



ENVIRONMENTAL
SCIENCE & PRACTICES

Environmental Sciences & Practices

ENERO - JUNIO, 2022

VOL. 1 NUM. 1



EQUIPO EDITORIAL / EDITORIAL TEAM / EQUIPA EDITORIAL**Editor Jefe / Editor in chief / Editor Chefe**

Dr. Lázaro Cremades. Universitat Politècnica de Catalunya, España Dra.

María Luisa Sámano. Universidad Europea del Atlántico, España

Secretaria / General Secretary / Secretário Geral

Beatriz Berrios Aguayo. Universidad de Jaén, España

Cristina Arazola Ruano. Universidad de Jaén, España

Sara Suarez Manzano. Universidad de Jaén, España

Editores Asociados / Associate Editors / Editores asociados

Dra. Inna Alexeeva - Universidad Europea del Atlántico, España

Dr. Eduardo García - Fundación Universitaria Iberoamericana, España

Dr. Miguel Ángel López - Instituto Politécnico Nacional, México

Dra. María Rosa Maimone - Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México

Dra. Gladys Rincón - Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador

Patrocinadores:

Funiber - Fundación Universitaria Iberoamericana
Universidad internacional Iberoamericana.

Campeche
(México)

Universidad Europea del Atlántico.

Santander (España)

Universidad Internacional Iberoamericana.

Puerto Rico (EE. UU)

Universidade Internacional do Cuanza. Cuito (Angola)

Colaboran:

Centro de Investigación en Tecnología Industrial
de Cantabria (CITICAN)

Grupo de Investigación IDEO (HUM 660) -
Universidad de Jaén

Centro de Innovación y Transferencia Tecnológica
de Campeche (CITTECAM) – México.

Environmental Sciences and Practices, Año 1, No. 1, Enero-Junio 2022, es una Publicación semestral editada por la Universidad Internacional Iberoamericana A.C., Calle 15 No. 36 entre 10 y 12, Col. Imi II, C.P. 24560, Campeche, Campeche, Tel. (981) 81-102-46, Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2021-061614175700-203, ISSN en trámite, <https://www.mlsjournals.com/Environmental-Science-Practices>, secretaria2@mlsjournals.com, Editor responsable: Dr. Miguel Angel López Flores. Responsable de la última actualización de este número, Gestora de la Revista, Cristina Arazola Ruano, Calle 15 No. 36 entre 10 y 12, Col. Imi II, C.P. 24560, Campeche, Campeche.

SUMARIO / SUMMARY / RESUMO

- Editorial 6

- Tecnologías de conservación de frutos rojos basadas en residuos de Eucalyptus Globulus..... 7
Red fruit preservation technologies based on Eucalyptus globulus residues
Lorena Madrigal Hoyos, Sandra Sumalla Cano, Iñaki Elio Pascual. Universidad Europea del Atlántico (España)

- Desarrollo de tecnologías para la reutilización sostenible del lactosuero..26
Development of technologies for the sustainable reuse of whey
Jesús Emilio Rosas, María José Acebo Garfías. Universidad Europea del Atlántico (España)

- Desarrollo de un bioplástico comestible y compostable a partir de residuos de la industria alimentaria.....42
Development of an edible and compostable bioplastic from food industry residues
María Balsa Núñez, Jorge Martínez de la Fuente. Universidad Europea del Atlántico (España)

- Obtención de biocombustibles a partir de biomasa de Chlorella vulgaris..... 57
Obtaining biofuels from Chlorella vulgaris biomass
Celia Verónica Blanco Cornelio, Asteria Narváez García, Juan Carlos Robles Heredia. Universidad Autónoma del Carmen (México)

- Obtención de ácidos grasos de metil ésteres en biomasa algal a diferentes tasas de aireación en FBR de columna69
Obtaining fatty acids of methyl esters in algal biomass at different aeration rates in column FBR
Juan Carlos Robles Heredia, Asteria Narváez García, Alejandro Ruiz Marín. Universidad Autónoma del Carmen (México) / Universidad Internacional Iberoamericana

Editorial

Iniciamos este primer número de 2022 con la ilusión de abrir un espacio de difusión de información relacionada con el medio ambiente en todas sus dimensiones. Desde el ámbito más científico, hasta los casos prácticos sustentados por una investigación aplicada en los que se haya logrado transferencia de conocimiento.

En este primer número se presenta una diversidad de temáticas importante relacionada, por un lado, con la economía circular en términos de la revalorización de residuos forestales y de la industria alimentaria. Por otro lado, con la obtención de biocombustibles y de ácidos grasos a partir de biomasa algal.

El primero de los artículos recogidos en este primer número trata sobre la reducción de los residuos no aprovechados de las plantaciones de eucalipto con el propósito de introducir en el sector de la alimentación un conservante “eco-friendly” natural y más eficiente energéticamente. Este trabajo presenta un caso de estudio en el que se planteó la validación de un producto conservante basado en esencia de eucalipto para su uso en la industria alimentaria de frutos rojos. Además, se presenta una innovación tecnológica en el análisis del rendimiento de la extracción de este aceite esencial.

A continuación, se presenta un artículo que recoge el desarrollo de nuevos métodos para el tratamiento y aprovechamiento de lactosuero ya que, dentro de la industria alimentaria, es un residuo cuyo volumen reviste cierta relevancia. Solo en España se generan 1.726.000 toneladas anuales de este residuo. Teniendo en cuenta que el lactosuero se considera un residuo altamente contaminante si se vierte directamente al medioambiente dado su contenido elevado en materia orgánica resulta doblemente importante convertirlo en subproductos de valor añadido. En este caso, se presenta el estudio llevado a cabo para la obtención de un líquido bioestimulante para el sector agrícola y un líquido de cobertura para el sector conservero a partir de este residuo.

El tercer artículo se mantiene, al igual que los anteriores, en el contexto de la economía circular y presenta la primera fase de un proyecto basado en el aprovechamiento de residuos del sector alimentario cántabro (residuos cereales de la industria de bebidas espirituosas y suero de leche) para fabricar un sustrato plástico comestible, biodegradable y compostable, como alternativa a la producción de plásticos actual. Este primer estudio permitió comprobar la viabilidad tanto técnica como económica para su futura implementación y, aunque se estima que el margen de beneficio empresarial no sería muy alto, los impactos ambientales positivos serían suficientes como para sustentar su implantación.

A continuación, se presenta el primero de los artículos que entra en el aprovechamiento de la biomasa algal. Este cuarto artículo presenta la metodología de obtención de biocombustibles a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. Esta opción, viable para evitar los agotamientos y problemas ambientales ocasionados por los combustibles fósiles, requiere de la capacidad de cultivo de esta materia prima. Por tanto, este estudio incluyó los aspectos de cultivo y reproducción de esta microalga identificada como uno de los mejores microorganismos productores de triglicéridos principalmente empleados para la obtención de biocombustibles como biodiésel y bioetanol. En este estudio, quedó demostrada la idoneidad de esta especie, aunque es necesario ahondar en la investigación del mejor método de cultivo a fin de obtener un mayor rendimiento.

Por último, en el quinto artículo se presenta la obtención de biocombustibles, pero a partir de ácidos grasos, específicamente. El biodiésel, por ejemplo, es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) por sus siglas en inglés, que puede sustituir al diésel y que se obtiene a partir de diferentes materias primas, como la biomasa. En este trabajo se analizó la variación de ciertas propiedades bioquímicas y FAME de *Chlorella vulgaris* debida al efecto de la hidrodinámica en fotobiorreactores de columna, alternando flujos de aireación de y luz blanca continua. Además, se analizó la tasa de corte para analizar la probable presencia de estrés hidrodinámico.

Dr. Lázaro Cremades, Dra. María Luisa Sámano
Editores Jefe / Editors in chief / Editores Chefe

Cómo citar este artículo:

Madrigal Hoyos, L. Sumalla Cano, S., & Elio Pascual, I. (2022). Tecnologías de conservación de frutos rojos basadas en residuos de *Eucalyptus Globulus*. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 7-25.

**TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN DE FRUTOS ROJOS
BASADAS EN RESIDUOS DE EUCALYPTUS GLOBULUS**

Lorena Madrigal Hoyos

Universidad Europea del Atlántico (España)

lorena.madrigal@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0003-1892-8758>

Sandra Sumalla Cano

Universidad Europea del Atlántico (España)

sandra.sumalla@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0001-9082-7877>

Iñaki Elio Pascual

Universidad Europea del Atlántico (España)

inaki.elio@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0001-6243-5550>

Resumen. El interés ambiental de la presente propuesta parte de la problemática para reducir los residuos no aprovechados de las plantaciones de eucalipto, así como también introducir en el sector de la alimentación un conservante “eco-friendly” natural y más eficiente energéticamente. En definitiva, el proyecto pretende convertir el residuo de las hojas de eucalipto en una materia prima de valor añadido que pueda ser empleado como conservante alimentario. Por un lado, se planteó la validación de un producto conservante basado en esencia de eucalipto para su uso en la industria alimentaria de frutos rojos. En particular, para el control del hongo *Colletotrichum acutatum* a nivel de postcosecha, en el que lamentablemente el extracto de eucalipto no mostró un efecto significativo dando valores de velocidad de crecimiento del hongo superiores al uso de ácidos orgánicos (láctico y cítrico). Por otro lado, se planteó una innovación tecnológica en el análisis del rendimiento de la extracción de esencia de *Eucalyptus globulus* de los bosques de Cantabria por diferentes métodos. El rendimiento promedio de extracción de aceite esencial demostró ser mayor por el método de destilación por arrastre de vapor.

Palabras clave: residuos forestales, eucalipto, aceites esenciales, extracción, frutos rojos.

**RED FRUIT PRESERVATION TECHNOLOGIES BASED ON
EUCALYPTUS GLOBULUS RESIDUES**

Abstract. The environmental interest of this proposal stems from the problem of reducing unused waste from eucalyptus plantations, as well as introducing a natural and more energy efficient "eco-friendly" preservative in the food sector. In short, the project aims to convert the residue of eucalyptus leaves into a value-added raw material that can be used as a food preservative. On the one hand, the validation of a preservative product based on eucalyptus essence for its use in the red fruit food industry was proposed. In

particular, for the control of the fungus *Colletotrichum acutatum* at the post-harvest level, in which, unfortunately, the eucalyptus extract did not show a significant effect, giving values of growth speed of the fungus higher than the use of organic acids (lactic and citric). On the other hand, a technological innovation was proposed in the analysis of the performance of the extraction of essence of *Eucalyptus globulus* from the forests of Cantabria by different methods. The average yield of essential oil extraction was shown to be higher by the steam distillation method.

Keywords: forest residues, eucalyptus, essential oils, extraction, red fruits.

Introducción

El eucalipto es el género botánico con más diversidad de especies todas de gran valor medioambiental, de las cuales 37 tienen interés para la industria forestal y 15 son usadas con fines comerciales. Entre la diversidad de especies se encuentran arbustos de pequeño tamaño hasta los árboles más altos del mundo (*Eucalyptus regnans* de más de 100 metros).

Actualmente el eucalipto está presente en más de 90 países, la mayoría en zonas tropicales y subtropicales, aunque existen plantaciones de gran productividad en zonas templadas de Nueva Zelanda, Chile, Argentina, Brasil, Uruguay, Sudáfrica, la Península Ibérica y Estados Unidos. Se extiende sobre más de 22 millones de hectáreas en todo el mundo (0,53% de la superficie forestal mundial), aunque sólo 13 millones de hectáreas tienen interés industrial. Las plantaciones con productividad industrial representan el 59% de los bosques de eucalipto. En España las plantaciones de eucalipto representan el 3% de la superficie forestal, lo que brinda una oportunidad de desarrollo económico y social natural y sostenible.

En cuanto al eucalipto se refiere, sólo en Cantabria la tala de estas plantaciones genera un total de 4.000 toneladas al año de residuos. El elevado coste que supone sacar del monte las ramas, rabeones y cortezas sobrantes de la tala de los eucaliptos convirtió en costumbre la quema in situ de esos restos, con el consiguiente riesgo de provocar un incendio forestal. Según datos de ENCE, de las talas de eucaliptos no se aprovechan las hojas de las que se extrae el eucaliptol: del 22% de la materia que representa la celulosa se obtiene pasta mientras que del resto (raíces, ramas, corteza, lignina) se obtiene energía. Pero alrededor del 2% de la materia residual se tiende a desaprovechar.

La presente investigación tiene como principal objetivo generar un conocimiento aplicable a la industria alimentaria para el aprovechamiento de los residuos del *Eucalyptus globulus*. En la investigación se evaluarán las diferentes alternativas de captación de residuos forestales que genera la industria maderera de Cantabria en la tala de eucalipto. A continuación, se evaluarán y optimizarán el proceso industrial de la extracción de aceites esenciales provenientes del residuo forestal. Finalmente, se caracterizará y validará el producto obtenido para su utilización como conservante en la industria alimentaria relativa a frutos rojos.

El subproducto a obtener a partir de los residuos de hojas de *Eucalyptus globulus* será una esencia de eucalipto que se aplicará como conservante.

Metodología y Resultados

Para la recolección de residuos forestales, se llevó a cabo una exploración de las empresas de la región que ofrecen servicios de tala, poda y recogida de residuos forestales, también se obtuvo información cualitativa con relación a la posible anuencia de estas empresas a participar en una iniciativa de economía circular, en la cual obtengan

remuneración por el tipo de residuos que gestionan. Actualmente, algunas de éstas obtienen provecho mediante el uso de estos residuos como biomasa para la combustión, por lo que el interés hacia esta otra alternativa estaría condicionado a la rentabilidad y la practicidad que por comparación ofrecería cada procedimiento.

Durante la ventana temporal en la que se realizó la recolección de este residuo, no fue posible formalizar la colaboración empresarial, por lo que se procedió a la recolección en sitios de propiedad privada, con previa autorización. No obstante, se estableció que las empresas involucradas deberían cumplir con los siguientes criterios: reportar actividad continuada durante el año, trabajar con árboles de la especie *Eucalyptus globulus* al menos dos veces al año, manejar un volumen de residuos correspondiente a plantaciones forestales y no correspondiente a zonas residenciales ni sitios públicos.

Los residuos forestales fueron obtenidos en Parbayón, municipio de Piélagos, con ubicación geográfica 43° 21'44''N, 3°54'09''W (Figura 1). Esta es una zona cuya principal especie de cultivo forestal es el eucalipto, específicamente la especie *Eucalyptus globulus*.

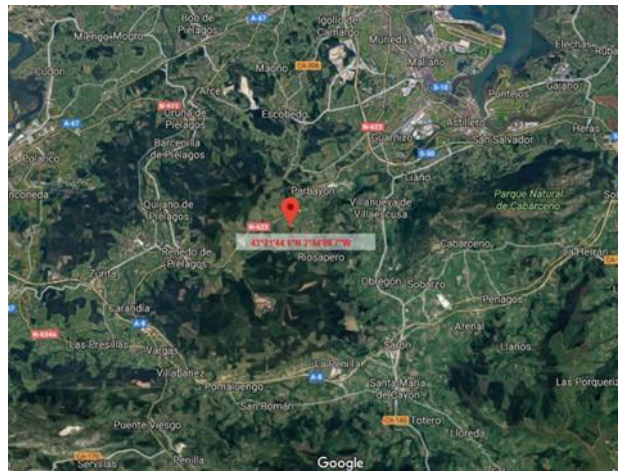


Figura 1. Ubicación geográfica de los residuos de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

Los residuos forestales fueron obtenidos “in situ” y en seguida se tomaron muestras de alrededor de 5 kg por cada lote. Se evaluaron 3 lotes en total, correspondientes a diferentes días de recolección de los residuos forestales, cada uno de éstos fue sometido a las mismas determinaciones técnicas, con la finalidad de obtener un resultado promedio y estimaciones estadísticas de la dispersión de los datos obtenidos.

Las fechas de la actividad de captación fueron: 28-07-2019, 04-08-2019, 18-08-2019.

Cada lote tuvo que ser procesado para su análisis en el menor tiempo posible, ya que el aceite esencial que se encuentra en las hojas se descompone rápidamente una vez que las hojas son separadas del árbol.

Los residuos captados fueron sometidos a un tratamiento de limpieza, para remover impurezas que pudieran alterar los resultados del estudio. La limpieza se llevó a cabo mediante la inmersión de las hojas de eucalipto en agua y haciendo movimientos de agitación para desprender las impurezas (Figura 2), seguidamente se realizó un segundo lavado con agua destilada.



Figura 2. Lavado de las hojas con agua

A continuación, las hojas frescas fueron escurridas (Figura 3) y colocadas sobre papel absorbente para retirar el agua en la superficie (Figura 4), lo que correspondió al secado inicial de las hojas, previo al proceso de secado en estufa.

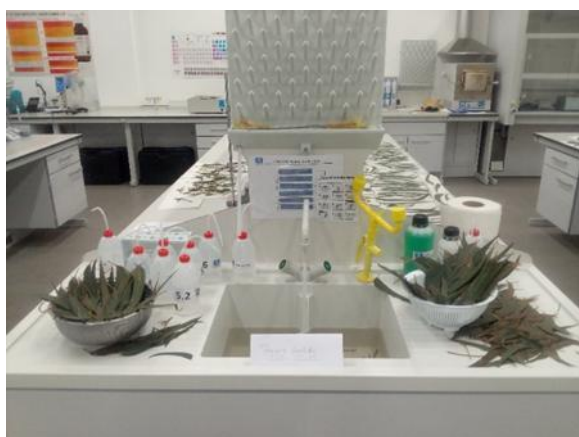


Figura 3. Lavado y escurrido de las hojas



Figura 4. Secado inicial de las hojas

El secado se llevó a cabo siguiendo las condiciones óptimas determinadas por el trabajo publicado por Moreno et al. 2010, correspondientes a 20 horas a temperatura de 40 °C. Las muestras fueron cortadas en pequeños trozos de 1 cm² aproximadamente (Figura 5) y colocadas en una estufa de secado marca Nahita modelo 631 (Figura 6).



Figura 5. Preparación de las muestras previo al proceso de secado



Figura 6. Muestras en estufa sometidas al proceso de secado

La etapa final de la fase de preparación de las muestras consistió en la molienda de las hojas (Figura 7). Este es un paso que se realiza comúnmente en los procesos de extracción de aceites esenciales y tiene el objetivo de disminuir el tamaño de partícula, lo que aumenta la superficie de contacto entre la muestra y el agua de extracción, facilitando así la transferencia de calor y masa, todo esto con el objetivo de lograr un mejor rendimiento de la operación de extracción del aceite esencial.



Figura 7. Muestras antes y después del proceso de molienda

Aceites esenciales

El fenómeno biofísico de la extracción del aceite esencial se describe como la ruptura de las estructuras histológicas de la planta (glándulas excretoras), liberando el aceite y éste se dispersa en el fluido de extracción, para posteriormente ser separado o aislado, generalmente por decantación (El Asbahani et al., 2015).

El fluido de extracción puede estar en forma líquida o en forma de vapor, pueden ser solventes orgánicos o agua. Para el caso de los alimentos, únicamente se puede utilizar agua como solvente de extracción, porque los solventes orgánicos son tóxicos y siempre existe el riesgo de encontrar trazas en el extracto del aceite esencial (Kumar et al., 2011). *Hidrodestilación*

La hidrodestilación es uno de los métodos más antiguos y sencillos para la extracción de aceites esenciales de las plantas (Meyer-Warnod et al., 1984). En este método (*Figura 8*) el material vegetal es sumergido en agua hirviendo, los vapores son condensados y el líquido obtenido es posteriormente decantado para separar el aceite esencial de la fase acuosa del condensado. El aparato de Clevenger es el que tradicionalmente se utiliza para este tipo de extracción (Rassem et al., 2016).

Esta técnica tradicional presenta importantes desventajas con relación a otras técnicas convencionales, como la de destilación por arrastre de vapor. Entre las principales desventajas se señalan los cambios químicos (hidrólisis, ciclación, entre otros) en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo y la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Peredo-Luna et al., 2009).

Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua (*Figura 9*) se lleva a cabo mediante la inyección de vapor de agua recalentado directamente en la muestra vegetal, produciendo la ruptura de la estructura vegetal y la liberación y evaporación de los componentes volátiles. Los componentes volátiles son transportados junto con el vapor de agua hasta una etapa de condensación en donde se obtiene una mezcla líquida de dos fases, acuosa y orgánica, que es separada por decantación para obtener el extracto de aceite esencial puro (fase orgánica).

Este método permite la separación de los compuestos volátiles de los no volátiles (vaporización selectiva), ya que estos últimos no son arrastrados por el vapor. Así mismo,

este método posee la ventaja de que la interacción física del vapor de agua sobrecalentado no produce cambios químicos significativos en las especies químicas del aceite esencial.

Esta técnica presenta la ventaja de permitir el uso de temperaturas menores para extraer aceites esenciales termosensibles. Para esto se requiere configurar un equipo de generación de vacío para realizar el proceso de extracción a presiones reducidas y de este modo la evaporación de los compuestos volátiles ocurrirá a menor temperatura (Peredo-Luna et al., 2009).

Extracción con disolventes

La extracción con disolventes también se conoce como extracción Soxhlet, por ser el método más utilizado. En este método, la muestra, previamente secada y molida, entra en contacto con disolventes orgánicos (alcohol y cloroformo entre los más utilizados), que son calentados para acelerar el proceso de ruptura de las estructuras vegetales y la solubilización de la esencia en el disolvente.

Una de las desventajas más importantes de este método es que todos los disolventes que se pueden emplear son tóxicos (excepto el etanol, pero éste no se utiliza por su bajo rendimiento) y por lo tanto no pueden usarse para obtener aceites esenciales destinados a ser añadidos a productos alimentarios. Otro inconveniente es que el disolvente también solubiliza y extrae otras sustancias (creas, grasas) y se obtiene al final un extracto impuro. También resulta costoso a nivel industrial y existe riesgos de explosión e incendio, por la naturaleza inflamable de los disolventes orgánicos.

De este modo, para obtener el extracto puro de aceite esencial, el producto de la extracción debe filtrarse y posteriormente se aplican condiciones de temperatura y presión para inducir la volatilización del disolvente, que además debe ser recuperado por restricciones de salud y seguridad y para ser reutilizado (Ortuño, 2006).

La extracción con disolventes por medio de métodos alternativos a Soxhlet, tienen la desventaja de requerir periodos de tiempo más largos y la mayor dificultad de separación del aceite esencial de la fase orgánica del extracto.

Evaluación de rendimiento de extracción por el método de destilación por arrastre de vapor

Los residuos de eucalipto, una vez acondicionados según lo descrito con anterioridad, se sometieron al proceso de destilación por arrastre de vapor (Figura 8) a escala de laboratorio. Para ello, se emplearon muestras de 500 g, previamente pesadas en balanza de precisión (Nahita 5062) para obtener los datos experimentales del peso del material antes de la extracción que permitieron calcular el rendimiento.

Las muestras estaban contenidas en un matraz o balón de fondo plano de 1000 ml de capacidad y el balón o matraz para la generación del vapor tenía una capacidad de 2000 ml.

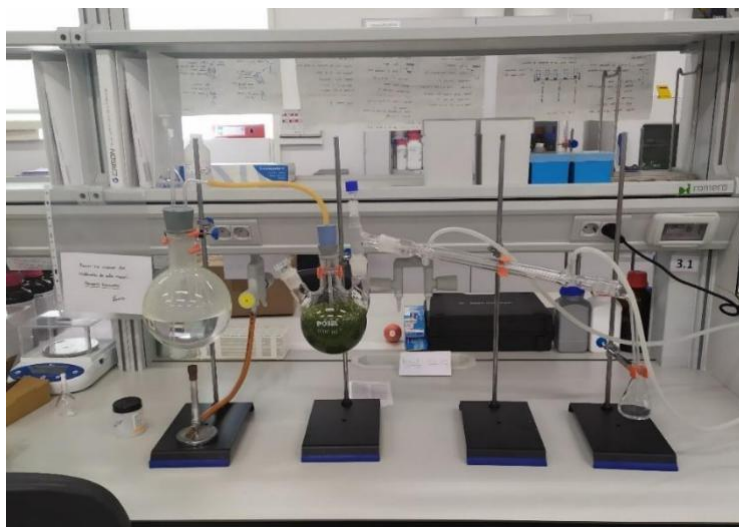


Figura 8. Método de extracción por arrastre de vapor realizado en el laboratorio del CITICAN, julio-agosto 2019

Se siguió un protocolo convencional para la extracción, bajo condiciones óptimas obtenidas mediante trabajos de investigación previos (Moreno *et al.* 2010) que corresponde a 120 minutos de tiempo de extracción, con las condiciones de sacado de las hojas de 42 °C y 20 horas.

Se realizaron tres ciclos de extracción por cada lote de residuos recolectado (tres lotes, recolectados en tiempos diferentes y en la misma localidad), y para cada método a ser comparado. Esta etapa de extracción se llevó a cabo en un tiempo aproximado de tres semanas, sin incluir las actividades de acondicionamiento de la muestra y el posterior manejo y almacenamiento del extracto. El extracto obtenido presentó un color amarillo claro, fue almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) y en ausencia de luz (Figura 9).

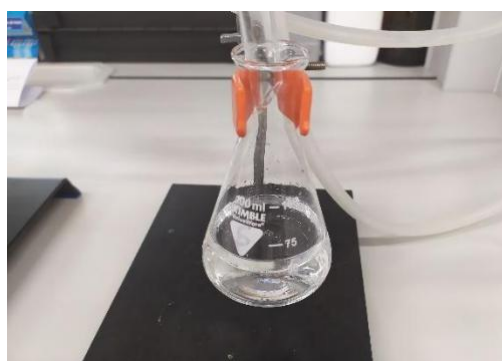


Figura 9. Extracto obtenido por el método destilación por arrastre de vapor

Una vez obtenido el extracto, se separó de la fracción acuosa mediante decantación (Figura 10), empleando un embudo de decantación (esmeril 19/26, 100 ml).

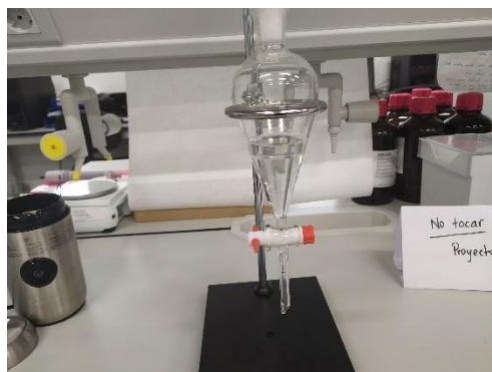


Figura 10. Separación del extracto de la fracción acuosa por decantación

El rendimiento de la extracción del aceite esencial (R), en proporción peso/peso, se determinó mediante la expresión:

$$R(\%) = \frac{m_a}{m_e} \times 100$$

Siendo m_a la masa del extracto obtenido del aceite esencial y m_e la masa de las hojas, después del proceso de secado, que fue pesada antes del proceso de destilación por arrastre de vapor, para la obtención del aceite.

El promedio de los valores obtenidos para el rendimiento de este método de extracción fue de 0,84%, con una desviación estándar de 0,08% y un coeficiente de variación del 9% (Cuadro 1).

En la bibliografía se evidencia un amplio rango de valores de rendimiento de extracción del aceite esencial mediante este método, que va desde 0,35% hasta 1,30% (Sebei et al. 2015). Hay múltiples factores que determinan esta variabilidad en los resultados, entre éstos: ubicación de los árboles, tipo de suelo, edad de los árboles, el método de secado como pretratamiento de las hojas y la estación del año (Aziz et al., 2018, Brooker et al., 2006). Por otro lado, un coeficiente de variación por debajo del 10% se suele considerar como aceptable en este tipo de investigaciones (Rao et al., 2014).

Tabla 1

Resultados rendimiento del método extracción por arrastre de vapor

Lote	Rendimiento (%)
1	0,85
2	0,91
3	0,76
Media	0,84
Desvest	0,08
C.V.(%)	9,0

Evaluación de rendimiento de extracción por el método de hidrodestilación

De modo similar al procedimiento anterior, los residuos de eucalipto fueron acondicionados según lo descrito previamente antes de ser sometidos al proceso de hidrodestilación (Figura 11). En este caso también se emplearon muestras de 500 g.

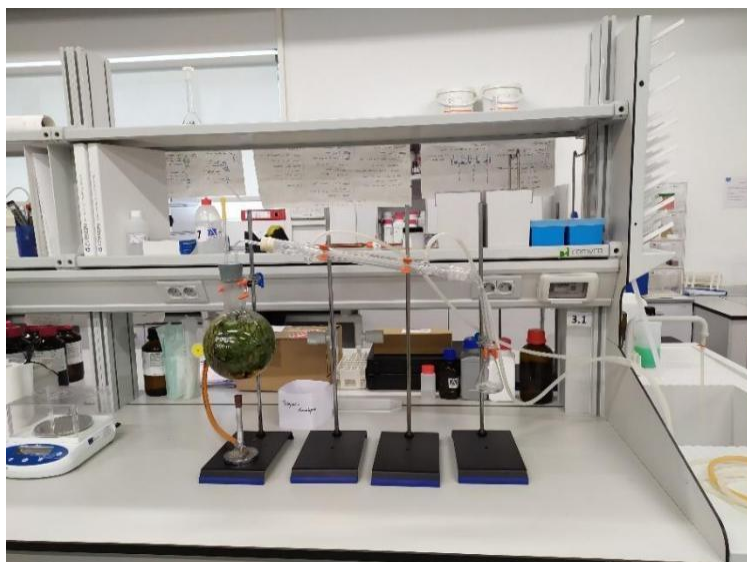


Figura 11. Método de extracción por hidrodestilación realizado en el laboratorio del CITICAN, Julio-Agosto 2019

Se siguió el protocolo de extracción utilizando las mismas condiciones del método de comparación, que fueron 120 minutos de tiempo de extracción y secado de las hojas a 42 °C por 20 horas.

De manera similar al método anterior, se recolectaron 3 lotes de hojas en la misma localidad y se realizaron tres ciclos de extracción para cada uno de estos. Esta etapa de extracción se llevó a cabo en un tiempo aproximado de tres semanas, sin incluir las actividades de acondicionamiento de la muestra y el posterior manejo y almacenamiento del extracto. De igual modo que en el método anterior, el extracto obtenido fue almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) y en ausencia de luz, antes de ser sometido al análisis fisicoquímico. Se observó un color ligeramente más oscuro que el extracto obtenido por el método anterior.

El extracto se obtuvo mediante la separación por decantación de la fracción acuosa y el extracto obtenido fue pesado para cada lote de extracción y, junto con los datos de masa inicial de las hojas, se determinó el rendimiento para cada lote, según la ecuación 1.

Los resultados de rendimiento por el método de extracción por hidrodestilación se presentan en el cuadro 2. Se obtuvo un promedio de 0,78% con una desviación estándar de 0,09% y un coeficiente de variación de 10% (Cuadro 2), éste último se considera aceptable en este tipo de investigaciones (Rao *et al.*, 2014).

Tabla 2

Resultados rendimiento del método extracción por hidrodestilación

Lote	Rendimiento (%)
1	0,75
2	0,72
3	0,87
Media	0,78
Desvest	0,09
C.V.(%)	10,2

Comparación de métodos de extracción del aceite esencial

Tal y como se evidencia en la literatura científica, existe una gran variabilidad en los resultados del rendimiento de extracción (0,35% - 1,30%) que no solo se deben a las diferencias entre los distintos métodos de extracción, sino que también obedecen a múltiples factores relacionados con las características propias del árbol o de las hojas, sin encontrar alguna correlación entre al menos una de estas variables y el rendimiento (Sebei et al., 2015; Brooker et al., 2006). Para minimizar el efecto de estos factores o variables, que pueden influir en el rendimiento, en cada método se aplicaron las mismas condiciones de temperatura y tiempo para el pretratamiento de secado de las hojas, conforme a las condiciones óptimas determinadas por estudios previos (Moreno et al., 2010). Asimismo, los lotes de muestra se obtuvieron del mismo lugar.

La característica de variabilidad del rendimiento según la ubicación del cultivo forestal de eucalipto convierte a este estudio en un aporte original de investigación, ya que en la revisión bibliográfica no se encontró ningún otro trabajo de investigación que estudiara el rendimiento de extracción de aceite esencial para cultivos forestales de eucalipto en esta región de España. De modo que se han generado datos experimentales que pueden tener utilidad en un futuro.

En la revisión bibliográfica se encontraron múltiples referencias sobre el método de extracción de destilación por arrastre de vapor, el cual es señalado como el procedimiento más viable desde el punto de vista de explotación comercial y con mayores facilidades para ser escalable a nivel industrial (Hesham et al., 2016; El Asbahani et al., 2015; Meyer-Warnod, 2004).

Si bien el promedio del porcentaje de rendimiento fue mayor para el método de extracción de destilación por arrastre de vapor, $0,85\% \pm 0,09\%$, con respecto al método de hidrodestilación, $0,78\% \pm 0,10\%$, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores. Por otro lado, la extracción por hidrodestilación es señalado en múltiples estudios como un método que presenta desventajas como cambios químicos en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo, así como la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Aziz et al.; 2018, Kumar et al.; 2011).

Por las razones expuestas, se considera que el método de extracción por destilación por arrastre de vapor es el más adecuado para los propósitos del presente proyecto. Por lo que se recomienda escoger este método para la siguiente fase de investigación, que consiste en la caracterización fisicoquímica del extracto.

Propuesta del proceso de extracción

De acuerdo con la evaluación de los diferentes métodos de extracción del aceite esencial el método seleccionado fue la destilación por arrastre de vapor. Esta propuesta ha sido fundamentada con los resultados experimentales y con el conocimiento generado en estudios previos, obtenidos de la literatura científica (Hesham et al., 2016; Meyer-Warnod, 2004).

Por otro lado, el método tradicional de extracción por hidrodestilación puede presentar la desventaja de la producción de cambios químicos del aceite esencial (Aziz et al.; 2018); el método de extracción por solventes orgánicos conlleva el riesgo de encontrar trazas del solvente en el extracto del aceite esencial, lo cual es tóxico si se encuentra en los alimentos (Kumar et al.; 2014); mientras que los métodos alternativos representan desventajas para el escalamiento del laboratorio al nivel industrial, porque involucran mayor complejidad en el diseño y requieren mayores costos de instalación y de mantenimiento (El Asbahani et al., 2015; Stateva et al., 2011).

Caracterización fisicoquímica del aceite esencial

Para la caracterización del aceite esencial obtenido mediante el método de extracción por destilación por arrastre de vapor, se siguieron los procedimientos señalados en la norma técnica española UNE 84300 para el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* de España (Asociación Española de Normalización y Certificación [AENOR], 2006).

Para la determinación de la densidad relativa del aceite esencial a 20 °C, se utilizó un picnómetro limpio y seco (Figura 12) de 3 ml de capacidad, se pesó vacío en una balanza analítica (Nahita 5062), seguidamente se llenó con el aceite esencial (que se encontraba en baño a 20 °C), tapándose y limpiándose el exceso de muestra y éste se pesó. Este procedimiento se repitió para muestras de los tres lotes del estudio. Se realizó el mismo procedimiento con agua destilada a 20 °C. Se determinó la densidad relativa del aceite esencial empleando la siguiente ecuación.

$$\rho_{rel} = \frac{m_{a.e} - m_p}{m_a - m_p}$$

Siendo ρ la densidad relativa a 20 °C, $m_{a.e}$ el peso en gramos del picnómetro con la muestra de aceite esencial, m_p el peso en gramos del picnómetro sin la muestra y m_a el peso en gramos del picnómetro con agua destilada.



Figura 12. Picnómetro 3mL para determinación de densidad relativa.

Este procedimiento se realizó siguiendo las pautas de la norma española correspondiente, para aceites esenciales (AENOR, 2000) y se obtuvieron valores para cada lote de aceite esencial que fue extraído mediante destilación por arrastre de vapor. Los resultados se presentan en el cuadro El valor promedio de densidad relativa fue de $0,91 \pm 0,01$, el cual resulta un valor dentro del rango que la norma española señala como aceptable, siendo éste entre 0,905 y 0,925.

Tabla 3

Densidad relativa obtenida para las muestras de aceite esencial

Lote	Densidad relativa
1	0,89
2	0,92
3	0,91
Media	0,91
Desvest	0,01
C.V.(%)	1,4

El índice de refracción es una propiedad definida como la razón entre las velocidades de la luz en dos medios diferentes, calculado como el cociente de los senos de los ángulos de incidencia (en el primer medio) y el ángulo de refracción (en el segundo medio). El índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando éste es mezclado o diluido con otras sustancias, por lo que éste es uno de los parámetros utilizados para evaluar la pureza del aceite esencial (Ortuño, 2006).

Se empleó un refractómetro digital (marca Hanna instruments, modelo HI96801), cuyas mediciones son arrojadas en las unidades de grados Brix, y se empleó una tabla de conversión correspondiente a 20 °C.

El cuadro 2 presenta los valores de índice de refracción obtenido para las muestras de los diferentes lotes. En promedio se obtuvo un valor de índice de refracción de 1,4601, que se encuentra dentro del rango de valores aceptables, entre 1,457 y 1,475, de acuerdo con lo indicado en la norma española UNE 84300 (AENOR, 2006).

Tabla 4

Índice de refracción de las muestras de aceite esencial

Lote	Índice de Refracción
1	1.4601
2	1.4583
3	1.4597
Media	1.4594
Desvest	0.0009
C.V.(%)	0.0648

Para el cálculo del índice de etanol, también se sigue el procedimiento respectivo según la norma española (AENOR, 2000). En éste, se utilizan mezclas etanol-agua de diferentes concentraciones volumétricas (70 y 96%) que se añaden a un volumen conocido de aceite esencial (1ml), al añadir un cierto volumen, de la mezcla de alcohol de mayor concentración, se observa una turbidez momentánea que desaparece por agitación. De manera progresiva, se continúa añadiendo la mezcla alcohólica, mientras se mide la cantidad añadida con una bureta.

Los resultados obtenidos para la solubilidad en etanol de las muestras de aceite esencial mostraron completa solubilidad para la mezcla de mayor concentración alcohólica, 96%, mientras que para la mezcla de 70% se obtuvo un valor de 7 partes de mezcla de etanol para obtener una solución clara, por cada parte (volumen) del aceite esencial.

Comparación con la norma UNE 84300:2006

El valor promedio de densidad relativa fue de 0,91 \pm 0,01 g/ml, mientras que la norma señala como aceptable los valores que se encuentren dentro de un rango de 0,905 y 0,925. El valor de índice de refracción que se obtuvo fue de 1,4594, el cual se encuentra dentro del rango de valores aceptables señalados por la norma, entre 1,457 y 1,475. Mientras que el resultado de solubilidad en etanol, 7 volúmenes o partes solubles de etanol al 70% también se encuentra dentro de los valores conformes a lo que indica la norma UNE 84300 (AENOR, 2006).

Diseño del conservante

El objetivo de esta fase de la investigación estaba orientado a lograr la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum acutatum*. Este hongo es el responsable de una enfermedad conocida como antracnosis y tiene una alta incidencia en la vida postcosecha de todos los frutos rojos, causando grandes pérdidas de producto comercial y, por tanto, pérdidas económicas para las empresas.

Este propósito se fundamenta en la baja disponibilidad de productos fitosanitarios autorizados de los que puedan disponer los productores en etapas de postcosecha, ya que es la etapa en la que el producto es adquirido por el consumidor para su consumo.

Para realizar el ensayo se utilizó la metodología propuesta por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) aplicado sobre un extracto de eucalipto comercial y el obtenido en este proyecto.

El principio de esta metodología es impregnar discos de papel de calidad de laboratorio en una solución de concentración conocida de la sustancia a testar. Dicho papel se pone sobre un medio agarificado que estimule el crecimiento del microorganismo. De esta manera se garantiza que el agente que inhiba el desarrollo es el que está inoculado en el disco.

Si esta sustancia tiene una propiedad antimicrobiana, inhibirá el desarrollo del microorganismo cerca de él. En cambio, si no posee dicha propiedad, el microorganismo crecerá en dicha zona. Por tratarse de un disco de papel, la sustancia se difunde de forma homogénea creando una circunferencia que se denomina halo de inhibición, cuyo diámetro es una estimación del poder de inhibición: a mayor diámetro mayor poder inhibitorio (Figura 13).



Figura 13. Esquema de halo de inhibición

Para realizar los ensayos, se adquirió en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) la cepa de antracnosis, pero en concreto su forma asexual o imperfecta que es la que certifica CECT, *Glomerella acutata*, y que además presenta la ventaja de que es fácilmente reproducible en condiciones de laboratorio.

Tras recibir el hongo, y tener adquirido el extracto comercial de eucalipto, al leer la etiqueta se observó que el producto era a base de un concentrado de extracto y que además tenía entre sus ingredientes alguna sustancia que igualmente pudiera presentar un efecto inhibitorio, por lo que se decidió comparar el extracto obtenido en este proyecto

con otros agentes frecuentes en el control de patógenos en postcosecha: ácido láctico y ácido cítrico (Feliziani et al., 2016; Romanazzi et al., 2009).

Ajustado el ensayo, se procedió a replicar el hongo en medio PDA (Patata-Dextrosa-Agar) y a impregnar los discos de papel en concentraciones de 0,1-5% de extracto de eucalipto, ácido láctico y ácido cítrico. En la figura 14 se puede observar los discos de papel, el trozo de hongo replicado y el micelio.

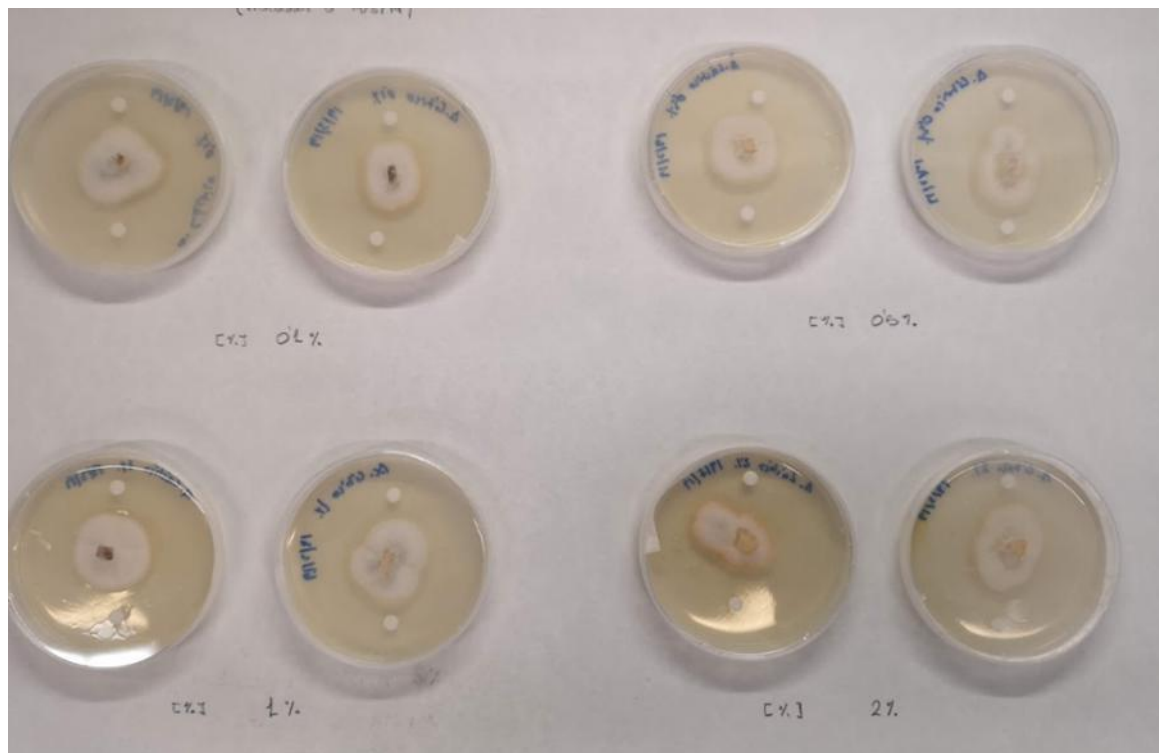


Figura 14. Trozo de hongo replicado y el micelio.

Se fue realizando un seguimiento diario del crecimiento. Como se puede observar en la figura anterior, la forma de crecimiento del micelio variaba entre circular y elíptica. En el primer caso se medía el diámetro y en el segundo el diámetro mayor. Se observó que en un periodo de 12-15 días la placa Petri estaba totalmente cubierta por el micelio del hongo. También se pudo observar que los discos no inhibían el desarrollo del hongo, creciendo el micelio por encima de los discos.

Este resultado obligó a replantear el ensayo buscando una metodología alternativa. Se optó por diluir el extracto de eucalipto, el ácido cítrico y el ácido láctico directamente en el medio PDA a las concentraciones estimadas (0,1-5%) y replicar directamente encima el hongo. En este caso los resultados sí fueron positivos, observando claramente cómo se modificaba la velocidad de crecimiento del hongo (Figura 15). El ensayo se mantuvo hasta que el micelio ocupaba toda la placa.

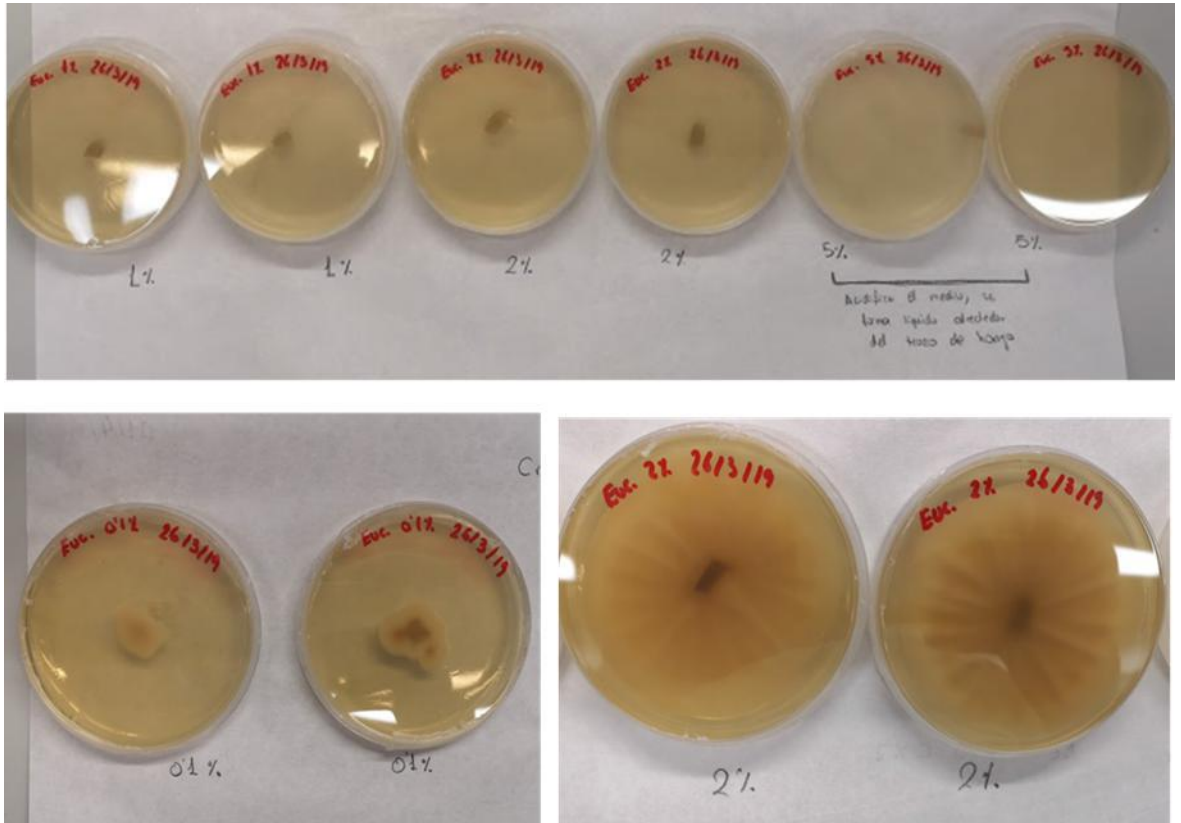


Figura 15. Velocidad de crecimiento del hongo

Las concentraciones a los que se aplicaron los tres productos fueron: 0,1%, 0,5%, 1%, 2% y 5%. En el caso de los ácidos cítrico y láctico, a partir de la concentración del 2% ya se inhibía el desarrollo del hongo, y en concreto, a partir del 1% la velocidad de crecimiento del ácido láctico era muy inferior al del ácido cítrico. En el caso del extracto de eucalipto, a partir del 2% el hongo seguía mostrando una actividad de crecimiento intensa.

En las siguientes figuras se muestran las gráficas que representan la velocidad de crecimiento de *G. acutata*. Cada línea viene definida por un tramo de ascenso cuya pendiente es la velocidad de crecimiento, expresada en mm/día, y una zona de meseta u horizontal que corresponde al momento en que la placa Petri estaba totalmente ocupada.

Para el caso de la concentración al 0,1%, el hongo creció de una manera más lenta con el extracto de eucalipto que con respecto a los dos ácidos. Con el extracto creció a un ritmo medio de 4,7 mm/día mientras que para los ácidos cítrico y láctico fue de 6,7 mm/día y 7,1 mm/día respectivamente. A pesar de tener una velocidad inferior, a partir del noveno día llenó toda la placa. Esto puede ser debido a que en el quinto y octavo día el hongo tuvo una actividad de desarrollo mayor que aceleró el proceso. No obstante, no se han encontrado referencias documentales para explicar este fenómeno.

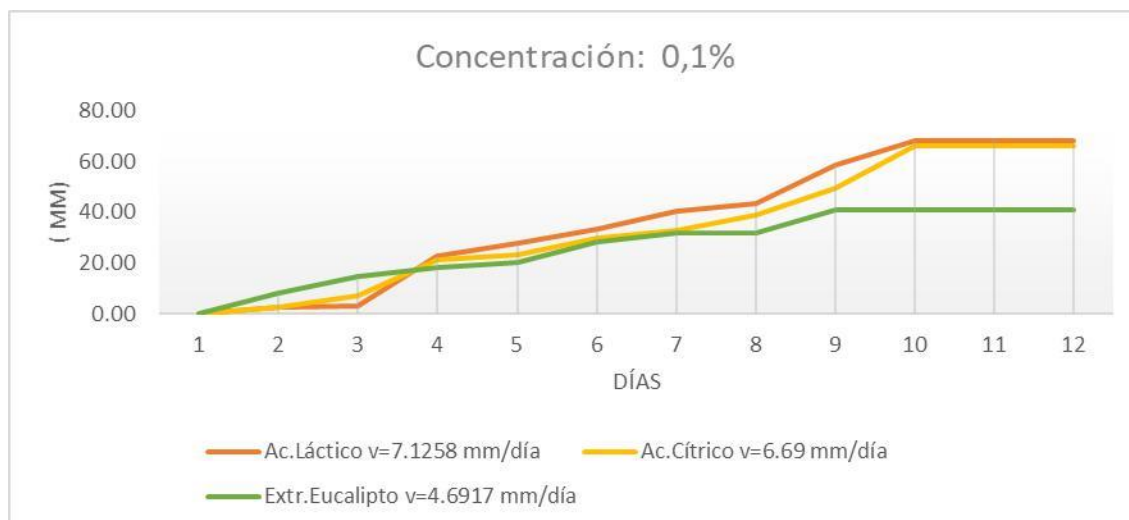


Figura 16. Velocidad de crecimiento de *G. acutata* para una concentración del 0,1% de los tres agentes de control ensayados.

Discusión y conclusiones

Si bien el rendimiento promedio de extracción de aceite esencial fue mayor para el método de destilación por arrastre de vapor con respecto al método de hidrodestilación, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores. No obstante, la extracción por hidrodestilación es señalado en múltiples estudios como un método que presenta desventajas como cambios químicos en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo, así como la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Aziz et al.; 2018, Kumar et al.; 2011). Por tanto, se considera que el método de extracción por destilación por arrastre de vapor es el más adecuado para los propósitos del presente proyecto.

Lamentablemente, el extracto de eucalipto no mostró efecto para el control del hongo *Colletotrichum acutatum* a nivel de postcosecha, dando valores de velocidad de crecimiento del hongo superiores al uso de ácidos orgánicos (láctico y cítrico).

Comparando el efecto en el color y composición en compuestos con actividad antioxidante y el pH del extracto de eucalipto, sólo se observaron diferencias significativas en la aplicación de extracto de eucalipto para el caso del pH y los compuestos fenólicos, siendo en este caso superior a los valores encontrados para los tratamientos con los dos ácidos.

Sensorialmente, los arándanos tratados con el extracto tuvieron la peor valoración.

Estos resultados, a priori negativos, invitan a una investigación más profunda en futuras ocasiones centradas en:

- Evaluar el efecto en distintos estadios de desarrollo de *Colletotrichum acutatum*
- Evaluar el efecto de control del extracto sobre bacterias que afectan al cultivo como la Roya (*Pucciniastrum vaccinii*).
- Evaluar el efecto de control del extracto sobre otros hongos de interés para el arándano: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, etc.
-

Agradecimientos

Los autores desean expresar un especial agradecimiento al Dr. Marcos Hernández Suárez por el apoyo y asesoramiento en este proyecto, poniendo a disposición su conocimiento y dedicación. Asimismo, los autores agradecen a la Sociedad para el Desarrollo de Cantabria (SODERCAN) la cofinanciación del proyecto EC18-XX-004 dentro de la Convocatoria dedicada a la Economía Circular.

Referencias

- Aris, A. & Morad, A. (2014). Effect of extraction time on degradation of bioactive compounds. *Journal Teknologi* 67(4), 63–66.
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2006. Aceite esencial, crudo o rectificado, de *Eucalyptus globulus* de España (UNE 84300).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2002. Aceites esenciales. Determinación de la miscibilidad en etanol (UNE 84153).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa a 20 °C. Método de referencia. (UNE 84156).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación del índice de acidez. (UNE 84157).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales. (UNE 84158).
- Aziz, Z., Ahmad, A., Setapar, S., Karacucuk, A., Ganash, M., Kamal, M., & Ashraf, G. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential – A review. *Current Drug Metabolism*, 19, 11-20.
- Bachir R. & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(9), 739-742.
- Boom, E., Orozco, J., Alean, J., & Rojano, B. (2018). evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales de eucaliptos cultivados en Colombia. *Información Tecnológica* 29(6), 57-66.
- Brooker, M. & Kleinig, D. (2006). *Field Guide to Eucalyptus. South-Eastern Australia, Bloomings*. Melbourne.
- Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., Blazheva, D., Toshkova, R., Gardeva, E., Yossifova, L., Hyrsil, P., & Vojtek, L. (2014). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chem*, 157, 37–44.
- El Asbahani, A., Miladi K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E., & Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., & Elaissari, A. (2015) Essential oils: from extraction to encapsulation. International. *Journal of Pharmaceutics*, 483(12), 220-243.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). <http://www.eucast.org/organization/>
- Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J., & Ippolito, A. (2016). Disinfecting agents for controlling fruits and vegetables diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 53-69.

- Hesham, R., Abdurahman, N., & Rosli, M. (2016). Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 10(16), 117-127.
- Kang, H.-C., Park, Y.-H., & Go, S.J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus: *colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol. Res*, 158, 321–326.
- Kumar, R. & Tripathi, Y. (2011). *Extraction technology of natural medicinal plants*. Forest Research Institute. Dehradun.
- Li, D., Li, B., Ma, Y., Sun, X., Lin, Y., & Meng, X. (2017). Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 84–93.
- Marcel, S. (2018). Use of essential oils as new food preservatives (Case: *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus crebra*). *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 2, 083-090.
- Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfume Flavorist*, 9, 93-104.
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria* 1, 147–154.
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejaranao, D., & Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens*. *Scientia Agropecuaria*, 3, 291-302.
- Ortuño, M. F. (2006). *Manual Práctico de Aceites Esenciales*. Aiyana.
- Rao, R., Syamasundar K., & Patel, R. (2014). Effect of method of distillation on the yield and chemical composition of *Artemisa annua* essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 26(6), 486-491.
- Romanazzi, G., Mlikota Gabler, F., Margosan, D., Mackey, B.E., & Smilanick, J.L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99, 1028–1036.
- Sebei, K., Sakoui, F., Larbi, M., & Boukhchina S. (2015). Chemical composition and antibacterial activities of seven eucalyptus species essential oils leaves. *Journal of Biological Research* 48(1), 70-83.
- Stateva, R.P. & Sovová, H. (2011). Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering* 27, 79–156.

Fecha de recepción: 30/05/2022

Fecha de revisión: 29/06/2022

Fecha de aceptación: 04/07/2022

Cómo citar este artículo:

Rosas, J. E. & Acebo Garfias, M. J. (2022). Desarrollo de tecnologías para la reutilización sostenible del lactosuero. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 26-41.

**DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS PARA LA REUTILIZACIÓN
SOSTENIBLE DEL LACTOSUERO**

Jesús Emilio Rosas

Universidad Europea del Atlántico (España)

jesus.rosas@alumnos.uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0002-8810-4925>

María José Acebo Garfias

Universidad Europea del Atlántico (España)

maria.acebo@alumnos.uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0002-5760-2905>

Resumen. En España se generan 1.726.000 toneladas anuales de lactosuero. En particular, en Cantabria se habla de una generación de lactosuero de 15.600 toneladas al año. El lactosuero se considera un residuo altamente contaminante si se vierte directamente al medioambiente dado su contenido elevado en materia orgánica. Con este proyecto se buscaba desarrollar nuevos métodos para el tratamiento y aprovechamiento de este residuo. La separación de la fracción sólida del lactosuero fermentado se puede conseguir de forma sostenible y efectiva con bentonita. Por su parte, en la composición de la fracción líquida acidificada, clarificada y esterilizada (LCE), no se observaron presencia de compuestos de interés económico para la industria láctea. En cambio, sí se detectaron oportunidades para convertirlo en subproductos de valor añadido para el sector agrícola y conservero. En el caso de la agricultura, se trabajó en la obtención de un nuevo bioestimulante capaz de aportar minerales, proteínas, regulación del pH, etc. Por otro lado, también se considera que el mercado de la industria alimentaria de conservas vegetales puede suponer un mercado objetivo que integre este subproducto como líquido de cobertura (conservador) pudiendo sustituir al vinagre.

Palabras clave: lactosuero, conservas vegetales, bioestimulante, ácido láctico

**DEVELOPMENT OF TECHNOLOGIES FOR THE SUSTAINABLE
REUSE OF WHEY**

Abstract. In Spain, 1,726,000 tons of whey are generated annually. In particular, in Cantabria there is talk of a whey generation of 15,600 tons per year. Whey is considered highly polluting waste if it is dumped directly into the environment given its high content of organic matter. This project sought to develop new methods for the treatment and use of this waste. Separation of the solid fraction from fermented whey can be achieved sustainably and effectively with bentonite. On the other hand, in the composition of the acidified, clarified and sterilized liquid fraction (LCE), no presence of compounds of economic interest for the dairy industry was observed. On the other hand, opportunities were detected to convert it into value-added by-products for the agricultural and canning sector. In the case of agriculture, work was done to

obtain a new biostimulant capable of providing minerals, proteins, pH regulation, etc. On the other hand, it is also considered that the food industry market for canned vegetables may be a target market that integrates this by-product as a covering liquid (preservative) and can replace vinegar.

Keywords: whey, vegetable preserves, biostimulant, lactic acid.

Introducción

El reto ambiental que asume el presente proyecto está enmarcado en la gestión de Residuos Industriales dentro del Plan de Residuos de Cantabria 2017-2023. El proyecto se enmarca en la reducción de residuos procedentes de la industria quesera.

La producción de queso en España es alrededor de 500.000 toneladas anuales (Sainz, 2002 y Martín P. 2021), mientras que en el mundo alcanza la cifra de 17 millones de toneladas (Martínez et al, 2020). Durante el proceso de coagulación de la leche para la obtención de queso se generan grandes volúmenes de lactosuero de quesería, que es el principal residuo, dado que de cada 100 litros de leche que entran en una quesería pueden salir 80 litros de lactosuero o visto de otro modo se generan entre 9 y 12 litros de lactosuero por cada kilo de queso fabricado. Esto hace que en el mundo se generen lo que una producción de 190 millones de toneladas de lactosuero anualmente y en España se generan 1.726.000 toneladas anuales de lactosuero y en el mundo hasta 190 millones de toneladas (Vázquez et al, 2019).

Lo que se pretende desarrollar son nuevos métodos para el tratamiento y aprovechamiento del lactosuero para convertirlo en dos subproductos de valor añadido para los sectores agrícola y de las conservas. En este caso, se percibe la oportunidad comercial para transferir las tecnologías surgidas de este proyecto a estos sectores y las queserías.

En el caso de la agricultura, se quiere facilitar al mercado un nuevo bioestimulante que además aproveche el agua presente en el lactosuero. Este mercado de los bioestimulantes es todavía un mercado muy incipiente (3,5% del terreno cultivable) pero cuenta con crecimientos anuales del 12% favorecido por la tendencia a incrementar las superficies agrarias.

Por otro lado, también se considera el mercado de la industria alimentaria de conservas vegetales que es un mercado maduro, con alrededor de 1,5 millones de toneladas anuales producidas y una facturación de 7.000 millones de euros anuales.

Finalmente, se cree que el sector de la producción de queso también puede aprovecharse de estas tecnologías dado que determinadas queserías pueden optar por adaptar sus plantas de producción para generar subproductos de valor añadido con interés comercial para terceros. En este caso, se dirige al sector de la producción de queso, el cual tiene un peso específico en España muy relevante y también en Cantabria que cuenta con 43 queserías que no están sacando el provecho económico del suero que se genera.

El objetivo de la presente investigación es aprovechar la fracción líquida del lactosuero residual de la industria quesera ya sea como líquido bioestimulante o como líquido de cobertura de conservas vegetales.

Entre las características propias del líquido bioestimulante destacan ser fuente de minerales y proteínas, así como presentar un pH ácido que permite la biodisponibilidad de otros minerales. Además, permite la reducción del gasto en agua de riego y, por tanto, de la huella hídrica.

En el caso del líquido de cobertura (conservador), la propuesta es emplear el nuevo subproducto obtenido a partir del suero para usarlo en conservas vegetales pudiendo sustituir al vinagre. Este líquido debería responder de forma positiva a los ensayos de termorresistencia, ser neutro en sabores y aromas y suponer un coste inferior en un 30%.

Para alcanzar los objetivos de la investigación se planteó evaluar las condiciones de fermentación del lactosuero residual de la industria quesera para incrementar su contenido en ácido láctico, diseñar una línea de procesado industrial para separar la fracción sólida y líquida del lactosuero, procesar y caracterizar la fracción líquida del lactosuero enriquecido en ácido láctico para su utilización en la industria conservera y procesar y caracterizar la fracción líquida del lactosuero enriquecido en ácido láctico para su utilización como bioestimulante para cultivos agrícolas.

Método

El objetivo de esta investigación es la de caracterizar química y microbiológicamente el lactosuero para identificar si existe algún parámetro que limita el desarrollo posterior de las fermentaciones.

El lactosuero fue suministrado por una empresa quesera local que utiliza leche de vaca pasteurizada para la elaboración de queso fresco (lactosuero dulce). Por tanto, no se pudo realizar la caracterización microbiológica a partir de un producto esterilizado.

Para los distintos ensayos la empresa proporcionó 20 litros en dos momentos distintos. Los valores que se muestran en el resto del artículo corresponden al valor medio global.

Para la caracterización química, además de algunos parámetros que se indican en el RD 140/2003 sobre aguas de uso alimentario (incluido los de la industria agroalimentaria), se midieron otros parámetros de calidad de la leche que pudieran afectar a las fermentaciones posteriores, como el peróxido de hidrógeno cuya presencia puede ser debido a algún problema sanitario de la vaca. Los parámetros físico-químicos que se consideraron fueron:

- Cationes y aniones: amonio, nitrito, nitrato y fosfatos.
- Minerales: nitrógeno, calcio, potasio, hierro y fósforo
- Otros: pH, ácido láctico y DBO (Demanda Biológica de Oxígeno)

Los métodos físico-químicos aplicados fueron espectrofotométricos, potenciométricos y volumétricos. En la siguiente tabla se indica con detalle la distribución de los métodos por parámetros.

Tabla 1
Características de los métodos de análisis (I)

Parámetro	Método de análisis	Observación
Amonio	Espectrofotométrico (= 690 nm)	Hipoclorito y fenol
Nitrito	Espectrofotométrico (= 543 nm)	Ácido sulfanílico y diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina
Nitrato	Espectrofotométrico (= 220 nm)	2,6-dimetilfenol
Fosfato	Espectrofotométrico (= 470 nm)	Vanadato-Molibdato
Cloruro	Espectrofotométrico (= 530 nm)	Tiocianato de mercurio (II)
Nitrógeno	Volumétrico	Método Kjeldahl
Calcio	Espectrofotométrico (= 570 nm)	Glioxal-bis(2-hidroxianilo)
Potasio	Espectrofotométrico (= 500 n)	Tetrafenil borato
Hierro	Espectrofotométrico (= 510 nm)	Triazina y tioglicolato
Fósforo	Espectrofotométrico (= 400 nm)	Vanadato-Molibdato
Peróxido de hidrógeno	Espectrofotométrico (= 528 nm)	Fenantrolina
pH	Potenciometría	-
Acidez	Volumetría	Valoración hasta cambio de color
DBO	Espectrofotométrico (= 620 nm)	Aproximación de Ramírez (1992)

Una vez identificados los métodos de análisis se procedió a calibrar los métodos espectrofotométricos mediante la determinación de:

- El rango de linealidad, que dará información de la concentración mínima y máxima del analito en la que se puede aplicar el método de determinación (ver Figura 1).
- La ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración y su bondad de ajuste. En todo momento se buscaron bondades de ajustes cercanos a 1 porque eso implica que la relación entre la concentración y la señal química es de “alta calidad”.
- El límite de detección y de cuantificación. Los mismos se midieron a partir de un blanco (agua destilada) a la que se le aplicó el mismo procedimiento como si de una muestra de lactosuero se tratara. Con dichos valores se determinaron un valor medio y desviación que se utilizaron para determinar ambos límites mediante las siguientes expresiones (ver Figura1):
 - Límite de detección: $\text{media} \pm 3 \cdot \text{desviación}$
 - Límite de cuantificación: $\text{media} \pm 10 \cdot \text{desviación}$

Se realizaron distintas soluciones a una misma concentración de cada analito, y se comparó su valor real con el teórico. Lo ideal son valores de errores lo más pequeños posibles. Se decidió poner como valor umbral máximo que el error fuera menor al 5%.

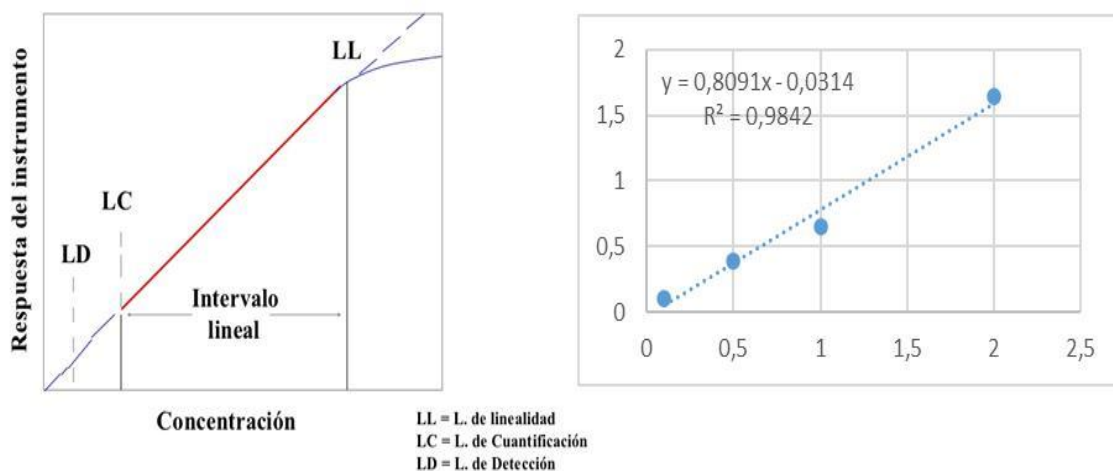


Figura 1. (A) esquema de parámetros de calibración y (B) Curva de nitrito obtenida en el proyecto.

Resultados

En la siguiente tabla se muestran los valores de la calibración de los distintos parámetros medidos mediante espectrofotometría:

Tabla 2

Características de los métodos de análisis (II).

Parámetro	Ecuación	Ajuste	Límites (mg/L)		Error (%)	
Amonio	$y = 0,0362x + 1099$	+	0,9996	1,01	3,50	2,24
Nitrito	$y = 0,8091x - 0,0314$	-	0,9842	0,11	0,15	3,42
Nitrato	$y = 0,0014x + 0,111$	-	0,9836	154,6	398,8	0,87
Fosfato	$y = 0,0217x + 0,0081$	+	0,9981	0,17	0,89	1,38
Cloruro	$y = 0,0106x + 0,2429$	+	0,9951	0,06	0,11	3,14
Calcio	$y = 0,0075x$		0,9893	3,42	7,22	1,55
Potasio	$y = 0,0004x + 0,0095$	+	0,9827	26,8	55,5	7,50
Hierro	$y = 0,2701x + 0,036$		0,9987	0,05	0,12	1,01
Fósforo	$y = 0,4474x + 0,0383$	+	0,9999	0,01	0,04	0,22
Peróxido de hidrógeno	$y = 0,1717x + 0,7587$	+	0,9739	0,01	0,02	1,69

Se puede observar cómo las bondades de ajustes son cercanas a 1 y con errores inferiores al 5%, salvo para el caso del potasio, que tuvo un error del 7,5%. Se intentó varias veces ajustar el método, pero no se pudo reducir el error, por lo que fue un parámetro que se decidió no incluir en los sucesivos análisis.

Una vez realizada la caracterización del lactosuero de partida, se procedió a reducir el pH del mismo mediante un proceso fermentativo que incrementa el contenido en ácido láctico. Las fermentaciones se llevaron a cabo con dos bacterias de gran utilización en la industria láctea:

- *L. acidophyllus*
- *E. faecium*

En las siguientes tablas se muestran los resultados del ensayo de fermentación, en términos de evolución del pH y del ácido láctico. El día 0 corresponde al día de la inoculación y por tanto al valor inicial de pH y ácido láctico del lactosuero. Estos valores de pH original están dentro del rango que la mayoría de las revisiones bibliográficas consultadas muestran para el lactosuero dulce (Villota et al, 2015; Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI, 2017).

En las siguientes tablas se recogen los datos para el caso de ambas bacterias (con suplementación del lactosuero, expresado con el símbolo + y sin suplementación, expresado con el símbolo -). Para ambas bacterias, se redujo más el pH en el medio sin suplementar y entre el día 2 de fermentación y el día 3, la disminución del mismo no fue tan alta como entre el día 1 y el día 2. Además, comparando entre bacterias, el pH más bajo se obtuvo para el caso de *L. acidophilus*, por lo que se concluyó que las características de la fermentación para el objetivo que se busca en este proyecto eran: inocular con un 2% de *L. acidophilus* directamente sobre el lactosuero y 48-72 horas de fermentación.

Tabla 3

Evolución del pH en la fermentación (+: medio suplementado, -: medio no suplementado).

Fermentación	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
<i>E. faecium</i> +	4,93	4,46	4,33	4,3
<i>E. faecium</i> -	5,4	4,55	4,28	4,22
<i>L. acidophilus</i> +	6,21	4,2	4,09	4,03
<i>L. acidophilus</i> -	6,53	4,13	3,98	3,87

Si se analizan los resultados obtenidos para la acidez, se observa como hay valores casi nulos del día 0 (por tratarse de un lactosuero dulce), y que su contenido va aumentando con los días de fermentación hasta llegar, en el caso de *L. acidophilus* sin suplementar a 12,15 g/L.

Una vez identificadas las condiciones de fermentación, se llevó a cabo una comparación de la composición química del lactosuero original y del mismo fermentado con ambas bacterias durante 48 horas (ver Tabla 4).

Tabla 4

Composición química del lactosuero original y tras la fermentación (mg/L).

Parámetro	Lactosuero original	<i>E. faecium</i>	<i>L. acidophilus</i>
Hierro	9,25± 1,12	1,71± 0,37	2,55± 1,08
Calcio	85,36± 15,11	54,18± 13,59	63,06± 22,80
Fósforo	14,86 ± 1,63	47,73 ± 2,25	47,99 ± 5,36
Amonio	173,34 ± 19,29	439,22 ± 24,41	411,94 ± 51,27
Nitrito	3,08± 0,12	0,68± 0,11	1,04± 0,35
Fosfato	235,36 ± 16,05	151,03 ± 13,28	153,51 ± 16,93
Cloruro	341,34 ± 37,20	242,33 ± 9,69	255,61 ± 12,09
Nitrógeno (%)	0,14±0,00	0,17±0,01	0,17±0,01
Peróxido de hidrógeno	3,07± 1,99	-	-

El lactosuero acidificado obtenido es una mezcla de sólidos (incluido los restos de microorganismos) y agua. El propósito fue separar ambas fracciones a fin de que la parte líquida (de interés en este proyecto) pudiera aplicarse para la generación de un líquido bioestimulante o de un líquido conservante, para ello, se procedió al desarrollo de dos ensayos de separación:

- Ensayo 1: filtración física mediante membrana y tierras inertes (como celite, zeolita u otras de interés).
- Ensayo 2: separación de fases mediante la utilización de agentes clarificantes de uso frecuente en la industria alimentaria (bentonita, albúmina, etc.) .

Antes de realizar los ensayos con un volumen alto de lactosuero fermentado, para el caso del ensayo 1 se hizo una pequeña prueba de velocidad de filtración a través de papel de filtro de laboratorio de distintos espesores (similar a como podría ser una membrana). Éste se colmataba muy pronto haciendo casi imposible mejorar el proceso incluso aplicando filtrado a vacío. Por tal motivo, se sustituyó el papel de filtro por un lecho de celite pero se observó que aunque inicialmente el proceso ocurría a una velocidad adecuada, el lecho de celite se compactaba impidiendo el paso de más lactosuero. Por otro lado, al intentar separar la fracción de sólidos del lactosuero que quedaba en la parte superior del lecho de celite, se arrastraba parte de esta tierra por lo que no era posible conseguir un producto de cierta pureza.

A raíz de estas dificultades, todos los esfuerzos se centraron en el uso de agentes clarificantes como la bentonita y la albúmina. Como primer paso se realizaron ensayos dosis-respuestas teniendo como producto de partida el lactosuero acidificado mediante *L. acidophilus* previamente pasteurizado para detener el proceso de fermentación a las 48 horas, destruyendo además toda la carga microbiológica que pudiera originar algún problema en el desarrollo posterior de la tarea.

El ensayo dosis-respuesta se realizó de la siguiente manera. En una colección de tubos falcon se puso la misma cantidad de este lactosuero acidificado y esterilizado y a cada uno de ellos se añadió por triplicado concentraciones crecientes de albúmina y bentonita.

Para evaluar la eficiencia de un producto respecto al otro se midió la pérdida de color (ver Figura 2) y la evolución del color amarillo a 420 nm, similar a como se mide dicho color en el vino. El proceso duró 24 horas y tal y como se observa en la figura 2 con la albúmina no hubo pérdida de color, todo lo contrario, a lo que se consiguió con bentonita al 5%.

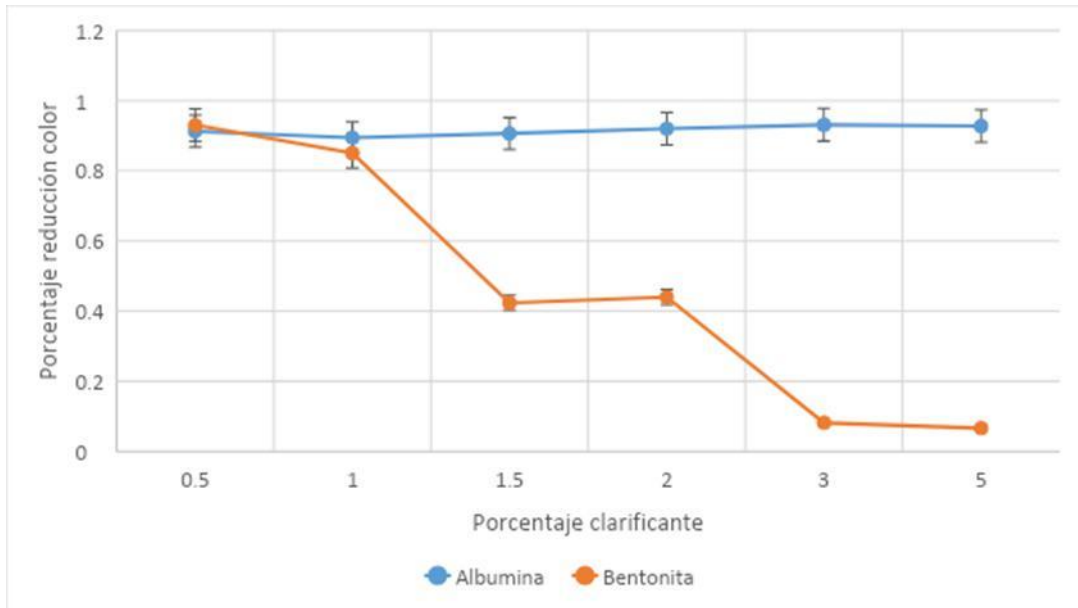


Figura 2. Pérdida de color tras la clarificación.

También se midió la cantidad de producto precipitado como medida de la eficiencia del grado de separación (ver Figura 3). Se puede ver como para el caso de la bentonita, además de una mayor disminución del color también hay un mayor porcentaje de sólidos con respecto a la albúmina.

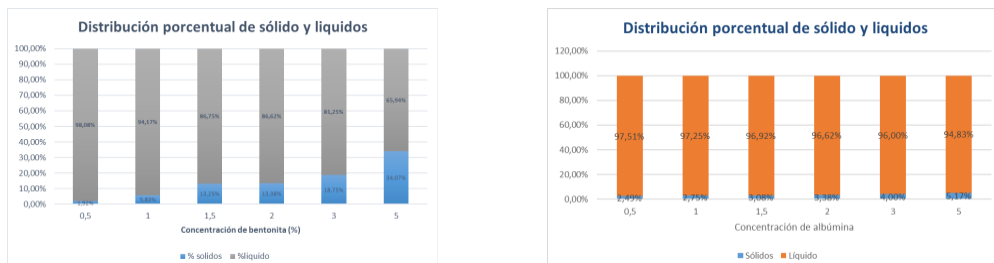


Figura 3. Estimación del porcentaje de sólidos y líquidos tras la clarificación.





Figura 4. Detalle de la separación de fases antes de la clarificación (imagen superior) y tras la clarificación (imagen inferior).

Una vez obtenido el producto clarificado se procedió a la desodorización con el propósito de eliminar las trazas de olor lácteo. Para ello se hizo pasar el lactosuero fermentado por una columna de carbón activo, aunque se observó que parte del carbón activo se arrastraba y oscurecía. Dado este resultado, se propone que, para futuras ocasiones, la mejor opción es utilizar lactosuero desnatado. Este proceso de desnatado del suero ya es habitual en algunas industrias lácteas para obtener la fracción de grasa necesaria para elaborar mantequilla de suero. Si no se dispone de este equipo, otra posible opción sería hacer clarificaciones secuenciales para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas del lactosuero y con ella se iría la fracción de grasa.

Posteriormente se hizo un análisis de los resultados obtenidos con anterioridad y de los usos a los que se les va a dar al producto final: líquido para conservas y bioestimulantes. La propuesta que se hace se muestra en la siguiente figura, que recoge algunos resultados de tareas posteriores:

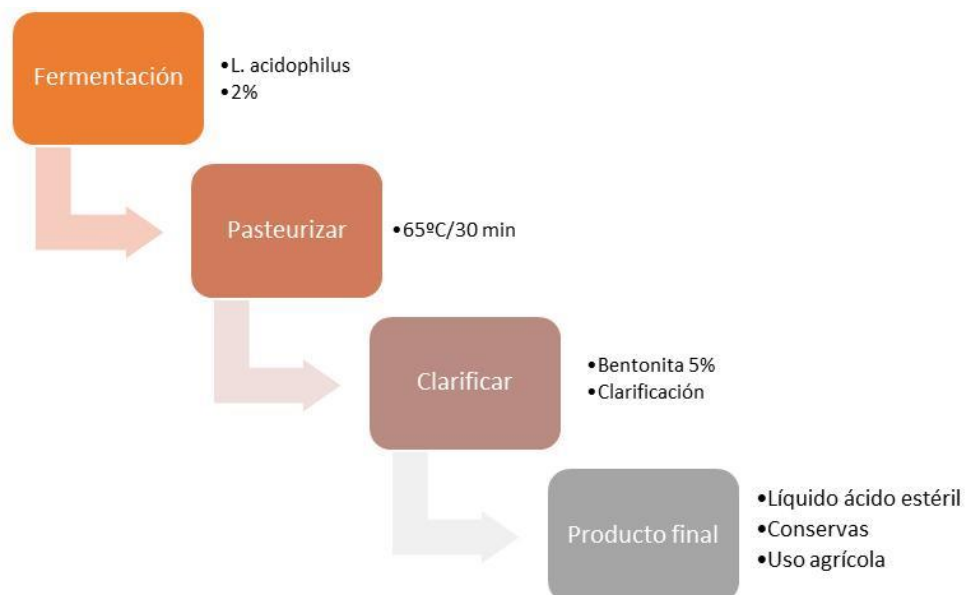


Figura 5. Esquema de tratamiento del lactosuero para obtener una fracción líquida acidificada.

- PASO 1: Partir de un lactosuero desnatado y pasteurizado o esterilizado. De esta manera se elimina desde el principio la fracción de grasa y la posible presencia de microorganismos que puedan afectar la fermentación posterior.
- PASO 2: Fermentar el lactosuero con *L. acidophilus*, inoculando a una concentración del 2% durante 48 horas. La fermentación se puede parar antes de ese tiempo dependiendo del pH final o contenido de ácido láctico.
- PASO 3: Parar la fermentación mediante una pasteurización VAT o LT-LT (65°C durante 30 minutos).
- PASO 4: Clarificar con bentonita. Aunque en este proyecto la concentración de bentonita eficaz fue del 5% durante 24 horas, lo cierto es que el tiempo de la clarificación y el porcentaje a utilizar del producto se realiza mediante ensayo dosis-respuesta porque depende del grado de turbidez del lactosuero de partida.

A partir de este punto, al lactosuero acidificado, clarificado y esterilizado (en adelante LCE) se le puede dar distintos usos:

Como líquido de conservas: se observó un doble efecto del pH del medio. Por un lado, un efecto negativo al aumentar la velocidad de descomposición de la borraja (producto utilizado para el ensayo), peor por otro lado se observó una menor oxidación de la misma, lo cual es positivo y sugiere un uso distinto al que se le ha dado en este proyecto.

Por su parte, como bioestimulante: se observó que es necesario elevar el pH para evitar respuestas de estrés en las plantas. Esto se puede realizar deteniendo la fermentación en valores de pH cercanos a 5 e incrementando el pH con algún carbonato o hidróxido. En este caso nunca puede contener sodio porque tendría un efecto perjudicial en la estructura del suelo. En este proyecto se incrementó el pH con KOH pero podría ser de interés en un futuro probar con otros agentes reguladores del pH.

En la siguiente tabla se muestra la composición química del LCE previo a su utilización como líquido de conserva y bioestimulante.

Tabla 6

Composición química del lactosuero original, tras la fermentación y tras la clarificación (LCE) (mg/L).

PARÁMETRO	Lactosuero original	<i>L. acidophilus</i>	LCE
Hierro	9,25± 1,12	2,55± 1,08	0,40± 0,03
Calcio	85,36± 15,11	63,06± 22,80	45,27 ± 3,21
Fósforo	14,86 ± 1,63	47,99 ± 5,36	22,75± 4,08
Amonio	173,34 ± 19,29	411,94 ± 51,27	122,47 ± 52,40
Nitrito	3,08± 0,12	1,04± 0,35	0,05±0,03
Fosfato	235,36 ± 16,05	153,51 ± 16,93	91,89 ± 0
Cloruro	341,34 ± 37,20	255,61 ± 12,09	183,93± 1,40
Nitrógeno (%)	0,14±0,00	0,17±0,01	0,17±0,01
Peróxido de hidrógeno	3,07± 1,99	-	1,30 ± 0,44

Se observa que la composición química del LCE respecto al lactosuero sólo acidificado con *L. acipophilus* disminuye, salvo para el caso del nitrógeno para el que

permanece constante. Esto puede ser debido a que la bentonita es una arcilla con capacidad de retención minerales (Navarro Blaya y Navarro García, 2003) y al precipitar junto con las proteínas y la grasa, arrastra consigo parte de estos compuestos. En algunos casos las pérdidas son mayores al 50% como en el hierro, fósforo, amonio, fosfato y peróxido de hidrógeno.

Asimismo, se llevó a cabo un estudio de la termorresistencia y vida útil para su aplicación en la industria conservera. El estudio de termorresistencia, destinado a determinar qué sistema de esterilización térmica de los que actualmente se aplican en la industria es compatible con las características del nuevo líquido de gobierno. Además, permitió validar si la composición del LCE puede promover el desarrollo de microorganismos y que los tratamientos térmicos convencionales sean insuficientes, por lo que haya que plantear algún tipo de ajuste en cuanto tiempos y temperaturas. Para llevar a cabo este ensayo se seleccionó *St. Aureus*. También se prepararon tres líquidos de gobierno: uno estándar (agua, cloruro sódico y acidificado), LCE y LCE suplementado con sal. Indicar que el LCE ya está acidificado por el propio proceso de fermentación.

Una vez que se reactivaron las cepas de *St. Aureus*, se procedió a inocular los tres tipos de líquido de gobierno anteriores, y se determinó si el patógeno crecía de forma efectiva o si por lo contrario las características de los tres líquidos había inhibido su desarrollo, lo cual podría conllevar a dar por positivos unos resultados cuando en realidad no lo son.

En la siguiente tabla se muestra que la inoculación con *St. Aureus* fue efectiva y que el carácter ácido o la concentración de sal no inhibía el crecimiento de la bacteria, por lo que los resultados que se obtengan serán sólo consecuencia del efecto de la combinación de la temperatura y el tiempo.

Tabla 7

Recuento de *St. Aureus* (ufc/100 μ L) en los tres tipos de líquido de gobierno.

Réplica	LCE	LCE+NaCl	Estándar
1	$9,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$1,05 \cdot 10^4$
2	$9 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$1,55 \cdot 10^4$
3	$1,25 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^4$	$1,65 \cdot 10^4$

Para el ensayo de termorresistencia se utilizaron tres tipos de tratamientos térmicos en los líquidos de gobiernos anteriores (confirmada la existencia de *St. Aureus*): pasteurización VAT o LT-LT (65°C/30 min), pasteurización HT-ST (72°C/15 s) y esterilización clásica (120°C/20 min).

Tanto para este caso como para el anterior se utilizó medio cromogénico específico para *St. Aureus*, cuyas colonias se ponen de manifiesto como puntos de color rosado/morado. Las colonias verdes se corresponden a *St. Epidermidis* que no se considera un patógeno.

Al finalizar los tratamientos térmicos, se observó que la carga de esta bacteria era prácticamente nula en los dos sistemas de pasteurización y nula en la de esterilización. No se apreció formación de color como consecuencias de reacciones de caramelización de la posible lactosa residual, lo que indica que este azúcar fue prácticamente transformado en ácido láctico. Tampoco se observó la aparición de olores indeseables. Con todo ello, se pudo confirmar que sea cual sea el sistema de tratamiento térmico que utilice una empresa de conserva, el LCE se puede utilizar.

El otro ensayo que se llevó a cabo fue el estudio de vida útil de las conservas que tengan como líquido de gobierno el LCE, comparándolo con el líquido de gobierno estándar. Se decidió no utilizar LCE suplementado con cloruro sódico porque al tener en su composición sales la información sería redundante.

Para realizar el estudio de vida útil se eligieron tres temperaturas: 5 °C, 20 °C y 5 °C (con una humedad del 60%). Para el primer caso las conservas se mantuvieron en refrigeración; el segundo caso, a temperatura ambiente y para el tercer caso, se utilizó un armario térmico con control de humedad.

Las conservas se realizaron con borraja, una hortaliza típica de Aragón que resultó ser interesante por dos motivos. Su color verde ayudó a disimular el color inicial del LCE y, además, reducía ligeramente el olor a lácteo que no se pudo eliminar durante el procesado.



Figura 6. Conserva de borraja en LCE (izquierda) y control (derecha).

En la figura 6 se puede observar la ligera turbidez inicial de la conserva con LCE respecto al control. El ensayo duró 14 días y el parámetro que se eligió para hacer el seguimiento fue la turbidez medida a 420 nm, tal y como se hace para el agua de consumo y porque es una variable que haría perder valor comercial a la conserva.

Tabla 8

Valores de la turbidez del líquido de gobierno en los distintos días considerados.

Temperatura	Tiempo (días)	Control	LCE
5°C	0	0,0583	0,0779
	4	0,0746	0,1051
	7	0,2869	0,1105
	10	0,3142	0,1676
	14	0,4722	0,2563
55°C y 60% de humedad	0	0,0583	0,0779
	4	0,4209	0,4040
	7	0,4975	0,4068
	10	0,6175	0,6175
	14	0,6813	0,6321

En la tabla 8 se observa como los incrementos de turbidez son mayores en el control que en el LCE para el caso de la temperatura a 5 °C, mientras que a 55 °C los valores son relativamente similares. Además, se observa como los valores a 55 °C son mayores que a 5 °C. Este último fenómeno es debido a que a mayor temperatura se aceleran los procesos de bioquímicos que pueden estar ligados a una mayor descomposición de la borraja por efecto del ácido láctico y, por tanto, a una mayor turbidez.

Con respecto al posible efecto bioestimulante nutricional en productos vegetales para su aplicación en la industria agrícola se analizó cómo variaba la composición del bioestimulante a lo largo del desarrollo del cultivo y la respuesta de la planta. El ensayo que se planteó para ello consistió en el ajuste del pH a 5,5 con adición de hidróxido de potasio al LCE ya que a esos valores podría haber problemas de toxicidad por el posible aluminio del medio. Teniendo esta información de partida, los ensayos posteriores implicaron la comparación entre LCE sin modificar el pH, el LCE con el pH ajustado y agua como control. Se observó que las plantas regadas con LCE sin ajustar el pH, presentaron síntomas de estrés que podrían ser debido por la toxicidad del aluminio o por desarrollarse en medio ácido, además de que las plantas entraron en una etapa de no recuperación. Esto obligó a acortar el desarrollo de la tarea. Para el ensayo se partió de plántulas de lechuga sembradas sobre substrato orgánico. El agua fue aplicada directamente a dosis de 30 ml/maceta cada 4 días hasta que se consideró que el ensayo debía finalizar por el estado que presentaban las plantas regadas con LCE directamente. En contrapartida, se pudo observar que las plantas regadas con LCE con el pH ajustado respondían muy positivamente, lo que confirmaba el efecto bioestimulante de la fracción líquida del lactosuero con fines agronómicos. Esta afirmación no sólo se basa en la observación, sino además en los valores medios de los parámetros analizados en las plántulas.



Figura 7. Estados de desarrollo de las plántulas de lechuga regadas con LCE sin ajustar el pH (superior izquierda), con agua (superior derecha) y con LCE con pH ajustado (inferior izquierda); y una comparación entre ellas (inferior derecha).

Tabla 9

Composición de algunos parámetros nutricionales de las plántulas de lechuga.

Muestra	Peso (g)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Ác			
				ascórbico (mg/100g)	Nitrógeno (%)	Calcio (mg/100g)	Fósforo (mg/100g)
Control	2,89±0,85	94,58±0,42	0,85±0,31	11,70±1,28	0,17±0,02	1,72±0,58	2,93±0,09
LCE (sin ajustar pH)	5,07±1,31	91,41±0,34	1,47±0,85	7,77±1,11	0,27±0,01	0,58±0,14	2,78±1,07
LCE (pH ajustado)	2,20±0,73	91,75±0,74	0,77±0,38	12,31±1,42	0,14±0,01	1,05±0,81	2,55±0,27

Aunque en esta etapa no se pueden comparar estos resultados con los de la bibliografía ya que las plantas no habían alcanzado la madurez comercial que es el punto donde se recolectan y se determina su composición química, es necesario destacar los siguientes resultados:

Por un lado, se observó que el contenido en minerales (determinados a través del contenido en cenizas) fue mayor en las plantas regadas con LCE de pH ajustado. Esto sugiere un mayor aprovechamiento de minerales con respecto a los otros casos, especialmente el control. Aunque este último tuvo unos mayores valores de Ca y P. La diferencia está en el contenido en nitrógeno, que ha sido mucho mayor para el caso del LCE de pH ajustado. Por otro lado, el contenido en ácido ascórbico fue menor para el caso del LCE de pH ajustado. Esto, lejos de ser un aspecto negativo, es un indicador de que la planta se encontraba en una situación de menor estrés, ya que el ácido ascórbico (vitamina C), como cualquier otro compuesto antioxidante, es sintetizado en mayor cantidad por las plantas si se encuentran estresadas. Estos resultados confirman que la fracción líquida del lactosuero, tras su procesado, puede tener una utilización agronómica positiva.

Discusión y conclusiones

A raíz de los resultados de este proyecto se puede concluir que entre las bacterias acidolácticas comparadas para llevar a cabo la fermentación del lactosuero dulce procedente de la elaboración de queso fresco de vaca, *L. acidophilus* producía el mejor resultado cuando se inoculaba a una concentración del 2% y sin requerimiento de suplementación nutricional. Produciéndose la fermentación, y la producción de ácido láctico, en 48 horas.

Por otra parte, la separación de la fracción sólida del lactosuero fermentado de la líquida se puede conseguir de forma efectiva con bentonita. Siendo necesario hacer ensayos de dosis para ajustar la cantidad exacta de dicha arcilla a emplear. Además, se ha observado que la utilización de bentonita también implica que los minerales se distribuyen entre la fracción sólida y líquida del lactosuero fermentado. La separación de la fracción sólida (rica en proteína y grasas y minerales) de la líquida (agua y minerales) mediante el uso de bentonita, afirma que esta metodología es sostenible (en términos ambientales y económicos al no emplearse procesos químicos por parte) y de fácil aplicación por parte de las pequeñas y medianas queserías.

Otra de las cosas que se ha observado es que en la composición de la fracción líquida acidificada, clarificada y esterilizada (LCE), no se observaron presencia de compuestos de interés económico para la quesería, como es la proteína o la grasa, y su composición permite ser vertida sin que produzca un problema ambiental al carecer de lactosa, grasa y proteína (compuestos responsables de su DBO).

En cuanto a la utilización del LCE como líquido de gobierno para conservas vegetales, se ha mostrado como un potencial agente capaz de ser compatible con los sistemas de tratamiento térmicos habituales presentes en las queserías (pasteurización y esterilización). Adicionalmente el LCE como líquido de gobierno para conservas vegetales, se ha mostrado como un potencial agente capaz de inhibir los procesos de oxidación enzimático en la borraja, posiblemente debido a la polifenol-oxidasa. Por último, el LCE como componente para la formulación de bioestimulantes vegetales, se ha mostrado como un potencial agente capaz de mejorar la respuesta de la planta tras un proceso de ajuste de su pH hacia valores neutros.

Agradecimientos

Los autores desean expresar un especial agradecimiento al Dr. Marcos Hernández Suárez por el apoyo y asesoramiento en este proyecto, poniendo a disposición su conocimiento y dedicación. Asimismo, los autores agradecen a la Sociedad para el Desarrollo de Cantabria (SODERCAN) la cofinanciación del proyecto EC18-XX-002 perteneciente a la Convocatoria de Economía Circular.

Referencias

- Callejas J., Prieto F., Reyes V., Marmolejo Y., Méndez M. (2012) . Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*, 22(1),11-18.
- Kreczmann B., Alonso A., Liloia M., Zamboni E., Cerutti R., Baroni D., Poluján D. (2015). Procesamiento del lactosuero: elaboración de lactosa y aprovechamiento de proteínas. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 87, 44-49.
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
- Martín, P. (2021). *Diseño y dimensionamiento de una línea con capacidad de 800 L/día para producción de queso con Denominación de Origen “Queso Zamorano” en Morales del Vino (Zamora)*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Martínez, M., Remón, D., Ribot, A., Riverón, Y., Capdevila, J.Z., Hernández, A., Peña, G.C., Martínez, A. (2020). *Evaluación de coagulante lácteo porcino en la elaboración de queso fresco artesanal*.
- Muset G., Castells, M. L. (2017). *Valorización del lactosuero*. Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
- Pérez F., Amaro I., Hernández M., Córdoba M. G. (2012) Valorización del lactosuero de quesería para su empleo como biopesticida. In *La agricultura y ganadería extremeña* (pp.161-172).
- Sainz, H. (2002). *Alimentos y bebidas con Denominaciones de Origen y distintivos de calidad*. Distribución y Consumo.

Vázquez, V.M., Gómez, L.A., López, E.J., García, E., Vela, G. (2019). Optimización del proceso de elaboración y viabilidad de bacterias probióticas en un queso untado tipo ricotta. *Revista Internacional de investigación e innovación tecnológica*, 6(36).

Villota G., Cuesta F., Flóres D., Rendon E., Toro A., Velasco D., Mariana Y. (2015). *Manejo integral del lacto-suero. Algunas aplicaciones*. Servicio Nacional de Aprendizaje

Fecha de recepción: 02/06/2022

Fecha de revisión: 27/06/2022

Fecha de aceptación: 06/07/2022

Cómo citar este artículo:

Balsa Núñez, M. & Martínez de la Fuente, J. (2022). Desarrollo de un bioplástico comestible y compostable a partir de residuos de la industria alimentaria. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 42-56.

**DESARROLLO DE UN BIOPLÁSTICO COMESTIBLE Y
COMPOSTABLE A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA**

María Balsa Núñez

Universidad Europea del Atlántico (España)

maria.balsa.n@gmail.com · <https://orcid.org/0000-0001-7844-9148>

Jorge Martínez de la Fuente

Universidad Europea del Atlántico (España)

jorge.martinez@alumnos.uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0003-1246-6708>

Resumen. El proyecto persigue el aprovechamiento de los residuos del sector alimentario cántabro (residuos cereales de la industria de bebidas espirituosas y el suero de leche), con el objeto de fabricar un sustrato plástico comestible, biodegradable y compostable, como alternativa a la producción de plásticos actual, aportando una solución a favor de la valorización de residuos industriales. Para el desarrollo del sustrato plástico comestible, se partió de los compuestos arabinosilanos y kefirán, provenientes de residuos cereales y del suero lácteo respectivamente. Se desarrollaron varias formulaciones para crear un prototipo pre-industrial del biocompuesto para el sustrato plástico comestible, asimismo, se realizó una búsqueda sobre el uso del lactosuero para la obtención de biofilm. Se elaboró un plan de explotación que evidenció la necesidad de vender 1900 kg de pellets de bioplástico al mes para asegurar la viabilidad económica del proceso. Esta producción tendría un coste unitario de 15 €/kg, inferior al precio de venta estimado de 20€/kg. Aunque se estima que el margen de beneficio empresarial no sería muy alto, los impactos ambientales positivos son suficientemente buenos como para considerar la implantación de la solución desarrollada.

Palabras clave: residuos alimentarios, plástico, bioplástico, medio ambiente.

**DEVELOPMENT OF AN EDIBLE AND COMPOSTABLE BIOPLASTIC
FROM FOOD INDUSTRY RESIDUES**

Abstract. The project pursues the use of waste from the Cantabrian food sector (cereal waste from the spirits industry and whey), in order to manufacture an edible, biodegradable and compostable plastic substrate, as an alternative to current plastic production, providing a solution in favor of the recovery of industrial waste. For the development of the edible plastic substrate, arabinosilanol and kefiran compounds were used, from cereal residues and milk whey, respectively. Several formulations were developed to create a pre-industrial prototype of the biocomposite for the edible plastic substrate, likewise, a search was made on the use of whey to obtain biofilm. An exploitation plan was drawn up that evidenced the need to sell 1,900 kg of bioplastic pellets per month to ensure the economic viability of the process. This production would have a unit cost of €15/kg, lower than the estimated

sale price of €20/kg. Although it is estimated that the business profit margin would not be very high, the positive environmental impacts are good enough to consider the implementation of the developed solution.

Keywords: food waste, plastic, bioplastic, environment.

Introducción

Debido al aumento de la población, el consumo excesivo de recursos y sus efectos negativos en el medio ambiente, en estos últimos 20 años creció el interés social hacia una economía circular, en la que la energía, la gestión de recursos, así como los patrones de producción y consumo deben considerarse. En enero del 2018 la Comisión Europea reportó que reciclar 1 millón de toneladas de plástico de origen petroquímico equivale, en términos de emisiones de dióxido de carbono, a retirar de la circulación 1 millón de vehículos. Se multiplican los anuncios por parte de los países sobre la necesidad de considerar la lucha contra el cambio climático y la contaminación, como uno de los principales desafíos actuales y futuros de nuestras sociedades (por ejemplo, la declaración de “emergencia climática” del Parlamento británico, mayo 2019.).

En particular, el 27 de marzo de 2019, la Eurocámara aprobó la directiva que prohíbe a partir de 2021, la venta de plásticos de un solo uso.

Se sabe que la solución a la contaminación por plásticos no consiste únicamente en reciclar, sino en reducir el uso, consumo y producción de materiales derivados del petróleo (OMC,2018). El uso excesivo de materias primas poco sostenibles, como el petróleo, es una de las causas principales de la contaminación del medio ambiente. En consecuencia, es preciso reevaluar la producción de bienes de consumo, con un mayor enfoque en el envasado de alimentos, uno de los mayores contaminantes (son un 18,6% de los plásticos presentes en el mar), que esta producción consuma menos energía, y que los plásticos continúen con un ciclo de vida de desperdicio mínimo o función diferente (Özdamar & Ateş, 2018).

Se han tomado medidas como la reducción, reutilización y reciclaje de los plásticos, sin embargo, el aumento de la producción sigue constante, y la reutilización y reciclaje son mínimos. Un estudio, llevado a cabo por Geyer, Jambeck y Lavender (2017) muestra que de los 6.300 millones de toneladas de plástico convertidos en residuo, solo el 9% terminó reciclado, siendo el 79 % acumulado en el medio ambiente. Es por ello que se deben plantear alternativas al uso de los plásticos de origen petroquímico.

Desde los ámbitos científicos aparecieron, a partir de los años 2000, los bioplásticos. Aquí vemos experiencias de fabricación de objetos a partir de materiales biocompostables (de origen vegetal, parcialmente vegetal o de origen fósil) como: envases y embalajes flexibles, artículos para catering, recubrimiento de papel, acolchados para la agricultura, bolsas de compra (Song et al, 2009). Hoy constituyen en Europa el 1% del total de los 335 millones de toneladas de plásticos producidas cada año y afortunadamente existe un interés creciente, especialmente hacia nuevos bioplásticos (Xu & Yang, 2012).

Se consideran bioplásticos los plásticos que son biobasados (que el material o producto es, en parte, un derivado de biomasa, es decir de plantas), o biodegradables y/o compostables (materiales susceptibles de ser transformados en sustancias naturales a partir de un proceso) o que reúnen ambas características. Están constituidos por:

- (1) materias primas de origen renovable biodegradables o no;
- (2) materia prima de origen petroquímico y biodegradable.

En la búsqueda de mejores características de estos bioplásticos, se ha explorado la combinación de elementos de naturaleza biológica, generando biocompuestos de gran interés.

Los biocompuestos son mezclas de dos biomateriales, y se fabrican para lograr un mejor rendimiento, lo cual no es posible con solo uno de los componentes.

Varias empresas han introducido mezclas de almidón y polietileno como materiales degradables para una serie de aplicaciones de corta duración, como botellas de bebidas, envases de alimentos y bolsas de plástico. Sin embargo, el impacto en el medio ambiente es negativo. Mientras que el componente de almidón puede degradarse, los residuos de polietileno permanecen en los ecosistemas y no son biodegradables.

Para poder diferenciar claramente los diferentes tipos de bioplásticos, podríamos distinguir tres tipos principales de plásticos: plásticos biobasados o de base orgánica, plásticos biodegradables y, plásticos biocompostables.

Los plásticos biobasados pueden definirse como derivados de recursos de biomasa renovables, que son en su gran mayoría biodegradables. Pueden proporcionar ventajas funcionales similares a las de los plásticos tradicionales, como sería su uso en embalajes (Song, 2009). Están constituidos por materia orgánica animal o vegetal, y muy a menudo combinados con materiales de origen petroquímico. Los plásticos de base orgánica dependen de cultivos y recursos escasos como el agua. En algunos casos, y exclusivamente si no contienen materiales procedentes de combustibles fósiles, son comestibles.

Los plásticos biodegradables se pueden fabricar a partir de recursos renovables o de combustibles fósiles (Bastoli, 2003), dado que el carácter de biodegradabilidad está relacionado con la estructura química del plástico. También proporcionan propiedades similares a los plásticos de origen petroquímico. Los plásticos biodegradables se degradan por la acción de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas, sin necesitar acción del ser humano.

Los plásticos biocompostables a diferencia de los biodegradables, implican que los materiales que los constituyen se puedan convertir en compost (abono orgánico), a través de un proceso donde interviene el ser humano, transformando el plástico a través de una maquinaria.

Así pues, este proyecto fue desarrollado para lograr el aprovechamiento de los residuos del sector agroalimentario cántabro (residuos cereales de la industria de bebidas espirituosas y suero de la leche, procedente de la producción de quesos), para la fabricación de un sustrato plástico comestible, biodegradable y compostable, como alternativa a la producción de plásticos contaminantes y no reciclables, aportando una solución a favor de la valorización de residuos industriales. Específicamente, salvado de cereales (residuo de la producción de bebidas espirituosas) y suero de leche (residuo de la producción de queso).

Métodología y Resultados

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de los dos residuos implicados en el proyecto. Para ello, se analizaron los compuestos arabinosilanos y kefirán, provenientes de residuos cereales y del suero lácteo respectivamente, ya que son los dos ingredientes principales del sustrato plástico comestible que se propone desarrollar. El tipo de caracterización se enfocó en la integración de los compuestos para la creación del sustrato.

Como primera aproximación se realizó un estudio de las alternativas para el pre-procesado de los residuos de cereal para la cual se desarrolló una investigación teórica sobre técnicas extractivas de compuestos de interés del residuo del cereal y la correspondiente identificación de procesos y equipos para optimizar el proceso extractivo. De los compuestos de interés del cereal, esta investigación se centró desde un principio en los arabinosilanos (AX). Los AX son polisacáridos que están presentes en los granos de los cereales, localizándose en el endospermo y el salvado (la aleurona, la cutícula y el pericarpio). El interés por estos polisacáridos, ya que se ha demostrado que pueden ser considerados como prebióticos.

Los AX pueden ser solubles en agua (WEAX, por sus siglas en inglés: water extractable arabinoxilanos) e insolubles en agua (WUAX, por sus siglas en inglés: water unextractable arabinoxilanos) y esta propiedad es la que se ha tenido en cuenta para ajustar el proceso extractivo.

Dado que los AX se encuentran formando parte de la hemicelulosa (Figura 1), se buscaron procedimientos de extracción de la hemicelulosa que fueran de fácil aplicación en laboratorio y que no implique: un uso elevado de reactivos, generación de residuos y una difícil aplicación en industrias verdes o sostenibles.



Figura 1. Tipos de polisacáridos

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Teniendo en cuenta los puntos anteriores, el método que se utilizó es el propuesto por Yadav y Hicks (2017) que se basa en el carácter soluble de la hemicelulosa y los AX y separa la Hemicelulosa A de la Hemicelulosa B, estando en esta última los AX. Se decidió no separar ambas fracciones porque no se encontraron referencias sobre en qué fracción estaban los AX. Cabe destacar que este proceso requiere de una etapa de centrifugado, así como el uso de reactivos como etanol e hidróxido de sodio. A nivel industrial estos requisitos son de fácil implantación. No obstante, el hecho de que el producto final quede disuelto en etanol, obligaría a implantar en la industria equipos adicionales para la evaporación y posterior recuperación de este disolvente.

Como primer paso del método propuesto es necesario llevar a cabo un tratamiento enzimático con α -amilasa. Esto es así para poder hidrolizar la amilasa y facilitar el proceso anterior. Pero como en este proyecto se parte de cereal agotado (es decir, el residuo de la industria alimentaria donde se ha extraído el almidón como fuente de azúcar), se decidió prescindir de ese proceso.

En las Figuras 2 y 3 se presentan la celulosa y hemicelulosa obtenidas de manera experimental.

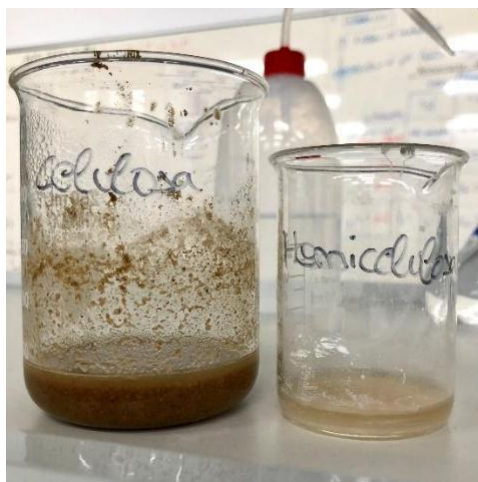


Figura 2. Celulosa y hemicelulosa extraídas.

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022



Figura 3. Celulosa (izquierda) y hemicelulosa (derecha) antes de secar.

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

La caracterización del kefirán se obtuvo a partir de procesos de fermentación y purificación del lactosuero por medio de un protocolo de producción a escala de laboratorio a partir de suero de leche y obtención de gránulos frescos de kéfir, mediante crecimiento en suero de leche esterilizado suplementado con sales de KH_2PO_4 y sacarosa, para después llevar a cabo la homogeneización, centrifugación y precipitación con etanol del kefirán.

El kefirán es el nombre que recibe una goma o polisacárido gelatinoso soluble en agua que desprende los granos de kéfir, formado por los monosacáridos glucosa y galactosa, que está dentro de la matriz del gránulo de kéfir (Piermaria et al, 2009). Este gránulo de kéfir, es un ecosistema donde habitan las bacterias y otros microorganismos responsables de la fermentación de la lactosa hasta ácido láctico.

La metodología para su obtención es la descrita por Joe Dailin et al. (2016) ligeramente modificado. Dicha metodología se basa en hacer crecer el kéfir en leche, e identifica el kefirán

como el polisacárido gelatinoso que recubre cada gránulo, haciendo posteriormente varias propuestas para su aislamiento y purificación.

Tras un análisis de dicho proceso se observó que el mismo requiere de unos factores que hace complicado el escalado de la metodología hacia una industria verde o sostenible. Esos factores eran:

- Se requiere leche, lo cual no es un subproducto.
- Se requiere volúmenes grandes de disolventes para el lavado y aislamiento del kefirán.
- El proceso de purificación igualmente necesita de una metodología y tecnología que no justifican la cantidad de residuo que genera y su posterior gestión.
- Siendo estos los factores limitantes, se planteó la siguiente modificación para salvar dichos inconvenientes:
- En lugar de emplear leche, se empleó lactosuero residual de la industria quesera, con lo cual se trabaja con un subproducto. Este lactosuero se enriqueció con lactosa para que se pudiera llevar a cabo la fermentación, el paso de lactosa a ácido láctico.
- En lugar de aislar el kefirán, se utilizó el gel formado por el propio proceso de fermentación como parte del biofilm. De esta manera no se genera residuo alguno (Figura 4).

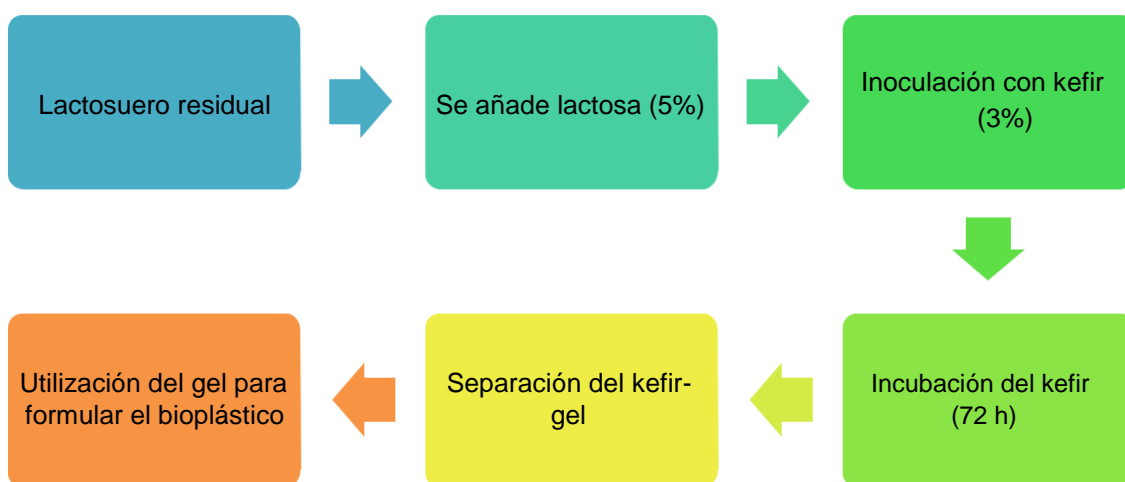


Figura 4. Proceso de obtención de gel para biofilm a escala de laboratorio

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Una vez separado el kéfir del gel, el mismo puede ser utilizado para otro proceso de inoculación y fermentación posterior, por lo que se trata de un proceso cíclico donde no genera residuos. Respecto a la lactosa, es un azúcar de fácil adquisición en dosis industriales. La Figura 5 muestra el gel final que se obtiene tras las 72 horas de fermentación.



Figura 5. Kéfir obtenido a partir de lactosuero fermentado

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

La inoculación del Kéfir se hizo al 3% sobre lactosuero enriquecido con lactosa al 5%. Por experiencias previas de proyectos llevados a cabo con el lactosuero, se sabe que su composición en nitrógeno proteico y no proteico, así como su composición mineral, no requiere ajuste de la composición química para facilitar el desarrollo de ningún microorganismo. La Tabla 1 muestra los resultados de su análisis, el cual se hizo sobre el lactosuero original. Tras el proceso fermentativo se midió el contenido de lactosa residual, pH y ácido láctico, parámetros que más pueden condicionar el uso posterior (Tabla 2)

Tabla 1

Composición inicial del lactosuero

Parámetro	<i>L. acidophilus</i>
Fosfato (mg/L)	154
Proteína (mg BSA/mL)	0,7
Calcio (mg/L)	62
pH	6,9
Lactosa (%)	0,38

Nota. Fuente: Elaboración propia, 2022

Tabla 2

Composición final del lactosuero fermentado con kéfir

Parámetro	Valor
pH	4,39
Láctico (%ácido láctico)	1,50
Lactosa (%)	0,20

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

La separación del kéfir del gel se realizó aplicando la filtración secuencial. Primero por filtros de mayor diámetro y luego por diámetros menores. En este caso, la caracterización microbiológica no fue considerada pertinente, porque se trata de un lactosuero pasteurizado. Hay que indicar que se trabajó siempre con lactosuero dulce desnatado.

La segunda caracterización fue de los residuos de cereales en bruto. Para ello, se realizaron procesos de lavado, secado y triturado del residuo de cereal para la obtención de arabinosilanos. En esta fase se aplicó la metodología descrita en la anteriormente y se cuantificó el volumen de celulosa/hemicelulosa y se caracterizó con una escala hedónica el grado de viscosidad-polimerización que se obtuvo en cada condición de trabajo (Tabla 3). El diseño experimental consistió en modificar las temperaturas y los tiempos del tratamiento alcalino para separar la celulosa de la hemicelulosa del método descrito por Yadav y Hicks (2017).

Los ensayos se realizaron con 0,5 g de cereal degastado (Figura 6) que se disolvieron en 10 ml de NaOH 2,3 N y sometido a tratamiento térmico (70°C y 40°C en distintos ensayos). Se decidió no precipitar la hemicelulosa a fin de evitar un nuevo residuo y porque al estar en medio líquido permitiría ver si tiene capacidad espesante o no. La capacidad espesante se determinó dejando enfriar la suspensión de la hemicelulosa a temperatura ambiente y observando el resultado final. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

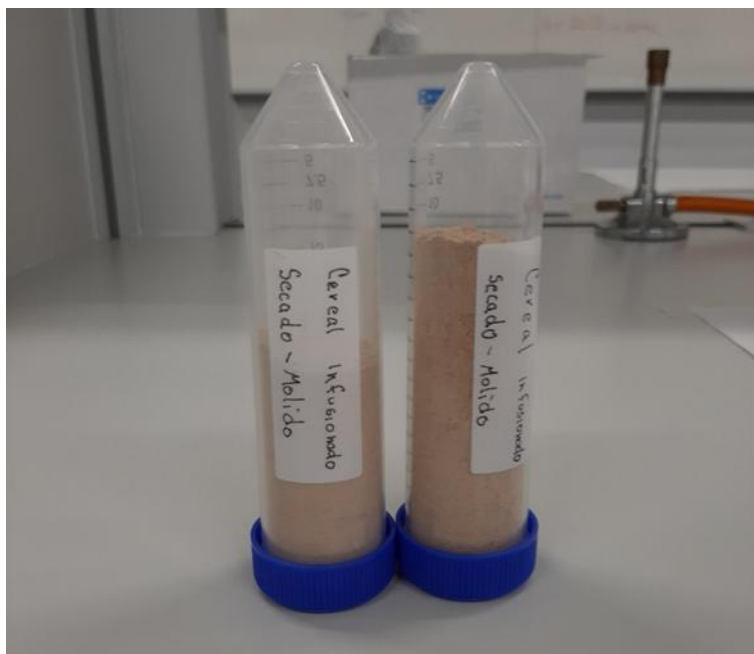


Figura 6. Harina de cereal degastado

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Tabla 3
Resultados del tratamiento alcalino inicial

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (ml)	Capacidad espesante
70	60	-	-	Muy alta
40	60	0,3	8	Media

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

A 70°C se formó una masa de alta viscosidad que no permitió separar las dos fracciones, por lo que se decidió repetir el ensayo a 40°C modificando los tiempos de duración del tratamiento alcalino. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4
Resultados del tratamiento a 40°C

Tiempo (min)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (ml)	Capacidad espesante
60	0,3	8	Media
120	0,4	7	Alta
180	0,5	6	Alta

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Tras 12 y 180 min, el sobrenadante final espesaba al enfriarse, sin llegar al nivel observado cuando la temperatura era de 70°C. En cambio, el tratamiento 40°C/60 min permite diferenciar muy bien ambas fracciones y no se produce ningún efecto de solidificación al enfriarse, lo cual permite conservar las muestras y dar tratamientos posteriores de concentración y purificación.

Por último, se realizó la selección y evaluación del biocompuesto, proceso que se realizó en tres etapas. Primero se realizaron distintas formulaciones adaptadas a las observaciones recogidas en las actividades anteriores. Como resultado de ellas, no se realizó un aislamiento de los arabinosilanos, en su lugar se utilizó la suspensión de hemicelulosa donde se encuentran estos compuestos y otros que pueden facilitar la formación de la goma o biofilm. Así no se genera ningún residuo. Del mismo modo, en lugar de utilizar el kefirán se utilizó el gel formado por la fermentación del lactosuero.

Específicamente, el diseño experimental consistió en comparar las siguientes formulaciones:

Control: almidón como polisacárido estructurante, acidificación con HCl 0,1N y agente de ajuste de la viscosidad formado por la mezcla de glicerina 50% y NaOH 2M en proporción 1:1,25.

Formulación 1: hemicelulosa procedente harina de cereal agotado, lactosuero fermentado (al estar acidificado sustituye al HCl) y glicerina 50%. No se aplica NaOH 2M porque ya está presente en la suspensión de hemicelulosa.

Tras la mezcla se aplicó un tratamiento térmico en microondas. El calor permite que se polimerice la formulación y se obtenga un film. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Comparación de formulaciones (I)

<i>Film</i>	<i>Polimerización</i>	<i>Viscosidad</i>
Control	Sí	Adecuada
Formulación 1	Muy baja	-

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Tras un primer ensayo, se observó que la Formulación 1 tenía un grado de polimerización muy baja (Figura 7).

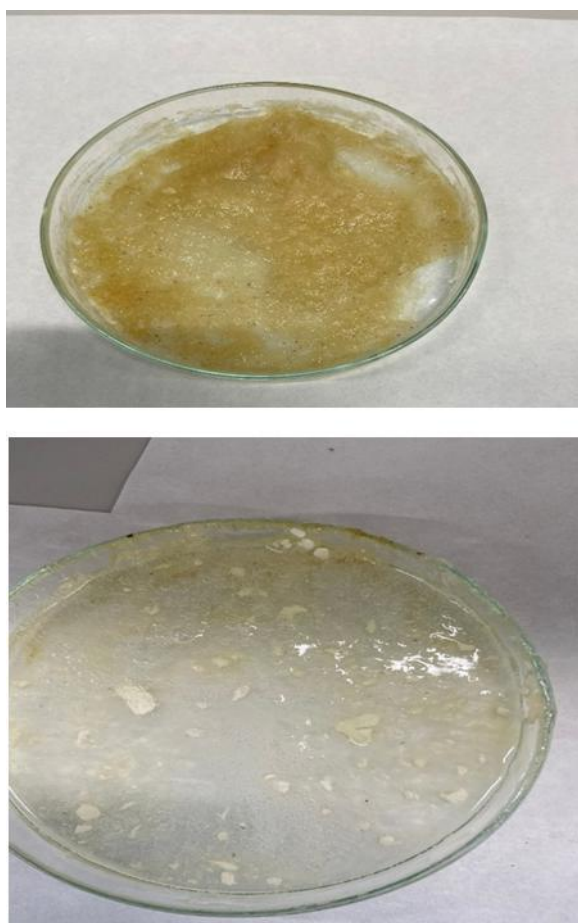


Figura 7. Comparación del biofilm control (superior) con el de la formulación 1 (inferior)

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Un análisis de resultados llevó a plantear la teoría que la cantidad de hemicelulosa es insuficiente para formar el film, por lo que se plantearon dos posibles soluciones: a) enriquecer con almidón la formulación y b) aumentar el contenido de hemicelulosa.

Elegir esta segunda opción tiene un inconveniente práctico a la hora de implantar el proceso en una industria y es el requerimiento en reactivos y aplicación de calor necesario para obtener la hemicelulosa, aparte de requerir de una centrífuga industrial para separarlo de la celulosa. Por todo ello, se optó por la primera vía mediante la suplementación con almidón (Figura 8).

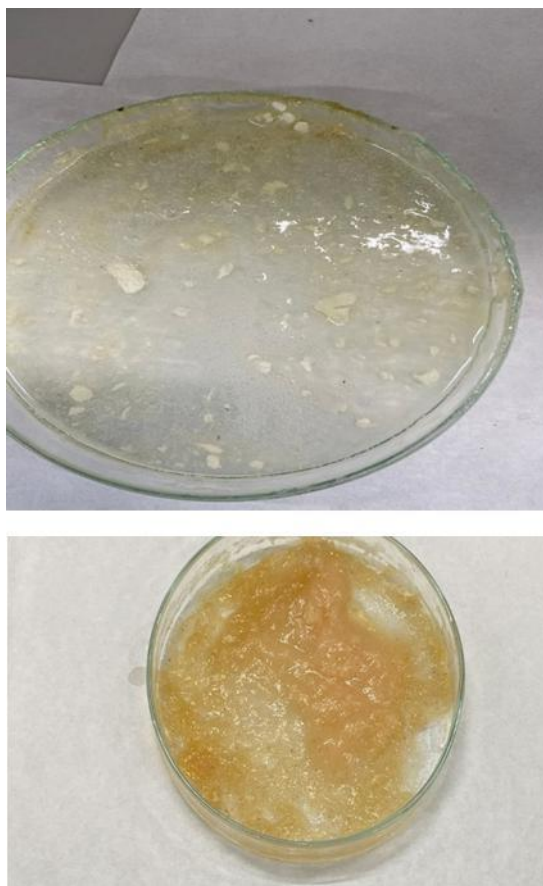


Figura 8. Comparación de la formulación 1 (superior) con la misma formulación suplementado con almidón 2% (inferior)

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

El almidón es un producto de fácil adquisición, muy frecuente en la industria alimentaria y de bajo coste, y no tendría ningún impacto tecnológico ni de generación de residuos. Tras esta primera comprobación, a las nuevas formulaciones se les añadió un 2% de almidón. Los resultados obtenidos mostraron muy buena estructura y comportamiento igual que el control al cabo de los días, es decir, se mantenía su consistencia.

A partir de estos resultados, se planteó la obtención de pellets de bioplásticos ya que esta forma es la habitual en la que la industria del plástico recibe su materia prima de partida y que tras un proceso de extracción le da la forma que desee.

De todos estos compuestos, la fracción del suero fermentado aporta calcio (por su propia composición) que es un elemento estructurante que en combinación con el alginato tiene la capacidad de formar esferas, es decir, los pellets que se desean obtener. Se realizó un ensayo dosis-respuesta de ensayo-error para determinar qué cantidad de alginato añadir a la formulación, tomando la decisión en base a las características finales del pellet, tal y como se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6

Características de los pellets a distintas dosis de alginato

Alginato (%)	Características del biofilm
0,5	No se forman pellets.
1	Se aprecia formación de pellets, pero en una cantidad muy limitada.
1,25	Se forman pellets inestables con el tiempo. Al perder su estructura no fue posible evaluar si crecían o no microorganismos.
1,5	Buena densidad, buena formación del pellet y estable con el tiempo. No hay proliferación de microorganismos.

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Para la obtención de los pellets se cargó una bureta con la formulación de trabajo y se dejó caer sobre un lecho de alginato con agitación y calor para favorecer el proceso de solidificación de las esferas a pellets (Figura 9).

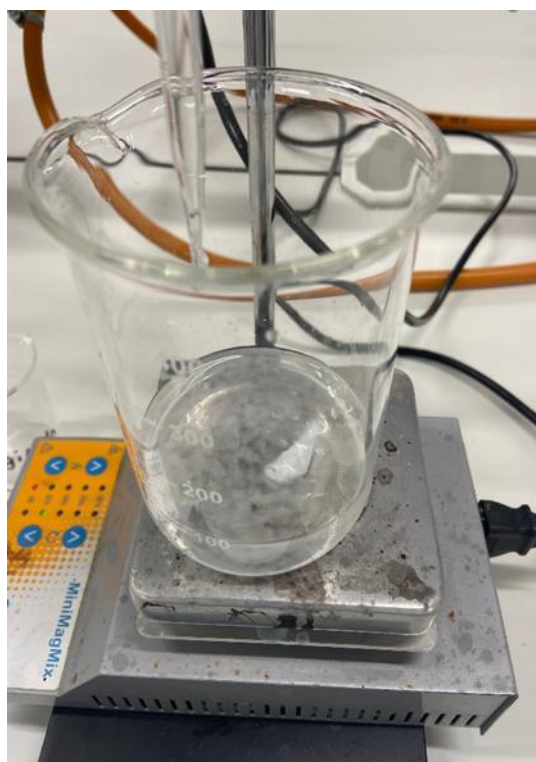


Figura 9. Formación de esferas o pellets en laboratorio

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Así pues, la Figura 10 resume el protocolo final diseñado para la obtención de pellets de bioplástico.

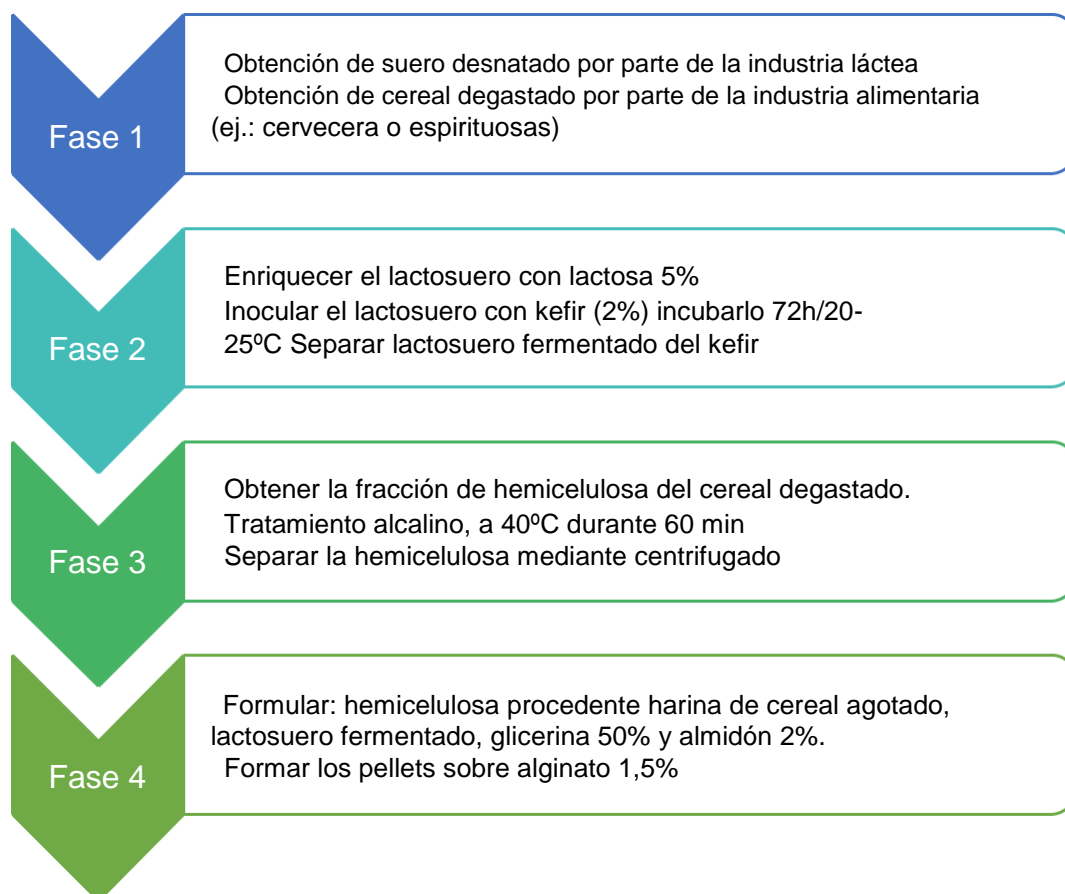


Figura 10. Proceso de obtención de pellets de bioplásticos

Nota: Fuente: Elaboración propia, 2022

Se realizó un plan de negocio preliminar mediante una estimación económica considerando los costes más importantes si se crea una start-up para procesar los residuos de la industria para formar el biofilm. Suponiendo que el pellet de bioplástico no debe superar el precio de 20€/Kg, se estimó la cantidad que debe producirse mensualmente para que el coste unitario sea compensado con el precio de venta. Los resultados mostraron que se deberían vender 1900 kg de pellets de bioplástico al mes. Esta producción tendría un coste unitario de 15€/kg, inferior al precio de venta estimado, pero con escaso margen de beneficio empresarial.

Discusión y conclusiones

Como resultado de este proyecto se creó un sustrato plástico comestible aportando una posible solución a favor de la valorización de residuos industriales, mediante el aprovechamiento de los residuos del sector agroalimentario cántabro, específicamente residuos de cereales de la industria de bebidas espirituosas y suero de leche procedente de la industria láctea.

Para el desarrollo de dicho sustrato, se partió de los compuestos arabinosilanos y kefirán, provenientes de residuos cereales y del suero lácteo respectivamente, los cuales fueron obtenidos mediante protocolos experimentales que fueron el resultado de una investigación de metodologías que se adaptaran a los objetivos del estudio.

Específicamente, se observó que el proceso de elaboración de pellets debía estar constituido por las siguientes tareas:

- La obtención de los componentes necesarios (suero desnatado y cereal degastado) provenientes de residuos de la industria alimentaria
- Enriquecer el lactosuero con lactosa 5%
- Inocular el lactosuero con kefir (2%) incubarlo 72h/20-25°C
- Separar el lactosuero fermentado del kéfir
- Obtener la fracción de hemicelulosa del cereal degastado.
- Proveer un tratamiento alcalino a 40°C durante 60 min
- Separar la hemicelulosa mediante centrifugado
- Formular: hemicelulosa procedente harina de cereal agotado, lactosuero fermentado, glicerina 50% y almidón 2%.
- Formar los pellets sobre alginato 1,5%

Cabe destacar que, en esta primera etapa de investigación, aunque el bioplástico generado ha sido obtenido a partir de residuos ya aptos para el consumo, no se han tenido en cuenta las condiciones de asepsia necesarias puesto que lo que se buscaba en esta fase inicial era determinar la posibilidad de obtener este material. En investigaciones posteriores se incluirán las consideraciones oportunas para que pueda ser comestible.

Con respecto a la viabilidad económica, se elaboró un plan de explotación que permitió llegar a la conclusión de que se deberían vender 1900 kg de pellets de bioplástico al mes. Esta producción tendría un coste unitario de 15 €/kg, que es inferior al precio de venta estimado de 20€/kg. Estos datos se pueden considerar como el valor mínimo de referencia.

Agradecimientos

Los autores desean expresar un especial agradecimiento al Dr. Marcos Hernández Suárez por el apoyo y asesoramiento en este proyecto, poniendo a disposición su conocimiento y dedicación. Asimismo, los autores agradecen a la Sociedad para el Desarrollo de Cantabria (SODERCAN) la cofinanciación del proyecto EC19-XX-001 perteneciente a la Convocatoria de Economía Circular.

Referencias

- Bastioli, C. (2003) Biodegradable material for various applications. En Steinbuchel, A. (Ed.). *Biopolymers: General Aspects and Special Applications*. Wiley-Blackwell.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- OMC. (2018). *Los residuos plásticos y la "economía azul", entre los temas examinados en el Comité de Comercio y Desarrollo*. Organización Mundial del Comercio
- Ozdamar, G. E., & Ates, M. (2018). Rethinking sustainability: A research on starch based bioplastic, *Journal of Sustainable Construction Materials and Technologies*. *Journal of Sustainable Construction Materials and Technologies*, 3, 249-260.

- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization.
- Song, Y., Zheng, Q., & Zhang, Q. (2009). Rheological and mechanical properties of bioplastics based on gluten- and glutenin-rich fractions. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.07.004>
- Xu, H., & Yang, Y. (2012). *Bioplastics from Waste Materials and Low-Value Byproducts Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice*. American Chemical Society.
- Yadav, M. P., Kale, M. S., Hicks, K. B., & Hanah, K. (2017). Isolation, characterization and the functional properties of cellulosic arabinoxylan fiber isolated from agricultural processing by-products, agricultural residues and energy crops. *Food Hydrocolloids*, 63, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.022>

Fecha de recepción: 30/05/2022

Fecha de revisión: 27/06/2022

Fecha de aceptación: 04/07/2022

Cómo citar este artículo:

Blanco Cornelio, C. V., Narváez García, A., & Robles Heredia, J. C. (2022). Obtención de biocombustibles a partir de biomasa de *Chlorella vulgaris*. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 57-68.

**OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE BIOMASA
DE CHLORELLA VULGARIS**

Celia Verence Blanco Cornelio

Universidad Autónoma del Carmen (México)

ailecverence72@gmail.com · <https://orcid.org/0000-0002-8302-1629>

Asteria Narváez García

Universidad Autónoma del Carmen (México)

anarvaez@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0001-6484-6062>

Juan Carlos Robles Heredia

Universidad Autónoma del Carmen (México)

jrobles@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0003-2591-6528>

Resumen. El presente trabajo, tiene como objetivo analizar la importancia de la obtención de biocombustibles mediante la microalga *Chlorella vulgaris* como materia prima para la obtención de combustibles como biodiésel y bioetanol. Para cultivar microalgas se requiere de luz, agua, nutrientes y una mínima extensión de tierra donde instalar el área de cultivo. Estos organismos al igual que las plantas, son capaces de utilizar el CO₂ y la luz solar para generar complejas biomoléculas que son necesarias para su supervivencia. A partir del efecto hidrodinámico de aireación y en condiciones de luz blanca continua en fotobiorreactores de columna por burbujeo; se analizan los diferentes métodos y fuentes para la obtención de combustibles renovables. Las microalgas se encontrarán en un conservador de cultivos para reproducción de más célula en aclimataciones por 30 días en matraces Erlenmeyer de 250 ml con una iluminación constante que ayudara a la motivación de la reproducción de las algas. En relación al análisis de la metodología, se obtiene que las microalgas eximidas se identifican como uno de los mejores microorganismos productores de triglicéridos principalmente empleados para la obtención de biodiésel y bioetanol. Sin embargo, actualmente es necesario una mayor investigación para determinar el mejor método de cultivo y con ello obtener un mayor rendimiento equilibrado de biomasa y lípidos.

Palabras clave: Aireación, Microalga, *Chlorella vulgaris*, biodiesel, bioetanol.

OBTAINING BIOFUELS FROM *CHLORELLA VULGARIS* BIOMASS

Abstract. The objective of this work is to analyze the importance of obtaining biofuels through the microalgae *Chlorella vulgaris* as a raw material for obtaining fuels such as biodiesel and bioethanol. To cultivate microalgae, light, water, nutrients and a minimum amount of land are required to install the cultivation area. These organisms, like plants, are capable of using CO₂ and sunlight to generate complex biomolecules that are necessary for their survival. From the hydrodynamic effect of aeration and continuous white light conditions in bubble column photobioreactors; The different methods and sources for obtaining renewable fuels are analyzed. The microalgae will be in a culture preserver for the reproduction of more cells in acclimatization for 30 days in 250 ml Erlenmeyer flasks with constant lighting that will help motivate the reproduction of the algae. In relation to the analysis of the methodology, it is obtained that the exempted microalgae are identified as one of the best triglyceride-producing microorganisms mainly used to obtain biodiesel and bioethanol. However, more research is currently needed to determine the best culture method and thereby obtain a higher balanced yield of biomass and lipids.

Keywords: Aeration, Microalgae, *Chlorella vulgaris*, biodiesel, bioethanol.

Introducción

Actualmente los combustibles fósiles son uno de los principales factores de diversos problemas ambientales, este recurso obtenido de la descomposición natural de materia orgánica se está agotando día con día; provocando que los precios de las reservas petroleras se eleven, dificultando el acceso a ellos. Una opción viable para evitar estos problemas de agotamientos es la alternativa de elaboración de nuevos combustibles mediante otros compuestos.

Los métodos y compuestos alternativos para la producción de combustibles implican principalmente reducir el impacto ambiental y poder prevenir la escasez de las reservas de combustibles fósiles. Las microalgas es una de las alternativas fundamentales a la producción de biodiésel, al igual para la obtención de otros productos energéticos como el bioetanol, biometano y biohidrógeno (Heredia et al 2019) El presente trabajo, tiene como objetivo analizar la importancia de la obtención de biocombustibles mediante la microalga *Chlorella vulgaris* como materia prima, con la finalidad de dar una mejor ideología a los diferentes métodos y fuentes para la obtención de combustibles renovables que no afecten al medio ambiente.

Además, que pueden ser utilizadas en zonas no aptas para los cultivos tradicionales y alcanzando tasas de crecimiento altas (0.5 a 1.2 d⁻¹). Sin embargo, muchas tecnologías de cultivo de microalgas involucran el uso de agua no contaminada, fertilizantes e inyección de CO₂ para su crecimiento, lo cual eleva el costo de la producción de biomasa algal y reduce su atractivo como tecnología. Para minimizar estos inconvenientes, una alternativa de cultivo es usar aguas residuales municipales, de la agricultura y la ganadería, donde las microalgas pueden desarrollarse aprovechando los nutrientes en este tipo de descargas. Esta integración permite:

1. Tratar las aguas residuales.
2. Obtener un efluente de alta calidad.
3. Generar biomasa algal útil para producir biodiésel u otros tipos de biocombustibles.

Por lo que las algas son organismos fotoautotróficos y presentan un rápido crecimiento en poco tiempo, lo que permite que se puedan cultivar en este tipo de aguas; ya que, la absorción de nutrientes por las microalgas emplea un alto contenido en nitrógeno, silicio, fosfato y sulfato de desechos humanos o animales; además que pueden

retener dióxido de carbono (CO₂) de fuentes industriales. De tal manera, que estas razones sustentan la investigación sobre las microalgas *Chlorella vulgaris*, ya que el obtenerlas no es un obstáculo.

En un estudio realizado en el 2006 por la Secretaría de Energía (SENER) de México se menciona que la producción de biodiésel a escala comercial puede ser factible a mediano plazo si se llevan a cabo acciones integrales, que incluyan aspectos técnicos, económicos y medioambientales con el sector agrario y agroindustrial, conjuntando esfuerzos en investigación y desarrollo tecnológico. Aluden que México requiere 10 plantas industriales con capacidad de 100,000 ton/año cada una, sólo para sustituir el 5% del diésel de petróleo usado cada año y recomiendan que la producción y el procesamiento se realicen con tecnologías diseñadas y construidas en el propio país. También argumentan que el uso de biodiésel reduciría en un 45% las emisiones de hidrocarburos, 47% de CO₂ y hasta un 66% las emisiones de partículas al ambiente (Escalante 2019).

En este sentido, los ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable (aceites vegetales, grasas animales y aceites de microalgas) representan la principal materia prima para la producción de biodiésel líquido obtenido en forma de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol. Los procesos más usados para la obtención de biodiésel son la pirólisis y la transesterificación, sin embargo, en el primer caso el método es caro y ofrece rendimientos bajos, mientras que el segundo se presenta como el método más viable para la obtención de biodiésel. Este proceso de conversión de aceites a biodiésel es necesario debido a que los aceites vegetales o extraídos de microalgas presentan una alta viscosidad y baja volatilidad, causando una combustión incompleta y la disposición de depósitos de carbón (Escalante 2019).

El cultivo a gran escala de microalgas busca obtener cantidades importantes de un producto valioso; por lo tanto, la productividad del sistema debe ser máxima. La comprensión de los factores que determinan el crecimiento óptimo es fundamental son (Robles et al 2019):

- Medio de cultivo.
- Intercambio de gases.
- pH.
- Temperatura
- Régimen de iluminación.

La temperatura es un factor ambiental muy importante debido a su gran influencia en el desarrollo de las microalgas. El efecto de la temperatura en la composición bioquímica afecta principalmente a dos mecanismos diferentes que son: la tasa de dependencia de la temperatura de las reacciones químicas y bioquímicas, y la dependencia de la temperatura para la fijación de carbono fotosintético en varios tipos de macromoléculas, como proteínas, carbohidratos y lípidos.

Este tipo de microalgas tienen un impacto especialmente en la ecología, ya que a través de ellas resulta una ventaja muy importante desde el punto de vista energético y ecológico, puesto que, presentan un mínimo nivel de emisión de gases nocivos como del dióxido de carbono (CO₂), compuesto principal del efecto invernadero (González 2015). Además de reducir otras cantidades de contaminantes, definiendo de esta forma al biodiésel como un producto biodegradable, que a partir de este también se pueden obtener aceites vegetales como la soya, palma, girasol entre otros.

Método

Microalga Chlorella vulgaris

Las microalgas son microorganismos microscópicos fotosintéticos y unicelulares, estos se clasifican en procariotas y eucariotas que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. Se dividen en diferentes grupos dependiendo su taxonomía. La *Chlorella vulgaris* es un alga unicelular de pigmentación verde de forma esférica; considerada como opción para la producción de biodiésel y bioetanol por su alto contenido de lípidos y aceites, sin embargo, estas tienen la capacidad de producir biomasa rápidamente en comparación con otros cultivos energéticos. Estos organismos al igual que las plantas, son capaces de utilizar el CO₂ y la luz solar para generar complejas biomoléculas que son necesarias para su supervivencia. De manera general son organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del Sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. La selección de microalga es el primer paso en el desarrollo de un proceso de producción, éstas deben tener las características adecuadas para las condiciones de cultivo específicas, con el fin de conseguir un determinado producto (Tabla 1) (Escalante 2019).

Tabla 1

Porcentaje lipídico y productividad de biomasa y lípidos de distintas microalgas

Especie	Lípidos acumulados (%)	Productividad de biomasa (g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Productividad de lípidos (g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Referencia
Anabaena variabilis Kützing ex Bornet & Flahault	46.90	0.1156	0.0542	Han et al. (2016)
Ankistrodesmus falcatus (Corda) Ralfs	59.60	0.1246	0.074	Singh et al. (2015)
Chaetoceros muelleri Lemmerman	43.40	0.2720	---	Wang et al. (2014)
Chlamydomonas reinhardtii P.A. Dangeard	25.25	2.0	0.505	Kong et al. (2010)
Chlamydomonas sp.	33.10	---	0.169	Nakanishi et al. (2014)
Chlorella sorokiniana Shihira et R.W.Krauss	31.50	12.2	2.9	Li et al. (2013)
Chlorella minutissima Fott et Nováková (UTEX2341)	62.97	1.78	0.29	Li et al. (2011)
Chlorella pyrenoidosa H. Chick	24.25	0.144	0.02685	Tang et al. (2011)
Auxenochlorella protothecoides (Krüger) Kalina et Puncochárová (= Chlorella protothecoides Krüger)	51.50	---	1.19	Mu et al. (2015)
Chlorella vulgaris Beyerinck [Beijerinck]	22.80	0.0848	0.01043	Frumento et al. (2013)
Chromochloris zofingiensis (Dönn) Fucíkocá et L.A. Lewis (= Chlorella zofingiensis Dönn)	54.50	0.0584	0.0223	Mu et al. (2015)
Desmodesmus abundans (Kirchner) E. Hegewald	---	0.27008	0.06708	Xia et al. (2014)
Dunaliella tertiolecta Butcher	11.44	0.42	0.0164	Sidney et al. (2010)
Nannochloropsis oculara (Droop) D.J. Hibberd	50.40	0.497	0.151	Sirin et al. (2015)

Neochloris oleoabundans S. Chantanachat et Bold	29.00	0.98	0.1124	Santos et al. (2013)
Tetradesmus obliquus (Turpin) M.J. Wynne (= Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing)	49.60	0.45-0.55	0.151-0.193	Feng et al. (2014)
Scenedesmus sp.	16.60	0.174	0.0195	Taher et al. (2014)
Tetraselmis sp.	30.50	0.130	0.047	Kim et al. (2016)

Bioreactor

Las microalgas *Chlorella vulgaris* son un tipo de células alégaes provenientes de un género de algas verdes de la clase *Chlorococcales*, para llevar a cabo la producción de biodiésel y bioetanol se emplean sistemas abiertos y cerrados por medio de fotobiorreactores (FBR), donde pueden utilizarse diferentes recipientes y configuraciones. Los sistemas cerrados son aquellos que se encuentran como FBR tubulares (Figura 1a) y de columna (Figura 1b), sin embargo, tiene un costo elevado en su construcción y operación, pero tienen la ventaja de controlar y mejorar las condiciones de cultivo, además de reducir los riesgos de contaminación por otros microorganismos; y brindando una mayor productividad de biomasa y aumentando la eficiencia en el uso de luz.

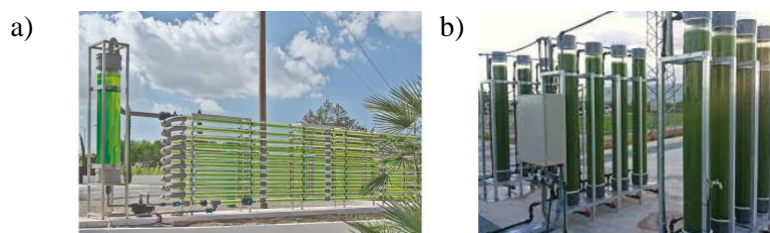


Figura 1. a) Fotobiorreactores Tubulares, b) Fotobiorreactores de Columna.

Mientras que los sistemas abiertos son más empleados para producción comercial de biomasa de las microalgas, por su rapidez y facilidad de mantenimiento. Este tipo de sistemas operan a un bajo costo, sin embargo, su desventaja recae en las pérdidas de agua debido a la evaporación, penetración limitada de luz, altos periodos de producción, control limitado de condiciones de cultivo y la limitada transferencia de CO₂ debido a su baja concentración en el aire.

Sin embargo, existe una alternativa para la producción de biocombustible por *Chlorella vulgaris*, donde se pueden emplear incluso botellas de plástico de 2 L. Así como FBR de vidrio de mayor volumen, (5, 10, 20) L, para procesos extensos en la creación de biocombustibles (Figura 2).

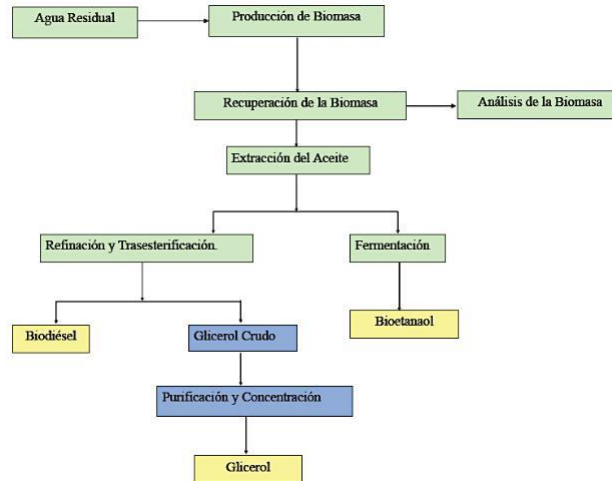


Figura 2. Metodología General de Operación para la Obtención de Biodiésel y Bioetanol.

Proceso de Aireación

La aireación es de gran importancia para la producción de microalgas, en este proceso se homogeneizan todos los nutrientes. Por ello, se debe realizar un mezclado bien distribuido y evitar la sedimentación de las células algales, ya que una agitación excesiva puede causar un estrés hidrodinámica y como consecuencia una disminución en la tasa de crecimiento. Este tratamiento de aguas consiste en exigir una fuente de oxígeno, conocida comúnmente como purificación biológica aeróbica del agua (Plata, Kafarov y Moreno 2009).

Para la realización de biocombustibles como el bioetanol y biodiésel, se necesita cualquier tipo de luz eléctrica para la motivación de la reproducción de las algas, de tal forma que el proceso se conforma por rotámetros que controlan la aireación sin afectar su crecimiento. Por lo tanto, el mezclado se realiza inyectando aire mientras se agita por burbujeo, donde por gravedad las células descienden y por la inyección de aire suben, el mezclado es continuo durante el proceso de cultivo, asegurando que la homogeneidad de las células y nutrientes que están dentro del cultivo; de tal forma que se eliminan los gradientes de luz, nutrimentos y temperatura.

Medio de Cultivo

Existen diversos factores que influyen en el proceso de cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, por ello es importante conocer e identificar las condiciones óptimas tanto individual como en conjunto que tienen de tolerancia las cepas microalgales. Por lo tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable, un suministro mínimo de nutrientes y condiciones químicas y físicas adecuadas. Estas condiciones son:

Iluminación que se divide en dos componentes importantes como irradiancia y el fotoperiodo. El primero hace referencia al flujo de luz en las cuales están expuestas las microalgas, mientras que el segundo término nos indica el número de horas en las que las microalgas son sometidas por la irradiancia. Las algas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila de sus células, de modo que las algas adaptadas a bajos niveles de luminosidad tienen una respuesta más rápida a cambios en la intensidad

luminosa ya que tienen más clorofila que las que están adaptados a intensidades de luz altas (Plata, Kafarov y Moreno 2009). Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción fotosintéticamente activa supone un 40% de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de alrededor del 1% en lo que a conversión de energía lumínica en biomasa se refiere. Se han demostrado, para las microalgas, eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4 % en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (González et al 2019)

Otro de los factores influyentes es la temperatura, durante el proceso de cultivo se consideran tres tipos de temperatura. La temperatura mínima es aquella que se encuentra por debajo de la óptima, por lo tanto, no es posible que ocurra un crecimiento, al igual que la máxima que está por encima y se encuentra alrededor de los 35°C. Mientras que la temperatura óptima se encuentra entre los 16 y 27°C, sin embargo, esta varía dependiendo el tipo de microalga. Sin embargo, los cambios de temperatura pueden causar alteraciones en las rutas metabólicas, afectando el crecimiento y desarrollo de los cultivos, ya que disocia las moléculas de carbono del medio haciéndolas disponibles para la fotosíntesis.

También las microalgas necesitan de un pH para su crecimiento, el rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9. Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aireación con aire enriquecido con CO₂. En el caso de los cultivos de alta densidad celular, la adición de dióxido de carbono corrige un incremento del pH, el cual puede llegar a un valor límite de 9 para el crecimiento de la microalga. Una reducción alta o baja del pH disminuye el crecimiento de la microalga por el rompimiento de muchos procesos celulares. El rango óptimo puede estar entre 8.2 a 8.7. El pH puede ser controlado mediante adición de CO₂, también hay un incremento del pH con la edad o tiempo del cultivo y el proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻ (González et al 2019).

Por lo tanto, las microalgas se encontrarán en un conservador de cultivos para reproducción de más células (Figura 3a), y por medio de sepas tomar los inóculos de 500 mL de solución con una agitación constante durante 5 días con el fin de determinar ciertas cantidades de células (Santos, González y Martín 2014). Al final del proceso la *Chlorella vulgaris* pasa por una transterificación y una fermentación por aireación hasta convertirse en biodiesel y en bioetanol, sustancias utilizadas por la sociedad como combustible en carros, colección en artículos domésticos entre infinidades de acciones de la vida diaria del ser humano (Figura 3 b).

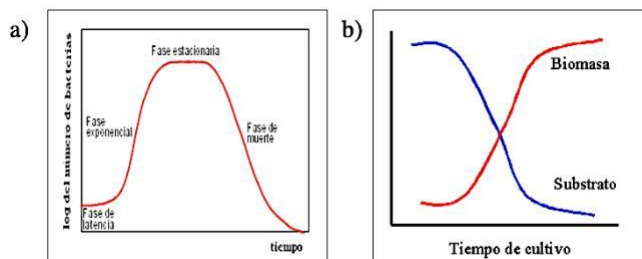


Figura 3. a) Diagrama de Crecimiento de los Microorganismos, b) Crecimiento y Disminución de Substrato

Transesterificación o alcoholísis

La transesterificación o alcoholísis es la reacción química ocurrida entre los aceites y un alcohol (comúnmente metanol o etanol) para producir glicerol y alquíl ésteres de ácidos grasos, los cuales son conocidos como biodiesel. Los principales factores que influyen en el proceso son la relación molar alcohol: triglicéridos, el tipo de catalizador (álcali, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima. En la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas de operación (González 2015)

Se requiere el uso de un catalizador para mejorar la conversión, el cual puede ser ácido o básico, homogéneo o heterogéneo. La catálisis homogénea ha sido hasta el momento la más implementada a nivel industrial. H₂SO₄ suele usarse con mayor frecuencia en catálisis ácida; no obstante, además de las dificultades surgidas por la corrosión de los equipos implicados en el proceso, se necesitan relaciones molares altas para alcanzar conversiones significativas [Robles et al 2019, Conde et al 2015]; por consiguiente, se prefiere emplear catalizadores básicos. Entre ellos, el más utilizado es NaOH en niveles que van de 0.75 a 1.5% w/w con base en el peso del aceite. Sin embargo, en el caso particular de la etanolísis, los niveles recomendados oscilan entre 0.4 y 0.8% (Figura 4), (Robles et al 2019).

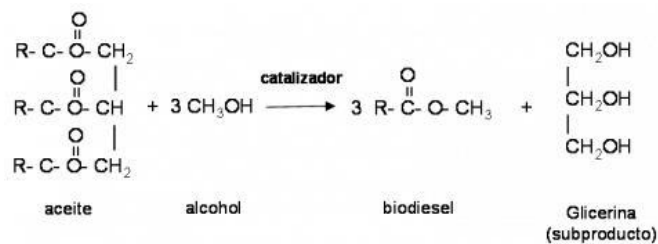


Figura 4. Reacción química del proceso de transesterificación.

Fermentación

Las microalgas son ricas en hidratos de carbono, por este medio se emplean como fuentes de carbono para obtener uno de los biocombustibles como el bioetanol. Por medio de la fermentación de la biomasa estos organismos aléales se puede convertir favorablemente con las biomásas obtenidas de cultivos alimentarios como la caña de azúcar o el maíz. El bioetanol de microalgas se puede obtener mediante dos tecnologías: fermentación, que consiste en la conversión de los materiales de la biomasa que contienen azúcares en etanol por levaduras, y gasificación, que implica convertir la biomasa en un gas de síntesis y éste se convierte en etanol posteriormente por catálisis. En la Fig. 5 se muestra un diagrama simplificado del proceso de producción de bioetanol cuyas etapas fundamentales son la fermentación y la destilación.

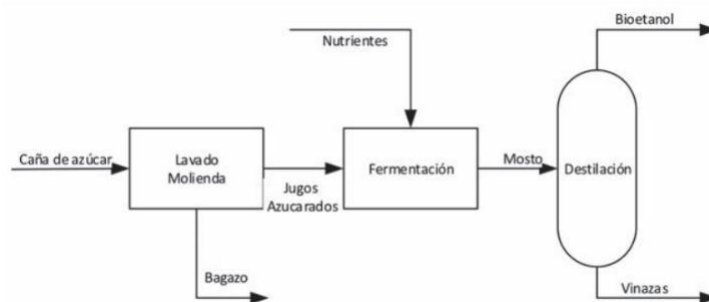


Figura 5. Diagrama del proceso de producción de bioetanol.

Resultados

Actualmente los factores económicos y ambientales son de índices altos, por lo cual, se busca una alternativa de combustibles de bajo impacto ambiental sin afectar la economía. Combustibles como el biodiésel y bioetanol a partir de microalgas surgen como sustitutos de los combustibles fósiles, puesto a que presentan ventajas principalmente por su biodegradabilidad y mínima toxicidad. Además, que durante su combustión producen componentes de menores emisiones como por ejemplo sulfatos, compuestos aromáticos y dióxido de carbono.

Se analizaron cepas de *Chlorella vulgaris* para la obtención de biodiésel y bioetanol en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Carmen (UNACAR), mediante un sistema de operación de FBR ecológicos, se replicó la columna de burbujeo mediante botellas PET con un volumen de 3 L, además de una botella con un volumen de 1 L para el agua destilada que se emplea para hidratar el aire por medio de agitación y evitar la evaporación del medio de cultivo (Figura 6a). De la misma manera se utilizaron otras dos botellas de con agua clorada al 20%, para evitar una posible contaminación al exterior.

La función del sistema en general contaba de una manguera plástica a un soplador y al otro extremo un rotámetro en la parte inferior. Mientras que en la parte superior del rotámetro se conectaba otra manguera plástica de 1 m de largo y su extremo se introducía uno de los orificios de la botella con agua destilada; después se utilizó un segmento de manguera plástica de 0.7 m de largo y se introdujo en el segundo orificio de la botella de agua destilada con una profundidad de 3 cm dentro del envase, el otro extremo de la manguera de 0.7 m se introdujo en el FBR con el medio del cultivo; se tomó otra manguera de 0.7 m de largo y se introdujo por uno de los orificios de la tapa del FBR para capturar el aire expulsado y este fuera transferido a una solución clorada contenida en una segunda botella.

Los cultivos se mantuvieron en aclimataciones por 30 días en matraces Erlenmeyer de 250 ml con una iluminación constante de lámparas de luz blanca fría fluorescente que ayudara a la motivación de la reproducción de las algas (Figura 6d), de tal forma que el proceso se conforma por rotámetros que controlan la aireación sin afectar su crecimiento (Figura 6c). Se prepararon medios de cultivos enriquecidos a 90 mg L⁻¹ (C₉₀): se prepararon 4 L de medio fresco, se les agregaron 3 mL de sales, 3 mL metales traza (medio f/2 de Guillard y Ryther) por L de solución; el medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 30 atm, se dejó enfriar para adicionar 3 mL de vitaminas por cada litro de agua.

Durante el proceso el aire de salida se burbuja en agua clorada a fin de evitar contaminar el exterior (Figura 6b). Una vez obtenida la biomasa se recupera dicho producto para la extracción del aceite, cuando el aceite se extrae se adiciona cierto porcentaje de solvente para realizar un proceso de transesterificación con la finalidad de

obtener biodiésel, en donde ocurre una reacción química entre aceite vegetal y alcoholes, principalmente influyendo el factor de relación molar alcohol como los triglicéridos que generan las microalgas, una vez catalizada la sustancia, se obtienen ésteres alquílicos de ácidos grasos y glicerol. Mientras que por un proceso de fermentación se obtiene como resultado bioetanol, con ayuda de levaduras como los azúcares provenientes de la biomasa de las microalgas. La población a nivel mundial debe resolver problemas relacionados con el desabasto energético, de aquí la importancia de explorar nuevas fuentes de energía renovable. Así pues, la biomasa algal podría satisfacer cerca del 25% de las necesidades energéticas mundiales, proveyendo además otros productos biotecnológicos (Santos, González y Martín 2014).

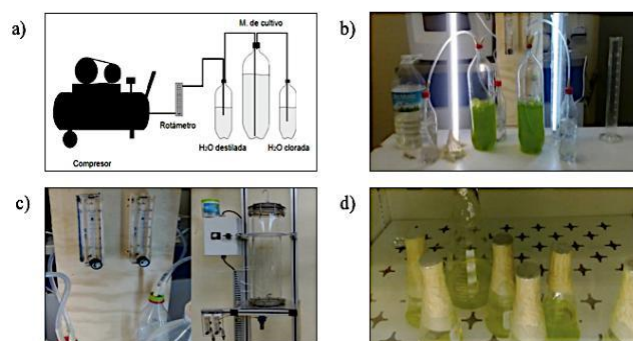


Figura 6. a) Modo de operación de un FBR para el sistema de cultivo, b) Método de transesterificación de *Chlorella vulgaris*, c) Equipo de Rotámetros y Reactor, d) Cultivos de *Chlorella vulgaris*.

Discusión y conclusiones

Los análisis obtenidos de las microalgas *Chlorella vulgaris* examinados en las instalaciones de la UNACAR, se identifican como uno de los mejores microorganismos productores de triglicéridos principalmente empleados para la obtención de biodiésel y bioetanol. Sin embargo, hoy en día es necesario una mayor investigación para determinar el mejor método de cultivo y con ello obtener un mayor rendimiento equilibrado de biomasa y lípidos, como base para la obtención de estos bicomcombustibles, así como mejorar la tecnología a fin de realizar un proceso ideal de cosecha, que es el punto de mayor costo en relación a los procesos de cultivo de estos microorganismos.

Ya que, a nivel industrial, los cultivos de microalgas a gran escala han demostrado ser efectivos y eficientes. Por lo cual, la difusión de esta tecnología es de un ámbito científico y fundamental para continuar su desarrollo. Sin embargo, existen ciertas limitaciones como por ejemplo que las leyes permitan la utilización de aguas residuales para cultivos. Otro de los factores que influye es el uso del suelo, puesto que es de suma importancia determinar la localización de la planta de los cultivos.

Las microalgas son la principal fuente de energía renovable, al igual que en la nutrición humana y animal. Existen diversos métodos de extracción empleados en las microalgas como físicos, mecánicos y químicos. Sin embargo, el método de extracción química es uno de los procesos fundamentales para las microalgas, ya que se obtienen un mayor rendimiento debido a la presencia de solventes orgánicos que ofrecen una mayor extracción de lípidos presentes en las microalgas *Chlorella vulgaris*.

A diferencia de los combustibles fósiles, los combustibles obtenidos por microalgas o también definidos como biocombustibles; tienen una alta capacidad de captación de los gases

de efecto invernadero, problemática principal que actualmente afecta al medio ambiente. El dióxido de carbono (CO₂) es uno de los componentes que afecta a la capa de ozono y que la mayoría de los artículos o productos que utiliza el ser humano lo produce, por ello, las microalgas son excelentes biomitigadores del CO₂ y de tratamientos de aguas residuales.

En el caso de la producción de biodiésel y bioetanol ha sido de gran ayuda para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero producidos durante la combustión de carburantes fósiles. Además de evitar la utilización de cultivos tradicionalmente empleados para la alimentación humana como materia prima. A pesar de las adversidades actuales para adquirir este tipo de aceite, el desarrollo de una metodología de transesterificación o de fermentación bien elaborada, permite que la obtención del aceite de la *Chlorella Vulgaris* resulta alentadora.

En México este tipo de producciones para obtener biodiésel y bioetanol a partir de microalgas, es de gran importancia si se consideran un buen desarrollo de tecnología y energía. Por lo cual, en un futuro estos factores darán respuestas satisfactorias a la ecología y potencialmente sustentable al requerimiento de combustibles líquidos producidos, haciendo que aumente la economía en nuestro país.

Agradecimientos

La presente investigación es respaldada por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Carmen (UNACAR) dentro del marco de investigaciones. También agradezco a los asesores del proyecto la Dra. Asteria Narvárez García y al Dr. Juan Carlos Robles Heredia por sus apoyos, recursos y principalmente por brindarme los conocimientos necesarios para llevar a cabo la investigación.

Referencias

- Franco, A. T. (2016). Producción Y Caracterización De Biodiesel A Partir De Aceite Microalgal De La Especie *Chlorella vulgaris*. *XXXVII Encuentro Nacional del AMIDIQ*, 37, 1-6.
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 3, 337-352.
- Conde, C., López, A., Aguilar, K., & Díaz, L. (2015). Producción de biodiesel a partir de microalgas cultivadas en aguas residuales. *Revista de Sistemas Experimentales*, 2, 82-87.
- Escalante, L. E. (2019). *Productividad de lípidos y producción de carbohidratos totales en *Scenedesmus obliquus* a diferentes condiciones de aireación en fotobiorreactor de columna*. Universidad Autónoma del Carmen.
- Gonzalez, A. (2015). Microalgas. *Cajamar*, 11, 1-11.
- González, N., Alfaro, O. G., Crespo, H., Pérez, R. M., & Jover, A. (2019). Temperature of the mixed culture of *chlorella vulgaris* to open sky: incidence in biomass concentration. *Tecnología Química*, 3, 580-591.
- Plata, V. P., Kafarov, V., & Moreno, N. (2009). Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *PROSPECTIVA*, 7, 35-41.
- Robles, J. C., Narvaez, A., Ruiz, A., Canedo-Lopez, Y., & Zavala, J. (2019). *Un review sobre la producción de biocombustibles, co-productos valiosos y recuperación de biomasa a partir de microalgas*.

- Robles-Heredia J.C., Ruiz, A., Narváez, A., Escalante, L.E., Marñunez, M., Canedo, Y., Pérez, L.J., Tamayo, F.A., & Zavala, J.C. (2019). Estudio Del Efecto Hidrodinamico En Fbr De Columna Sobre El Crecimiento Celular, Remoción De Nitrogeno, Productividad De Lipidos Y Perfil De Acidos Grasos En *Chlorella Vulgaris*. *RB&S, 1*, 72-90.
- Sacristán-de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena-Martínez, E., & Alva-Martinez, A. F. (2014). Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia, 48*, 271-284.
- Santos, A. M., González-Arechavala, Y., & Martín-Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Canales de mecánica y electricidad, 20-28*.

Fecha de recepción: 31/05/2022

Fecha de revisión: 23/06/2022

Fecha de aceptación: 04/07/2022

Cómo citar este artículo:

Robles Heredia, J. C., Narváez García, A., & Ruiz Marín, A. (2022). Obtención de ácidos grasos de metil esterres en biomasa algal a diferentes tasas de aireación en FBR de columna. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 69-82.

**OBTENCIÓN DE ACIDOS GRASOS DE METIL ESTERES EN
BIOMASA ALGAL A DIFERENTES TASAS DE AIREACION EN
FBR DE COLUMNA**

Juan Carlos Robles Heredia

Universidad Autónoma del Carmen (México)

jrobles@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0003-2591-6528>

Asteria Narváez García

Universidad Autónoma del Carmen (México)

anarvaez@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0001-6484-6062>

Alejandro Ruiz Marín

Universidad Internacional Iberoamericana (México)

aruiz@pampano.unacar.mx · <https://orcid.org/0000-0001-5075-9611>

Resumen. Los combustibles fósiles contribuyen en la contaminación del aire, por los compuestos que se liberan a la atmosfera durante la combustión; por esta razón se han propuesto reemplazarlos por los llamados biocombustibles, como el biodiesel que es la mezcla de esterres metílicos de ácidos grasos (FAME) por sus siglas en inglés, que puede sustituir al diésel y se obtiene de diferentes materias primas, como la biomasa. Se analizó la variación de crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y calidad del biodiesel en función del tipo de FAME de *Chlorella vulgaris* por efecto de la hidrodinámica en fotobiorreactores de columna (FBRC), variando flujos de aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua; además de la tasa de corte para comprobar probable presencia de estrés hidrodinámico. Los datos en tasa de corte fueron bajos (26.34 a 45.60) s⁻¹, mientras que los máximos valores de crecimiento celular y tasa de crecimiento específico (μ) fueron de (6.80 x 10⁶ cel mL⁻¹ y 0.023 d⁻¹), respectivamente; por otra parte, el consumo de nitrógeno fue de 65% a 0.75 vvm y productividad de lípidos de 15.92 mgL⁻¹d⁻¹ a 1.25 vvm. En relación a los FAME, se observó mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm; mientras que a 1.25 vvm, fueron saturados (SFA); la mayor cantidad de monoinsaturados (MUFA) fue a 0.75 vvm. Los componentes con mayor presencia fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2.

Palabras clave: FAME, aireación, *Chlorella vulgaris* fotobiorreactor, hidrodinámica

**OBTAINING FATTY ACIDS OF METHYL ESTERS IN ALGAL
BIOMASS AT DIFFERENT AERATION RATES IN COLUMN FBR**

Abstract. Fossil fuels contribute to air pollution, due to the compounds that are released into the atmosphere during combustion; For this reason, they have been proposed to replace them with so-called biofuels, such as biodiesel, which is the mixture of fatty acid methyl esters (FAME) for its acronym in English, which can replace diesel and is obtained from different raw materials, such as biomass. . The variation of cell growth, nitrogen consumption, lipid productivity and biodiesel quality was analyzed depending on the type of FAME of *Chlorella vulgaris* due to the effect of hydrodynamics in column photobioreactors (FBRC), varying aeration flows at (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm and continuous white light; the shear rate was analyzed to verify the probable presence of hydrodynamic stress. The shear rate data were low (26.34 a 45.60) s^{-1} , while the maximum values of cell growth and specific growth rate (μ) were (6.80×10^6 cel mL^{-1} y 0.023 d^{-1}), respectively, on the other hand, nitrogen consumption was 65% at 0.75 vvm and lipid productivity was 15.92 mgL⁻¹d⁻¹ at 1.25 vvm. In relation to the FAME, a greater presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was observed at 0.75 vvm, 1.75 vvm and 2.25 vvm; while at 1.25 vvm, they were saturated (SFA); the highest amount of monounsaturated (MUFA) was at 0.75 vvm. The components with the greatest presence were C12:0; C20:5N3; C24:1; C22:0; C22:2.

Keywords: FAME, aeration, *Chlorella vulgaris* photobioreactor, hydrodynamics

Introducción

La reducción del uso de combustibles fósiles es muy importante, para aminorar el problema de contaminación al ambiente que representan (Castillo et al., 2017). Es importante reducir el empleo de combustibles fósiles ya que provocan emisiones de CO₂, CH₄, N₂O, óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVDM), así como de dióxido de azufre (SO₂), provocando daños a la atmósfera, (Chandrasekhar et al., 2015; Kumar et al., 2017; Kumar-Enamala et al., 2018). Por eso la importancia de buscar otras alternativas de energías renovables (Castillo et al., 2017; Anto et al., 2020).

Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa como el biodiesel, son fuentes alternativas de energía que han recibido mayor atención para su investigación y aprovechamiento (Qaria et al., 2017; Ashok et al., 2019). De manera global la biomasa de microalgas podría satisfacer hasta un 25% de las necesidades energéticas, por las características de los compuestos de ácidos grasos de metil ésteres que pueden producir (Castillo et al., 2017). Por las aplicaciones para secuestro de CO₂, producir biocombustibles, alimentación humana y animal, además del aprovechamiento en la producción de biomoléculas de alta calidad, el uso de microalgas es para tomar en cuenta (Posten y Feng-Chen, 2016; Alishah et al., 2019; Gomez-Luna et al., 2022).

A pesar del número considerable de especies de microalgas existentes en diferentes hábitats, aproximadamente 30,000 especies han recibido más atención (Richmond 2004; Agarwal et al., 2018; Chew et al., 2018). Por ser microorganismos fotosintéticos, las microalgas pueden coexistir en diversos hábitats naturales; sin embargo, algunas microalgas pueden reproducirse de manera mixotrófica o heterotrófica (Castellanos et al., 2020). Ciertas microalgas contienen gran cantidad de lípidos, estos pueden incrementarse variando diferentes factores como: intensidad y tipo de luz, variaciones de temperatura, salinidad, intensidad de agitación, etc. (Posten and Feng-Chen 2016, Basto-Flores et al., 2022).

Algunas microalgas pueden acumular altas cantidades de triglicéridos (TAG), Kumar et al., (2018), que son la materia prima para producir biodiesel. La cantidad de biodiesel utilizando biomasa de microalgas no estriba nada más de la cantidad de biomasa, sino además de la cantidad de aceite contenida por célula. (Wu et al., 2017; Chew et al., 2018). Por su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones durante el cultivo, incluso aguas residuales, la microalga *Chlorella vulgaris* se ha utilizado para

experimentación en producción de biodiesel y otros compuestos de amplio uso (Li et al., 2012; Zhan et al., 2016).

Para el cultivo de microalgas se pueden utilizar sistemas abiertos, en forma de estanques, o sistemas cerrados o fotobiorreactores (FBR), para controlar mejor el proceso de cultivo, cantidad de lípidos y otros productos para su aprovechamiento en otras áreas (Kumar et al., 2018). Ambos tipos de sistemas de cultivo presentan ventajas y desventajas, de este modo, de las principales ventajas de los sistemas abiertos está su bajo costo, por los materiales que se utilizan para su construcción, sin embargo, el problema principal que presentan es la contaminación por microorganismos por su exposición al ambiente; mientras que los FBR presentan otras características, iluminación interna o externa, diferentes configuraciones, mejor control de las variables del tipo de proceso de cultivo y exhiben productividades superiores (Ashok et al., 2019); por estas características su desventaja principal es su costo, de ahí la necesidad de mejorar su diseño. En los FBR se pueden utilizar diferentes tasas de aireación que pueden influir en el crecimiento de las microalgas durante el proceso de cultivo, el mezclado ayuda a que las células tengan acceso a la fuente de luz y evita acumulación de oxígeno en el medio, impidiendo que las microalgas se adhieran a las paredes o que precipiten. (Deconinck et al., 2018; De Jesus et al., 2019). Algunas consideraciones en el diseño de FBR son: eficiencia para aprovechar la energía luminosa, fácil escalamiento, mezclado eficiente y mejor control de reacciones laterales, se sugiere bajo estrés hidrodinámico celular.

Dentro de las condiciones hidrodinámicas de importancia para un buen desempeño de los FBR de columna se pueden mencionar: gas hold up (gas remanente), velocidades superficiales de líquido y gas dentro del reactor, además de estimar la tasa de corte (Beal et al., 2015; Gonzalez-Lazo et al., 2019). Es necesaria una tasa de aireación adecuada, con la idea de evitar que las células sedimenten y se propicie muerte celular por ausencia de luz. De igual modo, existe un límite superior en el nivel aceptable de turbulencia, ya que las fuerzas hidrodinámicas tienen un efecto de estimulación sobre los procesos fisiológicos de las células algales. Un aumento progresivo de turbulencia, en algunas microalgas, favorece al aumento en la tasa de crecimiento, pues la agitación favorece el suministro de luz y CO₂. Sin embargo, con altos niveles de turbulencia, se disminuye el crecimiento, además aumenta de manera simultánea la velocidad superficial del gas ocasionando un posible daño celular (Trivedi et al., 2015; Gonzalez-Lazo et al., 2019). El esfuerzo de corte es uno de los principales problemas en el cultivo de microalgas debido al daño celular. El exceso de agitación causa turbulencia, afectando la estructura celular, disminuyendo el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provoca sedimentación y muerte celular. (Robles-Heredia 2014, Montoya 2021). El estrés hidrodinámico debido a la agitación mecánica y ruptura de burbujas en los FBR puede afectar el crecimiento y metabolismo de las microalgas (Arguelles et al., 2018; Alishah et al., 2019).

En este trabajo se analizó la variación de crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y calidad del biodiesel en función del tipo de FAME de *Chlorella vulgaris*, por efecto de la hidrodinámica en fotobiorreactores de columna (FBRC), variando flujos de aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua; además de la tasa de corte para comprobar probable presencia de estrés hidrodinámico. De aquí el interés por experimentar si a mayor flujo de aireación y con una iluminación discreta se podrían alcanzar mayores cantidades en la producción de biomasa y lípidos en la microalga.

Método

Con el siguiente proceso metodológico se realizaron diferentes determinaciones para conocer la variación del crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos y la calidad del biodiesel en función del tipo de componentes de metil ésteres presentes FAME de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores de columna (FBRC), alternando los flujos de aireación de (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y luz blanca continua.

Adaptación de la cepa

La cepa proviene del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México. Se aclimató por 30 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para iluminación se utilizó luz blanca fría con lámparas fluorescentes con emisión a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en forma continua. Se realizaron transferencias a matraces Erlenmeyer de 250 mL.

Medio de cultivo

Para el medio a 90 mg L^{-1} de N-NH_4^+ (C_{90}), se agregaron 3 mL de nutrientes por L de agua con la siguiente composición: 7 mg NaCl, 4 mg CaCl_2 , 2 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg KH_2PO_4 , 115.6 mg NH_4Cl , disueltos en 1L de agua, de igual forma se adicionaron metales traza y vitaminas considerando la técnica para medio de cultivo f/2 (Guillar and Ryther 1962), la esterilización fue en autoclave a 120°C y 30 atm; una vez frío el medio de cultivo se adicionaron 4 mL de vitaminas por cada litro de medio (Robles-Heredia, 2014).

Inóculo

Para el inóculo se utilizaron 500 mL de solución a C_{90} . Manteniendo agitación constante por 5 días, para obtener una concentración de 1×10^6 células mL^{-1} (cel x mL).

Crecimiento de células

Para verificar el desarrollo celular, cada 24 h se hizo conteo con cámara Neubauer Hematocitómetro de 0.1 mm; con altas densidades celulares, se realizaban diluciones de la muestra en 1:10 mL para facilitar el conteo, posteriormente el número de células total del conteo se multiplicaba por un factor de 10 de acuerdo a la dilución tomando en cuenta

según fuera el caso las ecuaciones (1 y 2) (Ruiz-Marín et al., 2010):

$$C_c = \text{Células contadas} \times 10,000 \quad (1)$$

$$C_{cd} = \text{Células contadas} \times 10 \times 10,000 \quad (2)$$

Dónde: C_c representa el número de células contadas y C_{cd} representa el número de células en dilución

Biomasa peso seco

Se filtraron 10 mL del medio con microalgas utilizando filtro a peso constante, el filtro con la biomasa se introdujo en una estufa por 24 h a 130°C . Después, el filtro se colocó en un desecador para enfriarse, se obtuvo el peso de la muestra seca mediante diferencia de pesos, considerando el volumen de muestra utilizado. El proceso se realizó cada 24 h hasta el final del proceso (Robles-Heredia, 2014).

Consumo de nitrógeno

Se tomó una muestra de 50 mL de medio de cultivo cada 24 h, se filtró y se le agregaron 5 gotas de H_2SO_4 para fijar el nitrógeno, posteriormente la muestra se dividió en 2 matraces Erlenmeyer con 25 mL cada uno, se les agregó 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Se agregó solución indicadora de ácido bórico en 2 matraces, cada una de 20 mL y se les agregó 3 gotas de indicador Shiro Toshiro. Posteriormente las muestras se destilaron en equipo Buchi micro Kjeldahl y se

colectaron 50 mL en los matraces con la solución de ácido bórico y se titularon con H₂SO₄ 0.02 N hasta que la solución viró de verde a morado. La concentración de N-NH₄⁺ se determinó con la siguiente ecuación (3) (Robles-Heredia, 2014):

Dónde: $N-NH_4^+$ representa concentración de nitrógeno amoniacal; 0.02N representa la normalidad del ácido sulfúrico; 14 y 1,000 representan valores constantes.

Cosecha

Después del proceso de cultivo, el volumen remanente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal. La biomasa recuperada se congeló a -4.0°C para su conservación, posteriormente se liofilizó por espacio de 3 a 5 días (Ruiz-Marín et al., 2010).

Producción de aceite

Se usó el método de Bligh y Dyer (1959) modificado: en tubos con rosca se colocaron 10 mg de biomasa liofilizada, se adicionaron 4 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua destilada, esta mezcla se sometió a ultrasonido por 15 minutos para romper pared celular y se cubrieron con papel aluminio, se incubaron por 24 h a 4 °C; después, se les retiró el papel aluminio para someterlas a ultrasonido por 5 min y se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min, el líquido remanente se trasladó a nuevos tubos con tapa de rosca y se agregaron 4 mL de agua para su lavado, se agitaron y nuevamente fueron centrifugadas, el agua de los tubos se retiró con pipeta Pasteur, se vaporizó el cloroformo en baño María y se les agregó 2 mL de mezcla ácido clorhídrico-metanol al 95%, se colocaron en digestor marca Hach DRB 200 por 1 h a 100 °C; después, se envolvieron nuevamente en papel aluminio para su resguardo en refrigeración por 24 h a 4 °C. Después, se les agregó 3 ml de hexano y se agitaron, para formar una bi-fase de la cual se extrajo la parte inferior con pipeta Pasteur, se agregaron 4 mL de agua a los tubos y se agitaron nuevamente, se extrajo el agua utilizando una pipeta Pasteur. Se envolvieron nuevamente en papel aluminio y se mantuvieron refrigeración por 24 h a 4 °C. Pasando el tiempo estimado, se vaporizaron con baño maría, en el proceso de vaporización se agregaron 3 mL de hexano antes de completar vaporización, las muestras se transfirieron a viales y se dejaron reposar por 24 h. El contenido de lípidos se traduce a una composición de lípidos (% ww⁻¹) en base seca w, y esta a su vez se traduce en una productividad de lípidos P_L (en mg L⁻¹ d⁻¹) con la siguiente ecuación (4):

Dónde: X_1 y X_2 es la concentración másica de biomasa seca en el medio al tiempo t_1 y t_2 (inicial y final). w contenido de lípidos en base seca. P_L productividad de lípidos en unidades de mg L⁻¹ d⁻¹

Obtención de metil ésteres de ácidos grasos.

El perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés) se obtuvo usando un equipo de cromatografía de gases marca Agilent Technology 7890. Se inyectó 1 µL de la solución hexano-lípido al cromatógrafo con detector de ionización de flama (FID), y con columna de separación DB -23 (60 m longitud, 0.32 mm ID, 0.25 µm espesor). Condiciones cromatográficas: T del detector: 250 °C; T del inyector: 250 °C; Programa de temperatura del horno: 120 °C por 5 min, aumentar la temperatura a razón de 10 °C min hasta 180 °C, mantener por 30 min. se aumentó nuevamente temperatura a razón de 10 °C min hasta 210 °C y mantener por 21 min. (total 65 min); Flujo gas portador: 15 psi; Split: 1:100; Gas portador: He alta pureza. Para identificar los componentes

FAME se utilizó un estándar de mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (% peso) Supelco™ 37 Componente FAME. Los resultados del diseño experimental se estimaron con análisis de varianza (ANOVA) factorial completa (α : 0.05) utilizando software STATISTICA V7.

Montaje de los Fotobiorreactores de Columna (FBRC)

Para el sistema FBRC se utilizaron botellas de material PET con 2 L de volumen de operación y otras con volumen de 1L; para evitar evaporación del medio se usó agua destilada para hidratar el aire inyectado; el aire saliente se burbujea en agua-cloro para evitar contaminación exterior, se emplearon mangueras de ¼ pulgada para inyección del aire; se emplearon flujómetros de acrílico transparente para control de aire, verticales Cole Parmer, Modelo ACRY-010052, nivel de aire 2-8 Lmin⁻¹ y carátula tipo regleta; compresor de 2.5 Hp de potencia y 8.5 kg cm⁻² de presión para inyectar el aire. Iluminación externa con luz blanca fría fluorescente a 100 μmol m⁻² s⁻¹. En La Figura 1 indican ciertas variables para realizar cálculos hidrodinámicos.

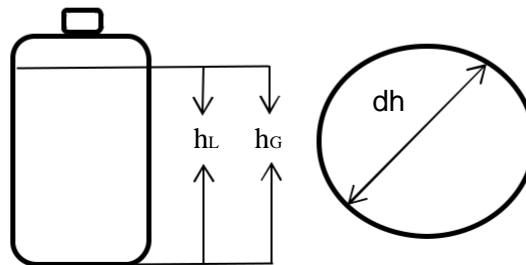


Figura 1. Equipo de columna de burbujeo (FBRC)

Donde las variables indicadas son las siguientes: h_L es la altura del líquido en reposo sin entrada de aire (m); h_G es la altura de la columna incluyendo la retención de gas (m); d_h es el diámetro de la columna de burbujeo (m); A_c área transversal de la columna (m²) y ρ_L es la densidad del líquido

Aireación

Se consideraron cuatro tasas de aireación (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm por experimento, con una variable respuesta (productividad de lípidos), una configuración (FBRC) y dos repeticiones.

Para calcular la tasa de corte los datos de altura de columna (h_G) fueron (0.21, 0.22, 0.23 y 0.24) para cada flujo de aireación respectivamente; los siguientes datos fueron considerados como constantes para todos los experimentos: $h_L = 0.205$ m; $d_o = 0.12$ m; $A_c = 0.036$ m²; $\rho_L = 998$ kg / m³.

La ecuación (5) se considera para calcular el flujo de aire total corregido por la presión absoluta en el fondo del reactor (Robles-Heredia, 2014).

$$F_g = F_a \left(\frac{P_{atm}}{P_{abs}} \right) \quad (5)$$

Dónde: F_g es el flujo de aire total expresado en (m³s⁻¹) y F_a el flujo de aire suministrado en (L min⁻¹)

Con las ecuaciones (6) y (7) se calcularon el área seccional de la columna (A_c) en (m²) y la velocidad superficial del gas (U_g), que es el flujo de gas por unidad de área dentro del sistema en (ms⁻¹), de acuerdo a Babcock et al, (2002).

$$A_c = \frac{F_g}{U_g} \quad (6)$$

Con U_g para columna de burbujeo, la tasa de corte (λ) expresada en (s^{-1}) se calcula con ecuación (8) válida en el rango de $0.008 < U_g < 0.09 \text{ ms}^{-1}$. (Cerri et al., 2008).

$$\lambda = 1000 \rho^{2.0} \quad (8)$$

El gas retenido ε se calcula con la ecuación (9); determina el porcentaje de gas o aire retenido dentro del equipo por el incremento del volumen de aire cuando este es inyectado (Doran, 1995).

$$\varepsilon = \frac{U_g^2}{g} \quad (9)$$

Con la ecuación (10) se calcula la velocidad superficial del líquido; que es el flujo de líquido por unidad de área dentro del sistema, se puede calcular para columnas de burbujeo con un diámetro entre 0.1 y 7.5 m y $0 < U_g < 0.4 \text{ ms}^{-1}$ (Doran, 1995)

$$U_L = 0.95 \sqrt{g^2 D^3} \quad (10)$$

Donde U_L es la velocidad superficial del líquido en (m s^{-1}), g es aceleración de la gravedad en (ms^{-2}), D es el diámetro de la columna en (m) y U_g velocidad superficial del gas o aire inyectado.

La ecuación (11) calcula potencia neumática, potencia generada por el aire inyectado al equipo para agitación del fluido dentro del FBRC. (Doran, 1995):

$$\text{Dónde: } PG/VL \text{ es la potencia neumática en } (\text{Wm}^{-3}), \text{ calculada con } \rho L \text{ que es la densidad} \quad (11)$$

del líquido en (kg / m^3), g es la gravedad en (ms^{-2}) y U_g la velocidad superficial del gas o aire inyectado. El uso de distintos flujos de aireación fue con la finalidad de establecer las mejores condiciones de aireación, definiendo Tasa de Corte (λ), con la finalidad de verificar el efecto sobre los ácidos grasos de metil ésteres, desarrollo celular, producción de biomasa, agotamiento de nitrógeno, y productividad de lípidos.

Resultados y discusión

A continuación, se indican los resultados obtenidos del presente trabajo.

La Tabla (1) indica los cálculos hidrodinámicos del FBRC a las tasas de aireación propuestas.

Tabla 1

Datos hidrodinámicos

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	F_a (Lm^{-1})	$F_g \times 10^{-5}$ (m^3s^{-1})	$U_g \times 10^{-3}$ (ms^{-1})	(%)	$U_L \times 10^{-2}$ (ms^{-1})	PG/VL (Wm^{-3})	λ
FBRC	0.75	1.5	2.50	0.694	2.38	9.57	6.80	26.34
	1.25	2.5	4.16	1.150	6.81	10.18	11.26	33.91
	1.75	3.5	5.83	1.620	10.86	11.40	15.86	40.25
	2.25	4.5	7.50	2.080	14.58	12.40	20.36	45.60

Se puede indicar que las células algales no presentaron algún tipo de deformación a las condiciones planteadas de aireación; aspectos similares fueron reportados por (Shi et al., 2016; Sadeghizadeh et al., 2017); según se observa en la Tabla (1), los valores obtenidos de la hidrodinámica de los FBRC, conforme incrementaron los flujos de aireación, aumentaron también todos los parámetros hidrodinámicos lo que indicó la

estrecha relación en cada uno de ellos, además de la posible afectación con los demás parámetros celulares que se plantean en este trabajo.

La Tabla (2) indica crecimiento celular, tasa específica de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno obtenidos a los diferentes flujos de aireación sugeridos.

Tabla 2

Crecimiento celular, tasa específica de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno obtenidos a los diferentes flujos de aireación sugeridos

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	Max crecimiento* celular (cel $\times 10^6$ mL $^{-1}$)	μ^* (h $^{-1}$)	Consumo* N-NH $_4^+$ (%)
FBRC	0.75	6.80 \pm 0.03 ^a	0.0230 \pm 0.09 ^a	65.00 \pm 0.08 ^a
	1.25	3.10 \pm 0.13 ^b	0.0170 \pm 0.06 ^b	53.00 \pm 0.07 ^b
	1.75	2.51 \pm 0.12 ^b	0.0165 \pm 1.70 ^b	50.00 \pm 0.93 ^b
	2.25	2.49 \pm 0.03 ^b	0.0160 \pm 0.50 ^b	47.00 \pm 0.05 ^b

Nota: * Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a prueba Tukey ($p \geq 0.05$); (\pm Desviación estándar).

Por otra parte, según los valores de crecimiento celular máximo de Tabla (2), se puede indicar que en relación con el crecimiento celular a 0.75 vvm, las células se adaptaron para incrementar su desarrollo, alcanzando 6.80 x 10⁶ cel mL⁻¹ y la mayor tasa de crecimiento específico μ (0.023 h⁻¹); no obstante, conforme se incrementó la tasa de aireación, se redujeron el crecimiento celular más del 50% (3.10 x 10⁶) cel mL⁻¹, así como, la tasa de crecimiento específico en todos los experimentos. Se puede mencionar que los resultados obtenidos de crecimiento y remoción de nitrógeno (N-NH $_4^+$), estuvieron muy por debajo de otros trabajos (Kee-Lam et al., 2016; Sadeghizadeh et al. 2017, Anto et al., 2020; Montoya, 2021).

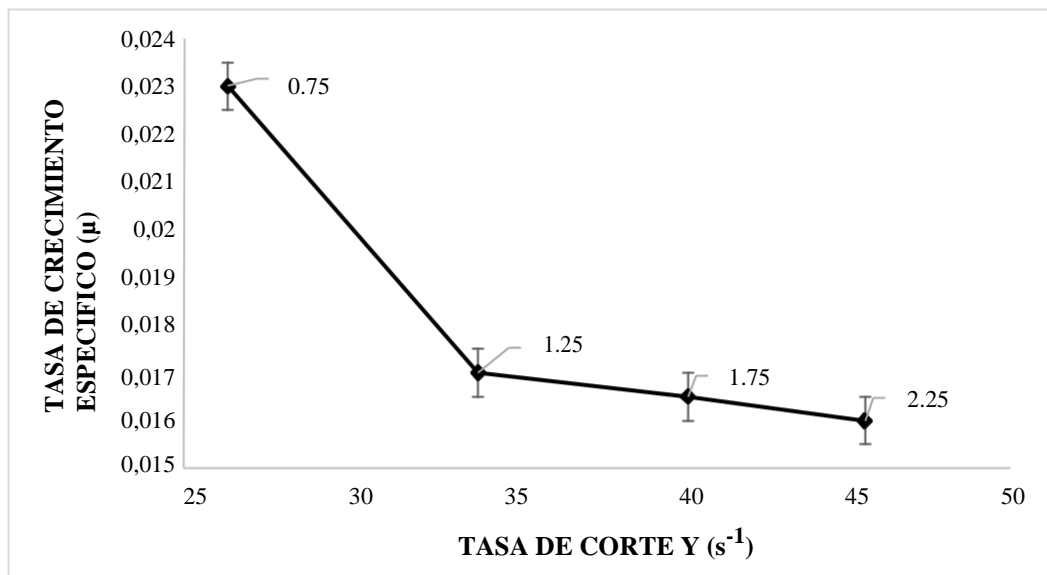


Figura 2. Tasa de crecimiento μ vs tasa de corte

De acuerdo a la Figura 2 se aprecia que conforme el flujo de aireación incrementaba, del mismo modo aumentaban los valores de las tasas de corte en cada experimento, lo que puede indicar que hubo una relación directa entre estos dos parámetros, no obstante, ocurrió lo contrario con la tasa de crecimiento específico (μ). Por tanto, se puede inferir que existió una relación inversamente proporcional con estos dos aspectos, a mayor aireación, mayor tasa de corte (μ), pero menor tasa de crecimiento celular (μ), de este modo se puede considerar que el flujo de aire óptimo sería a 1.25 vvm para realizar otros experimentos, según el producto a obtener, considerando otros factores de operación o de iluminación.

En la Tabla (3) se indican los datos de biomasa peso seco, contenido de lípidos y productividad de lípidos en *Chlorella vulgaris* a las tasas de aireación propuestas.

Tabla 3

Biomasa seca X, contenido de lípidos w y productividad de lípidos PL a las tasas de aireación propuestas

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	X (g L ⁻¹)	w _{max} (%ww ⁻¹)	PL máxima (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
FBRC	0.75	0.295±0.056 ^a	11.54 ± 0.03 ^a	3.99 ± 0.026 ^a
	1.25	1.395±0.010 ^b	14.28 ± 0.02 ^b	15.92 ± 0.019 ^b
	1.75	0.430±0.041 ^a	11.11 ± 0.02 ^a	7.28 ± 0.016 ^a
	2.25	0.405±0.050 ^a	10.00 ± 0.04 ^a	1.58 ± 0.016 ^a

Nota: *Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a prueba Tukey ($p \geq 0.05$); (\pm Desviación estándar)

De manera general, en este trabajo los valores alcanzados de productividades fueron bajos, comparados a otros reportes (Al-Ameri y Al-Zuhair 2019; De Jesus et al., 2019), sin embargo a 1.25 vvm, se observó la mayor productividad de lípidos (Tabla 3); aun cuando a 0.75 vvm se obtuvo el mayor crecimiento celular, se puede indicar entonces que, las células a 1.25 vvm resintieron el grado de agitación, probablemente ocurrió un ligero estrés por tasa de corte, lo que indujo a que produjeran mayor contenido de lípidos, incrementando la productividad, no obstante, conforme aumentó la tasa de aireación se presentaron condiciones desfavorables para la producción de lípidos. Otros reportes indican datos de 1.2 g L⁻¹ de biomasa a a diferentes grados de agitación, utilizando intensidades lumínicas mayores o cercanas a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Chiu et al., 2008, Montoya, 2021), mientras que Pham et al., (2017) reportan 1.35 g L⁻¹ de biomasa a 0.3 vvm, con iluminación de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; por lo que se puede inferir, que la cantidad de luz proporcionada, favorece más en la obtención de biomasa que la aireación. De igual modo, otros estudios han reportado que, a una iluminación superior a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se alcanzaron mayores aumentos de biomasa (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2015; Alishah et al., 2019; Castellanos et al., 2020).

La Tabla (4) muestra los principales ácidos grasos de metil ésteres producidos por la microalga, tomando en cuenta las condiciones de cultivo planteados.

Tabla 4.

Principales ácidos grasos de metil ésteres producidos por la microalga. (En % en peso total de ácidos grasos)*

FAME	0.75 vvm	1.25 vvm	1.75 vvm	2.25 vvm
------	----------	----------	----------	----------

C12:0	23.81 (± 0.38)	22.04 (± 0.71)	23.73 (± 2.02)	20.91 (± 5.08)
C13:0	0.96 (± 0.27)	0.93 (± 0.14)	0.39 (± 0.02)	0.84 (± 0.69)
C18:0	1.78 (± 0.07)	1.48 (± 0.038)	1.6 (± 0.13)	1.61 (± 0.10)
C20:0	0.93 (± 0.04)	n.d.	0.21 (± 0.11)	0.44 (± 0.005)
C21:0	n.d.	n.d.	0.27 (± 0.04)	0.23 (± 0.07)
C22:0	5.25 (± 6.95)	13.36 (± 2.25)	8.83 (± 8.73)	10.54 (± 11.32)
C23:0	0.58 (± 0.006)	1.23 (± 0.079)	1.22 (± 0.061)	1.49 (± 0.25)
C17:1	0.85 (± 0.11)	0.18 (± 0.05)	0.28 (± 0.45)	0.49 (± 0.073)
C18:1N9T	0.06 (± 1.09)	n.d.	n.d.	n.d.
C20:1	1.84 (± 0.10)	0.5 (± 0.31)	0.82 (± 0.074)	1.28 (± 0.15)
C22:1N9	2.01 (± 0.11)	1.77 (± 1.63)	2.6 (± 0.20)	2.39 (± 0.51)
C24:1	17.22 (± 2.71)	7.55 (± 1.63)	11.81 (± 0.48)	13.1 (± 5.41)
C18:2N6T	n.d.	n.d.	n.d.	0.27 (± 13.06)
C20:2	7.82 (± 0.63)	0.46 (± 0.053)	7.48 (± 8.20)	8.31 (± 9.03)
C20:3N3	n.d.	n.d.	0.34 (± 10.30)	0.74 (± 7.04)
C20:3N6	0.22 (± 0.14)	0.17 (± 0.093)	0.24 (± 0.13)	0.25 (± 0.16)
C20:4N6	3.32 (± 0.2)	2.41 (± 0.40)	2.98 (± 0.13)	2.46 (± 0.88)
C20:5N3	21.71 (± 2.51)	15.34 (± 3.02)	24.14 (± 0.81)	24.38 (± 8.37)
C22:2	8.35 (± 0.31)	9.66 (± 1.60)	14.71 (± 1.88)	20.46 (± 8.49)
C22:6N3	1.78 (± 0.25)	1.17 (± 0.05)	1.47 (± 0.085)	1.51 (± 0.34)
SFA	33.34 (± 8.57) ^a	39.07 (± 8.67) ^a	36.29 (± 8.73) ^a	36.10 (± 7.83) ^a
MUFA	22.00 (± 7.21) ^a	10.03 (± 4.97) ^b	15.53 (± 4.97) ^b	17.27 (± 5.46) ^b
PUFA	43.23 (± 7.39) ^a	29.24 (± 8.75) ^b	51.39 (± 8.75) ^a	58.43 (± 9.74) ^a

Nota: *Porcentajes en peso, Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($p \geq 0.05$); n.d.=no detectado, (\pm Desviación estándar).

Los compuestos de metil ésteres (Tabla 4) de ácidos grasos que predominaron fueron los poliinsaturados (PUFA), ya que estuvieron presentes a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm; no obstante, a 1.25 vvm, se alcanzó mayor presencia de ácidos grasos saturados (SFA). Los elementos en mayor cantidad fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2 de manera similar a los reportado por: (Al-Ameri y Al-Zuhair 2019; Alishah et al., 2019).

El análisis de varianza, mostró que no existió diferencia significativa entre SFA y PUFA; del mismo modo los monoinsaturados (MUFA) a 1.25, 1.75 y 2.25 vvm no revelaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$), mientras que a 0.75 el valor de los MUFA fue ligeramente mayor. Por los ácidos grasos obtenidos, se puede decir que el incremento en la aireación en los FBRC favoreció la mayor producción de PUFA, sobre todo a 1.75 vvm y 2.25 vvm, contribuyendo en las características del biocombustible; es recomendable que la composición de los lípidos sean ácidos grasos de cadena larga, con bajo grado de insaturación para evitar emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del combustible tales como el número de cetanos (NC) y estabilidad oxidativa (EO) (Knothe, 2010, Basto-Flores et al., 2022).

Considerando que dentro de las principales propiedades de los combustibles se encuentra el NC (número de cetanos), el cual de manera adimensional describe la calidad de ignición de un combustible y se relaciona con el tiempo de retardo de la ignición que experimenta un combustible (Arguelles et al., 2018); según el análisis FAME, debido a las mayores cantidades detectadas de PUFA en los experimentos, se puede indicar que el biodiesel sería de baja calidad considerando la baja presencia de ácidos grasos saturados.

Conclusiones

Por lo anterior se puede concluir que la tasa de aireación a 0.75 vvm fue la más apropiada para obtener un mayor crecimiento celular, pero hay que observar que, a 1.25 vvm ocurrió un mayor incremento en el contenido de lípidos y por tanto en la productividad de lípidos. El régimen de trabajo estuvo en el rango de flujo de tipo burbujeo homogéneo, por las características del reactor y la velocidad superficial del gas.

De acuerdo a las condiciones planteadas, en relación al crecimiento celular, lo conveniente sería manejar una tasa de aireación de 0.75 vvm; por otra parte, para que se obtenga mayor producción de lípidos, la tasa de aireación sería a 1.25 vvm, por tanto se podría considerar un proceso de cultivo primero creciendo las células y posteriormente a las condiciones con agitación de 1.25 vvm para continuar el cultivo, tomando en cuenta las concentraciones de nutrientes, el tipo de iluminación y verificando la productividad.

Importancia del estudio, fortalezas y debilidades

Este estudio se realizó con la finalidad de conocer e interpretar el efecto de la aireación y algunos parámetros hidrodinámicos como la tasa de corte (τ), sobre la producción de ácidos grasos de metil ésteres (FAME) principalmente, aunado al hecho de determinar de igual modo si estos cambios en la aireación benefician otros parámetros como el crecimiento celular, consumo de nitrógeno, productividad de lípidos, además utilizar correlaciones para determinar en función de los FAME la calidad del biodiesel, de acuerdo tipo de componentes de metil ésteres presentes a flujos de aireación planteados.

En relación a las fortalezas se puede indicar que se tiene un planteamiento metodológico adecuado para calcular la hidrodinámica en los fotobiorreactores y otras determinaciones, el conocimiento para poder interpretar los resultados obtenidos, además de contar con equipamiento para realizar la parte experimental, sobre las áreas de oportunidad se puede señalar que es necesario continuar experimentando, considerando otros factores operacionales, considerar mayor análisis de las determinaciones y profundizar más en relación estos.

Referencias

- Agarwal, A., Rana, M., & Park, J. H. (2018). Advancement in technologies for the depolymerization of lignin. *In Fuel Processing Technology* (Vol. 181, pp. 115–132). Elsevier B.V.
- Al-Ameri, M. & Al-Zuhair, S. (2019). Using switchable solvents for enhanced, simultaneous microalgae oil extraction-reaction for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 217–224.
- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *In Microbial Cell Factories* (Vol. 18, Issue 1, pp. 1–17). *BioMed Central Ltd.*

- Anto, S., Mukherjee, S. S., Muthappa, R., Mathimani, T., Deviram, G., Kumar, S. S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 242, 125079.
- Arguelles, E. D., Laurena, A. C., Monsalud, R. G., & Martínez-Goss, M. R. (2018). Fatty acid profile and fuel-derived physicochemical properties of biodiesel obtained from an indigenous green microalga, *Desmodesmus* sp. (I-AU1), as potential source of renewable lipid and high quality biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 411–419.
- Ashok, V., Shriwastav, A., Bose, P., & Gupta, S. K. (2019). Phycoremediation of wastewater using algal -bacterial photobioreactor: Effect of nutrient load and light intensity. *Bioresource Technology Reports*, 7(March), 100205.
- Babcock, R.W., Malda, J., & Radway, C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 14, 169-184.
- Basto-Florez, L. E., Millán-Alvarado, S. A., Medina-Caballero, L. F., Mora-Vergara, L. Z., & Caballero-Hernández, Y. T. (2022). Estudio del biodiesel obtenido a partir de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo). *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 41-53
- Beal, C.M., Gerber, L.N., Sills, D.L., Huntley, M.E., Machesky, S.C., & Walsh, M. J. (2015). Algal biofuel production for fuels and feed in a 100-ha facility: a comprehensive techno-economic analysis and life cycle assessment. *Algal Res-Biomass Biofuels Bioprod*, 10, 66–79.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 8, 911–917.
- Castillo, Omar S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.
- Castellanos, I. C., González-Peralta, K., & Pinzón-Torres, S. J. (2020). Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Revista Ontare*, 6. <https://doi.org/10.21158/23823399.v6.n0.2018.2425>
- Cerri, M.O., Futiwaki, L., Cruz, A.J., & Badino, A.C. (2008). Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 51–57
- Chandrasekhar K, Lee Y-J., & Lee D-W. (2015). Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes. *Int J Mol Sci Int J Mol Sci*, 16, 8266–93.
- Chew K.W., Chia S.R., Show P.L., Yap Y.J., Ling T.C., & Chang J.S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 1–13.
- Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. & Lin, C. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389-3396.

- De Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Moreira, L. S., Wolf Maciel, M. R., & Maciel Filho, R. (2019). Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renewable Energy*, *143*, 130–141.
- Deconinck, N., Muylaert, K., Ivens, W., & Vandamme, D. (2018). Innovative harvesting processes for microalgae biomass production: A perspective from patent literature. In *Algal Research* (Vol. 31, pp. 469–477). Elsevier B.V.
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. London: Academic Press Limited.
- Gómez-Luna, L., Tormos-Cedeño, L., & Ortega-Díaz, Y. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Tecnología Química*, *42*(1), 70-93. Epub 30 de abril de 2022.
- González Lazo, Y., Rodríguez Ramos P.A., Sánchez Borroto, Y.S., et al. (2019). Diseño y simulación de un fotobiorreactor para el cultivo de la microalga *Chlorella Vulgaris*. *Ing. Mecánica*. *22*(3), 169-77.
- Guillard, R.R.L., & Ryther, J.H. (1962) Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) *Gran. Canadian Journal of Microbiology*, *8*, 229-239.
- Jiang, L., Ji, Y., Hu, W., Pei, H., Nie, C., Ma, G. & Song, M. (2016). Adjusting irradiance to enhance growth and lipid production of *Chlorella vulgaris* cultivated with monosodium glutamate wastewater. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* *162*(1), 619-624.
- Kee-Lam, M., Iqram-Yusoff, M., Uemura, Y., Wei-Lim, J., Gek-Khoo, C., Teong-Lee, K. & Chyuan-Ong, H. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, *103*(1), 197-207.
- Kim, J., Lee, J. & Lu, T. (2015). A model for autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, *99*(1), 55-60.
- Knothe, G. (2010). Calidad del combustible biodiesel y la norma astm. *Palmas* *31*(Especial), 162-171.
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Pugazhendhi, A., Thi, NBD., Zhen G., & Chandrasekhar K. (2017). A comprehensive overview on light independent fermentative hydrogen production from wastewater feedstock and possible integrative options. *Energy Convers Manag*, *141*, 390–402.
- Kumar-Enamala M., Enamala S., Chavali M., Jagadish D., Yadavalli R., Kolapalli B., Vasu-Arathyula T., Velpuri J., y Kuppam Ch. (2018). Production of biofuels from microalgae. A review on cultivation,harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *94*, 49– 68.
- Montoya, A. (2021). Cultivo de Microalgas. CITED 2021, Quito, Ecuador
- Pham, H., Kwak, H. S., Hong, M., Lee, J., Chang W. S. & Sim, S. J. (2017). Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresource Technology*. *239*(1), 211-218.

- Posten C. & Feng-Chen S. (Ed.). (2016). *Microalgae biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Hannover, Germany: Editorial Springer International Publishing.
- Qaria H., Rehana M., & Nizami A.S. (2017). 9th International Conference on Applied Energy, ICAE2017, 21-24 August 2017, Cardiff, UK Key. Issues in Microalgae Biofuels: A Short Review. *Energy Procedia*, 142, 898–903.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Robles Heredia, J.C. (2014). Evaluación de la productividad de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* bajo dos modos de limitación de nitrógeno en fotobiorreactores tipo airlift y columna de burbujeo. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.
- Sadeghizadeh, A., Farhad dad F., Moghaddasi, L. & Rahimi R. (2017). CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243(1), 441-447.
- Shi, J., Pandey, P. K., Franz, A. K. Deng, H., & Jeannotte, R. (2016). *Chlorella vulgaris* production enhancement with supplementation of synthetic medium in dairy manure wastewater. *AMB Express*, 6(15), 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0184-1>
- Trivedi J., Aila M., Bangwal D.P., Kaul S., & Garg M.O. (2015). Algae based biorefinery—how to make sense? *Renew Sustain Energy Rev.*47, 295–307.
- Wu J., Alam M.A., Pan Y , Huang D., Wang Z., & Wang T. (2017). Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl ac-etate for biodiesel production. *Journal Taiwan Institute Chemical Engineering*, 71, 32-39.
- Zhan J , Zhang Q , Qin M., y Hong Y. (2016). Selection and characterization of eight fresh- water green algae strains for synchronous water purification and lipid production. *Front Environ Sci Eng*, 10(3), 548–58.

Fecha de recepción: 31/05/2022

Fecha de revisión: 30/06/2022

Fecha de aceptación: 12/07/2022