar .....	35
Figura No. 15. Detalle del ciclo de compresión utilizado.....	60

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No 1. Efectos de los distintos tratamientos estudiados en diversos tipos de algas .....	13
Gráfico No 2. Factor de fricción con respecto al numero de Reynolds (Mcabe, 1992) .....	63
Gráfico No 3. Curva característica de la bomba a utilizar en el llenado. ITT industries (Bell & Gossett) .	65
Gráfico No 4. Curva característica de la bomba que lleva el flujo hacia la sedimentadora centrifuga .....	67

## RESUMEN

Esta investigación tiene por objetivo provocar una ruptura en la pared celular de las algas seleccionadas, con lo que se busca diseñar un proceso adecuado para obtener mejores eficiencias y reducir el costo de extracción de aceites y biomasa a partir del cultivo de algas. Para poder llevar a cabo esta investigación se sometieron dos especímenes uno de microalgas (fitoplancton, especie no determinada) y otro de una planta vascular (*Hydrilla*) a diversos tratamientos, incluyendo calentamiento en autoclave, calentamiento con ondas microondas, sonificación con ultrasonido y congelamiento/descongelamiento, en donde según el método utilizado y las especies trabajadas solamente el tratamiento ultrasónico resultó ser el más económico de todos los tratamientos realizados, por lo que el mismo se propuso para el diseño de un reactor a escala industrial en donde este puede llegar a representar una disminución del costo de producción hasta en 32 veces con respecto al costo de extracción de aceite mediante el proceso tradicional con solvente.

## ABSTRACT

This research aims to cause a rupture in the algae cell wall, in order to design an appropriate process to obtain greater efficiencies and reduce the cost of oil extraction and biomass from the cultivation of algae. To carry out this research, two specimens (phytoplankton and hydrilla) were subject to various treatments, including autoclave heating, microwave, ultrasound sonication and freeze/ thawing, according to the method and the species used only ultrasonic treatment combined with freezing showed a degradation in the cell walls. Also the ultrasonic treatment turned out to be cheapest of all the treatments done, so it were proposed for the design of an industrial-scale reactor where it can come to represent a diminish 32 times the cost of oil extraction by traditional means with solvent.

# I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha surgido una creciente necesidad de utilización de energías renovables, en donde las algas han demostrado poseer un gran potencial en esta rama. Ellas poseen una tasa de crecimiento elevada, no requieren de grandes campos de cultivo y la cantidad de aceites y biomasa recuperados superan fácilmente cualquier otro tipo de cultivo, sus limitaciones radican en la dificultad que existe en la extracción de sus aceites, debido a que requieren mecanismos complejos como los son, secados, prensados, utilización de solventes, destilaciones posteriores, lo aumenta su coste de una gran manera. Todo esto debido a la protección celular que las algas poseen, mayoritariamente las especies unicelulares ya que por su pequeño tamaño un prensado se convierte en una manera sumamente ineficiente de ruptura en la pared celular, “Es como tratar de destripar un microorganismo con la suela del zapato”, por lo tanto el objetivo de este proyecto es el de provocar una ruptura en la pared celular de las algas estudiadas, mediante distintos métodos propuestos, comparando sus resultados con análisis estadísticos, con lo que se busca diseñar un proceso adecuado para obtener mejores eficiencias y reducir el costo de extracción de aceites y biomasa de alga.

Las algas son diversos organismos fotosintéticos autótrofos, que viven en ambientes muy húmedos, la mayoría de ellos protistas. Las algas se agrupan en distintos filos o divisiones, en donde cada división posee distintas características, las algas reales se caracterizan por no poseer hojas, filamentos u raíces, así mismo se diferencian de las plantas básicamente en su forma de reproducción, sus órganos sexuales son siempre unicelulares, así mismo como regla general casi ningún alga requiere de que el esporofito fecunde el gametofito como sucede con las plantas y organismos superiores.

La gran mayoría de las algas poseen una pared celular de dos capas, la interior es firme y contiene micro fibras, la exterior es gelatinosa y amorfa, la pared celular está compuesta por diversos carbohidratos, como celulosa, pectina, mucilago, y en algunas instancias proteínas. Esta pared celular es la que dificulta la extracción de biomasa y aceites de las algas.

Para la ruptura de la pared celular se utilizaron distintos métodos, y combinaciones de los mismos para verificar cuál de ellos es el mejor a la hora de rendimientos y costos. En la congelación se trató de propiciar la formación de cristales grandes e irregulares, así mismo se propuso métodos de congelamiento y descongelamiento. La trituración a altas RPM, aunque no se aseguro la destrucción de todas las células se puede confirmar que muchas de ellas resultaran dañadas debido a la acción de las cuchillas y el movimiento generado. También se utilizó un calentamiento a presiones relativamente elevadas, se sabe que la cinética de muchos procesos aumenta a temperaturas elevadas, por lo que la descomposición, separación y ruptura de la pared celular podría incrementarse. Finalmente se trabajó con ondas electromagnéticas, se sabe que muchas células no soportan la acción de dichas ondas, así mismo el uso de microondas se espera que proporcione la ruptura de la pared celular, el calentamiento de la solución y liberación de aceites de las algas estudiadas.

## II. ANTECEDENTES

### A. Algas

Se conocen como algas a diversos organismos fotosintéticos autótrofos, que viven en ambientes muy húmedos, están repartidas en diversos reinos, como lo son el reino mónica y el reino protista. Las algas se agrupan en distintos filos o divisiones, en donde cada división posee distintas características, las algas reales se caracterizan por no poseer hojas, filamentos u raíces, así mismo se diferencian de las plantas básicamente en su forma de reproducción, sus órganos sexuales son siempre unicelulares, así mismo como regla general casi ningún alga requiere de que el esporofito fecunde el gametofito como sucede con las plantas y organismos superiores. (Prescott, 1968, 3).

### B. Pared celular

La gran mayoría de las algas poseen una pared celular de dos capas, la interior es firme y contiene microfibras, la exterior es gelatinosa y amorfa, la pared celular esta compuesta por diversos carbohidratos, como celulosa, pectina, mucilago, y en algunas instancias proteínas. En algunos casos las paredes celulares están impregnadas con calcio, hierro y silicio, las membranas gelatinosas pueden ser tanto solubles o mucilaginosas, algunas especies no poseen una verdadera pared celular como es el caso de las euglenas, solamente posee una membrana celular como las células animales. (Prescott, 1968, 3)

### C. Algas Procariotas:

1. Algas Verde Azules (Phyla: Cyanochloronta). Las cianobacterias conocidas como algas verdeazuladas, se caracterizan por no tener separado su núcleo del citoplasma celular, estas se clasifican como algas, por el sencillo hecho de que liberan oxígeno al realizar su fotosíntesis, son grandes fijadoras de nitrógeno así mismo algunas pueden llegar a ser tóxicas y dañinas a la epidermis causando dermatitis. Algunas especies forman extensas y a veces, tóxicas floraciones en la superficie de charcas y costas. (Harold, Wynne, 1978, 31)

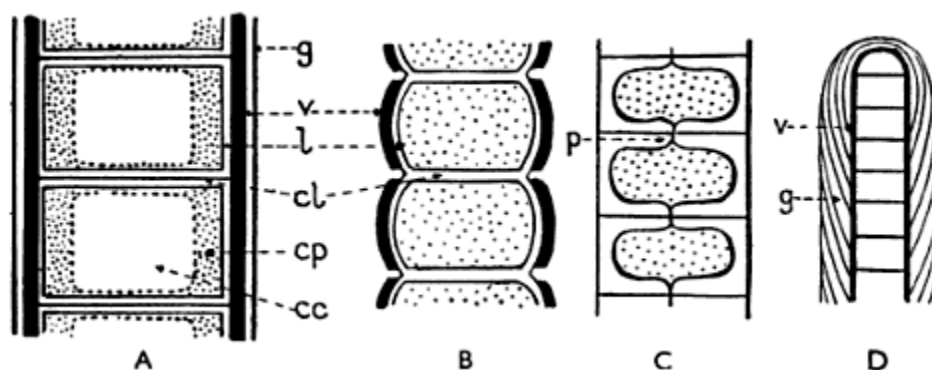
Estas células son ricas en glucosa, ácidos hexurónicos, d-xylosa, ribosa, galactosa y ramnosa, (Harold Bold), así mismo se ha reportado que algunas poseen cantidades significativas de aceite. Algunas cianobacterias producen glicógeno en vez de almidón, y bajo condiciones anaeróbicas pueden producir hidrógeno. La fermentación de los residuos del cultivo de microalgas, eventualmente mezclados con otros residuos orgánicos, produce metano, etanol y metanol. (Harold, Wynne, 1978, 31)

Su pared celular está compuesta de varias capas en donde son fácilmente distinguibles una vaina que es adyacente a la célula y una capa mucilaginosa que rodea al organismo. La pared celular está compuesta básicamente de ácidos pépticos y mucopolisacáridos. (Harold, Wynne, 1978, 35)

La pared de la célula de las Cianobacterias es compleja (Imagen No. 1). En ella se reconoce: 1° una capa profunda o lócala, delgada y blanda, pegada directamente al citoplasma; 2° una capa intermedia o vagina, continua o discontinua, que se aplica a las caras externas de las células, de aquí su forma tubular; 3° una vaina mucilaginosa, con frecuencia muy espesa, cuya estructura parece ser bastante variable. (H.D.Abbayes, 1989, 49)

El lóculo representa, probablemente, la membrana plasmática de la célula, mientras que las otras dos capas son de naturaleza metaplasma. (H.D.Abbayes, 1989, 49)

Figura No. 1 Paredes celulares de distintos tipos de cianobacterias



(H.D.Abbayes, 1989, 49)

En microscopía electrónica, la membrana parece hecha de tres capas; la membrana transversal comprende una capa media entre dos capas que parecen corresponder a las membranas plasmáticas (loculae) de dos células consecutivas. (H.D.Abbayes, 1989, 49)

La microscopía electrónica ha revelado que la membrana está perforada por numerosos poros, tanto en los tabiques transversales como en los longitudinales. El paso del citoplasma a través de los poros de los tabiques transversales no ha sido señalado; sin embargo es presumible; el mucus saldría por los poros de las paredes laterales. Se conocen algunos géneros de Hormogonales en los que las células comunican por amplios puentes o plasmodesmos que atraviesan el citoplasma. El mucus de la vaina contiene mucopolisacáridos; en *Leuconostoc mesenteroides*, el polisacárido es dextrano. (H.D.Abbayes, 1989, 49)

La vaina tiene una infraestructura lamelar o fibrilar. La presencia de láminas imbricadas unas con otras ya había sido observada al microscopio fotónico. (H.D.Abbayes, 1989, 49)

## D. Algas Eucariotas:

Poseen una membrana nuclear bien definida, así mismo poseen diversos tipos de organelos como el aparato de Golgi, mitocondrias, y retículos endoplasmáticos, que caracterizan a las células eucariotas, por lo tanto estas a diferencia de las algas verde azules poseen su clorofila en vacuolas o plastidos especializadas, mientras que las algas procariotas poseen la clorofila regada en el citoplasma. (Prescott, 1968, 5)

1. Algas Verdes (Phyla: Chlorophyta). Las algas verdes son el más grande grupo de las algas, se encuentran tanto como plancton o como especies bénticas, Se cuentan entre los organismos más antiguos. Se les considera predecesoras de las plantas verdes terrestres. Las algas verdes se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila A y B y almidón como material de reserva. La mayoría son unicelulares (móviles o no móviles), coloniales o pluricelulares. Las especies unicelulares móviles se desplazan en el agua gracias a flagelos. Las especies inmóviles pueden generar células reproductoras móviles, es decir, zoosporas. Tanto las móviles como las inmóviles pueden vivir aisladas o reunirse en colonias; a menudo, éstas tienen forma determinada y un número fijo de células, todas ellas iguales, y constituyen un cenobio o una comunidad celular. La mayoría posee paredes celulares con dos capas, una interna de celulosa y otra externa con pectina, sustancia blanca amorfa que producen algunas plantas. (Harold, Wynne, 1978, 63)

Muchos clorófitos unicelulares se agrupan en filamentos. En hábitats marinos las más desarrolladas se componen de sifones plurinucleados y alcanzan una longitud de 10 metros. Las algas verdes se localizan también en el suelo húmedo, adheridas a las plantas terrestres (algunas de éstas son parásitas), e incluso en la nieve y el hielo. Las formas marinas son fáciles de ver en las rocas costeras cuando baja la marea. Algunas especies terrestres de algas viven en simbiosis con los hongos (líquenes). Las algas verdes se reproducen de forma vegetativa (por fragmentación y división celular), asexual (por esporas y zoosporas), y sexual por conjugación; y en muchas especies se da la alternancia de generaciones. (Harold, Wynne, 1978, 70)

2. Euglenas (Phyla: Euglenophyta). Esta división del reino protistas poseen subdivisiones tanto en forma de protozoos como de algas, las especies con clorofila poseen tanto clorofila a como clorofila b en sus cloroplastos, difieren de las algas verdes en su bioquímica y en su organización, guardan su energía en “paramylon”, un  $\beta$  1-3 polímero de glucosa, que está presente en el citoplasma. (Harold, Wynne, 1978, 255)

Son organismos flagelados con una membrana mucilaginosa, sin pared celular evidente. Por lo que la extracción de aceites puede realizarse con mayor facilidad, en especies que posean reservas lipídicas, La empresa Biodisol, ha trabajado con la Euglena Gracilis, así como la empresa Biodroga, la cual utiliza este aceite como parte de sus formulaciones dermatológicas. (Biodroga 2009), la mayoría de euglenoides cuando se encuentran en condiciones desfavorables pierden sus flagelos se contraen en bola y se enquistan después de haber acumulado una gran cantidad de gotitas de aceite. (H.D. Abbayes, 1989, 75)

3. **Algas Pardas (Phyla: Phaeophyta).** Se asemejan mucho a las plantas terrestres, se encuentran principalmente en hábitats marinos, en las zonas agitadas de los mares polares, aunque hay algunas en las profundidades oceánicas; y rara vez en agua dulce. Poseen tanto clorofila a, b y c, así mismo  $\beta$  caroteno, y otros pigmentos fotosintéticos (fucoxantina, carotina y xantofila). Las algas pardas se conocen por su crecimiento rápido, su inmenso tamaño, llegando a medir hasta 200 metros de altura, y por sus tejidos relativamente complejos. Las algas pardas son pluricelulares y tienen estructuras diferenciadas que, en algunas especies, muestran una semejanza superficial con las raíces, tallos y hojas de las plantas más evolucionadas. Sin embargo, son bastante diferentes en su aspecto interno. Las paredes de sus células se componen de una celulosa similar a la que presentan las algas rojas y sus caras exteriores están recubiertas por un compuesto peptídico gelatinoso llamado alginato, que protege a las propias células y a los estratos celulares de la desecación cuando, al retirarse las aguas marinas, quedan al descubierto. Las algas pardas tienen alternancia de generaciones. Sus células reproductoras suelen tener flagelos que permiten la movilidad de las zoosporas. Las zoosporas se producen en mayor o menor número dentro de órganos especiales llamados zoosporangios. Cuando tales zoosporas se cansan de navegar, se paran, “germinan” y producen una nueva alga. Las algas pardas se utilizan como estabilizantes de la emulsión en la fabricación de helados, como fertilizantes, como fuente de alimentos ricos en vitaminas y para la obtención de yodo. (Harold, Wynne, 1978, 267)

Las algas pardas guardan sus reservas en un polisacárido soluble conocido como “laminaran”, también poseen manitol, sacarosa y glicerol.

4. **Dinoflagelados, (Phyla: Pyrhophyta).** Son protistas unicelulares que en su mayoría presentan plastos de distintos colores, derivados por endosimbiosis de otras algas unicelulares. Las zooxantelas a su vez son dinoflagelados endosimbióticos que crecen en distintos animales acuáticos marinos, especialmente corales. Los Dinoflagelados están muy cercanamente emparentados con los Ciliados. (Faust, 2002, 183)

Forman parte del plancton marino, si bien las hay de agua dulce y coloniales. Sus poblaciones se distribuyen en función de la temperatura, salinidad y profundidad. Alrededor de la mitad de los dinoflagelados son fotosintéticos y constituyen el grupo más grande de algas eucariontes aparte de las Diatomeas. Puesto que son productores primarios, constituyen una parte importante de la cadena alimenticia acuática. Ciertas especies fotosintéticas, las zooxantelas, son endosimbiontes de animales (corales, anémonas y almejas) y protozoos marinos desempeñando un papel importante en la biología de los arrecifes coralinos. Otros dinoflagelados son depredadores de otros protozoos y algunas formas son parásitas (véase por ejemplo, Oodinium y Pfiesteria). Algunos dinoflagelados son responsables de las mareas rojas, pues sintetizan fuertestoxinas. El nombre procede del griego dinos, girando y del latín, flagellum, látigo. (Faust, 2002, 183)

5. **Diatomeas (Phyla: Crysoophyta).** Las diatomeas son organismos unicelulares, pero pueden unirse en colonias con forma de tallo o ramificadas. Las células de las diatomeas son completas. Tienen membrana, núcleo, cromatóforos, dos vacúolos que se reparten el jugo celular, etc. En tales células no se acumula almidón, sino gotas de aceite. Lo más notable de estas plantas es la membrana que las envuelve y las protege, constituida por una modificación de la celulosa impregnada de una combinación silícica; esta especie de caparazón, el frústulo, se compone de dos piezas que encajan una en otra por sus bordes, como una caja y su tapadera. En muchas diatomeas existe una línea sinuosa que recorre la valva (rafe) que va de un nódulo extremo a otro, interrumpida por un nódulo central. El sílice les confiere rigidez y origina patrones de estrías, esculpidos de manera complicada, que suelen servir como rasgos para su identificación.

El citoplasma contiene el pigmento verde clorofila pero se mezcla con la xantofila (de color amarillento), la carotina y con la fucoxantina ofrecen a las diatomeas su apariencia castaño-dorada con una pigmentación similar, aunque no idéntica, a la de las algas pardas. Su reproducción generalmente es por división celular. Las cubiertas se separan y cada mitad segrega otra un poco más pequeña que encaja con la anterior. Las divisiones celulares sucesivas van produciendo células de menor tamaño, hasta que se alcanza una talla mínima. Periódicamente se originan células de la talla del organismo original por reproducción sexual. Se encuentran principalmente en charcas de agua dulce o en las capas superficiales de los océanos, donde constituyen un componente principal del plancton del que depende la vida marina; y en suelos húmedos. Pueden flotar formando parte del plancton o fijarse a rocas u otras superficies. Los restos fósiles de las conchas de las diatomeas se llama tierra de diatomeas, que se usa como abrasivo y filtrante. . (Harold, Wynne, 1978, 357)

6. **Algas rojas, (Phyla: Rhodophyta).** Son organismos protistas, anteriormente clasificados como plantas no vasculares, fotosintéticas que contienen clorofila a y clorofila d, además de pigmentos accesorios tipo ficobilinas y carotenoides. Corresponden a un grupo de 5000 a 6000 especies de una gran diversidad de formas y tamaños. Se caracterizan por la ausencia de células flageladas, la presencia de pigmentos ficobilínicos en los ficobilisomas y la ausencia de almidón en los cloroplastos, usando como material de reserva el almidón de florideas, los tilacoides son simples (rodoplastos). La reproducción sexual por endogamia, con células especializadas, carpogonios y espermacios . (Harold, Wynne, 1978, 451)

En este grupo se encuentran la mayoría de las algas que secretan carbonato de calcio y cumplen un papel crucial en la formación de los arrecifes de coral. Algunas algas rojas, por ejemplo la dulce o el nori, son utilizadas como alimento y usadas para producir agar, carragenanos y otros aditivos alimenticios. (Harold, Wynne, 1978, 460)

7. Algas doradas o algas verde-amarillas (Phyla: Cryptophyta). Se encuentran principalmente en agua dulce. Presentan una gran variedad en morfología y modos de nutrición; la mayoría son foto-autótrofos, aunque también hay heterótrofos (osmótrofos y fagótrofos). Viven en la mayoría de los lagos y lagunas de aguas dulces limpias y frías, y algunas especies son marinas. Generalmente se presentan como formas unicelulares flageladas, muchas forman colonias con formas, incluso, muy elaboradas. Las formas marinas poseen intrincados esqueletos silíceos. (Harold, Wynne, 1978, 566)

La mayoría de los miembros son unicelulares flagelados con dos flagelos visibles, como en *Ochromonas*, o a veces uno, como en *Chromulina*. La mayor parte no tiene ninguna cubierta celular. Sin embargo, algunos tienen armaduras de silicio. (Harold, Wynne, 1978, 566)

## E. Usos

Los usos de las algas son muy diversos: agrícolas, industriales, terapéuticos, y, principalmente, alimenticios. En el norte de Europa se recolectan muchas especies para utilizarlas como abonos y para extraer los productos minerales que contienen. Algunos tipos (goomen) se utilizan en la confección de colchones, y también en preparados industriales, culinarios, cosméticos o farmacéuticos. Las propiedades que poseen ciertas algas de aumentar el volumen en el agua se ha utilizado en cirugía. En Japón forman parte de algunos platos (kanten). Algunas algas (agar-agar) intervienen en la preparación de sustancias gelatinosas utilizadas para el cultivo de bacterias y hongos, como agentes gelificantes para postres y confituras, como ingredientes en cosmética, dentífricos, etc. De algas marinas se extrae yodo y la combustión de algas origina cenizas ricas en minerales para fertilizar los suelos. (Ledesma, 2000)

1. **Alimentos.** Las algas se han utilizado como alimento desde tiempos de antaño. En Japón ciertos tipos de algas marinas componen una parte importante de la dieta. Las algas de agua dulce no son consumidas masivamente como alimento más que en algunas zonas de África o América, pero las cultivadas apenas se emplean con ese objeto. En general, su valor nutritivo es elevado, pero presentan problemas de digestibilidad debido a su pared celular de celulosa, pero la deshidratación facilita la digestión. así, las algas secadas en tambores calientes se digieren mejor que las secadas al sol. De todos modos, la importancia de las algas microscópicas en la dieta no debe menospreciarse: en especial, *Spirulina* se considera como una posible gran fuente de proteínas para los países hambrientos del globo. En el primer mundo *Spirulina* se consume bastante en pastillas para reducir el apetito. *Scenedesmus*, por otro lado, se ha probado con niños desnutridos a razón de 11 g diarios en la dieta sin ningún tipo de rechazo corporal y con una ganancia neta de 28 gramos de peso diarios frente a una dieta sin *Scenedesmus* (Cobelas, 1989, 43).

2. **Fertilizantes.** El uso de las algas bentónicas marinas como fertilizante es también antiguo. Aunque ya hace tiempo que se haya abandonado este uso en las agriculturas industrializadas. Las algas planetónicas no han sido excesivamente utilizadas en este sentido, pero resultan un fertilizante barato y de simple aplicación, ya

que concentran en su interior nitrógeno y fósforo y pueden administrarse a los cultivos mediante riego. La mayor parte del uso como fertilizante se ha llevado a cabo en Asia. Las experiencias se han realizado con Cianofíceas fijadoras de nitrógeno atmosférico, cultivadas masivamente e inoculadas en los campos de arroz donde siguen viviendo y añaden nitrógeno orgánico a los cultivos. En China se han obtenido incrementos del 10-20 % respecto a los campos no fertilizados de este modo. En la India se han obtenido resultados similares (Cobelas, 1989, 43)

3. **Biocombustibles y aceites.** Las algas están entre los vegetales de más rápido crecimiento del mundo, y casi el 50 por ciento de su peso es aceite. (de algunas especies). Como se mencionó anteriormente, las algas depositan sus reservas de energía tanto en almidones como en los aceites, cuando las algas se encuentran en un ambiente estresante, convierten su almidón y otros azúcares en aceites, es un modo de guardar esta energía de una manera más prolongada, por lo que se deben de considerar en crear ciertas condiciones de estrés a las algas cuando les va a llegar el momento de recolección, aumentando de esta manera la productividad del alga para la recolección del aceite, Ese aceite lípido se puede emplear en hacer biodiesel para coches, camiones y aviones. (Brisanti, 2006, 101).

Así mismo la descomposición de la biomasa de una manera anaerobia, propicia la generación de metano y otros derivados, El metano producido por bacterias es el último eslabón en una cadena de microorganismos que degradan material orgánico y devuelven los productos de la descomposición al medio ambiente. Este proceso que genera biogás es una fuente de energía renovable, que puede ser utilizada como el antepenúltimo procesamiento que se le da a la biomasa de las algas, posteriormente esta materia puede ser compostada y obtener fertilizantes de muy buena calidad. (Brisanti, 2006, 101).

4. **Alcoholes.** La biomasa resultante de las algas es rica en polisacáridos, que pueden ser fácilmente fermentables, con la ayuda de microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol o metanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante puede ser procesado para diversos usos, ya sea como combustible, alimento, síntesis, u reactivo para el mismo proceso de biodiesel mencionado con anterioridad. (Brisanti, 2006, 110).

5. **Farmacéuticos y cosméticos.** En la industria cosmética los aceites de algas son ampliamente utilizados como componentes activos de cremas antiarrugas, “adelgazantes”, reafirmantes entre otros, en la industria farmacéutica, se les ha utilizado como expectorantes, relajantes y desparasitantes. (Sin autor, Nivea, 2009)

## F. Métodos para la Ruptura de la pared celular

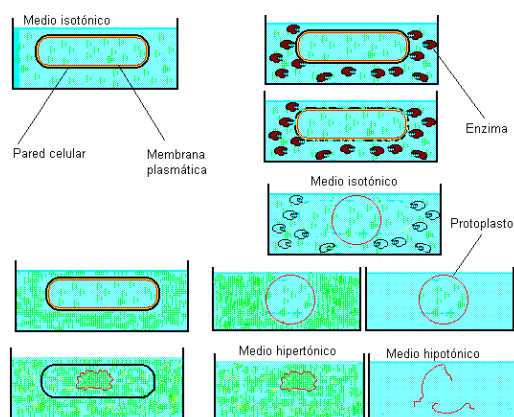
1. **Ruptura con Soluciones Hipotónicas (Osmosis).** Una solución hipotónica es aquella que tiene menor concentración de soluto en el medio externo en relación al medio citoplasmático de la célula. Una célula sumergida en una solución con una concentración más baja de materiales disueltos, está en un ambiente hipotónico; la concentración de agua es más alta (a causa de tener tan pocos materiales disueltos) fuera de la célula que dentro. Bajo estas condiciones, el agua se difunde a la célula, es decir, se produce ósmosis de líquido hacia el interior de la célula. (Raisma. 2000)

Una célula en ambiente hipotónico se hincha con el agua y puede explotar; cuando se da este caso en los glóbulos rojos de la sangre, se denomina hemólisis. Los organismos que viven en suelos de arroyos y lagos habitan en agua de lluvia modificada, que es un ambiente hipotónico. Las células animales sufren el fenómeno de citólisis, que lleva a la destrucción de la célula, debido al paso del agua al interior de ella. Por otro lado, en las células vegetales ocurre el fenómeno de presión de turgencia: cuando entra agua, la célula se hincha pero no se destruye debido a la gran resistencia de la pared celular, por lo que debe utilizarse métodos previos como una destrucción por enzimas. (Raisma. 2000)

2. **Ruptura enzimática.** Existen ciertos tipos de enzimas (catalizadores biológicos) conocidos como lisosomas que atacan precisamente las paredes de celulosa de muchos tipos de algas, generalmente estas enzimas rompen el enlace beta glucosídico de la mureína. La acción de la lisozima se pone en evidencia por un aclaramiento rápido de una suspensión de microorganismos. (Raisma. 2000)

El mecanismo de lisis es el siguiente: la destrucción de la pared celular deja al protoplasma de las bacterias rodeado únicamente por la membrana celular ("protoplasto"), lo cual convierte a la bacteria en un organismo extraordinariamente sensible a las variaciones de tonicidad del medio, esta es la base del fenómeno de aclaración que tiene lugar luego de la acción de la lisozima, cuando la solución es hipotónica. (Raisma. 2000)

Figura No. 2 Pared celular en medios Isotónicos



Los protoplastos son estables en medios hipertónicos e isotónicos; en medios hipotónicos, tal lo señalado, estallan y dejan restos de membrana citoplasmática llamados "fantasmas".(Raïma. 2000)

El proceso de síntesis de la pared celular comienza en el citoplasma bacteriano, a partir de N-acetilglucosamina-1-fosfato que se une al UDP (uridin difosfato). (Raïma. 2000)

- El UDP se combina con la N-acetilglucosamina-1-fosfato, para dar UDP-N-acetilglucosamina que primero forma el éter láctico y luego en sucesivos pasos enzimáticos se unen al mismo los cinco aminoácidos para formar el N-acetilmurámico. (Raïma. 2000)
- En el siguiente paso, que ocurre en el ámbito de la membrana citoplasmática la molécula que es hidrófila cambia a lipófila, lo cual facilita su transporte, por el cambio del UDP por undecaprenil-fosfato y el agregado de un pentapéptido de glicina a nivel de la L-lisina
- En la siguiente fase, en el ámbito de la pared celular, se produce la transglucosidación y formación del enlace beta alargando de esta manera la molécula.
- Los enlaces transversales entre moléculas del polímero se produce por transpeptidación, se libera una D-alanina y el grupo carboxilo se une a un grupo amino de la lisina de otro oligopéptido, también se libera el undecaprenil-fosfato. (Raïma. 2000)

3. **Ruptura por congelamiento.** Para que exista una destrucción de la pared celular debe de existir una formación de cristales grandes e irregulares en el momento de la congelación, para ello es necesario una congelación a temperaturas no muy bajas para permitir la formación de cristales grandes. (Vicente, 1994, 10)

Para que la cristalización se produzca más fácilmente se necesita la existencia de alguna partícula o sal insoluble que actúe como núcleo de cristalización. Cuanto menor es la temperatura, más fácilmente ocurre el fenómeno, formándose un mayor número de agregados cristalinos y, consecuentemente, el tamaño de los cristales es menor. Por el contrario a una temperatura próxima al punto de fusión, la nucleación es lenta, los núcleos cristalinos son pocos y, por tanto, resultan cristales relativamente grandes. (Vicente, 1994, 10)

Al estudiar al microscopio las formas de los cristales de hielo se observa que la congelación rápida produce cristales pequeños más o menos redondeados mientras que la congelación lenta da lugar a cristales mayores, alargados o en agujas. Esta congelación lenta tiene como consecuencia la rotura de las fibras y paredes celulares perdiendo el alimento parte de sus propiedades. (Vicente, 1994, 10)

En alimentos sólidos o de viscosidad elevada el tamaño de los cristales varía en una zona u otra del alimento. En las zonas periféricas los cristales se forman rápidamente y son de pequeño tamaño, mientras que en el interior la transferencia de calor es más difícil y los cristales crecen más lentamente alcanzando un mayor tamaño. (Vicente, 1994, 10)

#### 4. Ruptura mediante oxidación y otras reacciones.

a. Ozono. Es un gas azulado con un olor acre característico. Se forma de manera natural en la estratosfera en pequeñas cantidades como resultado de la acción de los rayos solares ultravioleta sobre el oxígeno así como también después de las tormentas. También se forma en la troposfera por las reacciones fotoquímicas que tienen lugar entre el oxígeno y nitrógeno con los hidrocarburos que desprenden entre otras fuentes, los coches y las industrias. Sin embargo, el ozono que se produce es muy inestable y se descompone rápidamente en el aire. El ozono tiene un potencial de oxidación alto comparado con los derivados del cloro como el hipoclorito, el ácido hipocloroso o el cloro. Una de sus ventajas es que no presenta algunos de los problemas asociados con el hipoclorito como son el olor y el sabor residual. Además, puede auto-descomponerse y no genera residuos en el agua, por lo que ésta se puede reciclar sin problemas de residuos químicos y medioambientales o de seguridad, a diferencia de los compuestos clorados. Su solubilidad en agua está influenciada por la temperatura, de forma que dicha solubilidad aumenta conforme disminuye la temperatura del agua. Sin embargo, las bajas temperaturas del agua conllevan a la reducción en la velocidad de reacción. Luego para conseguir la máxima efectividad se debe hallar el equilibrio entre menor temperatura con mayor solubilidad y máxima velocidad de reacción. El aumentar la solubilidad del ozono en agua fría tiene también la desventaja de que puede ser difícil mantener una dosis constante ya que evoluciona a oxígeno de forma muy rápida (Lenntech, 2007)

El ozono se descompone en solución produciendo los radicales hidroperoxil, hidroxil y superóxido. La alta actividad del ozono se atribuye al gran poder oxidante de estos tres radicales libres. La molécula de ozono se descompone espontáneamente en oxígeno y, por ello, el empleo de ozono minimiza la acumulación de desechos inorgánicos en el ambiente. La descomposición del ozono es tan rápida en la fase acuosa de los alimentos que su acción antimicrobiana puede tener lugar principalmente en la superficie de estos. Es estable durante unos 10-20 min por lo que el riesgo de ingestión de ozono por el consumidor no existe. (Lenntech, 2007)

El ozono es muy reactivo con la mayoría de los constituyentes que se encuentran en las paredes celulares y membranas que sirven de barreras protectoras a las bacterias, originando la oxidación de la pared celular bacteriana que conlleva la ruptura celular. Sin embargo, algunas bacterias pueden formar esporas en condiciones adversas, siendo estas 10-15 veces más resistentes al ozono, pero se pueden destruir si se exponen al ozono durante el tiempo necesario. La envoltura proteica de los virus es también sensible a la oxidación por ozono, por lo que puede ser efectivo contra los virus que se pueden transmitir a través de la cadena alimentaria como la hepatitis. (Lenntech, 2007)

b. Cloro. Las sustancias de naturaleza orgánica en células de bacterias reaccionan con dióxido de cloro, causando la interrupción de distintos procesos celulares. El dióxido de cloro reacciona directamente con

aminoácidos y el ARN de la célula. El dióxido de cloro ataca la estructura celular o los ácidos en el interior de la célula. Evita la formación de proteínas. El dióxido de cloro afecta la membrana celular cambiando las proteínas y grasas de la membrana e interfiriendo en la inhalación. Cuando las bacterias son eliminadas, el dióxido de cloro penetra en la pared celular.

Los virus son eliminados de manera diferente; el dióxido de cloro reacción con peptona, que es una sustancia soluble en agua que se origina en la hidrólisis de proteínas y aminoácidos. El dióxido de cloro mata los virus mediante la prevención de la formación de proteínas. El dióxido de cloro es mas efectivo en los virus que el ozono o el cloro. (Lenntech, 2007)

El dióxido de cloro como desinfectante tiene la ventaja de que reacciona directamente con la pared celular de los microorganismos. Esta reacción no depende del tiempo de reacción o concentración. Al contrario que en desinfectantes no oxidantes, dióxido de cloro mata microorganismos incluso cuando estos son inactivos. Por lo tanto la concentración de dióxido de cloro necesaria para matar microorganismos de manera efectiva es menor que concentraciones de desinfectantes no oxidantes. Los microorganismos no pueden desarrollar ningún resistencia en contra del dióxido de cloro. (Lenntech, 2007)

5. Ruptura de la pared celular mediante ondas ultrasónicas. Las algas verdes tienen muchas características en común con las células de las plantas. Como las plantas, las algas verdes tienen una vacuola rodeada de un tonoplasto, una membrana celular pegada a una pared celular y clorofila, responsable de la fotosíntesis. Uno de los efectos del ultrasonido es que puede romper el tonoplasto de las algas verdes, liberando el contenido de la vacuola en la célula interna. Además, se puede dañar la adhesión de la membrana celular y la pared celular. (LG, 2009)

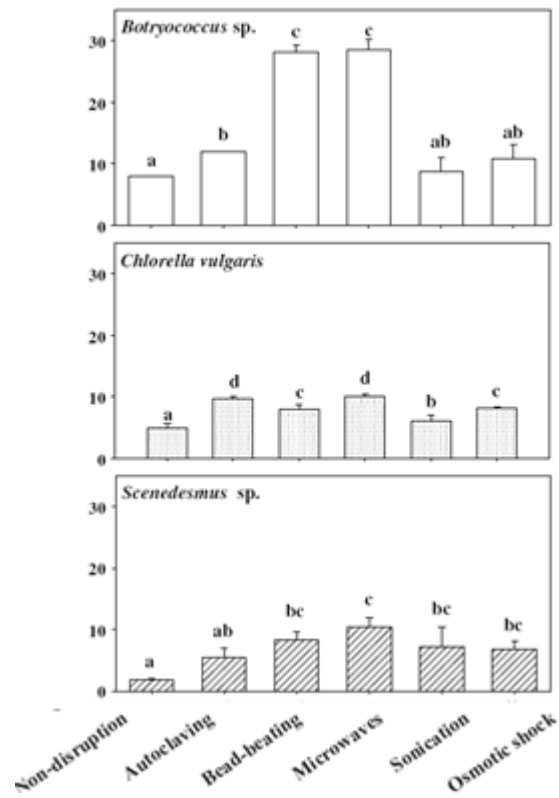
Las algas verde-azuladas son unas de las bacterias más antiguas. Estas bacterias también tienen algunas características en común con las células de una planta. Por ejemplo, su capacidad de producir energía a través de la absorción de luz, denominada fotosíntesis. Las algas verde-azuladas pueden trasladarse en el agua de forma vertical gracias a que poseen vesículas de gas. Las ondas de ultrasonido rompen estas vesículas de gas, haciendo que las algas verde-azuladas se vayan hacia el fondo y probablemente mueran por la falta de luz. (LG, 2009)

Figura No. 3 Efectos de las ondas ultrasónicas en distintos tipos de algas.



(LG, 2009)

Gráfico No 1. Efectos de los distintos tratamientos estudiados en diversos tipos de algas



(Lee, et al, 2009)

## G. Cavitación

Por cavitación se entiende la formación de bolsas localizadas de vapor dentro del líquido, pero casi siempre en las proximidades de las superficies sólidas que limitan el líquido. En contraste con la ebullición, la cual puede ser causada por la introducción de calor o por una reducción de la presión estática ambiente del líquido, la cavitación es una vaporización local del líquido, inducido por una reducción hidrodinámica de la presión. (Marchegani, 2007)

La cavitación o aspiración en vacío es un efecto hidrodinámico que se produce cuando el agua o cualquier otro fluido en estado líquido pasa a gran velocidad por una arista afilada, produciendo una descompresión del fluido debido a la conservación de la constante de Bernoulli (Principio de Bernoulli). Puede ocurrir que se alcance la presión de vapor del líquido de tal forma que las moléculas que lo componen cambian inmediatamente a estado de vapor, formándose burbujas o, más correctamente, cavidades. Las burbujas formadas viajan a zonas de mayor presión e implotan (el vapor regresa al estado líquido de manera súbita, «aplastándose» bruscamente las burbujas) produciendo una estela de gas y un arranque de metal de la superficie en la que origina este fenómeno. (Marchegani, 2007)

La implosión causa ondas de presión que viajan en el líquido. Estas pueden disiparse en la corriente del líquido o pueden chocar con una superficie. Si la zona donde chocan las ondas de presión es la misma, el material tiende a debilitarse metalúrgicamente y se inicia una erosión que, además de dañar la superficie, provoca que ésta se convierta en una zona de mayor pérdida de presión y por ende de mayor foco de formación de burbujas de vapor. Si las burbujas de vapor se encuentran cerca o en contacto con una pared sólida cuando implosionan, las fuerzas ejercidas por el líquido al aplastar la cavidad dejada por el vapor dan lugar a presiones localizadas muy altas, ocasionando picaduras sobre la superficie sólida. (Marchegani, 2007)

1. **Tipos de cavitación.** Por lo dicho precedentemente hay dos tipos de cavitación, uno con flujo y otro estando el líquido estático:

- a. Cavitación por flujo
- b. Cavitación por ondas

Ejemplos del tipo (a) los tenemos en tuberías donde la presión estática del líquido alcanza valores próximos al de la presión de vapor del mismo, tal como puede ocurrir en la garganta de un tubo venturi, a la entrada del rodete de una bomba centrífuga o a la salida del rodete de una turbina hidráulica de reacción. Los ejemplos del tipo (b) aparecen cuando estando el líquido en reposo, por él se propagan ondas, como las ultrasónicas denominándose cavitación acústica, o típicas ondas por reflexión sobre paredes o superficies libres debido a ondas de compresión o expansión fruto de explosiones y otras perturbaciones como en el caso del golpe de ariete, denominadas cavitación por shock. (Marchegani, 2007)

2. **Cavitación acústica.** El creciente interés sobre la contaminación de cuerpos de agua con compuestos orgánicos, ha estimulado las actividades de investigación hacia el desarrollo de tecnologías de tratamiento para remover o limpiar estos contaminantes. Muchos de estos avances envuelven a la tecnología ultrasónica. (Keiffer 2006)

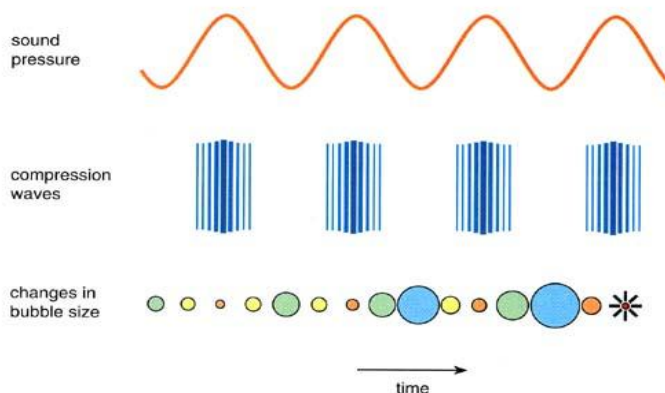
El ultrasonido provee una forma de energía para la modificación de las reacciones químicas, y mucho más eficiente que las normalmente usadas (temperatura y luz). Esta nueva herramienta se denomina sonoquímica. Los sonidos son vibraciones que se propagan a través del aire, agua o sólidos. (Keiffer 2006)

La audición en los seres humanos, ocurre siempre que una vibración tenga una frecuencia comprendida entre unos 15 y 20.000 hercios, y su intensidad sea la suficiente para llegar al oído interno. Cuando las vibraciones superan estos márgenes se habla de ultrasonido y no son perceptibles por el ser humano. Las frecuencias superiores a los 18 Kilohertz (ciclos por segundo) son generalmente consideradas como ultrasónicas. El origen del efecto químico del ultrasonido en los líquidos (efecto sonoquímico) es el fenómeno de Cavitación acústica. (Keiffer 2006)

El sonido se transporta a través de un líquido como una onda, con ciclos alternados de compresión y expansión. Si la onda de expansión es lo suficientemente poderosa, pueden generarse presiones negativas que traen como resultado que las moléculas empiecen a separarse formando “microburbujas” o cavidades (cavitación viene del latín cavus = cavidad). (Keiffer 2006)

Las cavidades crecen acompañando los ciclos y dependiendo de la intensidad del sonido. Durante los ciclos de expansión, la presión negativa que se ejerce sobre las burbujas hace que en ellas se acumulen pequeñas cantidades de gases disueltos y vapor del solvente, y durante los de compresión, los diámetros de estas burbujas aumentan. (Keiffer 2006)

Figura No. 4. Efectos de las ondas ultrasónicas en distintos tipos de algas



(Keiffer 2006)

Figura No. 4: El líquido irradiado con ultrasonido produce burbujas. Estas burbujas oscilan, creciendo durante la fase de expansión de la onda de sonido, y comprimiéndose en la fase contraria. Bajo estas condiciones las burbujas pueden colapsar violentamente, generando muy altas temperaturas y presión (cavitación). (Keiffer 2006)

Es por esto que las burbujas van aumentando su tamaño gradualmente durante los ciclos hasta llegar a un “tamaño crítico”, posteriormente las mismas colapsan violentamente, generando gran cantidad de energía. Este colapso establece un ambiente inusual para las reacciones químicas. Los gases y vapores del interior de la cavidad son tan comprimidos que generan intenso calor y crean regiones llamadas “hot spots”, o puntos calientes, con presiones de 500 atm y temperaturas de hasta 5000°C. Si bien la temperatura de estos puntos es extraordinariamente alta, la región en sí es tan pequeña que el calor se disipa rápidamente. (Keiffer 2006)

Las primeras reacciones químicas en el líquido se dan a causa de estas extremas condiciones: las altas temperaturas y presiones generadas, proveen la energía de activación requerida para la fragmentación de las moléculas (rotura de enlaces) generando especies más pequeñas o radicales, los cuales pueden a su vez causar reacciones secundarias. El ultrasonido es fuente de radicales, especialmente OH<sup>•</sup>, oxidante muy fuerte y no específico, el cual se escapa de la burbuja y reacciona rápidamente con los compuestos en solución.

Numerosos antecedentes demuestran que las ondas ultrasónicas pueden convertir substratos orgánicos de interés medioambiental (contaminantes) a compuestos inorgánicos inocuos (dióxido de carbono, agua) o a compuestos mucho menos peligrosos que los originales. (Keiffer 2006)

### III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha crecido la importancia de utilizar fuentes de energía renovables, una de ellas es la utilización de bioproductos, como lo son los biocombustibles, los que prometen reducir las emisiones de carbono, Si bien estos biocombustibles se pretenden quemar, liberando óxidos de carbono, las plantas que produjeron estos aceites para dichos combustibles debieron fijar el doble o el triple de carbono para crecer y atender sus propias necesidades, lo que significa que el balance general es de reducción en dichas emisiones, lo que convierte esta tecnología en cierta forma amigable con el ambiente.

Uno de los mayores problemas con dichas fuentes de energía renovable es que requieren un área de dimensiones importantes para la siembra de las plantas productoras de aceite, lo que ha causado polémica debido al hecho de que estas áreas podrían ser utilizadas para siembras dedicadas a la alimentación humana, de esta forma los cultivos dedicados a la alimentación y los cultivos dedicados a los biocombustibles entrarían en competencia, así mismo se estima que si dicha tecnología entra en vigor, los campos de cultivo deberían de duplicar o triplicar su tamaño, ganándole espacio a áreas silvestres, dejando de ser de esta manera una tecnología amigable con el ambiente, así mismo no existe suficiente tierra cultivable para satisfacer dichas necesidades.

Por estas razones ha surgido un gran interés en el cultivo de algas ya que estas solamente requieren una fracción de la tierra utilizada por las plantaciones comunes y pueden llegar a producir muchísimo más que la más eficiente de las cosechas de las plantas vasculares. Así mismo las algas no requieren de tierras cultivables para desarrollarse, ellas solamente requieren de la energía solar, ciertos nutrientes y un medio de cultivo adecuado, por lo que pueden ser plantadas en tierras áridas sin provecho aparente para la agricultura, eliminando de esta manera la competencia entre la comida y el combustible, otro aspecto importante a mencionar es que las algas se desarrollan a una tasa mucho más elevada que las plantas superiores, por lo que la cosecha se puede llevar a cabo a los pocos días después de su siembra, cosa que no es posible con las plantas superiores.

A pesar de todas las ventajas que poseen las algas sus altos costes en la extracción de biomasa y aceites debido a su pared celular no les ha permitido competir de una manera razonable en el mercado de los combustibles. Debido a esto se han desarrollado diversos estudios para reducir el coste de la extracción de dichos aceites. Este trabajo se centrará en la ruptura de la pared celular de las algas, facilitando de esta manera la extracción de aceites y otros productos de interés.

Los beneficios desde el punto de vista de Ingeniería Química radican en el hecho de que la carrera fue pensada para la obtención y refinamiento tanto de Hidrocarburos como de alcoholes, y estas tecnologías “bio-ecológicas” tienen el potencial de ser los nuevos motores de nuestra sociedad.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo general:

- Provocar una ruptura en la pared celular de las algas estudiadas, mediante distintos métodos propuestos, con lo que se busca diseñar un proceso adecuado para obtener mejores eficiencias y reducir el costo de extracción de aceites y biomasa de alga.

### B. Objetivos específicos:

- Determinar el mejor método con respecto a costes y eficiencia en la ruptura de la pared celular del organismo estudiado.
- Proponer un método de separación del aceite y la biomasa posterior a la ruptura de la pared celular.
- Proponer un proceso industrial en la extracción de aceites y biomasa para los experimentos llevados a nivel laboratorio.
- Proponer un método para la fermentación de la biomasa para la obtención de etanol.
- Proponer un método para producción de biodiesel a partir del aceite extraído.
- Proponer un método de reutilización de los desechos de la biomasa para enriquecer el medio de cultivo de un fotoreactor.

## V. PROBLEMA A RESOLVER

Los altos costes de extracción de materia útil de las algas, debido a su pared celular no les ha permitido competir de una manera razonable en el mercado nacional e internacional, a pesar de ser uno de los organismos con mayor retorno en biomasa, aceites entre otros productos por área de cultivo invertida, así mismo su tasa de crecimiento es sumamente acelerada, muchos tipos de algas pueden duplicar su biomasa en tan solo un día. También es importante mencionar que existe en el país una gran cantidad de cuerpos de agua en estado de eutrofización debido al exceso de biomasa acumulada en ellos, la cual podría ser aprovechada de diversas maneras.

Por lo anteriormente mencionado se investigarán diversos métodos para la ruptura de la pared celular de dichos seres vivos, con lo que se facilitara la extracción de aceites y biomasa de los mismos. Así mismo se propondrá un proceso industrial con los resultados obtenidos en escala de laboratorio.

## VI. METODOLOGÍA

Para la investigación de un método de ruptura de la pared celular de las algas se necesitan siete etapas, las cuales se delimitan de la siguiente manera.

- La primera fase consiste en el planteamiento del problema a resolver, los objetivos, el alcance y las justificaciones del proyecto, con ello se le puede dar una dirección adecuada a la investigación.
- La segunda fase consiste en una revisión bibliográfica, tanto de las algas en general, como de su anatomía; así mismo la investigación de distintos métodos utilizados para la disrupción de la pared celular, con estos datos se pueden plantear los métodos a utilizar en las fases posteriores.
- La tercera fase consiste en la recolección de especímenes a estudiar, se prevee trabajar con diversos tipos de algas, así mismo se prevee trabajar también con ciertos tipos de plantas acuáticas vasculares como la hydrilla, cuya pared celular es en ciertos aspectos similar a la de ciertas algas por lo que puede ser un buen espécimen de estudio. Es importante mencionar que esta planta invasora se encuentra en un gran número de cuerpos de agua en el país.

Las algas se conseguirán de dos maneras, una será mediante recolección de especímenes en una finca en Tiquizate, y la otra será de una tienda especializada de acuarios marinos la cual vende masivamente el género *Nannochloropsis*, como alimento para peces y corales, estas algas vienen muertas y concentradas, pero íntegras, por lo que son un excelente espécimen de estudio ya que se pueden conseguir fácilmente y se encuentran aisladas, por lo que no existe variación en los resultados debido a la intervención de otros especímenes.

- La cuarta fase consiste en la realización de las pruebas. Debido a que se trabajó con especímenes distintos se propusieron dos metodologías generales.

### **Metodología para la experimentación con microalgas**

- Preparar solución
- Tomar una muestra de 50 mL
- Homogenizar la muestra
- Realizar un conteo de células con microscopio. ( células enteras/area)
- Aplicación del método de ruptura
- Homogenizar la muestra
- Realizar un conteo verificando la presencia de células enteras/area(microscopio requerido)

### Metodología para la experimentación con macroalgas e *Hydrilla*

- Licuar el espécimen a utilizar
- Preparar solución
- Tomar una muestra de 50 mL
- Realizar un análisis cualitativo mediante microscopio
- Aplicación del método de ruptura
- Homogenizar la muestra
- Realizar un análisis cualitativo mediante microscopio

Se utilizaron 4 métodos de ruptura, y 2 métodos combinados.

- **Congelamiento:** La muestra se congeló a temperaturas inferiores a los 0°C, La temperatura exacta se determinó experimentalmente, porque no se conoce la temperatura de congelación del agua debido a las propiedades coligativas proporcionadas por el alga estudiada. Al trabajar a temperaturas cercanas al punto de congelación se esperó obtener un congelamiento lento fomentando la formación de cristales grandes e irregulares lo que se espera que se provoque la ruptura de la pared celular de las algas.

- **Trituración:** La muestra se tritura a altas revoluciones, para dicho caso se buscó una cuchilla adecuada para ser adaptarla a un rotamartillo de velocidad variable, la trituración se llevó a cabo en un recipiente metálico, para evitar accidentes.

- **Uso de microondas:** La muestra se calentó en un microondas a alta temperatura, (cerca de los 100° C and 2450 MHz) por 5 minutos, la muestra se colocó con un metal para romper la tensión superficial, así mismo se dejó enfriar por 10 minutos dentro del microondas para evitar accidentes.

- **Uso de calentamiento a presión:** Para este propósito se pensaba utilizar una olla a presión, finalmente se logró utilizar un autoclave a temperatura mayores de los 100° C y una presión superior a los 15 PSI

Cada una de estas metodologías se realizaron en cuadruplicado, dependiendo de la disponibilidad de materia orgánica disponible, así mismo se realizaron con dos especímenes distintos, las soluciones principales se llevaron a cabo en un balón de 1 L el cual se repartirá en los distintas muestras de 50 mL. Para poder tener un parámetro de comparación entre los métodos utilizados.

Los métodos combinados se formularon a partir de estos resultados.

Así mismo se hizo un conteo mediante un análisis de turbidometría, de la solución principal en donde el instrumento a utilizar se calibró con distintas soluciones conocidas preparadas mediante peso seco, de esta manera se pudo reconocer la solución preparada con mayor facilidad en cualquier parte del estudio, logrando de esta manera determinar rendimientos tanto de extracción de aceites como de ruptura de pared celular y obtención de biomasa.

- La quinta fase consistió en un análisis estadístico, de los resultados obtenidos, en donde se utilizó un análisis de varianza ANOVA para la determinación del método con mayor porcentaje de ruptura. Así mismo se utilizó una prueba T que nos permitió determinar si la diferencia entre métodos es significativa.
- La sexta fase consistió en proponer un diseño de proceso de acuerdo a los resultados obtenidos.
- La séptima fase consistió en realizar el informe de resultados, mediante el acoplamiento de la información obtenida en las fases de investigación.

## VII. CRONOGRAMA

En la siguiente tabla se presenta el cronograma de actividades en el cual se describe la planificación mensual de trabajo en función de la metodología.

Tabla No. 1 Cronograma de actividades

<b>Actividad</b>	<b>Fecha programada</b>
Formulación de objetivos y justificaciones del proyecto	Junio 2009
Revisión bibliográfica	Junio 2009
Recolección de especímenes a estudiar	Junio 2009
Pruebas de ruptura de pared celular	Junio -Agosto 2009
Análisis estadístico	Agosto 2009
Diseño de proceso	Agosto-Octubre 2009
Realización del informe de resultados	Octubre- Noviembre 2009

## VIII. RESULTADOS

Tabla No. 2 Resultados cualitativos de los tratamientos realizados:

Espécimen estudio	Microondas	Autoclave	Ultrasonido	Congelamiento
Phytoplankton	sin efectos visibles	sin efectos visibles	sin efectos visibles	sin efectos visibles
Hydrilla verticalata	-	-	Probable	Probable

Tabla No. 3 Resultados consumo energético de los equipos utilizados por tratamiento realizado

Espécimen estudio	Microondas	Autoclave	Ultrasonido	Congelamiento
Phytoplankton	0.1188 kWh	0.400 kWh	0.125 kWh	70 kWh
Hydrilla verticalata	0.00988 kWh			

Tabla No. 4 Costo del equipo propuesto EXW

Equipo	Cantidad	Costo	Gastos de importación e impuestos	Costo Total
Bomba 1.5 Hp	1	Q 12,238.79	Q 3,426.86	Q 15,665.65
Bomba 0.5 Hp	1	Q 7,657.00	Q 2,143.96	Q 9,800.96
Valvula 6" cédula 80	1	Q 4,755.40	Q 1,331.51	Q 6,086.91
Valvula 3 1/2" cédula 80	1	Q 362.70	Q 101.56	Q 464.26
Válvula de Paso 2.5"	3	Q 282.10	Q 78.99	Q 1,083.26
Centrifuga decantadora	1	Q 1,209,000.00	Q 217,620.00	Q 1,426,620.00
Equipo de ultrasonido	1	Q 15,194.47	Q 5,014.33	Q 20,208.80
Tanque horizontal	1	Q 162,812.00	Q 53,728.11	Q 216,540.11

Tabla No. 5 Consumo energético del equipo propuesto.

Equipo	Tiempo operación h	Consumo energetico kWh
Bomba llenado	1	1.12
Equipo de ultrasonido	504	6.05
Bomba vaciado	2.73	1.02
Centrifuga	2.73	101.79

Tabla No. 6 Comparativa de precios, del método propuesto

Método	Costo
Propuesto	47.50 Q/ton aceite
Tradicional*	1329.12 Q/ton aceite
Aceite soya (referencia)	6700.00 Q/ton aceite

\*(Calculo de muestra)

Tabla No. 7 Detalle de equipo y materia prima para una planta que produce 100 Ton/día

Batches /día x centrifuga	8	Batch
centrífugas necesarias	4	Centrífugas
Tanques requeridos /día	32	Tanques
Tanques requeridos /planta	320	Tanques
Terreno min x tanque	60	m2
Terreno requerido por los tanques	19200	m2
hectáreas requeridas	1.92	Hectáreas
Biomasa seca requerida	366.6666667	ton biomasa seca
liquido a procesar	592000	gal/día

Tabla No. 8 Ventajas y desventajas del método propuesto

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>Extracción económica de aceite y biomasa.</li> <li>No se requiere el uso directo de combustibles fósiles para operar.</li> <li>Flexibilidad en el diseño del reactor.</li> <li>Rendimiento relativamente alto.</li> <li>Sistema sencillo.</li> <li>No requiere de uso de solventes o fluidos supercríticos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo de residencia en reactor muy alto.</li> <li>Se requiere mucho espacio para montar la planta.</li> <li>Tiempo de residencia puede conllevar la descomposición de buena parte de la biomasa.</li> <li>Se requiere de mayor investigación para validar factibilidad del proyecto.</li> </ul>

Tabla No. 9 Métodos propuestos según producto u subproducto obtenido

Fase líquida	Recirculación a los fotobiorreactores
Lodos (Biomasa)	Fermentación/ bacterias termofilicas, según D. Bellamy (patente anexos)
	Compostaje Activo
Fase oleosa	Refinación
	Biodiesel/Transesterificación
Glicerina	usos varios/posible conversión a propilen-glicol

Figura No. 5. Comparación de tejido de hydrilla antes y después de los tratamientos



Figura No. 6. Comparación de tejido del phytoplankton utilizado mediante los distintos tratamientos.

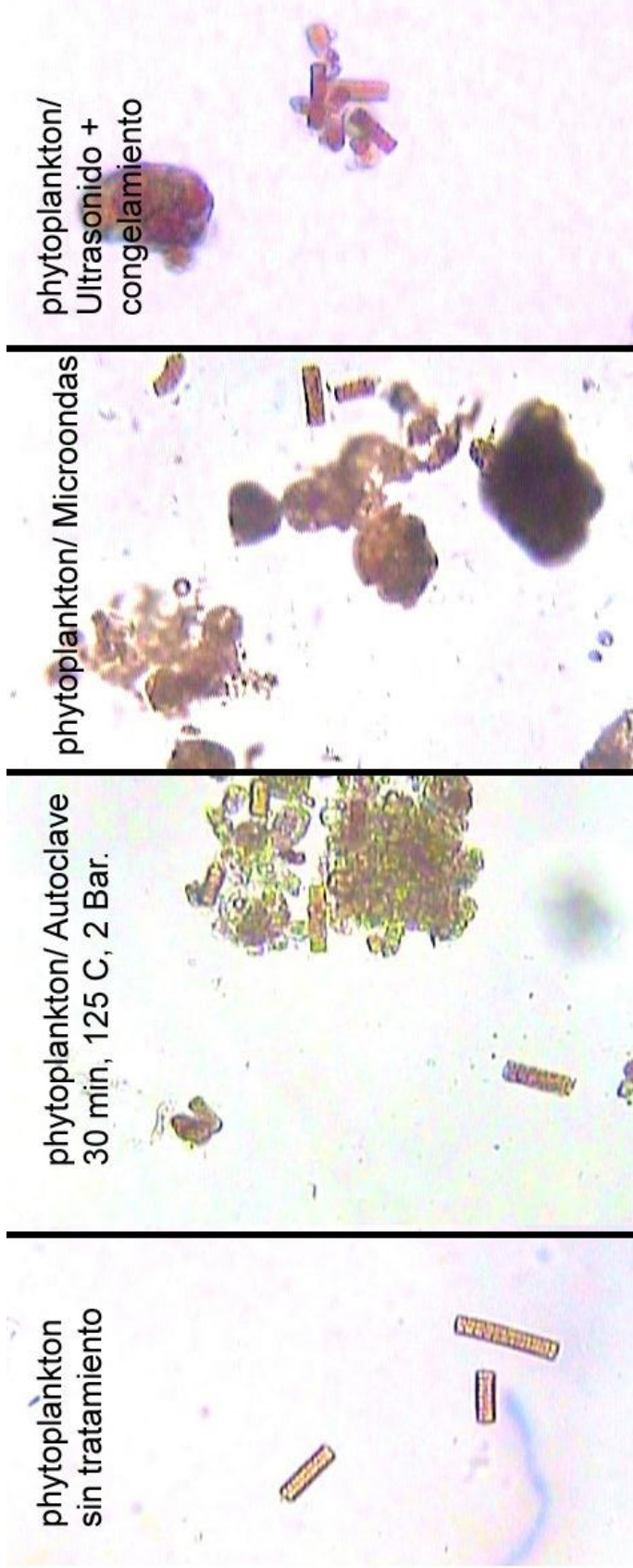


Figura No. 7. Diseño del sistema propuesto

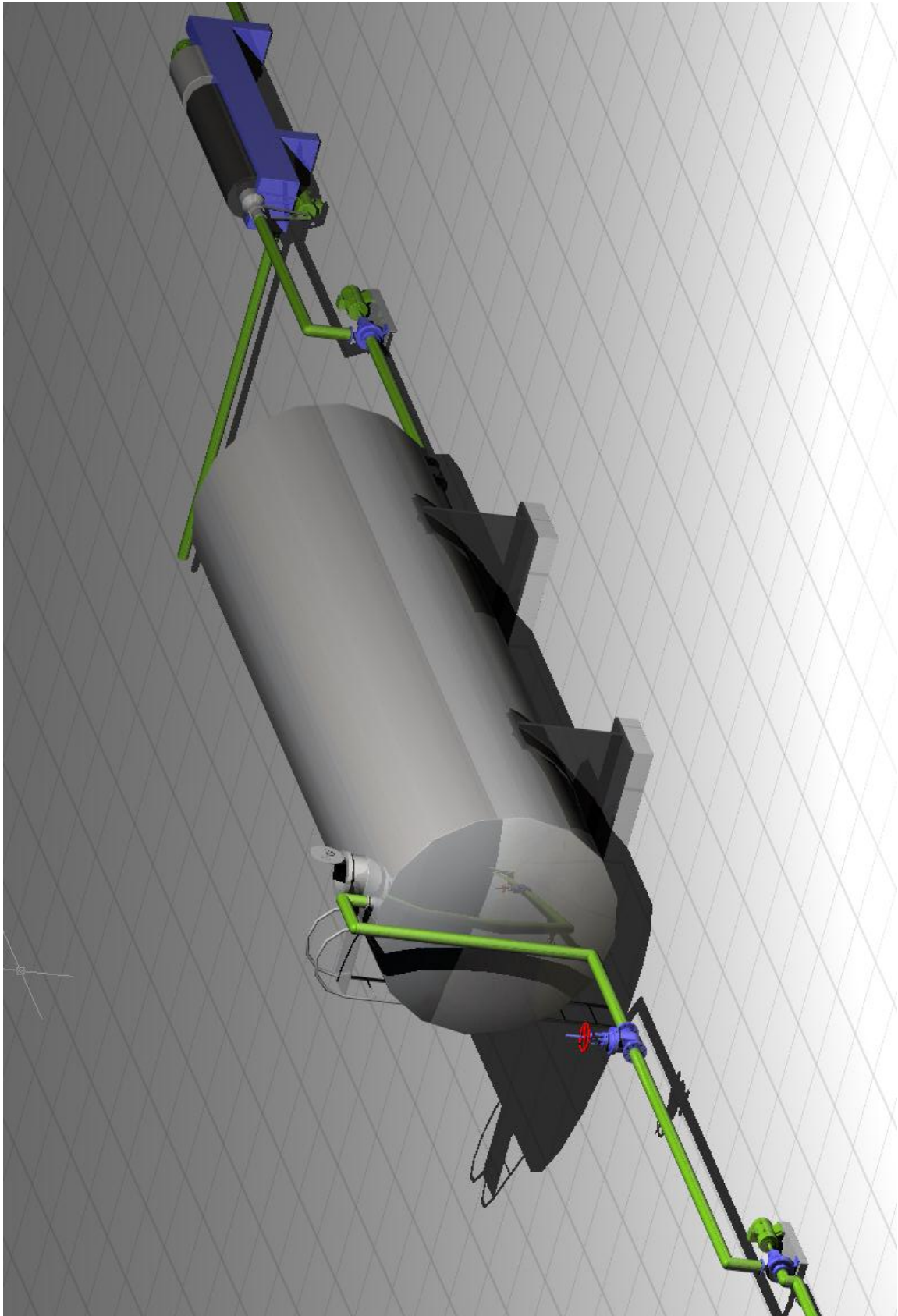


Figura No. 8. Balance de masa

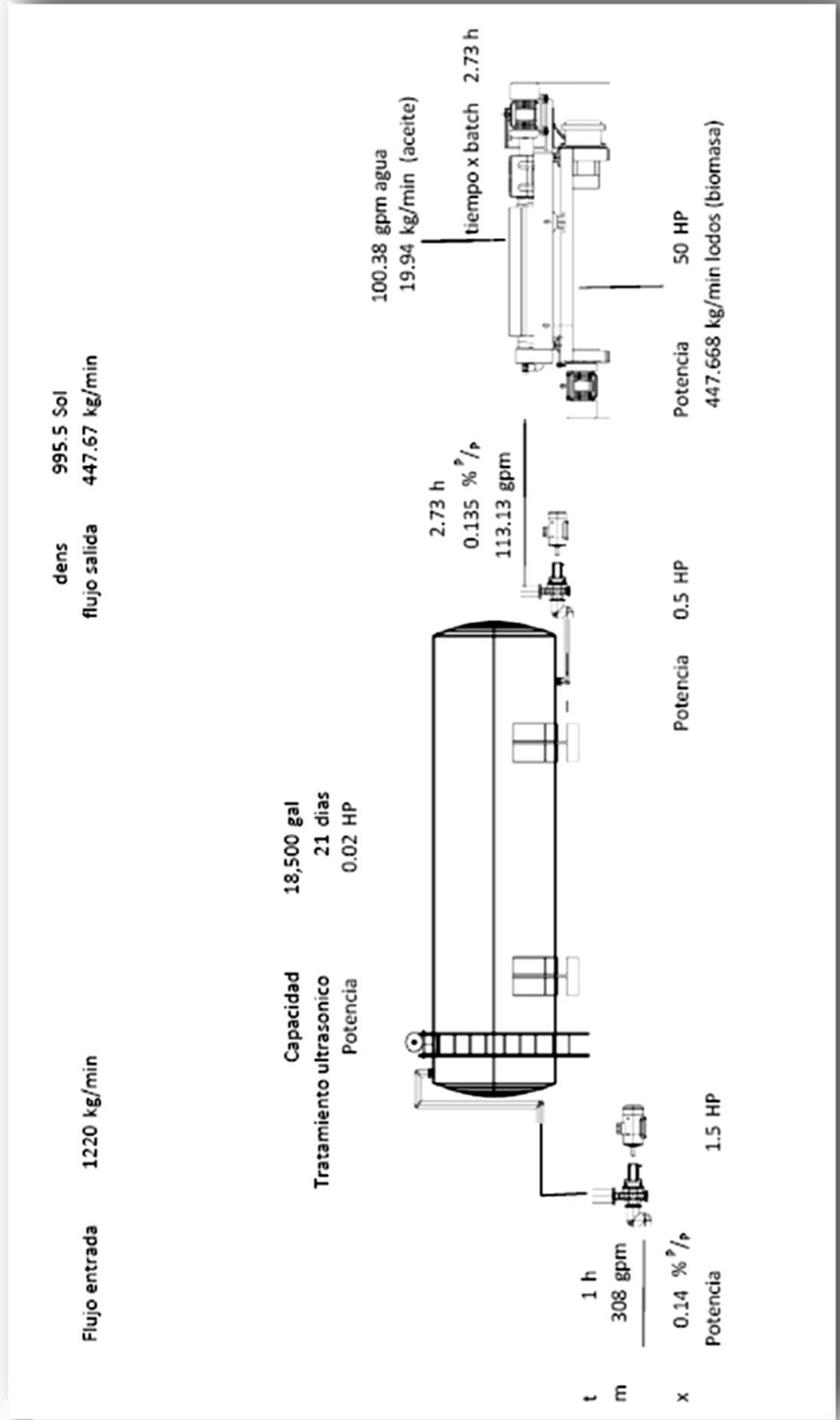


Figura No. 9. Detalle del tanque propuesto para el tratamiento ultrasónico.

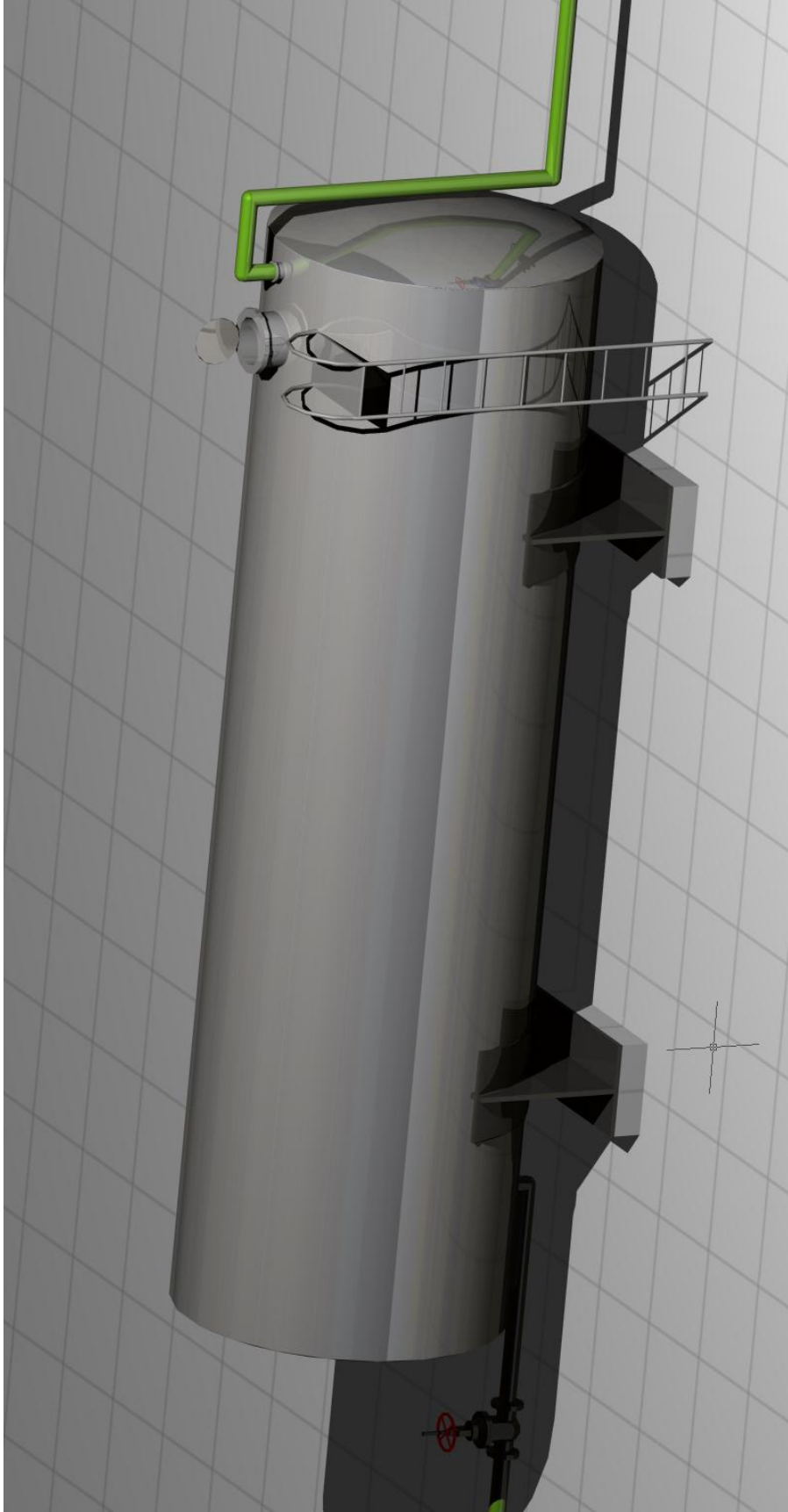


Figura No. 10. Dimensiones del tanque para el tratamiento ultrasónico

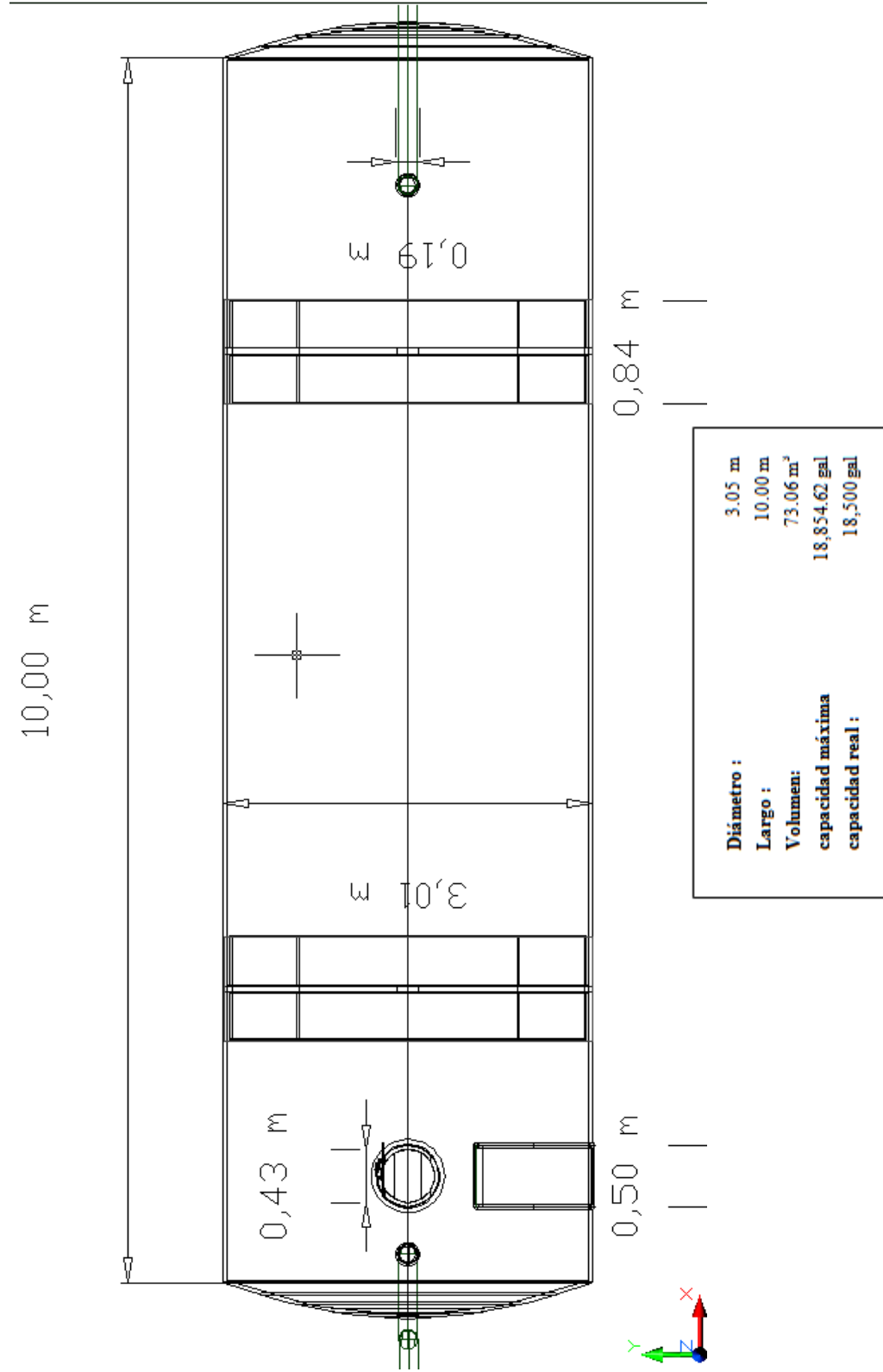


Figura No. 11. Detalle del decantador centrífuga

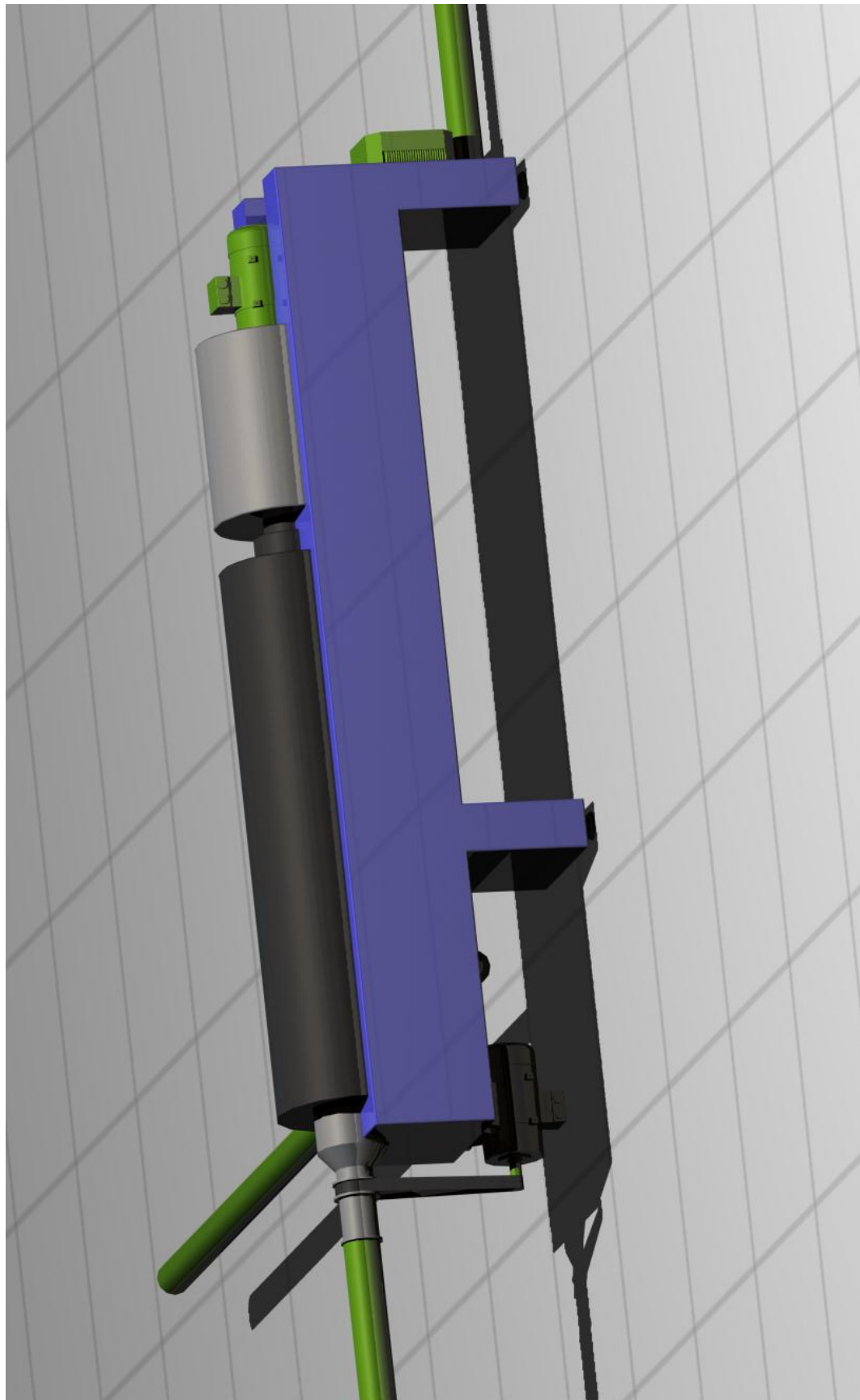
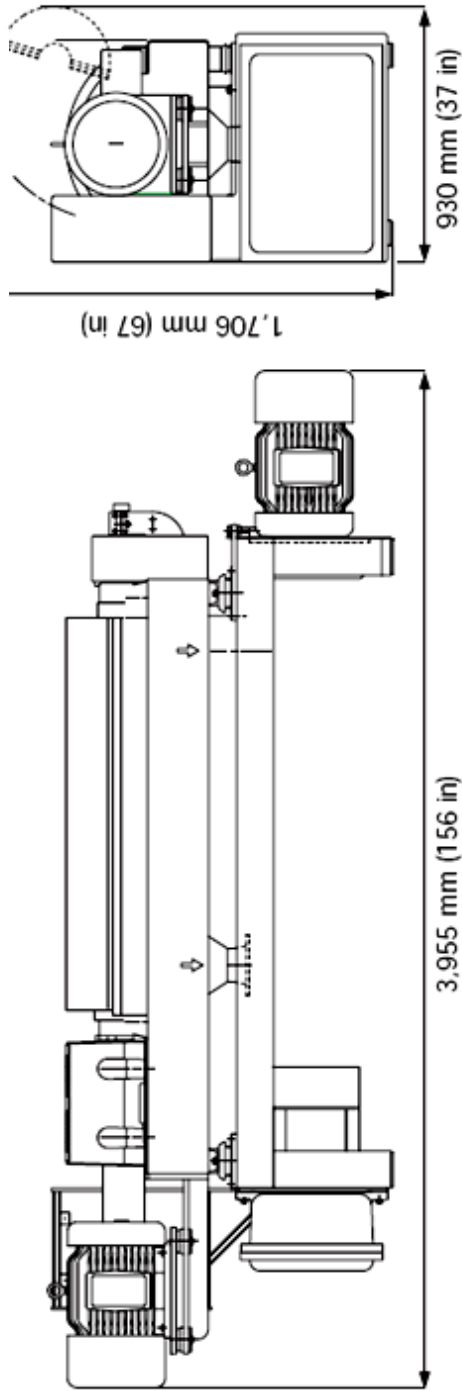


Figura No. 12. Dimensiones del decantador centrifugo



PEE00067EN 0605

Alfa Laval reserves the right to change specifications without prior notification.

- tungsten carbide tiled conveyor.

Technical data	
Maximum hydraulic flow rate*	50 m <sup>3</sup> /h (220 GPM)
Max. speeds with	3,300 rpm
(1,800 kg/m <sup>3</sup> wet solids)	2,200 G
(2,500 kg/m <sup>3</sup> wet solids)	2,800 rpm
Maximum speed	1,600 G
Centrifugal force up to	4,000 rpm
Differential speed range	3,150 G
Solids capacity	33 and 67 rpm
Main power	5 ton/h (11,000 lbs)
Back drive power	35 kW (50 Hp)
Dry weight	11/22 kW (15/30 Hp)
Operating weight	2,400 kg (5,290 lbs)
	2,575 kg (5,675 lbs)

\* The operating flow rate depends on the individual properties of the feed and the separation result required.

(Alfa Laval 2009)

Figura No. 13. Detalle de las bombas centrifugas a utilizar

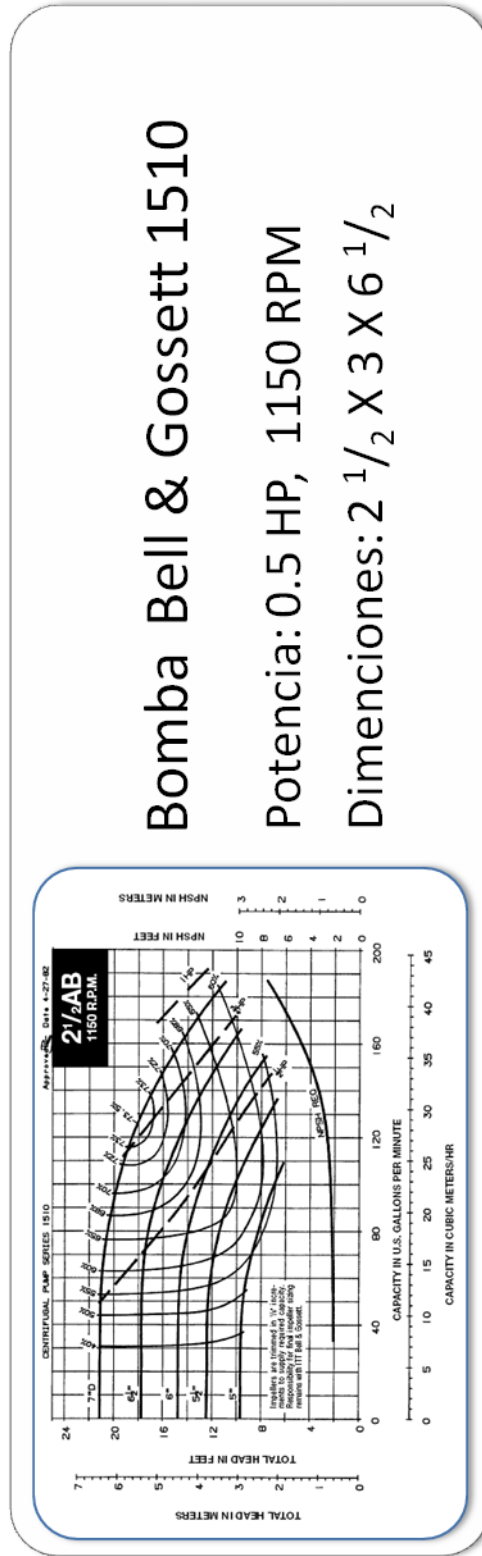
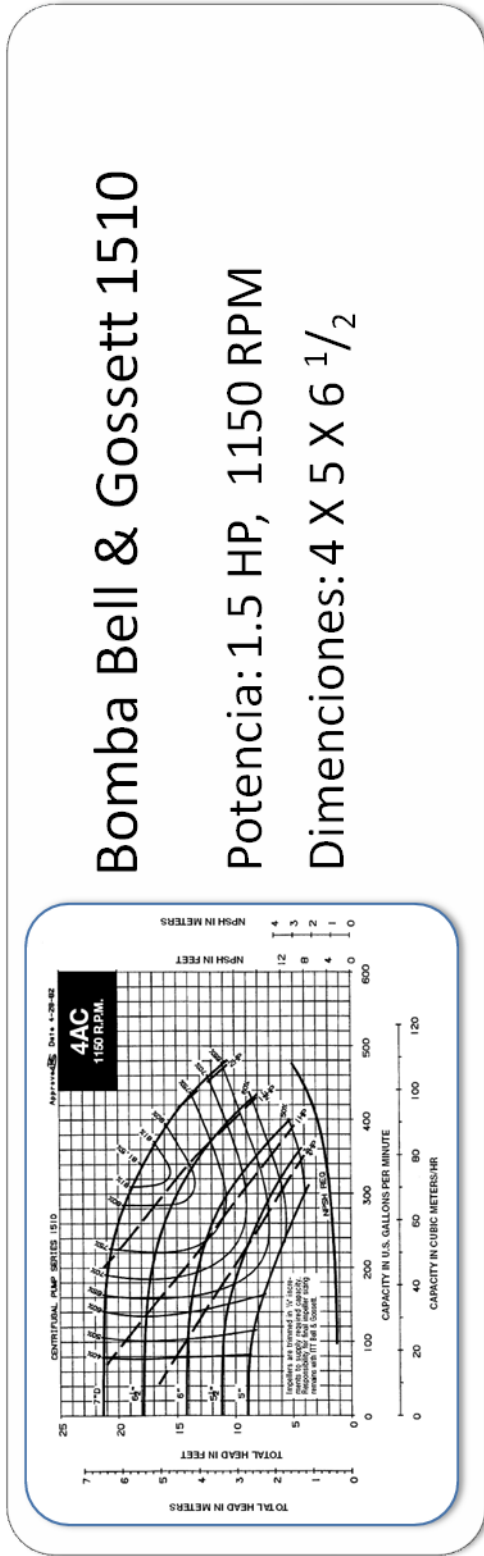


Figura No. 14. Detalle del equipo de ultrasonido a utilizar

Range	50m
AC input voltage (V)	220-240V AC, 50 Hz 110-125V AC, 60Hz
Energy consumption (W/h)	12W
Type of electric plug	Variable
Control mode	Chip on motherboard
Float	Yes
Power box material	Aluminum
Operation mode	Dual Core Multi Frequency (DC-MF)
Transducer cable length (m)	17m
Weight	6.2 Kg
Ingress protection power box	Ip67
Package sizing	36 - 25 - 36 cm



## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Esta investigación tiene como objetivo provocar una ruptura en la pared celular de las algas estudiadas, con lo que se busca diseñar un proceso adecuado para obtener mejores eficiencias y reducir el costo de extracción de aceites y biomasa a partir del cultivo de algas.

Para ello se llevaron a cabo distintos tratamientos con el fin de observar cual de todos ellos provocaba una ruptura en la pared celular, del alga, así como de los organelos u membranas que contienen lípidos dentro de la misma.

Los tratamientos se realizaron con dos soluciones distintas, una con fitoplancton, y la otra con hydrilla triturada. El fitoplancton se consiguió como alimento para crustáceos y peces de agua salada, estos especímenes contenían una gran cantidad de pigmento naranja que según el acuicultor son carotenos, esta solución se encontraba empacada con la marca “Kent Marine”, e indica que son organismos autótrofos “algas”, que comprenden tamaños de 5 a 25 micras. La otra solución se preparo de una planta vascular acuática, la cual no es un alga en todo el sentido de la palabra, ya que esta pertenece al reino plantae, mientras que la mayoría de las algas pertenecen al reino protista y algunas al monera, como lo son las cianobacterias, pero de igual modo la hydrilla se considero un buen espécimen de estudio ya que al igual que sus contrapartes protistas, las plantas superiores poseen una pared celular similar a la de ciertos tipos de algas. Muchos de los polisacáridos que se encuentran en las plantas superiores también se encuentran en las algas, por lo que se decidió realizar un estudio con esta planta vascular invasiva, la cual fue recolectada en la laguna del pino en Santa Rosa, Guatemala.

Las características físicas de las soluciones se determinaron utilizando la bascula de humedad y una bascula ordinaria, en donde la solución de fitoplancton poseía un 16.5% de sólidos, así mismo se determino una densidad experimental de 995.5 kg/m<sup>3</sup>, de la misma manera para la hydrilla se preparo una solución con el 39.8 % de biomasa seca, con una densidad e 992.3 kg/m<sup>3</sup>.

Las paredes celulares de las algas están compuestas por distintos polisacáridos, todo depende de la especie y del genero que sea el alga, pero todas tienen ciertos aspectos en común, el polisacárido mas abundante en sus paredes es la  $\beta$ -celulosa, así mismo poseen ácidos pépticos y mucopolisacaridos, como membranas mucilaginosas. La celulosa es la que confiere la solidez de la pared celular. Su estructura esta formada por varios cientos hasta varios miles de unidades de  $\beta$ -glucosa, la cual no es fácilmente aprovechable como fuente de alimento, por lo que tanto las plantas como las algas han adoptado este polisacárido como una especie de “exoesqueleto” que les da rigidez y soporte estructural.

Otro polisacárido muy común en las paredes celulares de la mayoría de las algas es la pectina, los cuales son una mezcla de polímeros ácidos y polímeros neutros muy ramificados, los cuales pueden constituir hasta un 30% del peso seco de las paredes celulares de muchos vegetales, este polisacárido es muy apreciado en la industria

alimentaría por lo que se podría sugerir un estudio para la extracción de este, en un proceso industrial de extracción de aceite de alga.

Para provocar una ruptura en la pared celular se utilizaron distintos métodos, que comprendían desde exponer la solución a un campo electromagnético, un calentamiento a presión, un tratamiento con ultrasonido, y un congelamiento y descongelamiento progresivo.

El primer tratamiento realizado se llevo a cabo en un autoclave a 125°C y 2 durante 30 minutos, se sabe que el calor y la presión debilitan la estructura celular de muchos alimentos. Esta prueba solamente se efectuó con la solución de fitoplancton, la cual no mostró una acentuada degradación de su pared celular. El equipo utilizado genera el vapor mediante resistencias, por lo que el consumo eléctrico del mismo es bastante elevado con respecto a los demás tratamientos, siendo este de 0.4 kWh por un solo tratamiento de 30 minutos.

El segundo tratamiento que se llevo a cabo fue a base de microondas, en donde se esperaba que el calentamiento generado por el campo electromagnético provocase un aumento en la presión dentro de la estructura celular del alga debilitando de esta manera su pared celular. Como se puede observar en la figura No. 7 no se puede determinar si existió algún tipo de daño en la estructura celular del fitoplancton, aún así no se puede descartar el método ya que cuando se alcanzaba la temperatura de ebullición de la mezcla, ésta se rebalsaba violentamente, dejando muy poca muestra dentro del beaker que contenía la solución lo que no permitió utilizar este procedimiento de una manera adecuada. Otro aspecto a considerar, es la gran cantidad de agua que posee la solución estudiada, para el fitoplancton se tiene un 16.5% de biomasa seca, aproximadamente un 30% de biomasa total en solución, ya que estas poseen un aproximado de 45% de humedad.

Esto refleja que se estaba calentando prácticamente agua en el microondas, como se sabe este aparato está diseñado a un rango de frecuencia que excita las moléculas de agua mediante movimientos vibratorios, lo que genera fricción y a su vez esta fricción se ve traducida en calor, una vez se llega a temperatura de ebullición es solo cuestión de tiempo esperar que una gran cantidad del agua absorba energía radiante satisfaciendo la necesidad energética para el cambio de fase a una tasa mucho más acelerada con la que se evapora, por lo que tiende a derramarse muy rápidamente. Para evitar este efecto se recomienda trabajar solamente con la biomasa húmeda (filtrada) lo que permitirá llevar la muestra a una temperatura mucho mayor, con lo que se podrá aumentar la cantidad de células dañadas por la expansión rápida provocada por la radiación del microondas, así mismo se optimizaría el proceso ya que se tendría que entregar menos energía para realizar el tratamiento, de esta manera el problema anteriormente mencionado prácticamente se podría eliminar ya que la humedad superficial sencillamente se evaporaría, a diferencia del contenido de agua interno de las células la cual se prevé que una buena parte se escape de las células mediante la membrana permeable, pero aumentan las posibilidades de provocar un cambio brusco en la presión dentro de la célula debido a que el calentamiento sería mucho más rápido (menos agua que calentar) , con lo que se lograría un debilitamiento efectivo e inclusive una ruptura de la pared celular.

Cabe mencionar que las muestras de Hydrilla tratadas con microondas, se descompusieron de una manera muy acelerada, por lo que no pudieron ser analizadas en el microscopio, aún así se puede inferir que la descomposición acelerada se debe a la exposición de almidones y otros azúcares de la muestra debido a una posible fractura en la pared celular, así mismo el calentamiento pudo cambiar de cierta manera la composición de la muestra fomentando el crecimiento de microorganismos.

Se dice que la descomposición fue rápida ya que la solución original aun se encontraba en buen estado, así como algunas de las alícuotas tratadas mediante otros métodos, aún así se decidió congelar las muestras de los otros tratamientos para evitar la descomposición de las mismas.

Se puede observar que el tratamiento con microondas para la hydrilla consumió menos energía, aproximadamente 0.00988 kWh, en comparación a la solución de fitoplancton la cual consumió alrededor de los 0.0119 kWh, esto es debido al contenido de humedad de cada muestra.

El tercer tratamiento realizado fue a base de ondas ultrasónicas, este proceso es muy conocido en microbiología el cual se utiliza para la disrupción celular, el ultrasónico como cualquier onda física se desplaza en el medio generando ciclos de alta presión y de baja presión, estos dependen de la frecuencia. Según la literatura durante el ciclo de baja presión, las ondas de ultrasonido crean pequeñas burbujas de vacío, durante el ciclo de alta presión estas burbujas colapsan violentamente lo que genera temperaturas muy elevadas aproximadamente de 5000K y presiones de 2000 atm, este fenómeno se conoce como cavitación. El resultado de la misma se traduce en fuerzas de cizallamiento lo que debilita y rompe la pared celular de las algas y otros vegetales. La frecuencia y la intensidad son dos factores clave para lograr la disrupción celular. Es muy importante que se trabaje a la frecuencia de resonancia, la cual es un fenómeno que se produce cuando un cuerpo capaz de vibrar es sometido a la acción de una fuerza periódica, cuyo periodo de vibración coincide con el periodo de vibración característico de dicho cuerpo, lo que hace que el cuerpo vibre, aumentando de forma progresiva la amplitud del movimiento tras cada una de las actuaciones sucesivas de la fuerza, este efecto es sumamente destructivo en cuerpos rígidos, como lo son las paredes celulares de las algas.

Como se puede observar en los anexos, variando la frecuencia ultrasónica se puede atacar selectivamente a una especie o familia de algas en particular, ya que cada una posee distintas frecuencias a las que se les debe someter para provocar un rompimiento efectivo en su estructura celular, éste no fue el caso en las células de fitoplancton estudiadas ya que no se pudo observar un rompimiento eficaz en el microscopio, la frecuencia utilizada fue de 42 kHz, mediante un limpiador ultrasónico marca Branson. Así mismo este tratamiento fue utilizado para la hydrilla triturada, en donde se puede apreciar la pérdida de coloración que se observa en la figura No. 7 lo que significa que efectivamente existió una disrupción celular en el alga, aún así no se puede asegurar que esta pérdida de materia por parte del tejido de hydrilla se haya debido solamente al ultrasonido ya que la misma se congeló y descongeló después del tratamiento, para evitar una descomposición de la muestra. Aún así es evidente la pérdida de coloración, en donde se puede observar en el lado izquierdo de la imagen que la clorofila cubre la totalidad del tejido, del lado

derecho puede observarse que muchas células perdieron coloración y se encuentran completamente vacías, dejando solamente el centro del tejido con clorofila visible.

Una vez realizadas las pruebas y con mucha investigación bibliográfica se propuso un sistema sencillo para la lisis celular, la extracción de aceites y biomasa de las algas, se tomo en cuenta un proceso con tratamiento ultrasónico, debido a que este es un método probado y utilizado para la lisis de microorganismos. Existen versiones comerciales específicas para el control de microalgas (cianobacterias) así como de biofilm. Otra de las ventajas por la que se escogió este tratamiento es debido al bajo consumo energético que el mismo posee, y el gran volumen de solución que puede procesar este equipo, un solo resonador puede alcanzar los 150 m efectivos de radio sonoro en el agua lo que significa aproximadamente 337500 m<sup>3</sup> de agua, aproximadamente 337 millones de litros de agua, suponiendo que la misma tiene un cultivo del 16.5% de biomasa seca y que el 33% de la misma sean lípidos totales, se podrá extraer de la misma una cantidad de lípidos totales mayor a las 18,000.00 Toneladas por batch. En el mercado no existen tanques con dicha capacidad, por lo que un sistema como este se tendría que operar en las mismas pozas de cultivo de las algas.

Se propuso trabajar con un tanque, con la idea de que el cultivo se extrae de un fotobiorreactor, el cual se encuentra prácticamente aislado y en condiciones controladas para el crecimiento de los organismos deseados, a diferencia de una poza que es probable que exista el crecimiento de organismos indeseados que competirán con las algas oleaginosas que se desean cultivar. Por lo tanto la utilización de un tanque como reactor para la lisis de la pared celular es para que no exista contaminación de otras algas las cuales sus paredes celulares puedan ser fracturadas a distintas frecuencias de las que trabaja el generador lo que se vería expresado en una menor eficiencia del reactor.

Se propuso la utilización de un tanque horizontal como reactor debido a que las algas poseen una densidad determinada para mantenerse en la superficie del lugar donde habitan, esto es debido a que la luz solamente logra atravesar una cantidad determinada de metros dentro del agua, por lo que se pensó que se podría aprovechar de una mejor manera la intensidad del resonador ultrasónico si se colocaba de una manera horizontal ya que la mayoría de algas, al entrar al reactor, aún se encontrarían vivas y se aglomerarían en la superficie del reactor. Aún así es también posible utilizar un tanque vertical con agitación u algún tipo de circulación para mantener la solución homogénea, de esta manera lograr trabajar con volúmenes mayores y obtener los mismos resultados.

Una de las principales desventajas que se encontró es el tiempo de residencia que debe de tener la solución dentro del tanque, entre las fuentes citadas y los catálogos de venta de los fabricantes de equipos ultrasónicos para el control de algas se encontró que el tiempo promedio para disminuir la población en un 95% es de aproximadamente 10 días, esto depende del resonador, de la intensidad del mismo así como de las dimensiones y volumen que posee el tanque que se desea limpiar. Por lo tanto en el diseño de equipo se propuso un resonador con capacidad de 50 m, aún cuando el tanque es solamente de 10 m, lo que podría disminuir el tiempo de residencia de la solución, así mismo se podría aumentar la cantidad de resonadores dentro del tanque buscando la manera que las ondas estén en fase, ya

que si se calibran mal las ondas entrarían en desfase destruyéndose mutuamente provocando menores efectos que si solamente existiera un resonador.

Como se menciono anteriormente la intensidad importa, por lo que se podría observar que las áreas cercanas al resonador son destruidas de una manera más eficaz que las que se encuentran lejanas ya que las ondas van perdiendo intensidad según la cantidad de choques que las mismas van experimentando, por lo que una circulación dentro del tanque podría disminuir el tiempo de residencia.

Una vez lograda la fractura en la pared se busco la separación de la biomasa, los lípidos y la fase acuosa, como no se trabajo con una especie de alga en específico sino se trato de buscar una solución general, por lo que se propuso la utilización de un decantador centrifugo el cual genera aceleraciones g muy altas con lo que se logra tanto una separación eficiente de fases así como una desintegración de los organelos y las paredes celulares que no se completaron de destruir durante el proceso de sonicación. De esta manera se asegura una extracción más eficiente del aceite.

Dependiendo el tipo de alga que se trabaje se pueden utilizar sistemas más sencillos de separación, como se puede observar en los anexos en el artículo de Bosma, se puede observar que con el mismo ultrasonido la biomasa del alga tiende a aglomerarse y sedimentarse, un efecto similar al uso de floculantes, por lo tanto se podría realizar una decantación simple en el tanque de sonicación, así mismo la distribución de los lípidos depende del tipo de alga que se esté trabajando, si el mismo se encuentra citoplasma la separación de fases se puede lograr sencillamente mediante la acción de la gravedad y del rompimiento de la pared celular, si el mismo se encuentra en organelos pueda ser que se requiera de un clarificador o en dado caso un decantador centrífugo, de igual forma se recomienda experimentar con el tipo de alga que se utilizara antes de decidir el equipo de separación.

Una vez se logra la separación de fases se tendrán tres flujos, uno oleoso, uno acuoso y lodos, los lodos están comprendidos en una buena parte de celulosa, almidón y pectinas, en donde se debe realizar ciertos estudios cual de todos estos componentes pueden ser aprovechados de una manera mas eficiente, se sabe que tanto el almidón y la celulosa pueden ser fermentados, ambos requieren de enzimas para lograr efectuar este proceso, estas a su vez son difíciles de extraer y su precio es muy elevado, por lo que el etanol a base de celulosa aun no es aprovechado como debería de ser, existen varias patentes y estudios que trabajan con microorganismos termófilos, los cuales generan sus propias enzimas y fermentan adecuadamente la celulosa, el problema es que estas se inhiben a concentraciones de etanol muy bajas aproximadamente del 2 al 4% lo que no permite una eficiencia atractiva a los inversionistas, aún así se esta trabajando con un proceso de dos etapas en donde se trabaja con bacterias termófilas y levaduras, en donde la labor enzimática se ve dada por la acción de las bacterias consumiendo una parte de las glucosas y la fermentación se ve dada por las levaduras, cabe mencionar que estos trabajos se están realizando con ingeniería genética en donde se están modificando cualidades tanto de las bacterias para consumir una cantidad menor de glucosa del almidón, y de las levaduras para soportar los subproductos que dejan las bacterias.

Otro posible uso que se puede dar a los lodos es un tratamiento tipo compost, en donde se estaría generando abono natural para otros cultivos que requieran nitrógeno, potasio entre otros, los cuales fueron suministrados al cultivo de algas anteriormente. La fase acuosa al ser rica en nutrientes se puede regresar al cultivo aunque antes debe de realizarse algún tipo de esterilización para evitar contaminar los fotobiorreactores con microorganismos indeseados.

Los aceites tienen diversos usos en la industria, pueden convertirse desde combustibles biológicos, lubricantes, pueden ser utilizados en la industria alimenticia, así como en la farmacéutica/cosmética. Todo depende del tipo de aceite y la composición de triglicéridos poli insaturados que contenga.

Como puede observarse en el cálculo de muestra el uso de esta tecnología representa una disminución del costo de operación en aproximadamente 32 veces del costo de extracción tradicional, aún así se deben de realizar más estudios para el escalamiento del proyecto a una tamaño industrial. Así mismo con este tipo de tecnología se podrá lograr disminuir el precio de los biocombustibles y hacerlos competitivos con respecto al petróleo, en donde se puede visualizar un ciclo en donde una fracción de la biomasa es convertida en combustible, otra en abonos o alcoholes que a su vez también son combustibles y nuevamente al cultivo. Con tecnologías de este tipo se puede tener un acercamiento esta filosofía energética, la cual promete ser una alternativa al consumo masivo y a nuestra dependencia del petróleo.

## X. CONCLUSIONES

1. El tratamiento que consumió menos energía y presentó mejores resultados fue el ultrasónico, en términos a disrupción celular, consumiendo por todas las muestras un total de 0.125 kWh.
2. El consumo energético por tratamiento fue de 0.278 kWh para el tratamiento con microondas, 400 kWh para el tratamiento con el autoclave, 0.125 kWh para el tratamiento ultrasónico y 70 kWh para el tratamiento en congelamiento.
3. Según las condiciones en las que se llevaron a cabo las pruebas ninguno de los tratamientos presentó efectos visibles en las muestras de fitoplancton.
4. Según las condiciones en las que se llevaron a cabo los tratamientos con hydrilla triturada solamente se vieron resultados visibles en la combinación del tratamiento ultrasónico/congelamiento.
5. El método propuesto puede significar un costo hasta 32 veces menor que la extracción tradicional por aceites
6. El costo de producción eliminando el costo de materia prima se tiene que con el método propuesto se puede alcanzar un costo de 47.50 Q/ton aceite.
7. Los costos de producción aproximados con el método tradicional hacen a los 1329.12 Q/ton aceite y el precio de referencia que se cotizaba el aceite de soya en el mercado en octubre del 2009 es de 6700 Q/ton aceite.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar algas vivas en los tratamientos, para disminuir las fuentes de error en los diversos procesos llevados a cabo, debido a que las algas empacadas muchas veces se someten a procesos de secado en donde la estructura celular cambia desviando los resultados.

Se recomienda realizar el estudio en un espécimen específico. Este trabajo al ser un estudio exploratorio, decidió trabajarse en un método general, centrándose en explotar las características generales de los mayores grupos de algas y algunas plantas vasculares, como lo es la pared celular (nótese que es muy diferente entre especies, aún mas entre reinos distintos), aún así poseen varias características comunes. Por lo que se considera necesario trabajar a fondo con una especie que sea comercialmente viable para la producción tanto de etanol como de hidrocarburos, estudiar bien su anatomía y explotar de ahí tanto la extracción de aceites, como de biomasa.

2. Se recomienda que el tratamiento con microondas debe realizarse con la biomasa del alga filtrada, con esto se refiere a que se tratara de separar al alga de su solución, permitiendo que la humedad se encuentra en mayor medida dentro del alga. Y se requiera de una cantidad menor de energía para llevar a cabo la disrupción celular.

La idea principal de utilizar microondas para la disrupción es en teoría que aumente la presión dentro del alga, debido a la rápida evaporación del agua dentro de ella, se trata que el alga tenga una fractura, por lo que el calentamiento debe ser abrupto, por lo tanto el uso de muestras pequeñas y separadas del agua, en lo que se podría llamar una muestra de textura pastosa son lo más recomendable. Así mismo es recomendable utilizar transistor con mayor potencia del microondas.

3. En el tratamiento ultrasónico se recomienda que el transductor sea capaz de reproducir distintas frecuencias, de preferencia a la vez para poder cubrir un amplio rango de resonancia.

Al utilizar ultrasonido se pretende realizar la disrupción mediante cavitación acústica, por lo que la utilización de algún método de saturación de dióxido de carbono, podría aumentar los efectos de la cavitación y acelerar el proceso de disrupción.

Se pensó que un tratamiento térmico podría cambiar la estructura de la pared celular, debido a que muchas proteínas y otros compuestos orgánicos cambian con ello, a pesar de que no se encontraron efectos visibles en los tratamientos empleados, se recomienda intensificar tanto la temperatura como la presión utilizada.

Un tratamiento mediante congelación-descongelación, se consideró factible debido a los cristales que se forman en el proceso de congelamiento, estos pueden maltratar muchas estructuras orgánicas, de ahí que muchas alimentos

pierdan sus texturas y composiciones al ser congelados, en este tratamiento se requiere que el producto se congele muy lentamente permitiendo la formación de cristales grandes los cuales puedan dañar en alguna medida la pared celular del alga estudiada.

Finalmente se recomienda utilizar combinaciones de tratamientos los cuales en combinación puedan resultar mucho más eficaces que realizar un solo tratamiento independiente. Posteriormente verificar que tratamiento consume menos energía y podría llegar a ser más rentable a la hora de llevarlo a gran escala.

4. Se recomienda realizar un análisis previo del sujeto de estudio, su composición y sus propiedades, para poder diseñar un tratamiento que se ajuste al sujeto de estudio.

5. Se recomienda realizar los análisis posteriores a los tratamientos seguidamente después de haber realizado el tratamiento ya que la materia orgánica comienza a degradarse con mayor facilidad una vez la pared celular se ha sometido a la lisis correspondiente.

6. Se recomienda diseñar un análisis cuantitativo en donde se pueda medir tanto la eficiencia como la eficacia del método estudiado. Logrando validar el método con el análisis estadístico correspondiente.

7. Un cultivo de algas es de gran utilidad a la hora de realizar un estudio como este, su cultivo se logra con mucha facilidad, si se conocen las necesidades de las mismas. En el apéndice se presentaran algunos tipos de reactores tanto comerciales como caseros para el cultivo de microalgas, todos han sido pensados para la utilización en acuarios, debido a que en muchos casos las microalgas se utilizan como base de la cadena alimenticia para alimentos de los alevines.

El cultivo se logra mediante la adición de fertilizantes, y un poco de aireación/inyección de CO<sub>2</sub>, en agua, muchas algas verdes como la chlorella, entre otras se encuentran inactivas en el aire en un estado parecido al de las esporas, y con el tiempo aparecerán en este cultivo. Una vez se tiene el cultivo inicial es recomendable seleccionar las cepas más adecuadas para el estudio, esto se logra con micro pipetas y microscopios (no se logra un aislamiento completo) pero se obtienen buenos resultados, una vez se tiene la cepa se comienza un cultivo aislado como se muestra en los anexos.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

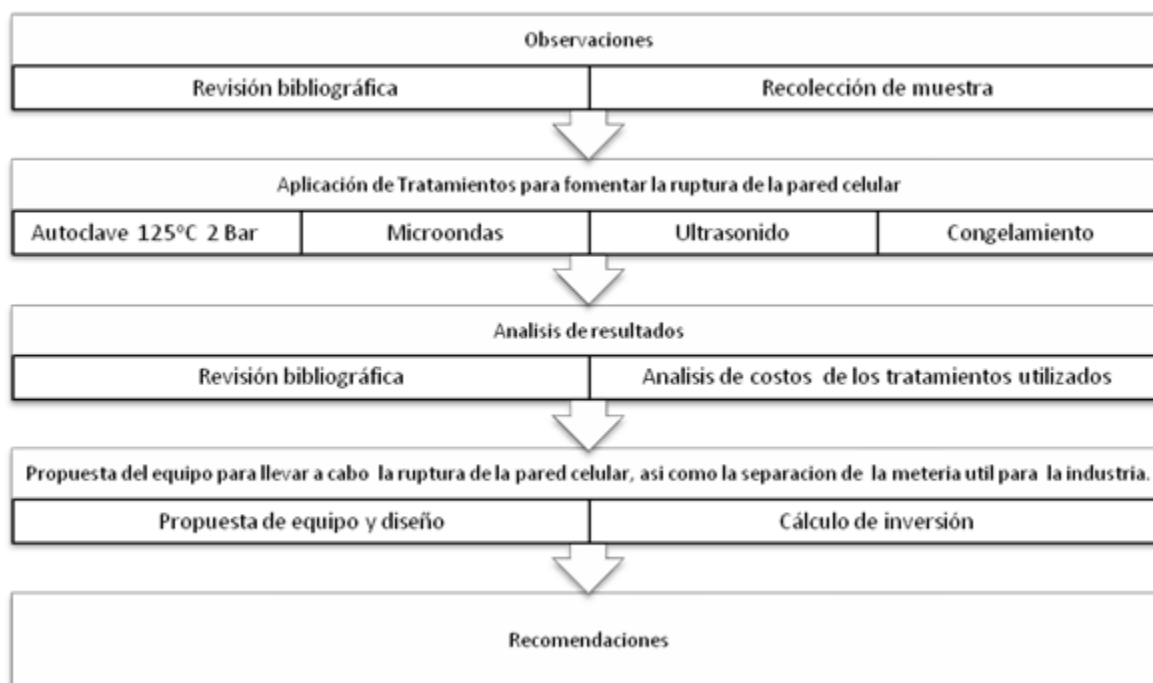
- Alvarez Cobelas 1989. *Una revisión sobre la biotecnología de las algas* Universidad Complutense. Madrid Pp 60
- Barsanti, L. y P. Gualtieri. 2006. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor and Francis Tour. Estados Unidos. Pp. 301.
- Biodroga 2009 *a-ENERGIZING FORMULA* <http://biodroga.org/pdf/energizing.pdf>
- Chisti, Yusuf. 2007. *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnology Advances* 25. Págs 294-306
- Dr. Jorge S. Raisma 2000. *Paredes Bacterianas* [http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm#gram\\_negativas](http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm#gram_negativas)
- Faust, M.A. and Gullledge, R.A. 2002. *Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Contributions from the United States National Herbarium* 42: 1 - 144.
- G.W. Prescott, 1968. *The algae: A review*. Houghton Mifflin Company Boston. Pp 435
- H. Des Abbayes 1989. *Botanica vegetales inferiores* Editorial Reverté. s.a. Libro electrónico link: [http://books.google.com.gt/books?id=zjqqXtzghvoC&printsec=frontcover&source=gbs\\_summary\\_s&cad=0#PPP1,M1](http://books.google.com.gt/books?id=zjqqXtzghvoC&printsec=frontcover&source=gbs_summary_s&cad=0#PPP1,M1)
- Harold C. Bold/ Michael J.Wynne 1978 *Introduction to the Algae*. Preantice Hall. New Jersey Pp 706.
- Lee, J.Y, *et al.* *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. *Bioresour. Technol.* (2009), Elsevier Academic Press.:10.1016/j.biortech.2009.03.058
- Lenntech 2007. *Desinfección del agua* <http://www.lenntech.com/espanol/Desinfeccion-del-agua/desinfectantes-dioxido-de-cloro.htm#ixzz0ILd0yiaz&C>
- LG 2009, *Control Ultrasonico para algas* <http://www.lgsonic.com/es/about/how-does-this-work>

- Luis Keiffer 2006 *Química ambiental* <http://www.qcaambiental.santafe-conicet.gov.ar/transerencia/Ultrasonido/cuerpoultrasonido.htm>
- Marchegani 2007. *Cátedra de máquinas hidráulicas*  
<http://fain.uncoma.edu.ar/centraleshidraulicas/archivos/PCH-%20CAVITACION.PDF>
  
- OriginOil, 2009, *Aplicaciones de las algas* <http://www.originoil.com/applications/overview.html>
  
- Vicente Antonio, Pastrana Rubio, Vicente Mary, *Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos*  
Madrid : AMV/Mundi-Prensa, 1994 Pp 277

## XIII. APÉNDICE

## A. Procedimiento

Figura No. 15 Diagrama de procedimiento



### 1. Equipo utilizado



Tabla No. 10 Datos de placa del equipo utilizado.

Equipo	Especificaciones
	MICROONDAS LG MS0474C Potencia consumida: 1000W Potencia transductor: 700W Niveles de potencia : 10 Capacidad 0.7 ft <sup>3</sup>

Equipo	Especificaciones
	<p>AUTOCLAVE NAPCO: 8000-DSE  Rango de temperaturas: 121-132°C  Rango de presión: 15-27 PSI  Dimensiones: 18x21x14.5 inch</p>
	<p>LIMPIADOR ULTRASÓNICO  BRANSON 2510  Potencia: 250W  Potencia de salida: 100W  Frecuencia: 42 kHz</p>
	<p>CONGELADOR Refrigeradoras de Guatemala</p> <p>Potencia compresor: 0.33 HP  Compresor: T21406k  Refrigerante: R404a  PH: 1</p>

## 2. Datos de los especímenes estudiados.

Tabla No. 11 Especificaciones de las soluciones utilizadas

Especímen	Solución
	<p>Fitoplancton: Acuicultura Kent Marine</p> <p><b>Análisis</b></p> <p><b>Proteína</b> min. 0.40%</p> <p><b>Lípidos</b> min. 0.20%</p> <p><b>Fibra</b> max. 0.50%</p> <p><b>Humedad</b> max. 99.0%</p> <p><b>cenizas</b> max. 1.0%</p>
	<p><b>Hydrilla</b></p> <p>La segunda solución Se trabajo con hydrilla triturada, los especímenes se consiguieron en la laguna del pino, el porcentaje de humedad de la misma fueron del 18%, así mismo la solución trabajada era del 35% en sólidos.</p>

## B. Datos originales

Tabla No. 12 datos de los pesos de las algas rojas

Muestra	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a
Tara $\pm 0.05g$	55.2	55.4	55.2	55.3	55.4	55.1	55.3	55.4
Peso total $\pm 0.05g$	117.7	116.1	116.7	117.4	118.6	117.2	115.5	116.6
Peso real $\pm 0.05g$	62.5	60.7	61.5	62.1	63.2	62.1	60.2	61.2

Tabla No. 13 datos de los pesos de la Hydrilla triturada

Muestra	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b
Tara $\pm 0.05g$	55.3	55.4	55.2	55.4	55.4	55.2	55.3	55.4
Peso total $\pm 0.05g$	122.8	123.6	117.3	118.5	116.9	117.2	115.4	116.6
Peso real $\pm 0.05g$	67.5	68.2	62.1	63.1	61.5	62.0	60.1	61.2

Tabla No. 14 concentración de biomasa en las soluciones

Solución	% biomasa
Algas rojas (a)	30.00%
Hydrilla (b)	41.21%

Tabla No. 15 concentración de biomasa en las soluciones

Consumo energético	1000	W
Salida microondas	700	W
Frecuencia	2450	MHz
voltaje	120	V
Amperaje	8.5	A

Tabla No. 16 concentración de biomasa en las soluciones

	1a	2a	1b	2b
Temperatura al finalizar la 1a corrida $\pm 0.05C$	40.1	43.1	39.1	40.1
Temperatura al finalizar la 2a corrida $\pm 0.05C$	79.21	85.31	80.12	80.75
Temperatura al finalizar la 3a corrida $\pm 0.05C$	95.21	92.15	95.32	95.31

Tabla No. 17 Condiciones de operación del autoclave

	T °C	P bar
condiciones	125	2

Tabla No. 18 Datos del tratamiento con el autoclave

Tiempo de tratamiento	30	minutos
Tamaño de muestra	0.067	kg
Potencia nominal	1000	W

Tabla No. 19 Datos del congelador

Potencia	0.33333333	HP
Voltaje	115	V
PH	1	
gasto energético mensual	358	Kwh
Refrigerante	R404a	
Compresor	T21406k	

Tabla No. 20 Datos del limpiador ultrasónico

Aparato	Branson 2510	
Modelo	2510R-MTH	
Input	117	V
Potencia	250	W
Output	100	W
Frecuencia	42	kHz $\pm$ 6%

## C. Cálculo de muestra

### 1. Costos de operación microondas

Para llegar a T ebullición se siguieron tres tratamientos, cada uno de 30 segundos a distintos porcentaje de potencia del microondas. En donde el primer tratamiento se trabajo al 30% de la potencia del microondas por 30 segundos. (Cálculos para la muestra No. 1)

- a. Cálculo de la energía consumida por el microondas.

$$P_u = P_n \cdot \%P \quad (\text{Ecuación No. 1})$$

Donde:

$P_u = \text{Potencia utilizada}$

$P_n = \text{Potencia nominal del microondas}$

$\%P = \text{Porcentaje de potencia utilizado}$

$$P_u = 1000 \text{ W} \cdot 0.3 = 300 \text{ W}$$

- b. La energía consumida viene dada por la siguiente ecuación:

$$E = P \cdot t \quad (\text{Ecuación No. 2})$$

Donde:

$E = \text{Energía consumida}$

$P = \text{Potencia utilizada}$

$t = \text{tiempo de trabajo}$

$$E = 300 \text{ W} \cdot 30 \text{ s} = 9000 \text{ J} = 0.0025 \text{ kWh}$$

- c. Cálculo de la energía absorbida por la mezcla

$$\Delta H = m \int C_p dT \quad (\text{Ecuación No. 3})$$

Donde:

$\Delta H = \text{cambio de entalpia en el agua}$

$C_p = \text{Capacidad calorífica, dependiente de la temperatura}$

$T = \text{Temperatura}$

Para el agua pura el Cp viene dado por la siguiente función:

$$\frac{C_p(T)}{R} = A + BT + CT^2 \quad (\text{Ecuación No. 4})$$

En donde:  $A = 8.712$ ,  $B = 0.00125$ ,  $C = -0.00000018$  (Smith-Van Ness)

Para la Muestra 1 se tiene las siguientes propiedades:

Masa:  $62.5 \pm 0.05$  g

Porcentaje de sólidos: 30% (Kent Marine)

Por lo tanto se tiene  $43.75 \pm 0.05$  g de agua y  $18.75 \pm 0.05$  g de sólidos

A partir de la ecuación 3 y 4 se tiene:

La temperatura al final del tratamiento fue de  $40.1^\circ\text{C}$  medido con termómetro infrarrojo.

$$\Delta H = 0.04375 \text{ kg} \cdot 8.314 \frac{\text{J}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \cdot \frac{1 \text{ kmol}}{18.01528 \text{ kg}} \int_{T=295.15\text{K}}^{T=313.25\text{K}} 8.712 + 0.00125T - 0.00000018T^2 dT = 3.317 \text{ kJ}$$

De igual manera para los sólidos, se tiene un Cp promedio de  $1256.1 \text{ J/kgC}$

$$\Delta H = 0.01875 \text{ kg} \int_{T=22\text{C}}^{T=40.1\text{C}} 1.256 \frac{\text{kJ}}{\text{kgC}} dT = 0.43 \text{ kJ}$$

Y para el vidrio se tiene un Cp para el pyrex de  $837.4 \text{ J/kgC}$  (Perry 6ª Edición)

$$\Delta H = 0.0552 \text{ kg} \int_{T=22\text{C}}^{T=40.1\text{C}} 0.8374 \frac{\text{kJ}}{\text{kgC}} dT = 0.84 \text{ kJ}$$

Por lo tanto se consumió en total  $4.58 \text{ kJ}$  para llegar a  $40.1^\circ\text{C}$

d. Cálculo de la energía teórica suministrada por el microondas. A pesar que el microondas consume  $1000 \text{ W}$  de potencia, el magnetrón del mismo solamente es capaz de suministrar  $700 \text{ W}$  en ondas electromagnéticas. De las cuales solamente un cierto porcentaje de las mismas se convertirá en energía calorífica.

A partir de la ecuación No1 y No 2, se tiene:

$$E = 700 \text{ W} \cdot 0.3 \cdot 30 \text{ s} = 6.3 \text{ kJ}$$

Esto refleja que solamente el 73% de la energía radiante suministrada es convertida en calor, de hecho si toda la energía radiante se hubiera convertido en calor se habría logrado una temperatura de 52°C para el primer tratamiento.

e. Cálculo de la temperatura de ebullición en Guatemala. La presión atmosférica según el INSIVUMEH es de 640.9 mmHg (0.8544 bar) para el año 2009, para que el agua ebulle como tal debe igualar su presión de vapor a la presión atmosférica, en donde la presión de vapor del agua viene dada por la siguiente ecuación obtenida del Perry 7ª edición:

$$P_v = e^{C_1 + \frac{C_2}{T} + C_3 \cdot \ln T + C_4 \cdot T^{C_5}} \quad (\text{Ecuación No. 5})$$

Para el agua:

$$C_1 = 73.649, C_2 = -7258.2, C_3 = -7.3037, C_4 = 4.17 \times 10^{-6}, C_5 = 2$$

Despejando T de la ecuación anterior se tiene:

$$0.8544 \text{ bar} = e^{73.649 + \frac{-7258.2}{T} - 7.3037 \cdot \ln T + 4.17 \times 10^{-6} T^2}, \quad T = 95.305 \text{ C}$$

f. Cálculo de la energía requerida para el cambio de fase. Se utilizaron tablas de vapor a:

$$T = 95.305 \text{ C}, \quad P = 0.8544 \text{ bar}$$

$$H_{liq} = 399.04 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}, \quad H_{vap} = 2667.5 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}, \quad \lambda = 2268.46 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}$$

g. Cálculo del costo de operación

$$E_{consumida} = \sum E_{tratamientos} \quad (\text{Ecuación No. 6})$$

$$E_{consumida} = 0.0025 \text{ kWh} + 0.00417 \text{ kWh} + 0.0038 \text{ kWh} = 0.0104 \text{ kWh}$$

Siendo el costo por kWh de 1.3784Q/kWh se tiene que para la muestra 1 se gastaron aproximadamente 2 ctvs. Así mismo el costo del microondas es de \$60.00, lo que equivale a Q504.00.

## 2. Cálculo del costo de operación del autoclave.

En esta prueba se ingresaron las 4 muestras de una sola vez, se trabajo durante 30 minutos a 2 bar y 125C.

a. Cálculo del volumen que ocupara el vapor. Las dimensiones del autoclave según el fabricante son las siguientes 18 x 21 x 14.5 in, el volumen ocupado por las muestras es de aproximadamente 60 mL por muestra, así como 20 cm<sup>3</sup> entre los beakers. Este valor fue obtenido mediante el peso y la densidad del pyrex.

$$V_v = V_1 - V_0 \quad (\text{Ecuación No. 7})$$

Donde:

$V_v = \text{Volumen ocupado por el vapor}$

$V_1 = \text{Volumen libre del autoclave}$

$V_0 = \text{Volumen ocupado por los beakers y su contenido}$

$$V_v = 0.0898 \text{ m}^3 - 0.00022 \text{ m}^3 = 0.0898 \text{ m}^3$$

El vapor a 125 C y 2 bar tiene una densidad de 1.1143 kg/m<sup>3</sup> lo que indica que se requieren 0.1 kg de vapor

b. Cálculo de la energía necesaria para calentar las muestras y mantener las condiciones de 125 C y 2 bar

Utilizando tablas de vapor, así como la ecuación 3 se tiene:

$$\Delta H_m = 80.97 \text{ kJ}, \quad \lambda = 288.88 \text{ kJ}$$

Por lo tanto la energía total requerida es de:

$$\Delta H_{tot} = 369.84 \text{ kJ}$$

c. Cálculo del costo de operación

Suponiendo que se cuenta con una caldera con una eficiencia del 80% se tiene lo siguiente:

$$\frac{369.84 \text{ kJ}}{0.8} = 462.30 \text{ kJ}$$

El calor de combustión del diesel es de 45500 kJ/kg, su densidad es de 0.88 kg/L. Suponiendo también que la caldera tiene una eficiencia de combustión del 85%, y el costo del diesel es de 23Q/gal se tiene:

$$\text{costo} = \frac{462.30 \text{ kJ}}{0.85} \cdot \frac{1 \text{ L}}{0.88 \text{ kg}} \cdot \frac{1 \text{ Gal}}{3.785 \text{ L}} \cdot \frac{23 \text{ Q}}{\text{Gal}} = 0.06 \text{ Q}$$

Obviamente una caldera no se prendera para la utilización de 0.1 kg de vapor, Así que el vapor es producido por el autoclave mediante una resistencia que consume 800 W, durante aproximadamente 10 minutos, (esta se prende y se apaga, según las condiciones del medio), utilizando la ecuación No 2 se tiene:

$$\text{costo} = 1.3784 \frac{\text{Q}}{\text{kWh}} \cdot 0.1284 \text{ kWh} = 0.18 \text{ Q}$$

Por la media hora del proceso de calentamiento a presión, así mismo el costo del equipo haciende a \$1,620.00, aproximadamente Q 13,608.00 EXW (sin gastos de importación).

### 3. Costos de operación limpiador Ultrasónico

Se utilizo un tratamiento por media hora, utilizando la ecuación 2 se obtiene que la energía total de trabajo de este aparato fue de

$$\text{costo} = 1.3784 \frac{\text{Q}}{\text{kWh}} \cdot 0.1 \text{ kW} \cdot 30 \text{ s} \cdot \frac{1 \text{ h}}{3600 \text{ s}} = 0.17 \text{ Q}$$

El costo del equipo asciende los \$375.00

### 4. Costos de operación congelamiento

a. Cálculo de la potencia del congelador. Para determinar la potencia consumida por el congelador se utilizo un ciclo de compresión de vapor utilizando las propiedades del refrigerante 134. La temperatura dentro del congelador era de aproximadamente -5°C, así mismo la temperatura ambiente era de 22° C, así mismo se sabe que se debe de tener una diferencia de temperatura mínima de 5°C para la transferencia de calor con lo que se tiene:

Las propiedades del refrigerante a -10°C son (punto 2):

$$\begin{array}{lll} \text{Hv} = & 241.34 & \text{kJ/kg} \\ \text{Sv} = & 0.9253 & \text{kJ/kgK} \end{array}$$

Las propiedades del refrigerante 134 a 0°C y 706.25 MPa corresponden al líquido condensado (punto 4):

$$\begin{aligned} H_l &= 87.18 \text{ kJ/kg} \\ S &= 0.3255 \text{ kJ/kgK} \end{aligned}$$

Durante el proceso de compresión las entropías permanecen constantes, así mismo la presión durante el proceso de condensación permanece constante (punto 3).

$$\begin{aligned} S &= 0.9253 \text{ kJ/kgK} \\ H_v &= 267.5655383 \text{ kJ/kg} \end{aligned}$$

En el punto 1, se tiene una mezcla difásica por lo que se aplica la siguiente ecuación:

$$S_1 = (1 - x)S^l + xS^v \quad (\text{Ecuación No. 8})$$

Donde x es la calidad (fracción de la masa de la mezcla que corresponde al vapor). De donde  $S_1 = S_4 = 0.326$  kJ/kgK, se obtiene:

$$0.326 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} = (1 - x)0.14855 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} + x \cdot 0.3255 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}}, \quad x = 0.2457$$

Para una eficiencia del compresor igual a 0.8 se tiene:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_s}{n} = \frac{26.22}{0.8} = 32.78 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}$$

El flujo másico viene dado por:

$$\dot{m} = \frac{\text{potenciaevap}}{H_2 - H_1} \quad (\text{Ecuación No. 9})$$

Con una potencia de evaporación de 4.5 kW se tiene:

$$\dot{m} = \frac{4.57 \text{ kW}}{241.34 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} - 87.18 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}}} = 0.029 \frac{\text{kg}}{\text{s}}$$

Por lo tanto la potencia del refrigerador es de

$$\text{Potencia} = \dot{m} \Delta H = 32.77 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} * 0.029 \frac{\text{kg}}{\text{s}} = 0.972 \text{ kW}$$

b. Cálculo de la energía consumida por el congelador.

De la misma manera que se calculo los requerimientos energéticos de calor del microondas se calcula las pérdidas de calor de las 4 soluciones utilizadas para llevar a cabo estos tratamientos. Utilizando la ecuación no 3 se tiene:

$$\Delta H = 0.1632 \text{ kg} \cdot 8.314 \frac{\text{J}}{\text{K} \cdot \text{mol}} \cdot \frac{1 \text{ kmol}}{18.01528 \text{ kg}} \int_{T=295.15\text{K}}^{T=273.15\text{K}} 8.712 + 0.00125T - 0.00000018T^2 dT = -14.73 \text{ kJ}$$

De la misma manera se calculan las perdidas energéticas, tanto de los beakers como de la materia orgánica las que suman -6.52 kJ

Cabe mencionar que solamente el agua cambia de fase a dicha temperatura, por lo que el la energía requerida para el congelamiento está determinada solamente por la cantidad de agua presente en la mezcla.

$$\Delta H_f = m \cdot \lambda \quad (\text{Ecuación No. 10})$$

Donde:

$\Delta H_f = \text{Energía requerida para el congelamiento del liquido}$

$m = \text{masa del liquido}$

$\lambda = \text{calor de fusión del liquido}$

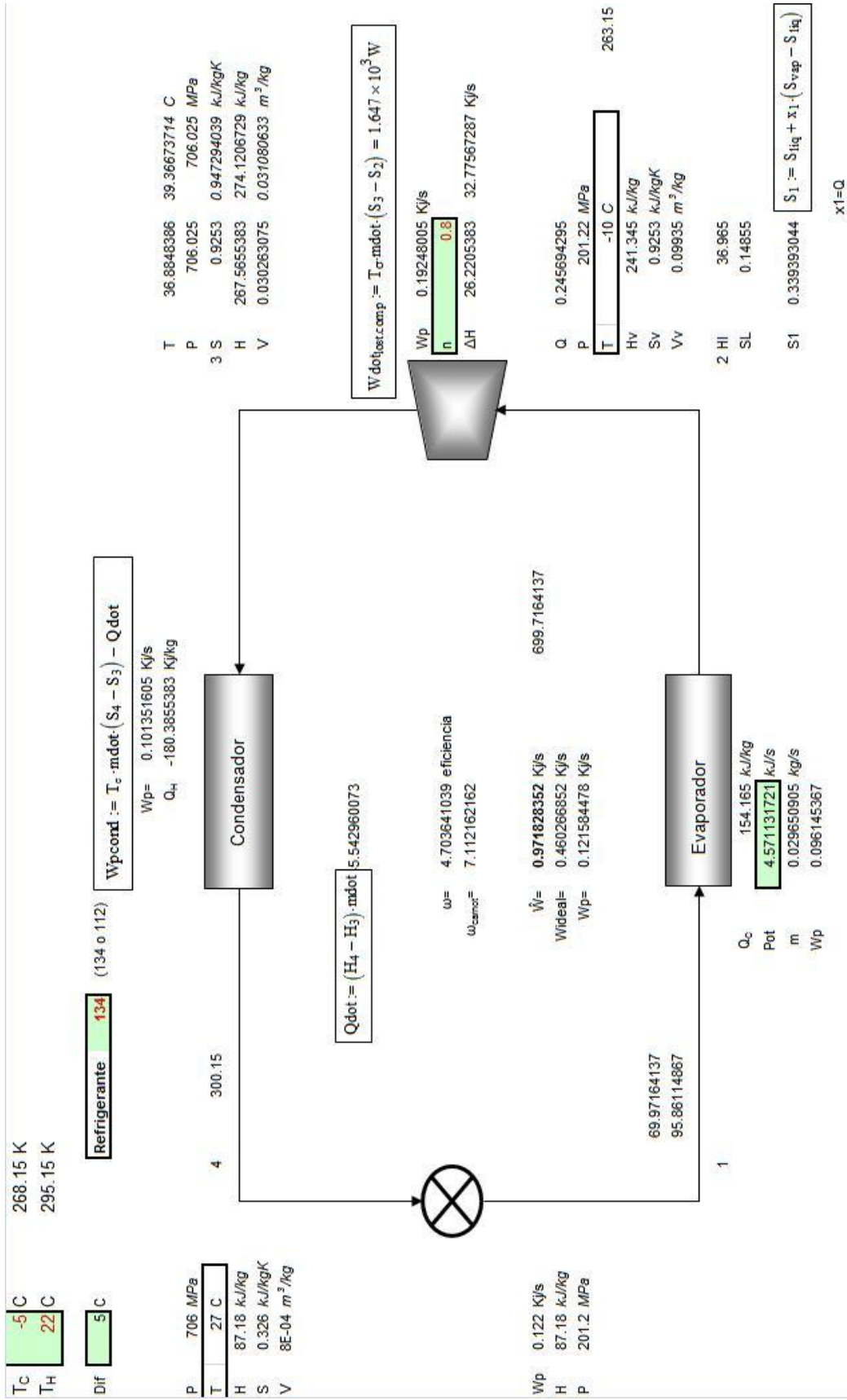
$$\Delta H_f = 0.1603 \cdot -333.75 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} = -53.503 \text{ kJ}$$

Por lo tanto la energía que se debe remover es de -74.76 kJ, así mismo se realizaron 5 descongelamientos, con su respectivo congelamiento posterior, suponiendo un 70% de eficiencia en la convección del refrigerador se requiere solamente de 0.173 kWh en todo el tratamiento.

La ficha técnica indica que el refrigerador consume 970 W, así mismo este se encuentra conectado, todo el día, suponiendo 3 días completos de tratamiento se tiene: que el equipo consumo 70 kWh durante todo el periodo que el mismo se mantuvo encendido, con las muestras, el costo de operación fue de Q95.70

El costo de este equipo asciende los \$1,260.00

Figura No. 15. Detalle del ciclo de compresión utilizado



## 5. Dimensionamiento del sistema propuesto.

a. Diseño del tanque de tratamiento. El equipo de ultrasonido tiene un alcance efectivo de 10m, por lo que se propone realizar un tanque horizontal, de 10 m de largo, con 3.05 m de diámetro. El cual tendrá una capacidad máxima de 18,853 gal, una capacidad real de 18,500 gal, lo que equivale a 71.7 m<sup>3</sup> de solución.

b. Flujo volumétrico requerido. Se desea llenar el tanque a máxima capacidad en aproximadamente 1 h, lo que requiere un flujo volumétrico de:

$$\dot{Q} = \frac{V}{t} = \frac{71.7 \text{ m}^3}{3600 \text{ s}} = 0.0199 \frac{\text{m}^3}{\text{s}} = 308.33 \text{ gmp} \quad (\text{Ecuación No. 11})$$

c. Selección del tamaño de tubería.

$$\bar{V}_{opt} = \frac{12 \dot{m}^{0.1}}{\rho^{0.36}} \quad (\text{Ecuación No. 12})$$

Donde:

$$\bar{V}_{opt} = \text{Velocidad optima } \frac{ft}{s}$$

$$\dot{m} = \text{flujomásico } lb/s$$

$$\rho = \text{densidad del fluido } \frac{lb}{ft^3}$$

El flujo másico se determina mediante el flujo volumétrico y la densidad del líquido a trabajar, experimentalmente se obtuvo que la densidad del mismo a una concentración del 30% de sólidos fue de 950 kg/m<sup>3</sup>

$$\dot{m} = Q \cdot \rho \quad (\text{Ecuación No. 13})$$

$$\dot{m} = 0.0199 \frac{\text{m}^3}{\text{s}} * 950 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} = 18.93 \frac{\text{kg}}{\text{s}} = 47.406 \frac{\text{lb}}{\text{s}}$$

Convirtiendo todos estos valores al sistema ingles se obtiene:

$$\bar{V}_{opt} = \frac{12 \cdot 47.406 \frac{lb}{s}^{0.1}}{59.35 \frac{lb}{ft^{0.36}}} = 4.058 \frac{ft}{s} = 1.24 \frac{m}{s}$$

## 1. Diámetro de tubería

$$D = 2 \cdot \sqrt{\frac{\dot{Q}}{V} / \pi} \quad (\text{Ecuación No. 14})$$

Donde:

$\dot{Q}$  = caudal (flujovolumetrico)

$V$  = velocidadlineal

$$D = 2 \cdot \sqrt{\frac{0.0199 \frac{m^3}{s}}{1.23 \frac{m}{s} \pi}} = 0.143 m = 5.63 inch \Rightarrow 6 inch \text{ cedula } 80$$

Se escoge cédula No 80, para que la abrasión no sea mayor problema, ya que se planea utilizar tubería PVC, para reducir costos.

## d. Carga de Bomba:

## 1. Determinación del No Reynolds

$$Re = \frac{Dv\rho}{\mu} \quad (\text{Ecuación No. 15})$$

Donde:

$D$  = Diámetro de tubería

$v$  = velocidad lineal del flujo

$\rho$  = densidad del fluido

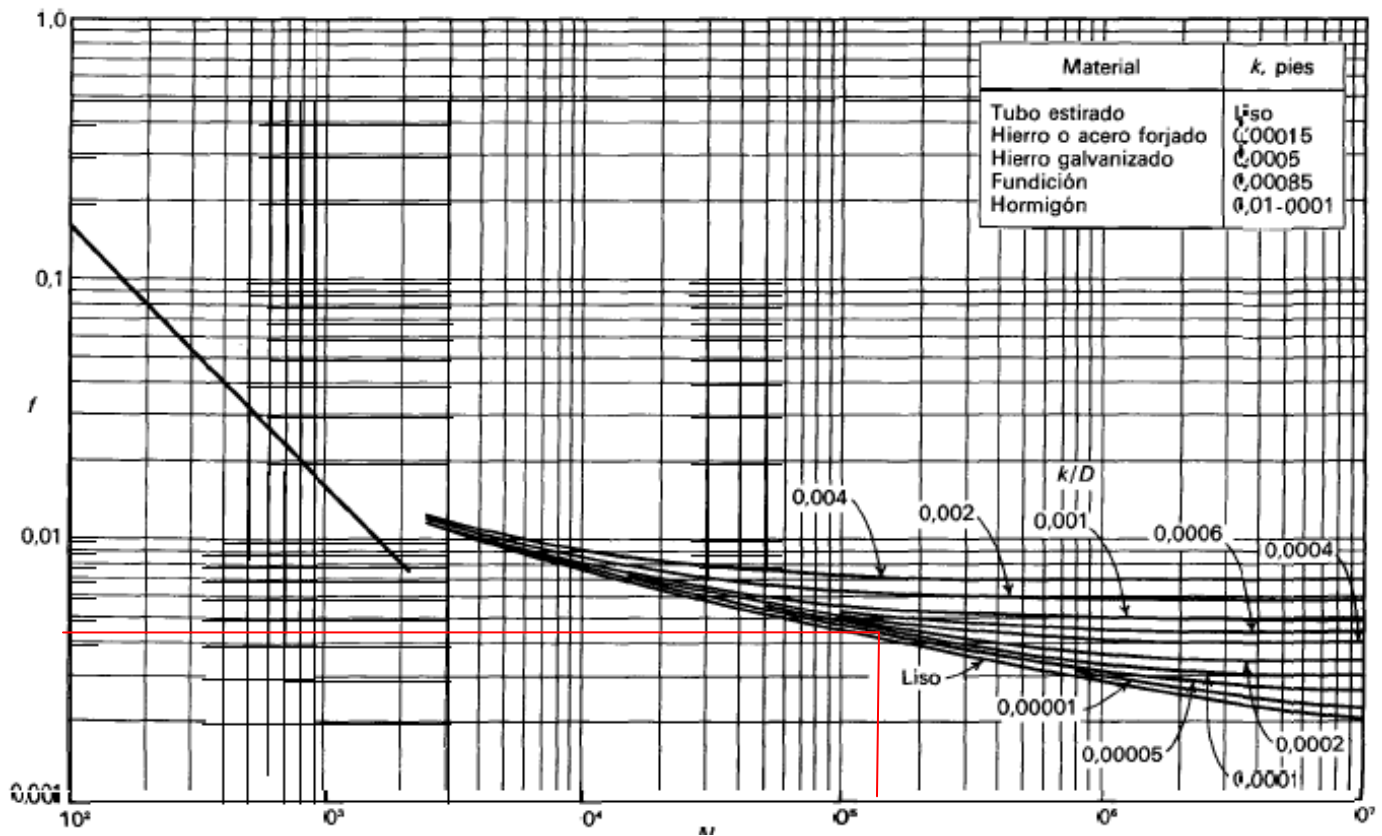
$\mu$  = viscosidad del fluido

$$Re = \frac{0.143m \cdot 1.24 \frac{m}{s} \cdot 950.5 \frac{kg}{m^3}}{0.00112 Pa \cdot s} = 1.57 \times 10^5$$

Este valor de número de Reynolds, nos indica que el flujo con el que se trabaja se encuentra en la región de flujo turbulento.

2. Determinación de la carga proveniente de la fricción. El PVC posee un coeficiente de rugosidad  $\epsilon = 0.0015$  mm. Como se puede ver en la grafica siguiente para lograr determinar el coeficiente es necesario conocer el valor de  $\epsilon/D$ , el cual en este caso sería de  $6.8 \times 10^{-8}$  (liso). Luego de leerlo en la grafica nos proporciona un coeficiente de fricción para la tubería de 0.0042

Gráfico No. 2. Factor de fricción con respecto al número de Reynolds (McCabe, 1992)



De la misma manera se tiene con la siguiente fórmula un valor muy parecido

$$f = 0.0014 + \frac{0.125}{Re^{0.32}} \quad (\text{Ecuación No. 16})$$

$$f = 0.0014 + \frac{0.125}{1.57 \times 10^5^{0.32}} = 0.004123$$

Así mismo otros factores de fricción considerados fueron:

$$\text{Codo de 90 grados} = 0.75$$

$$\text{Válvula} = 0.17$$

Se estima que la tubería recorrerá aproximadamente 50 m desde las pozas o fotobiorreactores hasta el tanque de tratamiento.

Con esta información la carga que debe levantar la bomba debido a la fricción es de:

$$H_f = \left( 4f \frac{L}{D} + K_c + K_e + K_f \right) \frac{\bar{v}^2}{2gc} \quad (\text{Ecuación No. 17})$$

Debido a que no existe ninguna contracción, tanto  $K_c$  como  $K_e$  son 0, quedando solamente los factores de las válvulas y los codos. Por lo tanto:

$$H_f = \left( 4 \cdot 0.004123 \frac{50 \text{ m}}{0.143 \text{ m}} + 0.75 + 0.17 \right) \frac{1.24 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}}{2} = 4.18 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}$$

La carga debido a la velocidad y las diferencias de altura viene siendo de:

$$H_c = \frac{P}{\rho} + gZ + \frac{\bar{v}^2}{2} \quad (\text{Ecuación No. 18})$$

$$H_c = 9.81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} * 3.4 \text{ m} + \frac{1.24 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}}{2} = 34.11 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}$$

Por lo tanto la carga total de la bomba viene dada por:

$$H_T = H_f + H_c = 38.30 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}$$

La carga expresada en unidades de longitud viene dada por:

$$\text{carga} = \frac{H_T}{g} = \frac{38.30 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}}{9.81 \text{ m/s}^2} = 3.9 \text{ m} = 12.81 \text{ ft} \quad (\text{Ecuación No. 19})$$

Con la carga mínima se puede estimar la potencia requerida de la bomba (la potencia real se estimara mediante curvas características), en donde la misma viene dada por la siguiente ecuación:

$$P = \frac{\dot{m} \Delta H_T}{\eta}$$

Considerando una eficiencia del 60% se tiene:

$$P = \frac{18.93 \frac{\text{kg}}{\text{s}} \cdot 38.30 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}}{0.75} = 966.58 \text{ W} = 1.30 \text{ HP} \approx 1.5 \text{ HP}$$

## 3. Cálculo del NPSH

$$NPSH = \frac{1}{g} \left( \frac{Pa - Pv}{\rho} - h_f \right) - Za$$

Donde:

$NPSH$  = carga neta de succión positiva

$g$  = aceleración de gravedad

$\rho$  = densidad del fluido

$Pa$  = Presión absoluta en la superficie del depósito

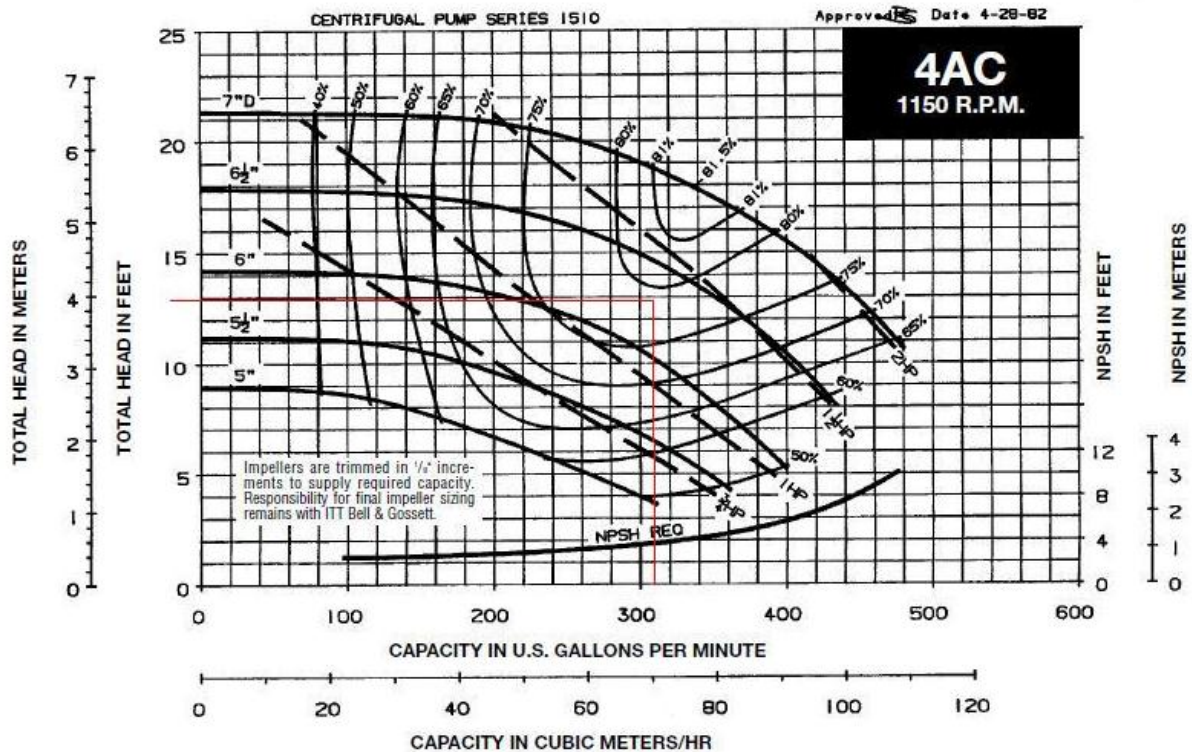
$Pv$  = Presión de vapor del líquido

$h_f$  = carga proveniente de fricción

$Za$  = altura de la superficie del tanque hasta la boca de la bomba

$$NPSH = \frac{1}{9.81 \frac{m}{s}} \left( \frac{85446.31 Pa - 2339.28 Pa}{950.5 \frac{kg}{m^3}} - 4.18 \frac{m^2}{s^2} \right) - 0.3m = 8.19m = 26.89ft$$

Gráfico No 3. Curva característica de la bomba a utilizar en el llenado. ITT industries (Bell & Gossett)



Como se puede observar, la bomba requiere de un motor de 1.5 HP, el cual estará trabajando a un poco más del 75% de su capacidad, debido a la baja carga que se le requiere. Aún así esta curva es la que mejor se adapta a los requerimientos de flujo.



Con estos datos se trabajará con una centrífuga de transportador helicoidal, la que tendrá una capacidad de operación de aproximadamente 113 GPM, 5 Ton/h de sólidos. esto indica que la descarga del tanque de ultrasonido se realizará en un mayor tiempo, la bomba de descarga del se escoge según la curva presentada a continuación, la cual será de 1/2 HP, y trabajará a una eficiencia del 65%

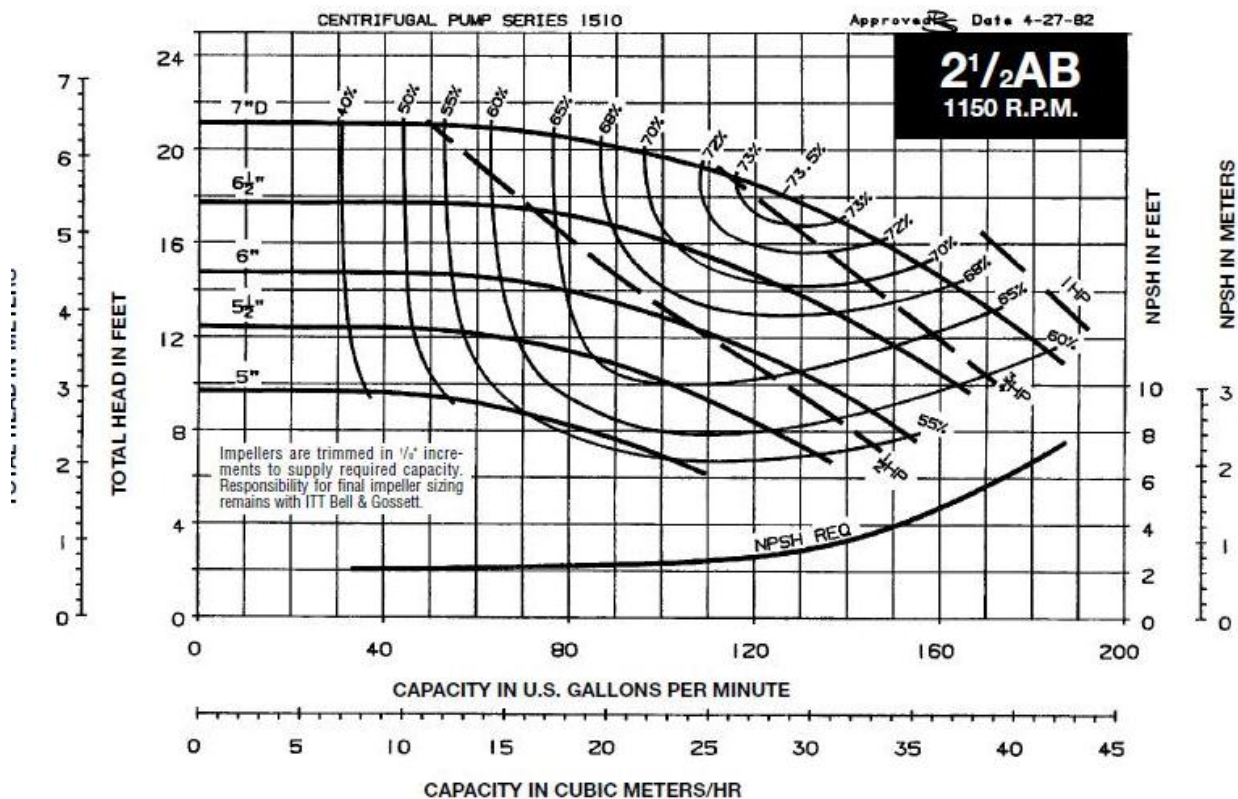
El equipo a utilizar es una centrífuga alfa laval con las siguientes características:

Tabla No. 23 Especificaciones de centrífugas a utilizar

Technical data		• tungsten carbide tied conveyor.	
Maximum hydraulic flow rate*		50 m <sup>3</sup> /h (220 GPM)	
Max. speeds with	(1,800 kg/m <sup>3</sup> wet solids)	3,300 rpm	2,200 G
	(2,500 kg/m <sup>3</sup> wet solids)	2,800 rpm	1,600 G
Maximum speed		4,000 rpm	
Centrifugal force up to		3,150 G	
Differential speed range		33 and 67 rpm	
Solids capacity		5 ton/h (11,000 lbs)	
Main power		35 kW (50 Hp)	
Back drive power		11/22 kW (15/30 Hp)	
Dry weight		2,400 kg (5,290 lbs)	
Operating weight		2,575 kg (5,675 lbs)	

\* The operating flow rate depends on the individual properties of the feed and the separation result required.

Gráfico No 4. Curva característica de la bomba que lleva el flujo hacia la sedimentadora centrífuga



## f. Diseño del Equipo de ultrasonido

Tabla No. 24 Especificaciones de los distintos transductores de ondas ultrasónicas de LGsonic

TECHNICAL SPECIFICATIONS:							
MODELS	XXL PLUS	XXL	XL PLUS	TANK	POOL	SSS	XS
Range (feet)	186 meter	150 meter	100 meter	50 meter	50 meter	10 meter	5 meter
AC Power input 110-125V 50/60 hz	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
AC Power input 220- 240V 50/60 hz							
DC Power input 36V or 24V	YES	NO	YES	NO	NO	NO	NO
Energy consumption (W/h)	13W	16W	11W	12W	12W	11W	11W
Lp-Bs Technology™	YES	NO	YES	NO	NO	NO	NO
Dual Core Multi Frequency™	YES	YES	YES	YES	YES	NO	NO
Type of electric plug	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable
Transducer cable length (feet)	17 meter	17 meter	17 meter	17 meter	10 meter	10 meter	10 meter
Float	Yes	Yes	Yes	Yes	Optional	Optional	Optional
Weight	6 kg	6 kg	6 kg	6 kg	4 kg	4 kg	3,5 kg
Guarantee	3 years	3 years	3 years	2 years	2 years	2 years	2 years

Como se puede observar el modelo que mejor se ajusta es el Ig sonic Tank.

6. Cálculo del costo de operación del sistema propuesto. Una vez dimensionados los equipos a utilizar, se realiza una estimación de los costos de operación mediante la potencia consumida durante el tiempo utilizado, estos cálculos están realizados en base a un batch de 18500 gal. Todos los costos de operación del equipo son eléctricos, todo el proceso puede ser automatizado o trabajarse de una manera manual, el costo del personal y el mantenimiento será mínimo, por batch, aún así según índices de plantas se tomara como un 15% de costos fijos de la planta.

a. Cálculo del costo de operación del sistema propuesto. Los tiempos en el que es utilizado cada equipo se presentan en la tabla No. 5 en la sección de resultados, Utilizando la ecuación No. 2 se tiene:

Para la bomba No 1:

$$E_{B1} = 1.5 \text{ HP} \cdot \frac{1 \text{ kW}}{1.34102 \text{ HP}} \cdot 1h = 1.12 \text{ kWh}$$

Para la bomba No 2:

$$E_{B2} = 0.5 \text{ HP} \cdot \frac{1 \text{ kW}}{1.34102 \text{ HP}} \cdot 2.73h = 1.02 \text{ kWh}$$

Para el equipo de ultrasonido. Según la literatura citada el equipo debe de operarse alrededor de 21 días para lograr el rompimiento del 98% de la totalidad de las algas, lo que corresponde a 504 h de trabajo continuo. (Shimizu, 2003)

$$E_U = 12 W \cdot \frac{1 kW}{1000 W} \cdot 504h = 6.05 kWh$$

Para el equipo de centrifugado:

$$E_c = 50 HP \cdot \frac{1 kW}{1.34102 HP} \cdot 2.73h = 101.79 kWh$$

Por lo tanto el costo total viene dado a partir de la ecuación No. 6 en donde el costo es la sumatoria de los costos individuales de cada equipo.

$$E_{consumida} = 1.12 kWh + 1.02kWh + 6.05 kWh + 101.79 kWh = 109.97 kWh$$

$$costo = 109.97 kWh \cdot 1.3784 \frac{Q}{kWh} = 151.76 Q$$

Con este proceso se logra separar los líquidos de los sólidos, la capa líquida posee dos fases inmiscibles, lo que facilita su separación de una manera física, como una decantación simple. Lo que no representa un costo energético, a menos que este proceso se realice automatizado, de igual manera, los equipos electrónicos, consumen muy poca electricidad en comparación a sus contrapartes eléctricas.

Una microalga promedio tiene aproximadamente un 45% en peso de humedad, así mismo un 33 % de lípidos en base seca. Con estos datos se tiene:

$$18,500 gal \cdot \frac{1 m^3}{258.06 gal} \cdot 950 \frac{kg}{m^3} \cdot 0.3 \cdot 0.45 = 9,198.76 kg \text{ biomasa seca}$$

$$9,198.76 kg \text{ biomasa seca} \cdot 0.33 = 3066.25 kg \text{ aceite crudo}$$

Por lo tanto el costo de operación por tonelada de aceite es de:

$$\frac{151.76 Q}{3066.25 kg \text{ aceite}} \cdot \frac{1000 kg}{1 Ton} = 49.49 \frac{Q}{ton}$$

Tomando en cuenta un 15% de costos fijos, se tiene que el costo de producción es:

$$49.49 \frac{Q}{ton} * (1.15) = 56.92 \frac{Q}{ton}$$

Una comparación con el costo de producción de aceite de soya se lleva a cabo de la siguiente manera. Según indexMundi ([www.indexmundi.com](http://www.indexmundi.com)) el costo por tonelada de aceite de soya en octubre del 2009 se cotizaba a 797.62 \$/ton, el costo de de la tonelada de la soya en grano es de 324.86 \$/ton, y el costo de la harina de soya es de 388.54\$/ton, (la harina de soya es el principal subproducto del proceso de extracción de aceite de soya).

La soya en grano tiene un promedio de 20% de lípidos utilizables como aceite, por lo tanto para la producción de una tonelada aceite de soya se requieren 5 toneladas en grano, y se obtienen aproximadamente 3.9 toneladas de harina, con ello se tiene:

$$\text{costosdeproductosterminado} - \%ganancia - \text{costosdemateriaprima} = \text{costosdeproceso}$$

$$\left[ 797.62 \frac{\$}{ton} \cdot 1 Ton + 388.54 \frac{\$}{ton} \cdot 3.9 Ton \right] \cdot (1 - 0.2) - 324.86 \frac{\$}{ton} * 5 Ton = 226.04 \frac{\$}{ton}$$

Por lo tanto el costo de operación de la planta con el 30% de costos administrativos e imprevistos se tiene:

$$226.04 \frac{\$}{ton} \cdot (1 - 0.3) \cdot 8.4 \frac{Q}{\$} = 1,329.12 \frac{Q}{ton}$$

Se puede observar este valor es aproximadamente 28 veces mayor que el método propuesto.

7. Cálculo del costo de importación del equipo propuesto. Para el cálculo de los gastos de envío CIP “carriage and insurance paid to”, así mismo como los impuestos se debió de buscar primeramente las partidas arancelarias correspondientes al equipo, para ello se utilizó el código SAC actual. Así, mismo se utilizó un estimado del 4% del costo del producto como gastos de flete, 1% al seguro, 1% en manejo en aduana y agente aduanal, y un 12% de IVA correspondiente.

Por lo tanto el cálculo para la bomba de 1.5 Hp se tiene que entra en la partida 8413.70.00 “bombas centrifugas”, las cuales tienen un 0% de arancel. Por lo tanto:

$$CT_{CIP} = C_{Exw} * (1 + \%IVA + \%DAI + \%FLETE + \%ADUANAS + \%SEGURO)$$

$$CT_{CIP} = Q12,239.00 * (1 + 0.12 + 0 + 0.04 + 0.01 + 0.01) = Q14,442.00$$

## D. Análisis de error

### 1. Análisis estadístico

- **Media.** La media se utiliza para sacar el promedio de una serie de datos, en pocas palabras permite conocer el valor central de un conjunto de datos. Se ejemplifica la media de densidades calculadas para las muestras de algas.

$$m = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (\text{Ecuación No. 20})$$

$$m = \frac{0.947.5 + 955.5 + 949}{3} = 950.50 \frac{kg}{m^3}$$

- **Desviación estándar.** La desviación estándar se utiliza para el cálculo de la dispersión de una serie de datos, y en este caso, se presenta cuando se da un resultado como un promedio de varios datos obtenidos. Por ejemplo, para el cálculo de la densidad promedio de las algas al 30% .

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ecuación No. 21})$$

$$s = \sqrt{\frac{(0.947.5 + 955.5 + 949)^2}{2}} = 3.97$$

### 2. Propagación de error

- **Incertidumbre para multiplicaciones y divisiones.** Se ejemplifica el cálculo de la incertidumbre para de la densidad de la primera muestra de la energía consumida por el microondas.

$$s_y = y \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \dots + \left(\frac{s_n}{n}\right)^2} \quad (\text{Ecuación No. 22})$$

$$s_y = 0.9850 \sqrt{\left(\frac{0.05}{19.7}\right)^2 + \left(\frac{0.1}{20}\right)^2} = 0.0055$$

## E. Datos calculados

Tabla No. 25 Datos para el tratamiento 1 microondas a 30% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Peso $\pm 0.0005$ kg	Energía consumida kWh	$\Delta H_{total}$ kJ
1a	0.0625	0.0025	3.74
2a	0.0607	0.0025	4.24
1b	0.0675	0.0025	3.44
2b	0.0682	0.0025	3.68

Tabla No. 26 Datos para el tratamiento 1 microondas a 30% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Temperatura $\pm 0.05^\circ$ C	Energía Teórica kJ	Temperatura según energía entregada $^\circ$ C
1a	40.1	6.3	52.44
2a	43.1	6.3	53.35
1b	39.1	6.3	53.30
2b	40.1	6.3	52.98

Tabla No. 27 datos para el tratamiento 2 microondas a 50% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Energía consumida kWh	$\Delta H_{total}$ kJ	Temperatura real mezcla $\pm 0.05^\circ$ C
1a	0.00416667	8.11	79.21
2a	0.00416667	8.51	85.31
1b	0.00416667	8.28	80.12
2b	0.00416667	8.29	80.75

Tabla No. 28 datos para el tratamiento 2 microondas a 50% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Energía entregada teórica kJ	Temperatura según energía entregada C
1a	10.5	90.67
2a	10.5	95.17
1b	10.5	91.12
2b	10.5	91.58

Tabla No. 29 Datos para el tratamiento 3 microondas a 80% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Tiempo C	Energía consumida kWh	$\Delta H_{total}$ para llegar a t ebullición kJ
1a	17	0.00377778	3.35446672
2a	30	0.00666667	2.02582283
1b	14	0.00311111	3.0775887
2b	15	0.00333333	2.98081534

Tabla No. 30 Datos para el tratamiento 3 microondas a 80% de potencia durante 30 segundos

Muestra	Energía entregada teórica kJ	Energía entregada como calor latente kJ
1a	9.52	6.16553328
2a	16.8	14.7741772
1b	7.84	4.7624113
2b	8.4	5.41918466

Tabla No. 31 Datos para el tratamiento en autoclave a 125C , 2 bar durante 30 minutos

Muestra	Peso	$\Delta H$ kJ	$\Delta H_{total}$ kJ	$\Delta H_{comb}$ kJ	Combustible	Costo Q
3a	0.0615	21.06	369.84	462.30	0.012 kg	0.06
4a	0.0621	21.31				
3b	0.0621	19.15				
4b	0.0631	19.45				

Tabla No. 32 datos para el tratamiento en autoclave a 125C , 2 bar durante 30 minutos

Muestra	5a kg	6a kg	5b kg	6b kg	Total kg
agua	0.044	0.043	0.036	0.036	0.16
biomasa	0.019	0.019	0.026	0.026	0.088

Tabla No. 33 Datos de energía a extraer para el tratamiento en congelamiento

H <sub>s</sub> solución kJ	H fusión kJ	H <sub>s</sub> vasos kJ	H Total kJ
-17.18	-53.50	-4.079	-74.76

Tabla No. 34 Datos del diseño del tanque de ultrasonido

diámetro m	Largo m	Volumen m <sup>3</sup>	capacidad gal	capacidad real gal
3.05	10.00	73.06	18854.62	18,500.00

Tabla No. 35 Datos del diseño de la tubería

densidad experimental del fluido	950.5	kg/m <sup>3</sup> al 30%
flujo másico	18.93	kg/s
Velocidad optima	4.06	ft/s
Diámetro tubería	0.14	m

Tabla No. 36 Datos del diseño de la bomba de llenado del tanque de ultrasonido

hf	4.18	m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup>
Carga	34.12	m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup>
carga total	38.30	m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup>
presión	36404.93	kg/ms <sup>2</sup>
carga en m	3.90	m
potencia min	966.58	W

Tabla No. 37 Datos del cálculo del consumo energético del sistema propuesto

Equipo	Energía consumida kWh
bomba llenado	1.12
generador de ondas	6.05
bomba vaciado	1.02
Centrifuga	162.86

## XIV. ANEXOS

# Anexo1 Cotizaciones de equipo

12/10/2009

used equipment dealer, plastic equipm...



[About Us](#) | [Corporate Solutions](#) | [Sell Us Equipment](#) | [Your Cart \(0\)](#) | [Your Account](#) | [Conversions](#) | [Directions](#) | [Contact Us](#)

*YOUR SOURCE ... for Pharmaceutical, Chemical, Plastics and Related Process Equipment.*

Print Page | Email Page | **1.800.652.2466**    

Search  All Categories  Enter item number or keyword   [Advanced Search](#) [Sign-Up To Receive Free Updates](#) Enter your email address  

**Quote Information:** [\(hide\)](#)

[Look Up Different Quote](#)

<b>Quote ID:</b> 42553	<b>Sales Person:</b> Gustavo Berenfus	<a href="#">Accept Quote</a>
<b>Status:</b> Pending	<b>PDF File:</b> <a href="#">287646_42553_1282009_9_31_53.pdf</a>	Click here to accept this quote. Your acceptance is not binding, but alerts your sales representative of your intention to purchase and assigns priority status to your quote. You will be contacted as soon as possible within 24 hours.
<b>Created:</b> Monday, December 07, 2009	<b>Number of Products:</b> 1	
<b>Last Activity:</b> Tuesday, December 08, 2009	<b>Total Price:</b> \$175,000.00	

**Quote Details:** [\(hide\)](#)

<b>25548 - NX436 ALFA LAVAL CENTRIFUGE, S/S</b> ONE (1) Used Alfa Laval horizontal decantor centrifuge, model AVNX436-B-31G, stainless steel construction, 360 degree solids discharge with replaceable wear liners, 24" x 98" bowl, 110 KW motor with hydraulic back drive, 2700 RPM bowl speed, 2600 Gs, rated 140 GPM, 1.3 Kg/dm3, serial no. 501-3625, new 1990.	<b>Manufacturer:</b> ALFA LAVAL <b>Size:</b> 43631.000 MOD
	<b>Quantity:</b> 1 <b>Total Price:</b> \$175,000.00

Model	Description	Price	range	extra
XS	LG Sonic XS®	€420	5m	2 year guarantee
SSS	LG Sonic SSS®	€750	10m	2 year guarantee
Pool	LG Sonic Pool®	€1200	50m	2 year guarantee
Tank	LG Sonic Tank®	€1400	50m	2 year guarantee
XL+	LG Sonic XL plus®	€2000	100m	AC/DC 3 year guarantee
XXL	LG Sonic XXL®	€2300	150m	3 year guarantee
XXL+	LG Sonic XXL plus®	€2800	186m	AC/DC 3 year guarantee

All prices are ExWorks and ex VAT.

## Anexo 2: Sedimentación mediante ultrasonido.



# ULTRASOUND

## A new technique to harvest microalgae ?



Ph. D. Student : Rourke Bosma  
 Thesis Advisor : Prof. dr.ir J.Tramper  
 Supervisor : Dr. ir. R.H. Wijffels  
 Research group : VLAG  
 Supported by : EET

Phone : +31 317 485447  
 Fax : +31 317 482237  
 E-mail : rouke.bosma@algemeen.pk.wau.nl  
 Period : 2000-2006

### Introduction

A novel separation device is introduced to harvest microalgae. The separation process is based on gentle acoustically induced aggregation followed by enhanced sedimentation.

### Aim

The scope of this study was to optimise the efficiency of the separation process by adjusting the set-up of the process. Five parameters were varied.

### Principle

When algae are exposed to an ultrasonic standing wave (fig.1a/2a) they experience a force that almost instantaneously drives them into the planes of the pressure nodes (fig.1b/2b). Subsequently, agglomeration of the cells occurs into the knots of the ultrasonic field (fig.1c/2c). When the field is switched off, the aggregated cells sediment rapidly from the fluid due to gravity forces.

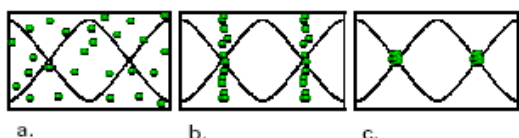


Figure 1 : Principle of the ultrasonic harvesting process



Figure 2 : Pictures of the ultrasonic harvesting process

### Method

An experimental design was used to model the efficiency of the process. The efficiency is the percentage of cells harvested.

$$\text{Efficiency} = 100\% - 100\% \cdot \frac{(C_{\text{ret/m}} \cdot \phi_{\text{ret/m}})}{(C_{\text{in}} \cdot \phi_{\text{in}})}$$

The model predicted the efficiency well (fig. 3). Deviations occurred mainly at low harvest flow rates.

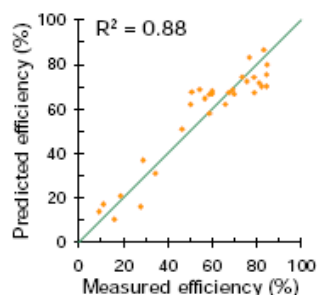


Figure 3 : Parity plot of measured efficiency vs predicted efficiency. The solid line presents a perfect match

### Optimisation

The biomass concentration and the ingoing flow rate were the parameters which had the most influence on the separation efficiency (fig. 4).

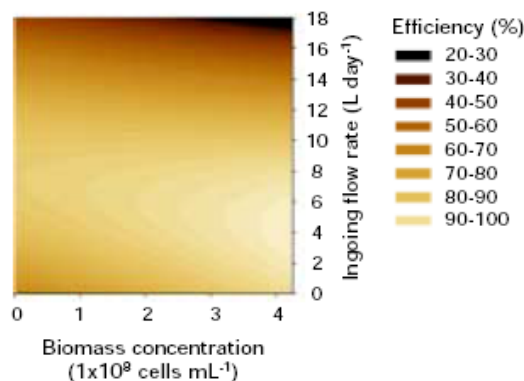


Figure 4: Surface plot of predicted efficiency

### Conclusion

The model of efficiency predicted the measured efficiencies well. After optimisation, it predicted that microalgae could be harvested with an efficiency of  $93 \pm 14\%$  and a concentration factor of  $11 \pm 2$ .

## Anexo 3: Destrucción selectiva de ciertos tipos de alga mediante ultrasonido.

**United States Patent** [19][11] **4,065,875**

Srna

[45] **Jan. 3, 1978**[54] **SELECTIVE DESTRUCTION OF CERTAIN ALGAE**

[56]

**References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**[75] Inventor: **Richard Frank Srna, Milton, Del.**

3,625,884 12/1971 Waltrip ..... 210/19

3,630,377 12/1971 Brooks ..... 210/19 X

3,650,094 3/1972 Goodwin ..... 210/19 X

3,763,824 10/1973 Schoon ..... 47/1.4 X

3,902,273 9/1975 Friedman ..... 47/58

[73] Assignee: **University of Delaware, Newark, Del.***Primary Examiner*—Robert E. Bagwill*Attorney, Agent, or Firm*—George W. Walker[21] Appl. No.: **724,411**

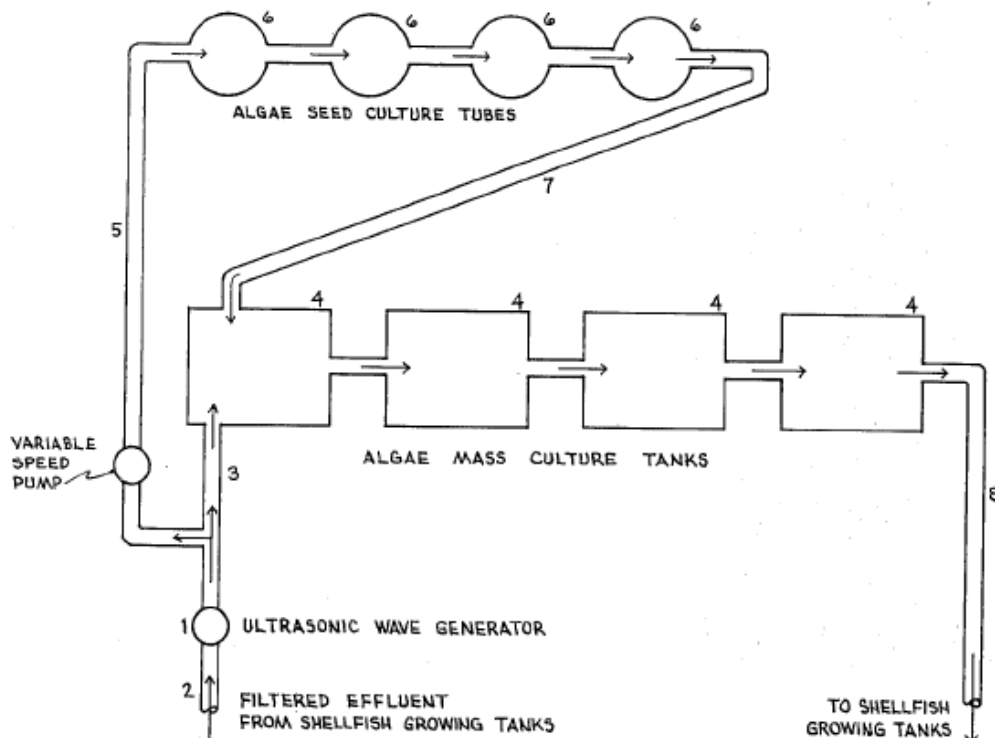
[57]

**ABSTRACT**[22] Filed: **Sept. 17, 1976**

A process is described for the selective destruction of Phaeodactylum cells in the presence of Thallasiosira cells by subjecting algae culture liquid containing these species to ultrasonic waves.

[51] Int. Cl.<sup>2</sup> ..... **A01G 9/00**[52] U.S. Cl. .... **47/1.4; 119/2; 210/19; 47/DIG. 12**

[58] Field of Search ..... 210/19; 47/1.4, DIG. 12, 47/58; 119/2.3, 4

**1 Claim, 1 Drawing Figure**

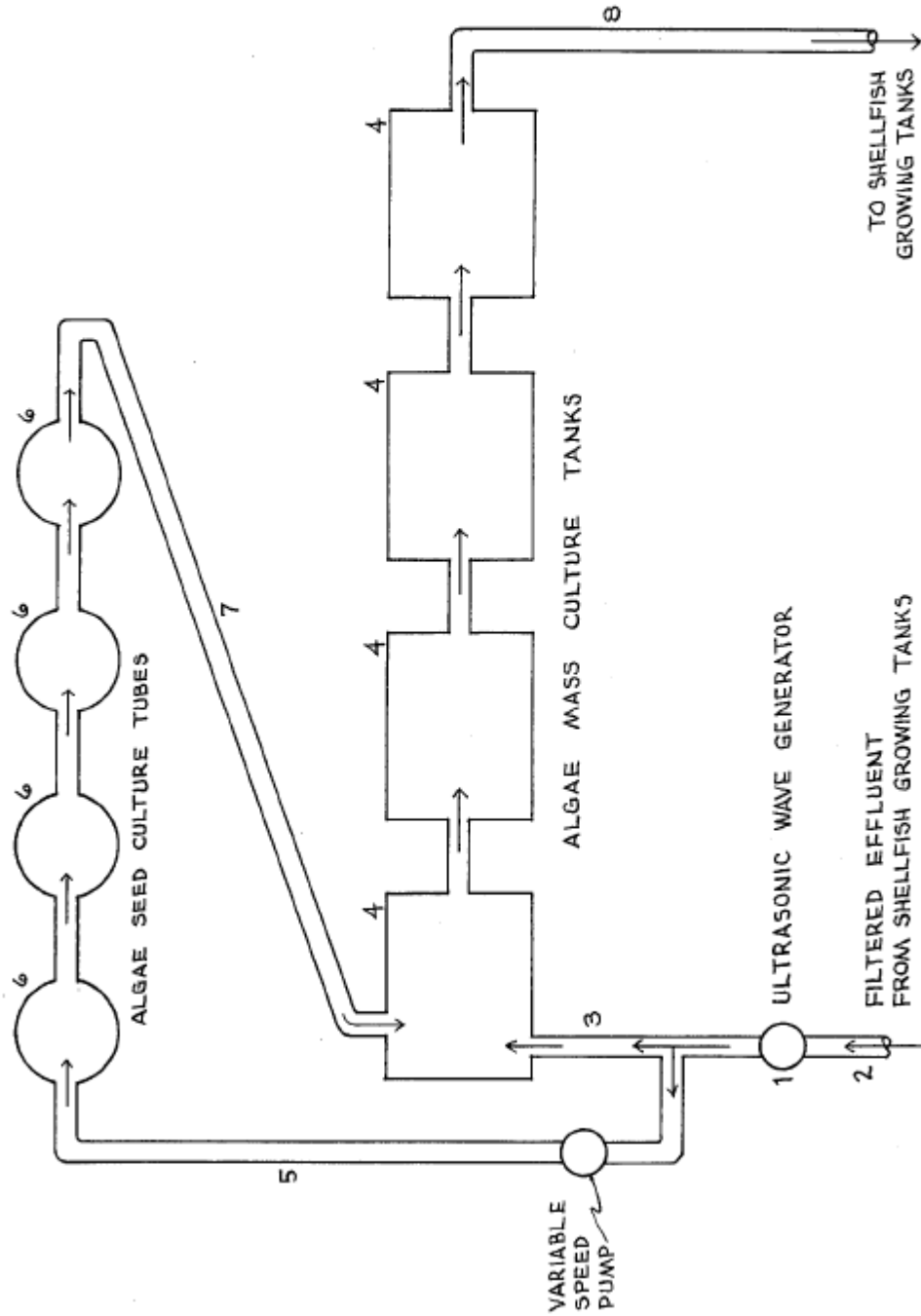


FIG. 1

4,065,875

1

**SELECTIVE DESTRUCTION OF CERTAIN ALGAE****BACKGROUND OF THE INVENTION**

The Government of the United States has rights in this invention pursuant to Grant No. 04-3-158-30 from the Department of Commerce.

**FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates to a method for purifying algae culture liquids by selectively destroying undesirable algae species.

**DESCRIPTION OF THE PRIOR ART**

In the mass culture of algae for use as nutrients for the feeding of shellfish, one genus, *Phaeodactylum*, is a troublesome contaminant. This has a rapid growth rate but it is not suitable for sustaining shellfish growth. Consequently the presence of this genus in algae cultures used as nutrients in mariculture systems is undesirable since it reduces the productivity of the algal culture medium containing it, and this in turn increases the cost of the nutrient supplied to shellfish growing systems.

It is therefore a major object of this invention to provide an effective method for destroying undesirable algal species in a mass algal culture system without destroying desired algal species.

Other objects of this invention will be apparent from the description of the invention given below.

It has been known for some time that ultrasonic waves have a deleterious effect on plant cells, bacteria and biological tissue. For example, plant cells and certain algae were found to be torn in pieces by ultrasonic waves ("Ultrasonics," by Ludwig Berman, translated by H. S. Hatfield, page 225, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1944). The destruction of bacteria in suspension is also described on page 234 of "High Intensity Ultrasonics" by Brown and Goodman, D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, N.J., 1965.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The process of this invention comprises subjecting an algae culture for use as a nutrient for feeding shellfish to ultrasonic waves in order to destroy undesirable algae particularly the *Phaeodactylum* algae cells. Preferably the process of this invention comprises subjecting such algae culture liquid flowing through an algae culture system to the action of ultrasonic waves. It has been found that ultrasonic waves act selectively on algae cultures containing both *Thalassiosira* and *Phaeodactylum* algae cells to destroy the latter without destroying a significant number of the former. This is a significant advance in the art of cultivating marine algae for use as nutrients for shellfish, since as indicated hereinbefore, *Phaeodactylum* is a troublesome contaminant that does not sustain growth of shellfish. On the other hand,

2

*Thalassiosira* is a highly desirable algae for feeding shellfish in mariculture systems.

The ultrasonic waves used in the process of this invention can be generated by conventional ultrasonic generators commercially available. The ultrasonic waves can be applied to the circulating algae culture liquid at various places in the culture system. For example, in the two-loop algae culture system described below in reference to the drawing, the ultrasonic wave generator can be placed in the tube carrying the entire incoming algae culture liquid. Alternatively, the ultrasonic wave generator can be placed in the algae culture seed loop alone, or in the algae mass culture loop alone, or in both. The ultrasonic waves can be applied to the algae culture liquid continuously or intermittently as desired. Ultrasonic wave generators capable of providing waves of 20,000 cycles per second are satisfactory for use in the process of this invention. However, waves of higher or lower frequency can also be employed.

**DESCRIPTION OF THE DRAWING**

FIG. 1 is a schematic flow sheet of one embodiment of the process of this invention.

In this embodiment the ultrasonic waves produced by the generator 1, are applied to the entire algae culture liquid entering the two-loop algae culture system at 2. The major portion of the treated culture liquid then passes through tube 3 to a series of interconnected mass algae culture tanks 4, and a minor proportion of the treated culture liquid passes through tube 5 to a series of seed algae culture tubes 6, and then is returned through tube 7 to the first of the mass culture tanks 4. The effluent from the last of the mass culture tanks is returned through tube 8 to the shellfish growing tanks.

In other embodiments of the invention the ultrasonic wave generator can be placed in tubes 3 or 5, or both, if desired.

Other types of contaminants in the algae culture liquid besides *Phaeodactylum* are destroyed by ultrasonic waves. For example, bacteria, viruses and larval pests are destroyed by the ultrasonic wave treatment of this invention.

It is apparent that changes and modifications may be made herein without departing from the invention in its broadest aspects. The aim of the appended claims therefore is to cover all such changes and modifications as fall within the true spirit and scope of the invention.

I claim:

1. In a process for the culture of *Thalassiosira* algae cells for use as a nutrient for feeding of shellfish, the improvement which comprises passing the culture liquid containing the *Thalassiosira* through a zone in which ultrasonic waves of the order of 20,000 cycles per second are generated in order to destroy any *Phaeodactylum* algae cells that may be present.

\* \* \* \* \*

Anexo 4: Producción de etanol de celulosa utilizando cultivos de organismos termófilos

**United States Patent** [19]

[11] **4,094,742**

**Bellamy**

[45] **June 13, 1978**

- [54] **PRODUCTION OF ETHANOL FROM CELLULOSE USING A THERMOPHILIC MIXED CULTURE**
- [75] Inventor: **Winthrop D. Bellamy**, Schenectady, N.Y.
- [73] Assignee: **General Electric Company**, Schenectady, N.Y.
- [21] Appl. No.: **774,380**
- [22] Filed: **Mar. 4, 1977**
- [51] Int. Cl.<sup>2</sup> ..... **C12C 11/38**
- [52] U.S. Cl. .... **195/33; 195/65; 195/111**
- [58] Field of Search ..... **195/13, 33, 96, 81, 195/111, 66 R, 65, 62**

[56] **References Cited**

**U.S. PATENT DOCUMENTS**

3,711,392	1/1973	Metzger .....	195/111 X
3,844,890	10/1974	Horikoshi et al. ....	195/62
3,983,002	9/1976	Ohya et al. ....	195/66 R
3,990,944	11/1976	Gauss et al. ....	195/33
4,009,075	2/1977	Hoge .....	195/33

**OTHER PUBLICATIONS**

Atkinson et al., "Production of Alcohol by *Bacillus Stereothermophilus*", Chemical Abstracts, vol. 84, No. 1, p. 297 (1976), Abs. No. 3254f.

Clermont-Beaugiraud et al., "Polysaccharidases from sporocytophaga myxococcoides:  $\beta$ -mannanase, cellulase, and xylanase", Chemical Abstracts, vol. 75, No. 5, p. 47 (1971), Abs. No. 30388y.

*Primary Examiner*—Raymond N. Jones

*Assistant Examiner*—Thomas G. Wiseman

*Attorney, Agent, or Firm*—Jane Binkowski; Joseph T. Cohen; Marvin Snyder

[57] **ABSTRACT**

A mixed culture of thermophilic cellulolytic sporocytophaga and thermophilic ethanol-producing bacillus is admixed with a suspension of cellulose in nutrient mineral broth and the resulting mixture is fermented at a pH ranging from 7 to 8 and at a temperature of 50° C to 65° C to produce ethanol.

**10 Claims, No Drawings**

## PRODUCTION OF ETHANOL FROM CELLULOSE USING A THERMOPHILIC MIXED CULTURE

The present invention relates to a process for producing ethanol from cellulose through the combined growth of thermophilic cellulolytic sporocytophaga and an ethanol-producing thermophilic bacillus.

Cellulose is a solid natural polymer of glucose. In its native state or form, cellulose has a physical structure comprised of a mixture of crystalline and amorphous areas or regions. Chemical reagents react with or penetrate the amorphous regions much more readily than the crystalline regions. In a pure or relatively pure form, cellulose can be converted by a variety of techniques to useful products such as paper, sugar, ethanol and methane. Yeast fermentation of cellulose to produce ethanol must be preceded by a hydrolysis step because yeast cannot hydrolyze cellulose.

Thus far, only mesophilic cellulolytic sporocytophaga have been known in the art. The mesophilic cellulolytic sporocytophaga grow at temperatures of 20°-30° C and digest cellulose at a rate too slow to be useful. The present invention utilizes a novel thermophilic cellulolytic sporocytophaga which grows at elevated temperatures and which produces enzymes that digest cellulose at a rate substantially higher than those of its mesophilic counterparts, frequently by a factor of 2 to 4. Specifically, in the present invention, a novel mixed culture of a thermophilic cellulolytic sporocytophaga and a thermophilic ethanol-producing bacillus is used to produce ethanol from cellulose in a single fermentation step. The enzymes of the thermophilic cellulolytic sporocytophaga hydrolyze cellulose to soluble sugars and the enzymes of the thermophilic bacillus convert the soluble sugars to ethanol. By the term soluble sugars herein it is meant sugars soluble in water at a temperature of 50° C. One of the advantages of the present invention is that it obviates the necessity for more complex conventional approaches which require application of external chemicals at high cost with the concomitant residue disposal problem associated with the added chemicals.

Briefly stated, the present process comprises admixing cellulose or a cellulosic material with nutrient mineral broth to form a suspension having a pH ranging from about 7 to 8, admixing with said suspension a mixed culture of thermophilic cellulolytic sporocytophaga and thermophilic ethanol-producing bacillus, and fermenting the resulting mixture at a pH ranging from about 7 to 8 and at a temperature ranging from about 50° C to about 65° C to produce at least a significant amount of ethanol. By a cellulosic material it is meant herein cellulose itself or a material which has been treated to make the cellulose component available, in at least a major amount, or preferably at least a substantial amount, for contact with the mixed culture. Also, by a significant amount of ethanol it is meant herein ethanol in an amount of at least about 10% by weight of the cellulose present in the fermentor.

In carrying out the present process the source of cellulose is not critical and native or natural cellulosic material as well as waste cellulose are useful.

Cellulose is the major constituent of vegetable tissues. The bulk of renewable organic matter on earth consists of lignocellulose. Except in the form of cotton and some bacterial polymers, cellulose does not occur pure naturally but is present in the tissue of land plants complexed

with lower molecular weight, alkali-soluble polysaccharides collectively termed hemicelluloses and with lignin, a high molecular weight three-dimensional random polymer of phenylpropane alcohols. Lignin in the form of a protective covering prevents enzymatic hydrolysis of the cellulose to soluble sugars. The greater the lignin content of lignocellulosic material, the more resistant is its cellulose component to enzyme attack. Representative of the lignocellulosic materials are wood, manure fiber, and straw. Wood contains about 50% cellulose whereas cotton fibers contain about 98% cellulose.

Representative of the waste cellulosic material which are useful herein as a source of cellulose are industrial cellulosic wastes such as boxes, newsprint and paper bags and agricultural wastes such as bagasse.

In the present invention, the source of cellulose, i.e. natural or waste, need only be treated, if necessary, to make its cellulose component available at least in a major amount, preferably higher than 60% by weight of the cellulose present, for contact with the mixed culture. Such treatment may be physical or chemical.

According to one method the lignocellulosic material is comminuted to a fine particle size, preferably less than 100 microns, to expose and make available at least a major portion of the cellulose component for contact with the present mixed culture during fermentation. Comminutation can be carried out by conventional techniques such as by mechanical grinding or pulverizing the lignocellulosic material.

Alternatively, to free the cellulose component, the lignocellulosic material can be treated with acid or alkali metal hydroxide which penetrate the lignin and degrade or depolymerize it sufficiently to make the cellulose available for contact with the present mixed culture. For example, the lignocellulosic material in its natural form, i.e., hull, stalk or blade, or preferably in particulate form, is immersed in an aqueous metal hydroxide which may range in concentration from about 5% to 50% by weight of the alkali metal hydroxide, preferably sodium hydroxide, and preferably at an elevated temperature which may range up to 100° C. The alkali-treated material can then be recovered by conventional techniques, such as decantation or filtration, and then treated with acid, such as hydrochloric acid, to bring it to the desired pH range of 7 to 8. The particular concentration of alkali metal hydroxide, its temperature and the period of time of immersion of the lignocellulosic material therein are determinable empirically and depend largely on the amount of lignin present and the degree of degradation or disruption of lignin desired.

The present fermentation must be carried out under submerged condition. The present fermentation medium has a pH ranging from about 7 to 8 and it is comprised of a suspension of solid particulate or fibrous cellulosic material in aqueous nutrient mineral broth. The suspension can be formed in a standard manner by simply admixing the particulate or fibrous cellulosic material with the nutrient broth in proper amounts. The amount of cellulosic material in the suspension should be sufficient to provide at least significant contact with the mixed culture to allow fermentation to proceed at least at a practical rate. To be useful, the amount of solid cellulosic material present in the suspension should be at least about 2% by weight of the total suspension, and preferably, it ranges from about 5% by weight to about 50% by weight of the suspension. Amounts of cellulosic material higher than about 50% by weight of the sus-

4,094,742

3

pension absorb a substantial amount of water making it too difficult to form a suspension.

The fermentation medium must have a pH ranging from about 7 to 8 and should be maintained at such pH during fermentation. At a pH below 7, the thermophilic cellulolytic sporocytophaga does not grow whereas at a pH above 8 it grows very slowly. Preferably, for optimum growth rate of the present mixed culture, the pH of the fermentation medium should range from 7.2 to 7.8. The pH of the contents of the fermentor during fermentation can be monitored continuously by conventional means such as a pH probe. Whenever necessary during fermentation, the contents of the fermentor can be adjusted to the proper pH in a conventional manner by the addition of suitable acid or alkali such as hydrochloric acid or sodium hydroxide.

The solid cellulosic material used in forming the fermentation medium is comminuted, if necessary, by standard techniques such as grinding or pulverizing to fine particulate or fibrous form. The particulate cellulosic material should have a size less than about 1,000 microns and preferably less than about 100 microns. The fibrous cellulosic material should have a diameter less than about 1,000 microns and preferably finer. The finer the cellulosic material, the more surface area is available for contact with the mixed culture and thereby the more effective is the digestion of the cellulose, i.e., the faster is the rate of fermentation of the cellulose to produce ethanol. Also, as a practical matter, the cellulosic material should contain cellulose in an amount of at least 30% by weight, and preferably at least 50% by weight or higher of the total amount of cellulosic material used in forming the suspension. Also, preferably, the cellulosic material has a pH ranging from about 7 to 8.

The particular nutrient mineral broth used is not critical, and preferably, it has a pH of about 7 to 8 which is necessary for growing the mixed culture organisms. The term broth herein includes a solution as well as a suspension. Specifically, the broth is largely inorganic and includes a number of minerals in solution to provide the major nutrient ions such as sodium, potassium, phosphate, sulfate, magnesium and iron and usually includes an organic chelating agent to keep iron from precipitating. The absolute concentrations of the nutrients in the broth are not critical as long as they are present in adequate amounts for the mixed culture organisms to grow but not so high as to inhibit growth. Standard bacteriological growing media are useful herein as nutrient mineral broth because they all contain the major ions necessary for bacteria growth, and the exact formulation may be modified in the standard manner depending on the composition of the particular cellulosic material, i.e., the extent to which the nutrients are already contained in the substrate.

The mixed culture of the present invention is comprised of a thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga and an ethanol-producing gram-positive thermophilic bacillus.

The ethanol-producing gram-positive thermophilic bacillus of the present invention is a strain which grows at temperatures within the range of from about 50° C to 55° C and at a pH ranging from 7 to 8 and produces ethanol at at least a practical rate, i.e., at least about 0.25 gram per liter  $\times$  hour. The Eighth Edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., 1974, discloses at page 540 that *Bacillus stereothermophilus* grows at temperatures from a minimum range of 30° C to 45° C to a maximum range of 65°

4

C to 75° C, and that *Bacillus coagulans* grows at temperatures from a minimum range of 15° C to 25° C to a maximum range of 55° C to 60° C. Therefore, representative species which can be utilized in accordance with the present invention include *Bacillus stereothermophilus* and *Bacillus coagulans*. Cultures of these bacilli are contained in the American Type Culture Collection located in Washington, D.C. and in other repositories. It is believed that the present thermophilic cellulolytic gram-positive bacillus is a *Bacillus stereothermophilus* which grows slowly at 65° C.

The present mixed culture can be formed in a conventional manner, i.e., the thermophilic cellulolytic sporocytophaga and ethanol-producing bacillus can be grown together submerged in a standard nutrient solution at temperatures ranging from about 50° C to about 65° C.

The present mixed culture comprised of thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga designated "US" and ethanol-producing gram-positive thermophilic bacillus designated "OK" was deposited with the U.S. Department of Agriculture. This mixed culture (NRRL B-11077) is identified as follows:

This sporocytophaga culture US was isolated from a sample of soil and decaying wood collected at the base of an old elm stump in the Schenectady, NY, area during a search for thermophilic cellulolytic microorganisms. After enrichment growth in an aqueous medium which was comprised of, on the basis of 100 ml of water, 0.05 gram yeast extract, 0.05 gram tryptone, particulate filter paper and soil samples, it was subcultured on an aqueous medium which was comprised of, on the basis of 100 ml of water, 0.1 gram yeast extract, 1 gram tryptone, M/15 phosphate buffer pH 7.0 and particulate filter paper. This sporocytophaga strain was found to produce a bright yellow to orange pigment when grown on cellulose. It did not initiate growth in the presence of air but grew up to the surface after submerged growth had become established. This sporocytophaga strain grows as a long thin gram-negative rod with a diameter of about 0.7 micron and a variable length up to several microns with an enlarged terminal spore. All attempts to grow this sporocytophaga in a pure culture have failed; it is always associated with a gram-positive thermophilic bacillus. This strain US of sporocytophaga will survive 90° C for 10 minutes but not 20 minutes, and 96° C for 4 minutes but not 7 minutes. In a media freshly inoculated with the present mixed culture, the bacillus rapidly established an aerobic and anaerobic growth, the sporocytophaga grew more slowly and initiated cellulose digestion and pigment production under anaerobic conditions. No yellow pigment was produced by the sporocytophaga when grown in a medium containing glucose as the carbohydrate source. The optimum pH for this sporocytophaga was found to be 7.5 to 7.8; it did not initiate growth at 6.5, nor above 8.5. The optimum temperature for its growth was found to be 55° C to 65° C. Specifically, growth of the sporocytophaga was abundant at 45° C but very slow or absent at 40° C and 70° C.

This strain OK of ethanol-producing gram-positive thermophilic bacillus was isolated from decaying vegetation and soil obtained from an anomalous hot earth area in Yellowstone National Park. It was found to grow on a rich medium such as Luria broth. It did not grow in unsupplemented mineral broth but did grow in mineral broth supplemented with 0.2% yeast extract. It

grew from 40° C to 60° C. It did not grow at 70° C nor at 30° C. It is a large gram-positive rod with a diameter of about 1 micron and a length ranging from 2.5 to about 5 microns with a single spore. It fermented both glucose and cellobiose. It exhibited proteolytic action when grown on litmus milk.

A subculture of this mixed culture can be obtained from the permanent collection of the Northern Marketing and Nutrient Research Division, Agricultural Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A.

The present fermentation is carried out at a temperature ranging from about 50° C to 65° C. The particular fermentation temperature used depends largely on the growth rate at such temperature of the particular ethanol-producing bacillus used. Fermentation temperatures below 50° C are not useful because the sporocytophaga grows too slowly whereas at temperatures above 65° C the bacilli grow not at all or too slowly to be useful. Fermentation temperatures ranging from about 55° C to 60° C usually result in optimum growth of the mixed culture of the present invention.

The present fermentation is carried out in a closed vessel or fermentor. The mixed culture, usually suspended in nutrient mineral broth, is preferably admixed with the fermentation medium so that it is distributed throughout the suspension at least significantly uniformly. The present fermentation is anaerobic but it does not require the bubbling of carbon dioxide gas through the fermenting medium or mass because the present mixed culture of organisms gives off carbon dioxide gas during fermentation. Also, the evolution of such carbon dioxide gas maintains the fermenting mass in sufficient suspension so as to eliminate the need for external agitating means.

The present fermentation may be carried out as a batch process. It may also be a continuous process by adding additional cellulosic material to the fermentor to replenish cellulose which has been digested and removed. The atmosphere in the fermentor during fermentation may be at atmospheric pressure or it may be a partial vacuum. At atmospheric pressure, as ethanol accumulates in the fermentor, it slows fermentation and eventually stops it substantially. In a batch process carried out at atmospheric pressure, the residence time in the fermentor may vary and it is determinable empirically by determining when production of ethanol ceases. This can be done by a number of techniques such as, for example, removing samples of the fermenting mass over a period of time and determining their ethanol content in a standard manner. When fermentation carried out at atmospheric pressure is completed, the contents of the fermentor are then treated to separate and recover its ethanol component. This can be carried out by subjecting the contents of the fermentor to a temperature ranging from about 78° C to about 85° C to distill off the ethanol or alternatively, subjecting the fermentor contents to temperatures below 78° C, preferably from about 50° C to 70° C, and a partial vacuum.

A partial vacuum in the fermentor is preferred since it results in yields of ethanol substantially higher than those produced at atmospheric pressure. For example, at atmospheric pressure the yield of ethanol based on cellulose may range from about 10% to about 20% of theoretical whereas with a partial vacuum the yield of ethanol can range from 40% to 80% or higher of theoretical. The partial vacuum distills off ethanol as fast as

it is formed and the amount of ethanol produced, is limited largely by the amount of cellulose present in the fermentor. The partial vacuum need only be sufficient at the particular fermenting temperature to vaporize the ethanol produced during fermentation and also sufficient to withdraw the ethanol vapor from the fermentor. Usually, such partial vacuum ranges in pressure from about 100 mm Hg. to about 400 mm Hg.

When a partial vacuum is used during fermentation, it is preferred to flow a gas through the atmosphere in the fermentor to help sweep the ethanol vapor out of the fermentor. The gas may be one to which the contents of the fermentor are inert such as nitrogen, or it may be a basic gas such as ammonia or an acidic gas such as CO<sub>2</sub> to help maintain the proper pH during fermentation. The flow of gas can vary and is determinable empirically. The carbon dioxide gas also improves the growth of the sporocytophaga by replenishing carbonate or CO<sub>2</sub> gas removed by the partial vacuum, because CO<sub>2</sub> is required for its effective growth.

The invention is further illustrated by the following example.

#### EXAMPLE 1

In this example the mixed culture assigned the number NRRL B-11077 and comprised of thermophilic cellulolytic sporocytophaga "US" and thermophilic cellulolytic ethanol-producing bacillus "OK" was used. The nutrient mineral broth used contained (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0 grams; NaCl, 1 gram; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 gram; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.008 gram; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 gram; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.02 gram; CaCl, 0.02 gram; Versenol, 0.2 gram; and M/15 phosphate buffer per liter of distilled water and was adjusted to pH 7.5.

The apparatus used was comprised of a one liter fermentation vessel associated with a 500 ml water trap, and a 50 ml alcohol trap, plus necessary connectors, and condensers. The fermentor vessel had a pH probe and an inlet for either carbon dioxide gas or ammonia. The water trap had a vacuum gauge, and the condenser in the alcohol trap operated on ground water at 15° C to 18° C. Both the fermentor and the water trap were maintained at desired temperature by thermostated glass-coil heaters. During operation, the pH and the partial vacuum in the fermentor vessel were maintained at desired values by manual operations. The pH of the fermenting mixture was maintained at 7.5 by periodic addition of ammonia as ammonium hydroxide because organic acids were produced during growth. Carbon dioxide gas from an associated lecture cylinder was periodically bled into the atmosphere of the fermentor slowly to help sweep out the ethanol vapor from the fermentor atmosphere and to replace the carbon dioxide removed by the partial vacuum.

A suspension of 500 ml of the mineral broth plus 0.5 gram yeast extract and 5 grams of Whatman #1 filter paper which had a particle size ranging from about 100 to 1,000 microns was inoculated with the present mixed culture (NRRL B-11077) at room temperature. The filter paper consists of cellulose only. Although yeast extract was included in the mineral broth, it is not a required nutrient for growth of this mixed culture, and specifically, it is not required for growth of the ethanol-producing bacillus in the present mixed culture since the sporocytophaga provides the required nutrients supplied by the yeast extract.

The resulting fermentation mass was maintained in the closed fermentation vessel at 55° C at a pH ranging

4,094,742

7

from 7 to 8 at atmospheric pressure for 12 hours. At the end of that time, there was heavy growth of the mixed culture in the fermentation vessel. The atmospheric pressure was then gradually lowered to 153 mm Hg. The fermentation vessel was maintained at 55° C, the water trap at 40° C, and the ethanol trap was at room temperature which was about 25° C while the condenser water was 15° C to 18° C. Under these conditions, 10 ml of 50% ethanol was collected in the trap during the first two hours, and approximately 2 ml of 50% ethanol per hour was collected for the next 7 hours. It was necessary to return the water from the water trap to the fermentation vessel to make up the water lost at the end of the two hours and five hours. The yield of ethanol based on the amount of cellulose was about 40% of theoretical.

What is claimed is:

1. A process for fermenting cellulose to produce ethanol by the combined growth of a mixed culture of thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga and thermophilic ethanol-producing gram-positive bacillus said thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga always being associated with a gram-positive thermophilic bacillus, which comprises providing a particulate or fibrous cellulosic material wherein at least a major amount of the cellulose component is exposed, admixing an aqueous nutrient mineral broth with said particulate cellulosic material to form a suspension having a pH ranging from about 7 to 8, said aqueous nutrient mineral broth being a source of nutrients for said mixed culture, admixing said mixed culture with said suspension, and fermenting the resulting mixture at a temperature ranging from about 50° C to about 65° C and at a pH of about 7 to 8 to produce at least a significant amount of ethanol and recovering said ethanol.

2. A process according to claim 1 wherein said cellulosic material is cellulose.

8

3. A process according to claim 1 wherein said pH ranges from 7.2 to 7.8.

4. A process according to claim 1 wherein said fermentation temperature ranges from 55° C to 65° C.

5. A process for fermenting cellulose to produce ethanol by the combined growth of a mixed culture of thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga and thermophilic ethanol-producing gram-positive bacillus, said thermophilic cellulolytic gram-negative sporocytophaga always being associated with a gram-positive thermophilic bacillus, which comprises providing a particulate or fibrous cellulosic material wherein at least a major amount of the cellulose component is exposed, admixing an aqueous nutrient mineral broth with said cellulosic material forming a suspension having a pH ranging from 7 to 8, said aqueous nutrient mineral broth being a source of nutrients for said mixed culture, admixing said mixed culture with said suspension, and fermenting the resulting mixture at a temperature ranging from about 50° C to about 65° C and at a pH of about 7 to 8 in an atmosphere which is a partial vacuum to produce at least a significant amount of ethanol, said partial vacuum being sufficient to vaporize said ethanol at said fermenting temperature, said partial vacuum vaporizing said ethanol and withdrawing said ethanol vapor from said fermentation and condensing said withdrawn ethanol vapor.

6. A process according to claim 5 wherein said partial vacuum ranges in pressure from about 100 mm Hg to about 400 mm Hg.

7. A process according to claim 5 wherein gas is flowed through said atmosphere.

8. A process according to claim 5 wherein said pH ranges from 7.2 to 7.8.

9. A process according to claim 5 wherein said cellulosic material is cellulose.

10. A process according to claim 5 wherein said fermenting temperature ranges from 55° C to 65° C.

\* \* \* \* \*

## Anexo 5: Comparación de distintos métodos para una efectiva extracción de lípidos de microalgas.

Bioresource Technology xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)



### Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae

Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh\*

Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Republic of Korea

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 7 November 2008

Received in revised form 16 March 2009

Accepted 19 March 2009

Available online xxx

##### Keywords:

Biodiesel

Cell disruption

Lipid extraction

Microalgae

#### ABSTRACT

Various methods, including autoclaving, bead-beating, microwaves, sonication, and a 10% NaCl solution, were tested to identify the most effective cell disruption method. The total lipids from *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp. were extracted using a mixture of chloroform and methanol (1:1). The lipid contents from the three species were 5.4–11.9, 7.9–8.1, 10.0–28.6, 6.1–8.8, and 6.8–10.9 g L<sup>-1</sup> when using autoclaving, bead-beating, microwaves, sonication, and a 10% NaCl solution, respectively. *Botryococcus* sp. showed the highest oleic acid productivity at 5.7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> when the cells were disrupted using the microwave oven method. Thus, among the tested methods, the microwave oven method was identified as the most simple, easy, and effective for lipid extraction from microalgae.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Global warming and the exhaustion of fossil fuels are major world-wide problems. Thus, the production of biodiesel using various materials, such as plants, microalgae, and animal fat, has been attempted as an alternative energy source (Vasudevan and Briggs, 2008). In particular, biodiesel has two main advantages, the mitigation of carbon dioxide and as a substitute for petroleum (Chisti, 2008). Plus, microalgae also have certain advantages compared to other energy crops, including a high growth rate, short growth time, high biomass production, and low land use (Milne et al., 1990).

The key processes involved in biodiesel production using microalgae are cultivation, harvest, lipid extraction (cell disruption), and the transesterification of the lipids. Although all these steps are essential, the cell disruption is particularly important, as the contents of the extracted lipids are determined according to the disruption method and device. Therefore, the appropriate cell disruption method and device are key to increasing the lipid extraction efficiency.

Various methods, such as microwaves, sonication, and bead-beating, have already been used for cell disruption. For example, microwaves that shatter cells using the shock of high-frequency waves were recently suggested as an efficient method for vegetable oil extraction (Cravotto et al., 2008; Virot et al., 2008), while sonication that cracks cell wall and membrane due to a cavitation

effect has been widely used to disrupt microbial cells (Engler, 1985; Lee et al., 1998). Plus, bead-beating that causes direct mechanical damage to cells based on high-speed spinning with fine beads has been used on both a laboratory and industrial scale (Lee et al., 1998; Geciova et al., 2002). However, the most efficient method for microalgae has not yet been settled. Accordingly, further methods of cell disruption, including autoclaving at a high temperature and pressure and the use of a 10% NaCl solution to break cell wall by osmotic pressure, were compared with microwaves, sonication, and bead-beating to determine the most efficient method.

#### 2. Methods

##### 2.1. Microalgae cultivation and harvest

*Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp. were obtained from the Biological Resource Center (BRC), Korea. The microalgae were incubated in separate 9-L jars in a BG11 medium (Rippka et al., 1979) with 0.3 v/v/m air and 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The biomass of cultured cells was harvested by centrifugation, then the wet cell mass was frozen overnight at -70 °C and freeze-dried at -70 °C under a vacuum.

##### 2.2. Cell disruption

An aliquot (0.5 g) of the dry cell biomass was blended with 100 mL of distilled water and the mixture disrupted using five different methods as follows: (1) autoclaving at 125 °C with 1.5 MPa for 5 min, (2) bead-beating using a bead beater (bead diameter

\* Corresponding author. Tel.: +82 42 860 4321; fax: +82 42 879 8103.

E-mail addresses: heemock@kribb.re.kr, envbio0720@hanmail.net (H.-M. Oh).

0.1 mm, BioSpec Products Inc., USA) at a high-speed of 2800 rpm for 5 min, (3) microwaves using a microwave oven at a high temperature (about 100 °C and 2450 MHz) for 5 min, (4) sonication using a sonicator (Sonic and Materials Inc., USA) at a resonance of 10 kHz for 5 min, and (5) osmotic shock using a 10% NaCl solution with a vortex for 1 min and maintained for 48 h.

### 2.3. Lipid extraction

The total lipids were extracted by mixing chloroform–methanol (1:1 v/v) with the samples in a proportion of 1:1 using a slightly modified version of Bligh and Dyer's method (1959). The mixtures were transferred into a separatory funnel and shaken for 5 min. The lipid fraction was then separated from the separatory funnel and the solvent evaporated using a rotary evaporator. The weight of the crude lipid obtained from each sample was measured using an electronic scale.

### 2.4. Fatty acid composition analysis

A fatty acid composition analysis was performed using a gas chromatograph (Shimadzu GC-2010, Japan). Fifty milligram samples were placed into capped test tubes, saponified with 1 ml of a saturated KOH–CH<sub>3</sub>OH solution at 75 °C for 10 min, and then submitted to methanolysis with 5% HCl in methanol at 75 °C for another 10 min. Thereafter, the phase containing the fatty acids was separated by adding 2 ml of distilled water and then recovered. The components were identified by comparing their retention times and fragmentation patterns with those for standards (Xu et al., 2001). Six fatty acids (C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3) were used as the standard materials.

### 2.5. Statistical analysis

The extracted lipid contents from the three microalgal species were compared according to the five disruption methods using a one-way ANOVA and Tukey test. The level of significant difference was at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Cell biomass

The three microalgal species were incubated until a similar biomass was produced. While *Botryococcus* sp. was cultured for 14 days, *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. were only incubated for 7 days (Table 1). The *C. vulgaris* showed the highest biomass productivity at 74.2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> on day 7, when compared to the other species. The biomass productivity of *Scenedesmus* sp. was similar to that of *C. vulgaris*. However, the biomass productivity of *Botryococcus* sp. was only 35.7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> which was about half of that of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp.

### 3.2. Comparison of lipid extraction methods

The lipid content from *Botryococcus* sp. was about 160.3 mg L<sup>-1</sup>, which was about 2 times higher than that from *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. Meanwhile, *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. showed a similar lipid content. The lipid productivity of *Botryococcus* sp. was highest at 11.5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, which was similar to that of *C. vulgaris* (Table 1). A higher lipid content was extracted from the three species when using the microwave oven method rather than the other methods (Fig. 1). The bead-beating and microwave oven methods were the most efficient among the compared methods at 28.1% and 28.6%, respectively, for *Botryococcus* sp. ( $P < 0.05$ ), while the sonication method had the lowest efficiency at 8.8%. Plus, in a previous study, the bead-beating method was also shown to extract a higher lipid content from *Botryococcus braunii* than sonication, homogenization, French press, and lyophilization (Lee et al., 1998). However, despite the efficiency of the bead-beating method, it is not easy to scale-up. For *C. vulgaris*, the autoclaving and microwave oven methods showed the highest efficiency, whereas the bead-beating method showed the lower efficiency at 7.9%. For *Scenedesmus* sp., the microwave oven method showed the highest efficiency, while the efficiencies of the bead-beating, sonication, and osmotic shock methods were similar. Although the osmotic shock method is simple and showed similar results to the bead-beating method for *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. it required a longer treatment time (48 h).

A similar lipid extraction method using microwaves has already been reported for vegetable oils and animal fats (Mahesar et al., 2008; Virost et al., 2008). Plus, this study found that, the microwave oven method was the most simple, easy, and efficient method for the tested microalgae. Furthermore, this lipid extraction method can be easily scaled-up. In conclusion, the microwave oven method was found to be the most applicable for large-scale lipid extraction from a microalgal biomass.

### 3.3. Fatty acid composition

The major fatty acid composition of the tested microalgae was determined using a GC analysis (Table 2). In a previous report (Knothe, 2008), palmitic, stearic, oleic, and linolenic acid were recognized as the most common fatty acids contained in biodiesel. In the three tested microalgae, oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2) were commonly dominant. Oleic acid was higher in *Botryococcus* sp. and *Scenedesmus* sp. at 6.68 and 10.75 mg g<sup>-1</sup> dw, respectively, while linoleic acid was highest in *C. vulgaris* at 19.79 mg g<sup>-1</sup> dw. The daily lipid productivity of each microalgal species is shown in Table 1. The productivity of oleic acid calculated based on the daily lipid productivity was highest for *Botryococcus* sp. at 5.7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. In particular, oils with a high oleic acid content have been reported to have a reasonable balance of fuel properties (Rashid et al., 2008). The properties of a biodiesel fuel, including its ignition quality, combustion heat, cold filter plugging

**Table 1**  
Biomass, lipid contents, and productivity of *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp.

Item	Algal species		
	<i>Botryococcus</i> sp.	<i>C. vulgaris</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.
Incubation days	14	7	7
Dry weight (g L <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	0.5
Biomass productivity (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	35.7	74.2	71.4
Average lipid content (mg L <sup>-1</sup> )	160.3	77.9	66.5
Lipid productivity (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	11.5	11.1	9.5
<b>Microwave oven method</b>			
Lipid productivity (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	10.2	7.4	7.4
Oleic acid productivity (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	5.7	1.2	4.2

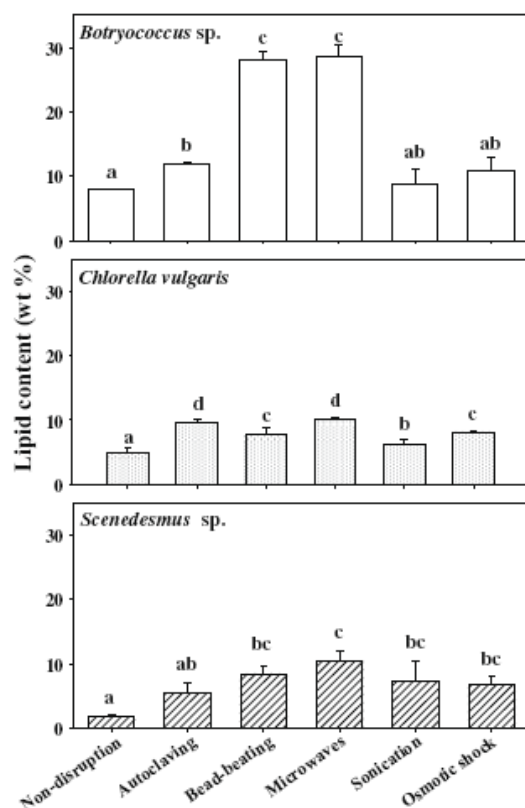


Fig. 1. Lipid extraction efficiency according to species and method. The different letters in the graphs indicate a significant difference at  $P < 0.05$ .

Table 2  
Fatty acid composition of *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus* sp.

Fatty acid	Amounts of fatty acids ( $\text{mg g}^{-1}$ dw)			
	<i>Botryococcus</i> sp.	<i>C. vulgaris</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.	
C16:1	0.58 (4.8)	ND	ND	ND
C17:0	0.10 (0.8)	0.20 (0.1)	0.13 (0.7)	(0.7)
C18:0	0.52 (4.3)	0.85 (3.4)	0.57 (3.0)	(3.0)
C18:1	6.68 (55.7)	4.07 (16.3)	10.75 (57.2)	(57.2)
C18:2	4.10 (34.2)	19.79 (79.4)	6.91 (36.8)	(36.8)
C18:3	0.02 (0.2)	0.03 (0.1)	0.40 (2.2)	(2.2)
Total	12.00 (100)	24.94 (100)	18.78 (100)	(100)

ND: not detected.

( ): Fatty acid composition (wt %).

point (CFPP), oxidative stability, viscosity, and lubricity, are determined by the structure of its component fatty esters. As such, a higher oleic acid content increases the oxidative stability for longer storage (Knothe, 2005) and decreases the CFPP for use in cold re-

gions (Stourmas et al., 1995). Therefore, among the tested microalgal species, *Botryococcus* sp. showed the highest oleic acid content, making it the most suitable for the production of good quality biodiesel.

#### 4. Conclusions

The efficiency of lipid extraction from microalgae was found to differ according to the species and extraction method. The highest lipid content was extracted from *Botryococcus* sp. and was about two-fold higher compared to that from the other species. Plus, the microwave oven method showed the highest efficiency for all the tested species. *Botryococcus* sp. showed the highest oleic acid productivity at  $5.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , when the cells were disrupted using the microwave oven method. Thus, it was concluded that the microwave oven method would appear to be the most simple, easy, and efficient method for lipid extraction from microalgae.

#### Acknowledgements

This research was supported by a grant M102KP010017-08K1601-01710 from the Carbon Dioxide Reduction and Sequestration Research Center, a 21st Century Frontier Program funded by the Korean Ministry of Education, Science and Technology.

#### References

- Bligh, E.G., Dyer, W.M., 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126–131.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason. Sonochem.* 15, 898–902.
- Engler, C.R., 1985. Disruption of microbial cells. In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, second ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 305–324.
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P., 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – a review. *Int. Dairy J.* 12, 541–553.
- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* 86, 1059–1070.
- Knothe, G., 2008. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuel* 22, 1358–1364.
- Lee, S.J., Yoon, B.D., Oh, H.M., 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12, 553–556.
- Mahesar, S.A., Sherazi, S.T.H., Abro, K., Kandhro, A., Bhangar, M.L., Van de Voort, F.R., Sedman, J., 2008. Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds. *Talanta* 75, 1240–1244.
- Milne, T.A., Evans, R.J., Nagle, N., 1990. Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape-selective zeolites. *Biomass* 21, 219–232.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G., 2008. *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99, 8175–8179.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61.
- Stourmas, S., Lois, E., Serdari, A., 1995. Effects of fatty acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 433–437.
- Vasudevan, P.T., Briggs, M., 2008. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 421–430.
- Viroi, M., Tomao, V., Gines, C., Visinoni, F., Chemat, F., 2008. Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *J. Chromatogr. A* 1196–1197, 57–64.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., Zeng, C., 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidia* sp. (Eustigmatophyta). *J. Appl. Phycol.* 13, 463–469.

## Anexo 6. Medio de cultivo en agua dulce (Guillard, In: Stein, 1979)

Guillard (comunicación personal a J. Steinn, 1973. Handbook of phycological methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge at the University Press: 448 pp.

### a. Macronutrientes:

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36.76 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	36.97 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	12.60 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.71 g/l
NaNO <sub>3</sub>	85.01 g/l
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28.42 g/l

De esta solución rotulada como a se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

### b. Micronutrientes:

Na <sub>2</sub> EDTA	4.36 g/l
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15 g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01 g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.022 g/l
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.01 g/l
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.18 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.006 g/l

De esta solución rotulada como b, se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

### c. Vitaminas:

Thiamine. HCl	0.1 mg/l
Biotin	0.5 g/l
Cyanocobalamina	0.5 g/l

De esta solución rotulada como c, se obtiene 1 ml y se le adiciona a 1 litro de agua esterilizada.

### d. Tris:

Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethano	50.g/200 ml H <sub>2</sub> O dest.
-----------------------------------	---------------------------------------

(Cuando el cultivo se encuentra axénico el tris puede reemplazarse por Glycylglycine). De esta solución rotulada como d, obtener 2 ml y adicionar al litro de agua esterilizada que se está

preparando el cultivo. Una vez preparado el medio de cultivo, se debe hacer ajuste de pH a 7.2 con HCl cuidadosamente para no obtener el pH ácido.

### **Materiales**

- Cepa inicial\*.
- Fertilizante: generalmente basado en el medio Guillard F/2 se vende comercialmente o se puede preparar según se indica en la tabla No, anexa. Así mismo se puede utilizar con buenos resultados, fertilizantes agrícolas.
- Varios contenedores, los dobles litros funcionan considerablemente bien.
- Agua Purificada
- Pequeños compresores de acuario, como fuente de aireación
- Fuente de luz, preferiblemente de amplio espectro
- Sal, medidores de pH, y jeringas (para la adición del fertilizante)

### **Método**

Se deben de lavar y esterilizar los contenedores, los cuales una vez limpios se llenan con agua purificada, se adiciona la cepa inicial, (siempre es bueno iniciar dos cultivos) agregar los fertilizantes como se describe en la tabla del medio Guillard.



Suministrar una fuente de luz de aproximadamente 16 horas de luz y 8 horas de descanso al día, así mismo agregar una línea de aire permitiendo una burbuja por unos cuantos segundos, la idea es mantener n circulación muy suave, la temperatura se debe de mantener entre los 21°-25°C.

Para iniciar el cultivo se puede realizar de distintas maneras, una es comprando la cepa, otra es extrayendo agua de un acuario, pileta, estanque etc, agregarla a un medio rico en nutrientes y con abundante luz, preferentemente solar. Al cabo de pocos días se obtendrá un agua con una alta concentración de algas, de donde se podrá comenzar el cultivo de la manera anteriormente expuesta.