



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel**

**Luis Miguel Serrano Bermúdez, Ing. Qco.**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ingeniería, Departamento Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá, Colombia

2012



# **Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel**

**Luis Miguel Serrano Bermúdez, Ing. Qco.**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ingeniería Química**

Director:

Ing.Qco., MSc, Ph.D. Rubén Darío Godoy Silva

Codirector:

Biólogo MSc, Dr. Luis Carlos Montenegro Ruiz

Línea de Investigación:

Bioprocesos – Cultivo de microalgas

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ingeniería, Departamento Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2012



*En memoria de mi papá*

*La mejor persona que he conocido y  
conoceré, ojalá algún día pueda hacerlo la  
mitad de bien.*



## **Agradecimientos**

A mis padres Miguel Serrano y Olivella Bermúdez por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanos Paula Andrea y Oscar Mauricio por su inmensa comprensión y constante apoyo, en especial en los momentos difíciles que todos tuvimos que afrontar sobre todo al final de esta maestría.

A mí tío Fernando Bermúdez y su esposa Piedad Llanos ya que con su ejemplo demostraron que todo es posible.

A la Universidad Nacional de Colombia y al departamento de Ingeniería Química y Ambiental por mi formación como Magister en Ingeniería Química.

A los profesores Rubén Darío Godoy Silva del departamento de Ingeniería Química y Ambiental y Luis Carlos Montenegro Ruiz del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia por la dirección en el proyecto.

Al profesor Paulo César Narváez del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia por su asesoramiento siempre acertado durante el desarrollo de mi tesis.

A Colciencias y a su programa de formación de investigadores Generación del Bicentenario del programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, 2009.

A la estación La Terraza, sede piscícola de la Universidad Nacional por permitir el cultivo masivo de las microalgas.

A los laboratorios de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología y de Toxicología del Departamento de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia por su

colaboración en la liofilización de la biomasa algal y por la caracterización de aceites, respectivamente.

A mis amigos y colegas Daniel Ramirez, Liliana Ardila y Marisol Herrera por sus contribuciones y observaciones siempre acertadas en el cultivo de algas.

A mis compañeros del posgrado en Ingeniería Química por su apoyo constante en esta tesis.



## Resumen

La presente investigación evaluó la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas de Colombia y un alga de referencia como fuentes potenciales para la producción de biodiesel. Las microalgas *Scenedemus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* presentaron las mayores productividades de lípidos con 18,8 y 18,7 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>, respectivamente, equivalentes a 4,1 veces la productividad de aceite de la palma africana, actual materia prima empleada en Colombia para la producción industrial de biodiesel. De acuerdo con la caracterización de los ácidos grasos producidos por las microalgas estudiadas, todas pueden ser empleadas en la producción de biodiesel, debido a la similitud de estos con aceites ya empleados en la producción de biodiesel, por lo cual fue escogida la microalga *Chlorella vulgaris* para estudios posteriores, los cuales consistieron en la optimización de la acumulación y productividad de lípidos variando los factores contenido de CO<sub>2</sub>, irradiancia, fotoperiodo y aireación. La productividad de lípidos óptima predicha por el modelo estadístico dentro del intervalo estudiado fue 69,7 ± 5,9 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>, 15,2 veces la productividad de la palma africana, para un contenido de CO<sub>2</sub> de 2%, irradiancia de 114 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 24:0 LO y aireación de 1,2 vvm; el contenido de lípidos bajo las condiciones mencionadas fue de 16,4 ± 1,4%. La optimización de los factores para maximizar el contenido de lípidos y minimizar la disminución de la productividad de lípidos se logró para un contenido de CO<sub>2</sub> del 1,2%, irradiancia de 22 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 12:12 LO y aireación de 0,4 vvm con valores de 32,7 ± 1,4% y 42,0 ± 5,9 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>, respectivamente, equivalente a 9,1 veces la productividad de aceite de la palma africana, las anteriores son condiciones fácilmente alcanzables en cualquier parte del territorio colombiano.

**Palabras clave:** cultivo de microalgas, acumulación de lípidos, productividad de lípidos, biodiesel.

## Abstract

This research evaluated the ability to accumulate lipids and their composition of five microalgae, four of them native from Colombia and one reference alga as potential feedstocks for biodiesel production. The microalgae *Scenedesmus ovalternus* and *Chlorella vulgaris* had the highest lipid productivity: 18.8 and 18.7 mg·L<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, respectively, 4.1 times longer than the productivity of palm oil, current feedstock for the industrial production of biodiesel in Colombia. According to the characterization of the fatty acids produced by the microalgae studied, the five microalgae can be employed in the production of biodiesel because their oils have similarity with the oils used in the production of biodiesel. Microalga *Chlorella vulgaris* was chosen for next research where CO<sub>2</sub> content, irradiance, photoperiod and aeration were evaluated as parameters of production and accumulation of lipids. The optimal lipid productivity predicted by the statistical model in the range studied was 69.7 ± 5.9 mg·L<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, 15.2 times the oil productivity of African Palm, for CO<sub>2</sub> content of 2%, irradiance of 114 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, photoperiod of 24:0 LO and aeration of 1.2 vvm. The content of lipids in those conditions was 16.4 ± 1.4%. The optimal conditions of the factors in order to maximize the lipid content and to minimize the reduction in lipid productivity was reached with CO<sub>2</sub> content 1.2%, photoperiod 12:12 LO, Irradiance 22 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> and aeration 0.4 vvm, these conditions are easily reachable in any part of Colombia. The optimum lipid content and lipid productivity were 32.7 ± 1.4% and 42.0 ± 5.9 mg·L<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>, respectively, 9.1 times the oil productivity of African Palm.

**Keywords:** microalgae culture, lipid acumulation, lipid productivity, biodiesel.

.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Producción de biodiesel a partir de microalgas</b> .....	<b>5</b>
1.1 Introducción.....	6
1.2 Producción de biodiesel .....	10
1.2.1 Fuentes de biodiesel.....	13
1.2.1.1 Biodiesel a partir de plantas.....	14
1.2.1.2 Biodiesel a partir de microalgas.....	16
1.3 Producción de biomasa microalgal.....	18
1.3.1 Medio de cultivo.....	19
1.3.1.1 Nitrógeno.....	19
1.3.1.2 Fósforo .....	19
1.3.1.3 Hierro.....	19
1.3.1.4 Micronutrientes.....	20
1.3.2 Parámetros de cultivo .....	20
1.3.2.1 CO <sub>2</sub> .....	20
1.3.2.2 Temperatura .....	21
1.3.2.3 Iluminación .....	21
1.3.2.4 pH.....	23
1.3.2.5 Agitación.....	23
1.4 Métodos de cultivo .....	24
1.4.1 Estanques exteriores .....	24
1.4.1.1 Estanques largos exteriores .....	25
1.4.1.2 Lagos o cuencas naturales .....	25
1.4.1.3 Sistemas inclinados .....	25
1.4.1.4 Estanques circulares .....	26
1.4.1.5 Estanques <i>Raceway</i> .....	26
1.4.2 Fotobiorreactores.....	27
1.4.2.1 Fotobiorreactor tubular .....	27
1.4.2.2 Fotobiorreactor de panel plano .....	28
1.4.2.3 Fotobiorreactor de columna .....	30

1.5	Recuperación de biomasa .....	30
1.5.1	Sedimentación.....	30
1.5.2	Floculación .....	31
1.5.3	Centrifugación .....	31
1.5.4	Filtración.....	31
1.6	Recuperación de lípidos.....	32
1.6.1	Deshidratación biomasa .....	32
1.6.2	Rompimiento celular.....	32
1.6.3	Extracción lípidos .....	33
<b>2.</b>	<b>Comparación de cinco métodos gravimétricos y uno colorimétrico para la medición de lípidos totales en la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>.....</b>	<b>35</b>
2.1	Introducción .....	36
2.2	Materiales y métodos.....	38
2.2.1	Mantenimiento de microalgas.....	38
2.2.2	Condiciones de cultivo.....	38
2.2.3	Reactivos .....	38
2.2.4	Rendimiento de peso seco .....	39
2.2.5	Disrupción celular.....	39
2.2.6	Medición del contenido total de lípidos por métodos gravimétricos.....	39
2.2.6.1	Extracción Soxhlet.....	40
2.2.6.2	Método Bligh & Dyer original .....	40
2.2.6.3	Método Bligh & Dyer modificado por Inouye.....	41
2.2.6.4	Método Bligh & Dyer modificado por Manirakiza .....	41
2.2.6.5	Segunda modificación de método Bligh & Dyer por Manirakiza.....	42
2.2.7	Medición de lípidos por colorimetría .....	42
2.2.8	Diseño experimental, análisis estadístico y modelo cinético.....	43
2.3	Resultados y discusión .....	43
2.3.1	Disrupción celular.....	43
2.3.2	Comparación métodos gravimétricos de medición de lípidos .....	48
2.3.3	Calibración método colorimétrico para medición de lípidos de microalga .....	51
<b>3.</b>	<b>Microalgas <i>Scenedesmus ovalternus</i>, <i>Chlorella vulgaris</i>, <i>Nannochloropsis sp.</i>, <i>Isochrysis sp.</i> y <i>Botryococcus braunii</i> como fuentes potenciales de biodiesel .....</b>	<b>53</b>
3.1	Introducción .....	54
3.2	Materiales y métodos.....	56
3.2.1	Mantenimiento de microalgas.....	56
3.2.2	Condiciones de cultivo.....	57
3.2.3	Medición de crecimiento.....	57
3.2.4	Reactivos .....	57
3.2.5	Rendimiento de peso seco .....	57
3.2.6	Contenido de lípidos totales .....	58
3.2.7	Caracterización lípidos .....	58
3.2.8	Ajuste cinéticas de crecimiento .....	59
3.2.9	Diseño experimental y análisis estadístico .....	60
3.3	Resultados y discusión .....	60
3.3.1	Crecimiento microalgas.....	60
3.3.2	Productividad de biomasa .....	64
3.3.3	Contenido de lípidos.....	67
3.3.4	Productividad de lípidos .....	68

3.3.5	Caracterización de los lípidos derivados de las microalgas .....	70
3.3.6	Selección mejor cepa para producción de biodiesel .....	74
<b>4.</b>	<b>Efecto del CO<sub>2</sub>, la luz y la aireación en el crecimiento y acumulación de aceites en la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>.....</b>	<b>77</b>
4.1	Introducción.....	78
4.2	Materiales y métodos .....	80
4.2.1	Mantenimiento de microalgas .....	80
4.2.2	Diseño experimental .....	80
4.2.3	Condiciones de cultivo.....	81
4.2.4	Medición de crecimiento .....	82
4.2.5	Reactivos.....	83
4.2.6	Rendimiento de peso seco .....	83
4.2.7	Contenido de lípidos totales.....	83
4.2.8	Ajuste cinéticas de crecimiento.....	84
4.2.9	Análisis estadístico .....	84
4.3	Resultados y discusión.....	84
4.3.1	Velocidad específica de crecimiento aparente (Y <sub>1</sub> ) .....	86
4.3.2	Productividad de biomasa (Y <sub>2</sub> ).....	89
4.3.3	Contenido y producción de lípidos (Y <sub>3</sub> y Y <sub>4</sub> ).....	90
4.3.4	Optimización productividad de lípidos.....	93
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>97</b>
5.1	Conclusiones.....	97
5.2	Recomendaciones.....	98
<b>Anexo A</b>	<b>Elaboración medios de cultivos empleados.....</b>	<b>101</b>
<b>Anexo B</b>	<b>Pruebas de Tukey realizadas.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo C</b>	<b>Informe composición ácidos grasos microalgas cultivadas.....</b>	<b>107</b>
<b>Anexo D</b>	<b>Efecto del CO<sub>2</sub>, la luz y la aireación en el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> LAUN 002.....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo E</b>	<b>Modelos de superficies de respuesta del efecto del CO<sub>2</sub> y la luz sobre el crecimiento y acumulación de lípidos en <i>Chlorella vulgaris</i> LAUN 002.....</b>	<b>127</b>
<b>Anexo F</b>	<b>Comentarios jurados sustentación pública tesis.....</b>	<b>137</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>.....</b>	<b>141</b>



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.1.</b> Precio petróleo crudo en dólares por barril .....	7
<b>Figura 1.2.</b> Oferta mundial de energía según combustible.....	8
<b>Figura 1.3.</b> Emisiones de CO <sub>2</sub> mundiales según combustible .....	9
<b>Figura 1.4.</b> Transesterificación de triglicérido.....	11
<b>Figura 1.5.</b> Porcentaje en la reducción de emisiones con el uso de B100 y B20 en motores de combustión. THNQ: total de hidrocarburos no quemados; MP: material particulado. NOx: óxidos de nitrógeno. HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos. nHAP: nitratos de HAP .....	12
<b>Figura 1.6.</b> Producción mundial histórica de aceite vegetal (barras) y aporte porcentaje principales aceite vegetales: palma (□), soya (Δ), colza (◇), girasol (○) .....	13
<b>Figura 1.7</b> Evolución de producción mundial de biodiesel (línea) y porcentaje de aceite empleado en la producción de biodiesel (barras) .....	14
<b>Figura 1.8.</b> Distribución mundial por fuente de la oferta de materias primas para la producción de biodiesel.....	15
<b>Figura 1.9.</b> Evolución de la producción de aceite de palma de los mayores productores mundiales: Indonesia (◇), Malasia (□), Nigeria (Δ), Tailandia (+) y Colombia (○) .....	16
<b>Figura 1.10</b> Esquema estanque abierto <i>Raceway</i> (96). .....	26
<b>Figura 1.11</b> Esquema fotobiorreactor tubular (96).....	28
<b>Figura 1.12</b> Esquema fotobiorreactor de panel plano (96) .....	29
<b>Figura 2.1</b> Diagrama del equipo de extracción Soxhlet. 1, Condensador; 2, Zona de Extracción; 3, Balón; 4, Sifón; 5, Muestra; 6, Dedal; 7, Vapor de solvente; 8, Solvente condensado (114). .....	40
<b>Figura 2.2</b> Efecto de la amplitud de sonicación en la cinética de disrupción celular de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> suspendida en agua destilada. Densidad celular: 1,2x10 <sup>9</sup> células·mL <sup>-1</sup> . Potencia específica de sonicación: (◇): 1,4 W·mL <sup>-1</sup> ; (□): 1,9 W·mL <sup>-1</sup> ; (Δ): 2,4 W·mL <sup>-1</sup> ; (○): 2,9 W·mL <sup>-1</sup> . n=2 Barra error: 1 Desv. Estándar .....	44
<b>Figura 2.3</b> Efecto de la concentración celular inicial en la disrupción de microalga suspendida en agua destilada; potencia específica de sonicación 2,4 W·mL <sup>-1</sup> . (○): 8,9x10 <sup>07</sup> células·mL <sup>-1</sup> ; (□): 1,6x10 <sup>08</sup> células·mL <sup>-1</sup> ; (Δ): 1,2x10 <sup>09</sup> células·mL <sup>-1</sup> . n =2. Barra error: 1 Desv. Estándar.....	45
<b>Figura 2.4</b> Efecto de la potencia específica de sonicación en el parámetro <i>k</i> , para microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . Barra error: 1 error estándar de regresión .....	47
<b>Figura 2.5</b> Porcentaje de lípidos extraídos en peso seco de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> LAUN 002 con cada método de extracción evaluado. Métodos gravimétricos n=3,	

método colorimétrico n=7. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.....	50
<b>Figura 2.6</b> Curva de calibración Absorbancia a 375 nm en función de la cantidad de lípidos, microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar .....	52
<b>Figura 3.1</b> Curvas de crecimiento de las microalgas <i>Scenedesmus</i> (◇), <i>Chlorella</i> (□), <i>Botryococcus</i> (○). Medio <i>BBM</i> , Temperatura 24°C, irradiancia 40 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 18:6 LO, aireación 0,7 vvm, aire atmosférico ( $\text{CO}_2 \sim 0,03\%$ ), n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. ....	61
<b>Figura 3.2</b> Curvas de crecimiento de las microalgas <i>Nannochloropsis</i> (○), <i>Isochrysis</i> (□). Medio <i>f/2</i> , Temperatura 24°C, irradiancia 40 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 18:6 LO, aireación 0,7 vvm, aire atmosférico ( $\text{CO}_2 \sim 0,03\%$ ), n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. ....	62
<b>Figura 3.3</b> Velocidad específica de crecimiento aparente para las diferentes microalgas estudiadas n=3. Barra error: 1 Error Estándar de regresión. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.....	63
<b>Figura 3.4</b> Productividad de biomasa de microalgas cultivadas al final del periodo de crecimiento, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.....	65
<b>Figura 3.5</b> Contenido de lípidos del peso seco de las microalgas estudiadas al finalizar el periodo de crecimiento, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.....	68
<b>Figura 3.6</b> Productividad de lípidos de las microalgas estudiadas, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey. ....	70
<b>Figura 4.1.</b> Esquema suministro aire enriquecido con $\text{CO}_2$ en cultivo de microalgas.....	82
<b>Figura 4.2.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Velocidad específica de crecimiento aparente ( $\mu$ ) .....	88
<b>Figura 4.3.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Productividad de biomasa ( $P_{\text{bio}}$ ) .....	89
<b>Figura 4.4.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre contenido de lípidos totales del peso seco (% PS).....	91
<b>Figura 4.5.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Productividad de lípidos ( $P_{\text{lip}}$ ) .....	92
<b>Figura 4.6</b> Efecto del contenido de $\text{CO}_2$ en el aire sobre el porcentaje de acumulación de lípidos del peso seco ( $\Delta$ ) y sobre la disminución de la productividad de lípidos (□), respecto con la máxima obtenida ( $69,7 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ). Irradiancia 22 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 12:12 LO, aireación 0,4 vvm.....	94



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.1.</b> Plantas de producción de biodiesel existentes en Colombia (70; 71). .....	17
<b>Tabla 1.2.</b> Contenido de aceite de algunas especies de microalgas (16) .....	17
<b>Tabla 1.3</b> Comparación de algunas fuentes de biodiesel, para suplir el 50% de la demanda de combustible en USA (16) .....	18
<b>Tabla 2.1</b> ANAVA efecto de la concentración celular y el tiempo sobre el porcentaje de disrupción en los primeros 6 minutos de sonicación .....	45
<b>Tabla 2.2.</b> Coeficientes de regresión lineal porcentaje de disrupción celular en función del tiempo, después de 12 minutos de sonicación .....	46
<b>Tabla 2.3.</b> Coeficientes de regresión lineal del parámetro $k$ en función de la densidad celular inicial de sonicación .....	46
<b>Tabla 2.4.</b> Coeficientes de regresión lineal del parámetro $k$ en función de la potencia específica de sonicación .....	47
<b>Tabla 2.5.</b> ANAVA efecto de método de extracción sobre el contenido de lípidos extraído .....	49
<b>Tabla 3.1</b> Matriz de coeficientes de modelos logísticos ajustados a las cepas evaluadas según Ec. 3.1. con sus respectivos errores estándar (EE) y coeficiente de determinación $R^2$ ; Unidades: $X_{max}$ y $X_0$ en Células·mL <sup>-1</sup> y $\mu$ en día <sup>-1</sup> .....	64
<b>Tabla 3.2</b> ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en la tasa de crecimiento de éstas .....	64
<b>Tabla 3.3</b> ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en la productividad de biomasa de éstas .....	65
<b>Tabla 3.4</b> Productividades biomasa ( $P_{bio}$ ) mínima y máxima de microalgas burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con CO <sub>2</sub> ; productividades en mg·L <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> .....	66
<b>Tabla 3.5</b> ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en el contenido de lípidos del peso seco de éstas.....	67
<b>Tabla 3.6</b> Porcentaje de lípidos mínimo y máximo de microalgas del peso seco burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con CO <sub>2</sub> .....	67
<b>Tabla 3.7</b> ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en el contenido de lípidos del peso seco de éstas.....	69
<b>Tabla 3.8</b> Productividades de lípidos ( $P_{lip}$ ) mínima y máxima de microalgas burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con CO <sub>2</sub> , productividades en mg·L <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> .....	69
<b>Tabla 3.9</b> Composición de los ácidos grasos de lípidos de las microalgas estudiadas...	71
<b>Tabla 3.10</b> Composición típica de ácidos grasos de algunos aceites vegetales.....	73

<b>Tabla 4.1</b> Factores y sus niveles de diseño experimental de optimización de productividad de biomasa y lípidos .....	80
<b>Tabla 4.2</b> Distribución unidades experimentales diseño experimental .....	81
Tabla 4.3 Valores de respuestas de unidades experimentales, Unidades: $Y_1$ en $\text{día}^{-1}$ , $Y_2$ y $Y_4$ en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y $Y_3$ en % PS .....	85
<b>Tabla 4.4</b> Resumen de los modelos de regresión, ( $\alpha=5\%$ , g.l.modelo: 14, g.l.residuo: 19, $F_{\text{crítico}}= 2,26$ ) .....	85
<b>Tabla 4.5</b> Matriz coeficientes modelos de regresión ajustados para Ec. 4.3 .....	86

# Lista de símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$A$	Área	$m^2$	$\iint dx dy$
$a$	Coefficiente regresión múltiple	1	<i>Ec. 4.3</i>
$E$	Energía	J	$m \cdot L^2 \cdot t^{-2}$
$f$	frecuencia	Hz	$t^{-1}$
$I$	Irradiancia	$W \cdot m^{-2}$	$E \cdot A^{-1} \cdot t^{-1}$
$L$	Longitud	m	<i>DF</i>
$m$	Masa	kg	<i>DF</i>
$M$	Porcentaje de mortalidad	1	<i>Ec. 2.1</i>
$M_{max}$	Porcentaje de mortalidad máxima	1	<i>Ec. 2.1</i>
$n$	Cantidad de materia	mol	<i>DF</i>
$P_{bio}$	Productividad de biomasa	$kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	$m \cdot A^{-1} \cdot t^{-1}$
$P_{lip}$	Productividad de lípidos	$kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	$m \cdot A^{-1} \cdot t^{-1}$
$r$	Radio	m	<i>DF</i>
$t$	Tiempo	s	<i>DF</i>
$T$	Temperatura	K	<i>DF</i>
$V$	Volumen	$m^3$	$\int dr^3$
$X$	Densidad celular	$N^0 \text{ células} \cdot m^{-3}$	<i>Ec. 3.1</i>
$X_0$	Densidad celular inicial	$N^0 \text{ células} \cdot m^{-3}$	<i>Ec. 3.1</i>
$X_{max}$	Densidad celular máxima	$N^0 \text{ células} \cdot m^{-3}$	<i>Ec. 3.1</i>

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$k$	Constante de proporcionalidad de primer orden de velocidad de disrupción	$s^{-1}$	<i>Ec. 2.1</i>
$\lambda$	Longitud de onda	m	<i>DF</i>
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento media	$s^{-1}$	<i>Ec. 3.1</i>

## Superíndices

### Superíndice Término

$n$	Exponente, potencia
-----	---------------------

## Subíndices

Subíndice	Término
-----------	---------

---

<i>O</i>	Inicial
<i>bio</i>	biomasa
<i>lip</i>	lípidos
<i>Max</i>	Máximo

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

---

<i>D</i>	Estadístico de Durbin y Watson
<i>DE</i>	Desviación Estándar
<i>DF</i>	Dimensión Fundamental
<i>DO</i>	Densidad óptica
<i>DSH</i>	Diferencia significativa honesta
<i>EE</i>	Error estándar
<i>F</i>	Estadístico de Fisher
<i>FAME</i>	Metil ésteres de ácidos grasos (por sus siglas en inglés)
<i>HAP</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<i>HL</i>	Horas de luz diarias
<i>LO</i>	Ciclo de luz oscuridad
<i>MP</i>	Material Particulado
<i>MUFAs</i>	Ácidos grasos monoinsaturados (por sus siglas en inglés)
<i>n</i>	Número de repeticiones
<i>nHAP</i>	Nitratos de hidrocarburos aromáticos policíclicos
<i>PAR</i>	Radiación Fotosintéticamente Activa (por sus siglas en inglés)
<i>PUFAs</i>	Ácidos grasos poliinsaturados (por sus siglas en inglés)
<i>PS</i>	Peso seco
<i>p-valor</i>	Valor probabilístico
<i>SFAs</i>	Ácidos grasos saturados (por sus siglas en inglés)
<i>t</i>	Estadístico t de Student
<i>THNQ</i>	total de hidrocarburos no quemados
<i>vvm</i>	Volumen de gas por volumen de líquido y por minuto

## Introducción

En los últimos seis años, el costo del petróleo crudo a nivel mundial ha fluctuado de manera considerable. Las razones de estas fluctuaciones se hallan en las frecuentes tensiones geopolíticas, como la guerra del Golfo en 1991 (1), los movimientos políticos del norte de África a inicios del 2011 (2; 3) o las constantes especulaciones en el mercado de los combustibles (1; 4; 5). Dado que el consumo anual mundial de crudo es un 6,4% mayor que la producción anual mundial (6), es de esperarse que el precio del crudo se incremente nuevamente en el corto o mediano plazo. Según algunas estimaciones, se espera que las reservas mundiales de petróleo perduren 43 años de acuerdo con la demanda y las reservas de crudo del 2010 (6). Colombia no es ajena a este panorama, ya que se estima que para el 2020 se perderá la autosuficiencia petrolera (6; 7). A pesar de las dramáticas variaciones en su costo, el petróleo sigue siendo la principal fuente de energía a nivel mundial, con un 32,8%, seguido de cerca por el carbón y el gas natural; adicionalmente, el petróleo es el segundo responsable, luego del carbón, de las emisiones al ambiente de CO<sub>2</sub>, uno de los gases de efecto invernadero, por tal motivo, frecuentemente es asociado como uno de los responsables del calentamiento global (8).

Los biocombustibles de primera generación como el biodiesel obtenido a partir de oleaginosas, representan actualmente el 10,2% de la oferta mundial de energía. Tales biocombustibles constituyen una alternativa que impacta significativamente menos la generación neta de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (9). Los biocombustibles de primera generación, sin embargo, presentan serias desventajas, de un lado, la generación de sus materias primas tradicionales requiere de grandes extensiones de tierra cultivable (10; 11), además, la producción de estos biocombustibles también tiene potenciales impactos negativos en el ambiente, los cuales incluyen deforestación y pérdida de biodiversidad, la transformación de ecosistemas naturales y pérdida de los servicios ambientales asociados a esos ecosistemas, el establecimiento de monocultivos, el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero ante una posible deforestación de

ecosistemas boscosos, aumento en el consumo y contaminación del agua así como mayor degradación y erosión de suelos (12; 13). Los biocombustibles de segunda generación son obtenidos empleando materiales lignocelulósicos, los cuales tienen una capacidad de producción mayor; sin embargo, aún necesitan zonas fértiles para su cultivo. Por su parte, los biocombustibles de tercera generación, como los obtenidos a partir de las microalgas no presentan ninguna de las anteriores desventajas (14; 15; 16).

Las microalgas son seres unicelulares capaces de asimilar el CO<sub>2</sub> presente en el aire empleando luz solar, agua y algunos nutrientes para producir diversos productos naturales de alto valor agregado, proteínas y aceites; por tal razón se han considerado como una fuente potencial para la obtención de biodiesel (16; 17; 18; 19; 20). La idea de usar microalgas como una fuente de combustibles no es nueva, sin embargo en la actualidad se está tomando en cuenta seriamente debido a la constante fluctuación en el precio del petróleo y a la emergente preocupación acerca del calentamiento global que está asociado con la quema de combustibles fósiles (16).

Las microalgas presentan varias ventajas sobre organismos vegetales terrestres para la producción de lípidos: por un lado, se ha encontrado que para producir la misma cantidad de aceite que se obtiene a partir de plantas oleaginosas como la palma africana, la cantidad de territorio requerido es mucho menor (16). Por otro lado, las microalgas no requieren ser cultivadas en tierras fértiles o en zonas de cultivos tradicionales, ya que pueden ser cultivadas en zonas desérticas o de escasa fertilidad, disminuyendo así el impacto sobre cultivos agrícolas destinados para alimentos. Algunas microalgas pueden, incluso, cultivarse en agua de mar, por lo que no competirían por agua potable con otros cultivos (11; 16). Adicionalmente son capaces de fijar mayor cantidad de CO<sub>2</sub> que los árboles y requerir menor cantidad de agua que estos últimos (21).

Una de las principales dificultades de obtención de lípidos intracelulares a partir de microalgas radica en su pared celular, dura y de difícil penetrabilidad (20; 22), haciéndola un obstáculo a superar para una recuperación efectiva de sus lípidos. Por ello se ha estudiado una gran cantidad de métodos de rompimiento de células microalgales que incluyen métodos térmicos, enzimáticos, mecánicos y químicos (20; 23; 24; 25), haciendo que el proceso de recuperación de lípidos microalgales sean costosos.

Una vez que la integridad de la pared celular de la microalga ha sido comprometida, es posible realizar la extracción y cuantificación de los lípidos producidos por aquella durante su etapa de crecimiento; para tal fin es común el uso de métodos gravimétricos gracias a su simplicidad y confiabilidad; tales métodos, sin embargo, presentan una desventaja: para lograr resultados precisos y reproducibles es necesario el uso de cantidades considerables de biomasa, lo cual no sucede con los métodos colorimétricos, en los cuales se pueden emplear desde 30 mg de muestra (26). En este último caso, es posible realizar cultivos microalgales en volúmenes no mayores que un litro para la obtención de la biomasa requerida para la cuantificación de los lípidos producidos, lo cual es muy ventajoso para microalgas con bajo rendimiento de biomasa como *Botryococcus braunii*, para la cual se han reportado concentraciones celulares que llegan hasta  $370 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  después de 14 días de cultivo (27).

El cultivo masivo de microalgas para la producción de biodiesel debe superar una gran cantidad de retos, el primero de ellos es quizá la adaptación a las condiciones ambientales del ecosistema local, por lo cual se prefieren estudiar cepas nativas a cepas modificadas genéticamente, pues aquellas se caracterizan por tener mayor tolerancia a la contaminación y a las condiciones medioambientales, permitiendo que el control de las condiciones de cultivo sea menos riguroso (28; 29), además tales cepas deben tener tanto altas productividades de lípidos, como porcentajes de acumulación lipídica intracelular superiores al 30% del peso seco debido a los altos costos asociados con el proceso de extracción de aquellos (16; 30; 28; 29) Algunas de las microalgas que son capaces de acumular grandes cantidades de aceite son *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis sp.* y *Scenedesmus sp.*, para los cuales se ha reportado concentraciones de aceite de hasta 75%, 68%, 56%, 33% y 27% de la biomasa seca, respectivamente (16; 31; 32), las cuales además de acumular altos niveles de lípidos, se caracterizan por su rápido crecimiento y comprobada adaptación a las condiciones climatológicas colombianas gracias a que se han encontrado cepas nativas de dichas microalgas en el territorio nacional, lo cual hace a estas microalgas idóneas para la evaluación como potencial fuente de biodiesel a nivel de Colombia, país que cuenta con una alta riqueza hídrica y lumínica, condiciones propicias para el cultivo de microalgas (33; 34; 35)

Adicionalmente, para el cultivo masivo de microalgas con el objeto de producir biodiesel se debe tener en cuenta otros aspectos como: seleccionar las condiciones del cultivo adecuadas, seleccionar el modo de cultivo indicado (36; 37; 38) y seleccionar el método de recuperación de biomasa y lípidos (20; 23; 39) que permitan que el proceso sea viable económicamente.

Las condiciones de cultivo de mayor importancia para el crecimiento de cualquier microalga, son el medio de cultivo, la temperatura, la luz y el CO<sub>2</sub> (16; 20; 40). De las anteriores condiciones, las dos últimas pueden ser controladas de manera que optimicen la acumulación de biomasa y lípidos. Además están íntimamente relacionadas, dado que la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> por parte de las microalgas está directamente relacionada con la utilización eficiente de la luz (21; 41; 42), haciendo necesario la optimización de estos parámetros de manera conjunta. El efecto de la luz se puede estudiar desde tres puntos de vista: la irradiancia, la frecuencia y el fotoperiodo; este último es aproximadamente constante a lo largo del territorio colombiano (21; 22; 33; 43); en el caso del CO<sub>2</sub> también hay dos factores, el primero es el flujo de aireación que es suministrado y el segundo es el porcentaje de CO<sub>2</sub> que se suministra en dicho flujo, ambas variables fácilmente controlables (44; 42; 45; 46).

Colombia es un país tropical con condiciones adecuadas para el cultivo de microalgas, haciendo necesario realizar estudios que permitan seleccionar microalgas con perspectivas para su uso como posible materia prima de aceites para la producción de biodiesel, lo anterior fue uno de los objetivos de la presente investigación, en la cual se cultivaron a escala laboratorio las microalgas colombianas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ovalternus*, *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.* y la cepa foránea *Botryococcus braunii* UTEX 572, esta última empleada como microalga de referencia. Una vez seleccionada la cepa nativa con mayor perspectiva para la producción de biodiesel, el siguiente objetivo buscó evaluar el efecto de la irradiancia, fotoperiodo, contenido de CO<sub>2</sub> y aireación, además de la interacción entre éstos, sobre el crecimiento, la productividad de biomasa, la acumulación de lípidos y la productividad de lípidos en la microalga seleccionada. Previo a estos dos objetivos, se estandarizó un método de disrupción celular microalgal y método espectrofotométrico de cuantificación del contenido total de lípidos producidos por la microalga *Chlorella vulgaris*.



# 1. Producción de biodiesel a partir de microalgas

## RESUMEN

La energía es fundamental en el quehacer cotidiano al punto que es uno de los factores fundamentales de la economía mundial. En 2009 las principales fuentes de energía a nivel mundial fueron los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural), con una oferta de 9830 millones de toneladas de equivalentes de crudo anuales (correspondientes al 80,9% de la energía total ofertada) mientras que su demanda fue 5555 millones de toneladas de equivalentes de crudo anuales (66,5% de la energía total consumida en el planeta), cuya combustión fue responsable de la emisión de 28883 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> (99,6% de las emisiones anuales). Los biocombustibles aparecen como una alternativa energética ambientalmente más amigable debido a que su uso implica una producción neta de CO<sub>2</sub> cercana a cero; a pesar de su viabilidad técnica y ambiental, la producción de biocombustibles es polémica ya que sus insumos tradicionales pueden entrar en conflicto con otros sectores, especialmente el alimenticio. Actualmente se están estudiando nuevos insumos para la obtención de biodiesel; las microalgas constituyen una alternativa interesante pues presentan mejores rendimientos de lípidos por unidad de área que las plantas oleaginosas. En el presente artículo se presenta una exposición del contexto mundial actual de los combustibles y biocombustibles, especialmente del biodiesel, junto con una revisión del estado del arte del uso de las microalgas como insumo alternativo para la producción de biodiesel.

**Palabras clave:** energía, calentamiento global, biodiesel, microalgas

## ABSTRACT

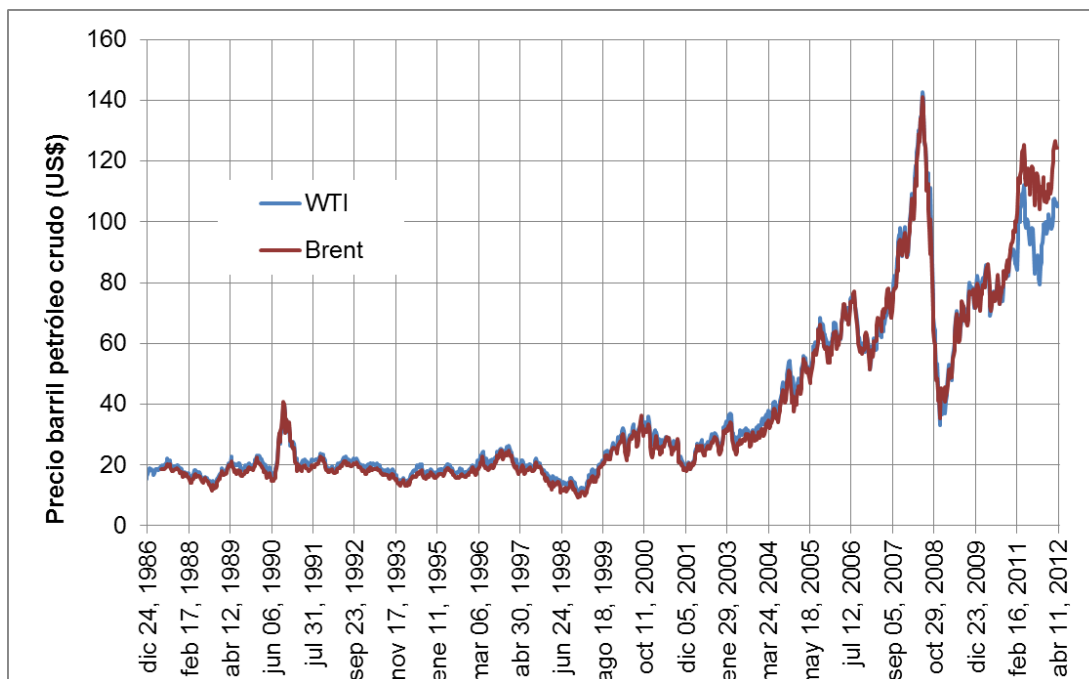
Every day, energy is essential; actually, is a key factor in global economy. In 2009 the most important energy sources around the world were fossil fuels (coal, oil and natural gas) amounting 9830 million tons of oil equivalent of supplied energy per year

(corresponding to 80.9% of total supplied energy) and 5555 million tons of oil equivalent of energy demanded per year (corresponding to 66.5% of the total energy consumed in the world). The combustion of fossil fuels was responsible for the emission of 28883 million tons of CO<sub>2</sub> (99.6% of annual emission). Biofuels appear as a more environmentally friendly energy alternative because their use implies a net production of CO<sub>2</sub> near to zero. Despite its technical and environmental feasibility, biofuels production is controversial because the use of their traditional feedstock may be in conflict with other sectors, especially food. New feedstocks for the production of biodiesel are currently under study; microalgae are an interesting alternative because of their better yield per unit area compared to oilseeds. In this paper, an exposition of the current global context of fuels and biofuels, especially biodiesel, is presented along with a review of the state of the art of microalgae usage as an alternative feedstock for biodiesel production.

## 1.1 Introducción

En los últimos seis años, el costo del petróleo crudo a nivel mundial ha fluctuado de manera considerable (ver Figura 1.1), alcanzando un máximo de casi 140 dólares en junio del 2008, posteriormente reduciéndose hasta los 40 dólares en diciembre del mismo año, incrementándose de nuevo hasta 120 dólares en abril del 2011 para finalmente reducirse hasta alcanzar un valor estable alrededor de 106 dólares en abril de 2012. Las razones de estas fluctuaciones se hallan en las frecuentes tensiones geopolíticas, como la guerra del Golfo en 1991 (1), los movimientos políticos del norte de África a inicios del 2011 (2; 3) o las constantes especulaciones en el mercado de los combustibles (1; 4; 5) .

Dado que el consumo anual mundial de crudo es un 6,4% mayor que la producción anual mundial (6), es de esperarse que el precio del crudo se incremente nuevamente en el corto o mediano plazo. Según algunas estimaciones, se espera que las reservas mundiales de petróleo perduren 43 años de acuerdo con la demanda y las reservas de crudo del 2010 (6). Colombia no es ajena a este panorama, ya que se estima que para el 2020 se perderá la autosuficiencia petrolera (6; 7).

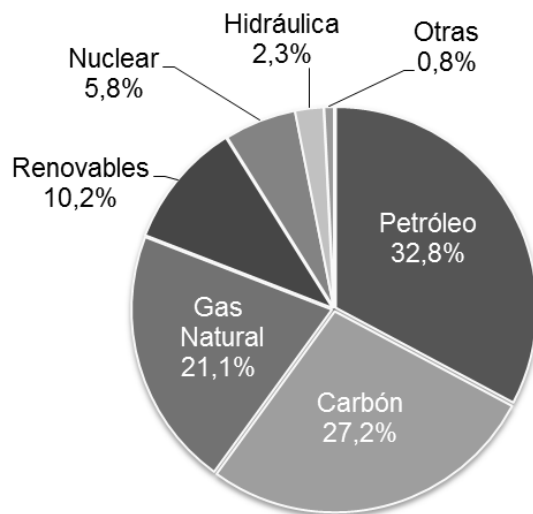


**Figura 1.1. Precio petróleo crudo en dólares por barril (47)**

A pesar de las dramáticas variaciones en su costo (especialmente en el período 2007-2008 y 2011), el petróleo sigue siendo la principal fuente de energía a nivel mundial, con un 32,8%, seguido de cerca por el carbón y el gas natural (ver Figura 1.2); adicionalmente, el petróleo es el segundo responsable, luego del carbón, de las emisiones al ambiente de CO<sub>2</sub>, uno de los gases de efecto invernadero (ver Figura 1.3); por tal motivo, frecuentemente es asociado como uno de los responsables del calentamiento global (8).

A lo largo de los últimos 200 años, la quema de combustibles fósiles, la deforestación y otras actividades humanas han provocado un aumento considerable en la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico desde 280 ppm hasta 392 ppm en la actualidad, lo cual implica un incremento de alrededor del 40% (48). Los gases de efecto invernadero, como el CO<sub>2</sub> y el metano, son responsables de atrapar radiación infrarroja, evitando que se libere el calor de la atmósfera hacia el espacio; este efecto es necesario para conservar la superficie del planeta caliente y mantener la vida tal como la conocemos; sin embargo, si las concentraciones de estos gases en la atmósfera aumentan, la temperatura de la Tierra se incrementará significativamente (49). Según datos de la NOAA y la NASA, la temperatura media de la superficie de la Tierra ha aumentado en alrededor de 1,2 a

1,4°C en los últimos 100 años; por este motivo, se ha propuesto que gran parte del calentamiento global en las últimas décadas es el resultado de actividades antrópicas (49).

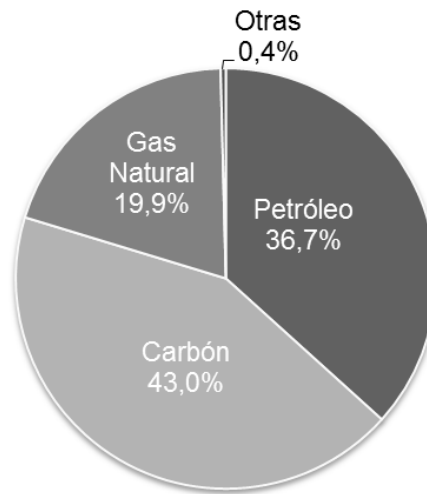


**Figura 1.2.** Oferta mundial de energía según combustible. (8)

Según la Figura 1.2, los biocombustibles de primera generación (combustibles derivados de fuentes orgánicas renovables, como por ejemplo el bioetanol, obtenido a partir de caña de azúcar, almidón u otras fuentes de carbohidratos, y el biodiesel, obtenido a partir de alcoholisis de triglicéridos provenientes de fuentes animales o vegetales como la palma africana o la colza), representan actualmente el 10,2% de la oferta mundial de energía. Tales biocombustibles constituyen una alternativa que impacta significativamente menos la generación neta de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, pues gracias al ciclo cerrado, las emisiones de CO<sub>2</sub> del biodiesel son un 78,5% menor que las del diesel (9).

Los biocombustibles de primera generación, sin embargo, presentan serias desventajas. De un lado, la generación de sus materias primas tradicionales requiere de grandes extensiones de tierra cultivable, lo que reduce el área disponible para otros cultivos necesarios y puede causar una crisis en la seguridad alimentaria (10; 11). Asimismo, la producción de estos biocombustibles también tiene potenciales impactos negativos en el ambiente, los cuales incluyen deforestación y pérdida de biodiversidad, la transformación de ecosistemas naturales y la consecuente pérdida de los servicios ambientales asociados a esos ecosistemas, el establecimiento de monocultivos en donde

previamente existían ecosistemas naturales, el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero ante una posible deforestación de ecosistemas boscosos, aumento en el consumo y contaminación del agua así como mayor degradación y erosión de suelos (12; 13).



**Figura 1.3.** Emisiones de CO<sub>2</sub> mundiales según combustible (8)

La segunda generación de biocombustibles emplea la hidrólisis de material lignocelulósico para la obtención de azúcares fermentables. El uso de residuos agrícolas o de especies maderables evita la competencia directa con la producción de alimentos y reduce los costos de materias primas; sin embargo aún se necesitan zonas fértiles para cultivo forestales y no se han resuelto todos los problemas generados por la presencia de la lignina y de la hemicelulosa en la casi totalidad de estos materiales (14; 15; 50).

Los biocombustibles de tercera generación, son obtenidos a partir de las microalgas (14; 15; 16). Las microalgas son seres unicelulares capaces de asimilar el CO<sub>2</sub> presente en el aire empleando luz solar, agua y algunos nutrientes para producir diversos productos naturales de alto valor agregado, proteínas y aceites; por tal razón se han considerado como una fuente potencial para la obtención de biocombustibles y más específicamente biodiesel (16; 17; 18; 19; 20). La idea de usar microalgas como una fuente de combustibles no es nueva, pero nuevamente está siendo tomada en cuenta seriamente debido a la constante fluctuación en el precio del petróleo y a la emergente preocupación acerca del calentamiento global que está asociado con la quema de combustibles fósiles (16).

Las microalgas presentan varias ventajas sobre organismos vegetales terrestres para la producción de lípidos: por un lado, se ha encontrado que para producir la misma cantidad de aceite que se obtiene a partir de plantas oleaginosas como la palma africana, la cantidad de territorio requerido es mucho menor (16). Por otro lado, las microalgas no requieren ser cultivadas en tierras fértiles o en zonas donde ya hay siembras tradicionales, ya que pueden ser cultivadas en zonas desérticas o de escasa fertilidad, disminuyendo así el impacto sobre cultivos agrícolas destinados para alimentos. Algunas microalgas pueden, incluso, cultivarse en agua de mar, por lo que no competirían por agua potable con otros cultivos (11; 16). Adicionalmente son capaces de fijar hasta  $25,6 \text{ kg} \cdot \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{año}^{-1}$ , es decir entre 28 y 85 veces la cantidad de  $\text{CO}_2$  que puede fijar los árboles, los cuales consumen más de 550 kg de agua por 1 kg de  $\text{CO}_2$  fijado mientras las microalgas requieren sólo de 140 a 200 kg de agua para efectuar la misma labor (21). Finalmente, en la producción de biocombustibles a partir de microalgas, al igual que cualquier otra fuente, el aumento en su demanda probablemente incrementaría el consumo de algunos insumos agrícolas, entre ellos la mano de obra; por esto la producción de biocombustibles es vista como una posibilidad de nuevas fuentes de ingresos y empleos (10).

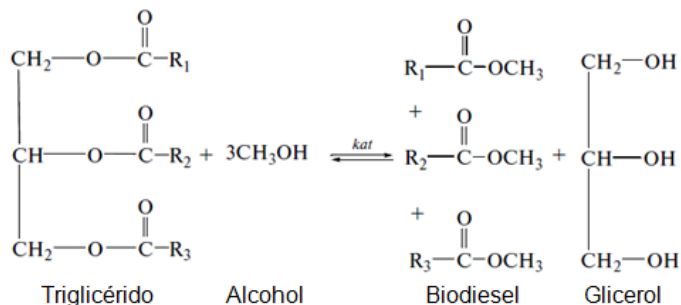
Las principales desventajas de los biocombustibles de tercera generación es la recuperación de la biomasa después de ser cultivada y la posterior extracción de aceites, debido principalmente al alto contenido de humedad que presentan las microalgas y a los altos costos de extracción, respectivamente (23; 39; 51; 52). Los biocombustibles de cuarta generación o biopetróleo, son obtenidos a partir de biomasa, ya sea vegetal o microalgal, procesada a alta temperatura en ausencia de oxígeno en procesos termoquímicos como la pirolisis o la licuefacción (53; 54). En el caso de las microalgas se han obtenido conversiones de hasta un 55% de la biomasa seca en biopetróleo a 750 K (53).

## 1.2 Producción de biodiesel

La elaboración del biodiesel consiste en la transesterificación de un triglicérido de origen animal, vegetal o microbiano con un alcohol, preferiblemente de bajo peso molecular

como el metanol. La transesterificación o alcoholólisis produce glicerol y alquilésteres de ácidos grasos, más comúnmente conocidos como biodiesel (55; 56; 57; 58; 59).

La reacción de la Figura 1.4 es de equilibrio; por tal razón a nivel industrial se emplean de seis a diez moles de metanol por cada mol de triglicérido, con el fin de que el exceso de metanol asegure que la reacción se dirija hacia los productos, haciendo que la conversión supere el 98% (17; 56; 57; 60).



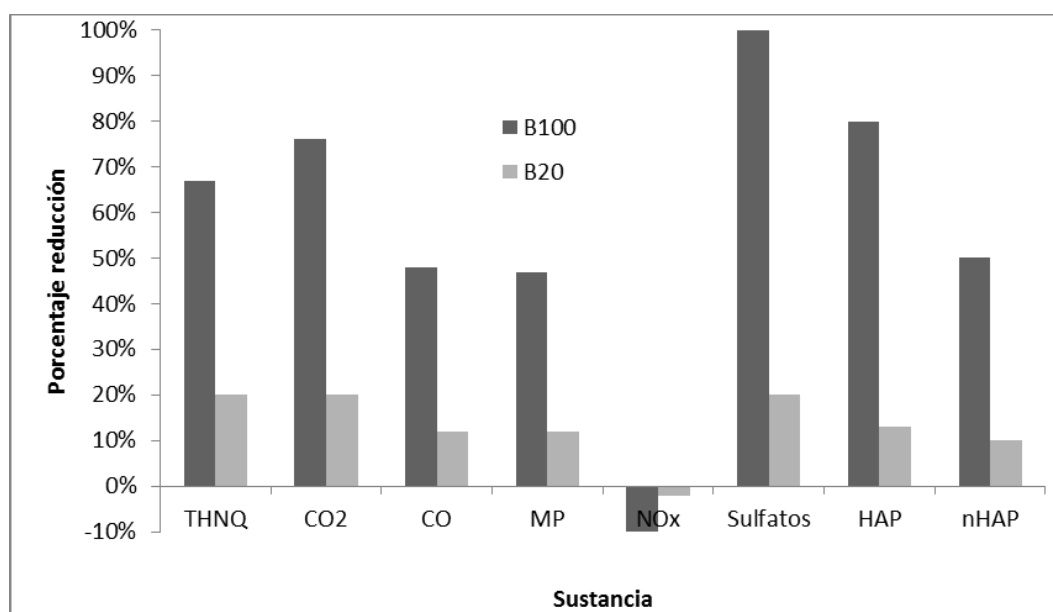
**Figura 1.4.** Transesterificación de triglicérido (56)

Los catalizadores empleados pueden ser ácidos, álcalis o enzimas. La transesterificación por catálisis alcalina puede llegar a ser 4000 veces más rápida que por catálisis ácida; por esto, los hidróxidos (metóxidos) de sodio o potasio son comúnmente empleados en la reacción en una concentración cercana al 1% del peso del triglicérido. Las enzimas son poco empleadas, pues su costo es demasiado alto y su tiempo de reacción es elevado (17; 19; 59; 60).

En cuanto a las condiciones de temperatura y presión, la transesterificación puede ser llevada a cabo a 64°C, punto de ebullición del metanol a presión atmosférica; sin embargo se pueden emplear temperaturas más altas en combinación con presiones suficientes para evitar la ebullición del alcohol, aunque el proceso se hace más costoso. Para evitar una disminución en el rendimiento, el triglicérido y el alcohol deben tener la menor humedad posible y el contenido de ácidos grasos libres en el aceite debe ser bajo, no mayor al 3%, para evitar reacciones de saponificación (59; 60); finalmente el biodiesel se recupera mediante decantación, destilación instantánea, neutralización del catalizador y posterior lavado con agua para remover el metanol excedente y el glicerol (16; 60; 61).

Los motores convencionales de diesel podrían operar con biodiesel puro (B100) o mezclas tales como B20 (20% biodiesel mezclado con 80% de diesel) sin mayores modificaciones y mejorar el rendimiento general. Sin embargo, las desventajas técnicas del biodiesel son su relativo más bajo contenido de energía (8% menos que el diesel), mayor viscosidad, menor volatilidad, reactividad de hidrocarburos insaturados, baja estabilidad oxidativa, punto de nube más alto y la potencial presencia de glicerol sin reaccionar. La industria actual tiene muchos enfoques innovadores para mitigar estos posibles inconvenientes, como la mezcla de combustibles con aditivos para aumentar la estabilidad oxidativa o la reducción de viscosidad con aceites menos viscosos como el de colza (55; 58; 61; 62).

Finalmente, la mayoría de emisiones debido al uso de biodiesel en los motores de combustión son mucho menores comparadas con las del diesel convencional. La Figura 1.5 muestra el porcentaje en la reducción de tales emisiones empleando B100 y B20 comparado con el diesel convencional (63).



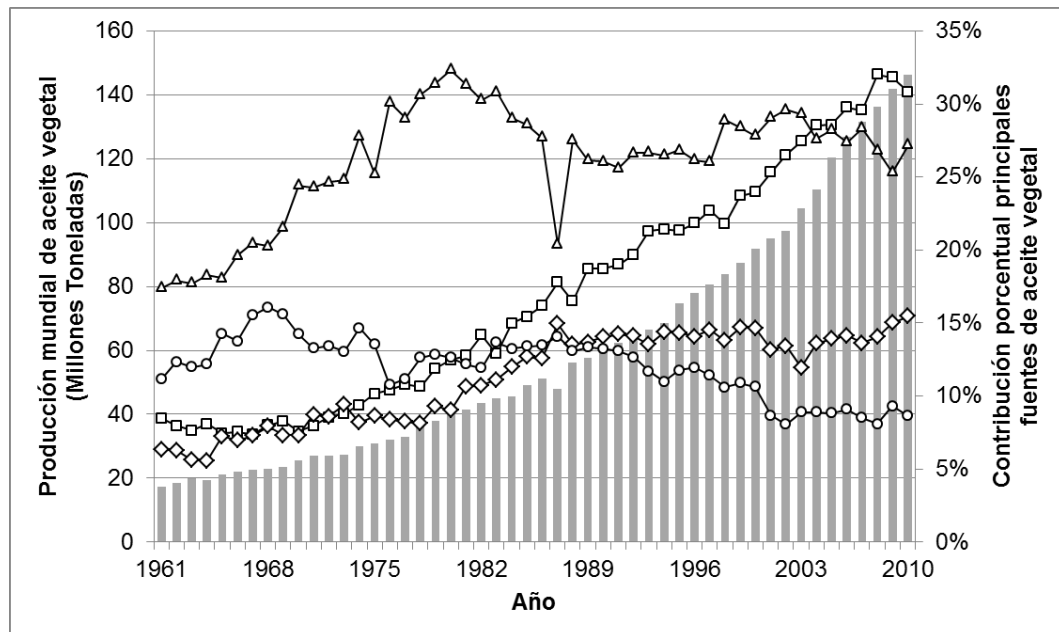
**Figura 1.5.** Porcentaje en la reducción de emisiones con el uso de B100 y B20 en motores de combustión. THNQ: total de hidrocarburos no quemados; MP: material particulado. NO<sub>x</sub>: óxidos de nitrógeno. HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos. nHAP: nitratos de HAP (63).



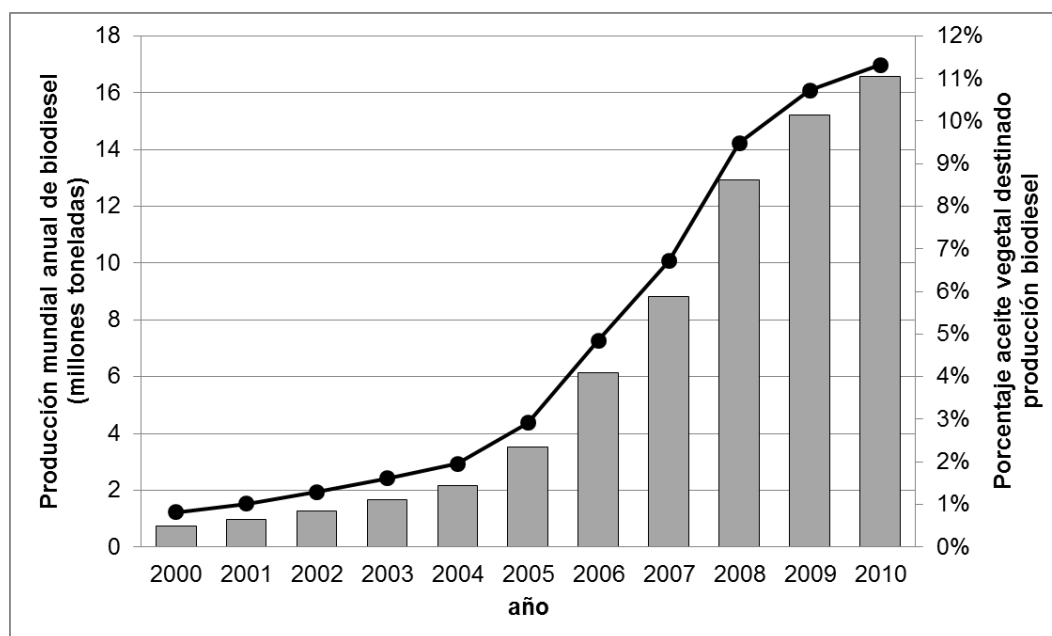
### 1.2.1 Fuentes de biodiesel

Las plantas y las algas son las principales fuentes para la producción de biodiesel por su directa utilización del sol como fuente de energía. Los animales y los hongos son también fuentes importantes, pero representan una fuente de menor importancia para la producción de biodiesel pues obtienen su energía principalmente de otras fuentes de carbón. Actualmente, los aceites de soya, colza y palma son los principales insumos para la producción de biodiesel; el aceite de colza es el líder en Europa, el aceite de soya el líder en Estados Unidos y el aceite de palma el líder en Malasia, Indonesia y Colombia (55; 56; 59; 64; 65).

La Figura 1.6 muestra la evolución histórica de la oferta mundial de aceites vegetales, y sus cuatro principales fuentes, con una producción total aproximada de 146 millones de toneladas para el año 2010 (65), de las cuales el 11,3% fueron destinadas para la producción de biodiesel (Figura 1.7), correspondientes a 16,6 millones de toneladas (65; 66). Debido a que el empleo de microalgas para la producción de biodiesel es un campo apenas en desarrollo, no incide de manera notable en la producción mundial de éste.



**Figura 1.6.** Producción mundial histórica de aceite vegetal (barras) y aporte porcentaje principales aceite vegetales: palma (□), soya (Δ), colza (◇), girasol (○) (65)



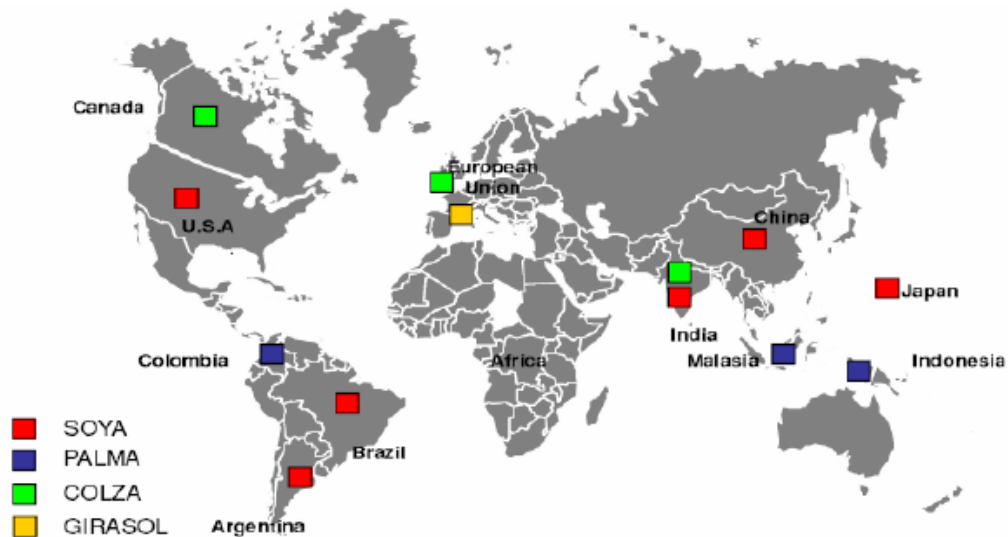
**Figura 1.7** Evolución de producción mundial de biodiesel (línea) y porcentaje de aceite empleado en la producción de biodiesel (barras) (65; 66)

Las Figura 1.6 y Figura 1.7 destacan el ascenso del aceite de palma como el de mayor producción desde el año 2004, además de la estrecha relación del aumento de la oferta de aceite mundial y el aumento en la producción de biodiesel a nivel mundial (65; 66)

### 1.2.1.1 Biodiesel a partir de plantas

Los aceites de origen vegetal son virtualmente los únicos aceites empleados en la producción de biodiesel; en general, el aceite vegetal empleado en cada país es aquel de mayor abundancia, lo cual varía con su localización y su clima (59). La Figura 1.8 presenta la distribución geográfica mundial actual de los aceites de mayor producción (67).

La colza es una planta que crece preferiblemente en climas más frescos en verano como el norte de Estados Unidos, Canadá y Alemania (16; 56; 68). La colza es la principal fuente para la obtención de aceite en Europa, India y Canadá; su contenido de aceites está entre 40 y 48% del peso seco y tiene rendimientos cercanos a los 1200 litros de aceite por hectárea y por año (16).

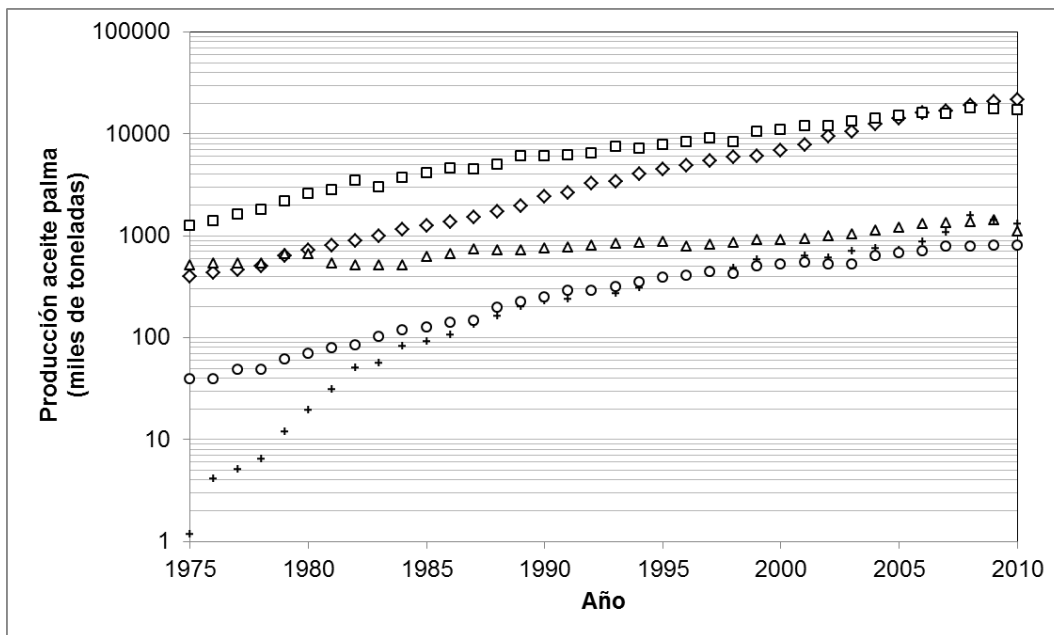


**Figura 1.8.** Distribución mundial por fuente de la oferta de materias primas para la producción de biodiesel (67)

La soya es cultivada principalmente en Estados Unidos, Brasil, Argentina y China; a pesar de tener un alto contenido proteico (cerca del 79% del peso seco) también es empleada para la obtención de aceites. Si bien el rendimiento de aceite de la soya es menor al de muchas plantas oleaginosas, cerca de 450 litros por hectárea por año; su cultivo a gran escala rotado con el cultivo de maíz, para la producción de biodiesel y etanol, respectivamente, hace de estas fuentes económicamente atractivas para la producción de biocombustibles en Estados Unidos (55; 56; 68).

La palma africana es la planta oleaginosa con los rendimientos de aceite más altos, cercanos a los 6.000 litros por hectárea por año, lo cual la hace energéticamente la oleaginosa de mayor viabilidad para la producción de biodiesel; desafortunadamente, las características biológicas de la planta solo permiten su cultivo en zonas tropicales cercanas al Ecuador (55; 57; 68). La Figura 1.9 detalla la producción de aceite de palma en los cinco principales países responsables del 92,5% de la producción total (65); es notorio el incremento exponencial de la producción de Indonesia, Malasia y Tailandia, lo cual ha demostrado estar asociado con enormes problemas ambientales, principalmente deforestación y pérdida de biodiversidad (13; 55; 57; 69).

En el caso de Colombia la producción industrial de biodiesel inició en enero del 2008 y se decidió que la materia prima fuera el aceite de palma debido a los desarrollos alcanzados en el sector (12). Colombia es el principal productor de aceite de palma en Latinoamérica y el quinto a nivel mundial, (responsable del 1,8% de la producción anual mundial) (65), adicionalmente cuenta con siete plantas industriales para la producción de biodiesel, con una capacidad total de 516 mil toneladas por año (70). En la Tabla 1.1 se presenta un listado de las plantas existentes para la producción de biodiesel en Colombia junto con su ubicación y características principales (70; 71)



**Figura 1.9.** Evolución de la producción de aceite de palma de los mayores productores mundiales: Indonesia (◇), Malasia (□), Nigeria (Δ), Tailandia (+) y Colombia (○) (65)

### 1.2.1.2 Biodiesel a partir de microalgas

Algunas especies de microalgas tienen contenidos elevados de aceite que puede ser transformado a biodiesel mediante tecnologías existentes. En la Tabla 1.2 se aprecia el contenido de aceite como porcentaje del peso seco (PS) para varias especies de microalgas (16).

**Tabla 1.1.** Plantas de producción de biodiesel existentes en Colombia (70; 71).

Región	Inversionista	Capacidad (ton-año <sup>-1</sup> )	Área sembrada (ha)
Norte, Codazzi	Oleoflores	70.000	23.000
Norte, Santa Marta	Odin Energy	36.000	12.000
Norte, Santa Marta	Biocombustibles sostenibles del Caribe	100.000	33.300
Oriental, Facatativá	Bio D	100.000	33.300
Central, Barrancabermeja	Ecodiesel de Colombia	100.000	33.300
Oriental, San Carlos de Guaroa, Meta	Aceites Manuelita	100.000	33.300
Norte, Santa Marta	Clean Energy	30.000	10.000
<b>Total</b>		<b>546.000</b>	<b>178.200</b>

Una de las ventajas de utilizar estos aceites para la producción de biodiesel radica en el hecho de que la producción de triglicéridos por unidad de área cultivada puede ser, fácilmente, del orden de 30 veces mayor que la de una planta oleaginosa como la soya (ver Tabla 1.3) (16; 51).

**Tabla 1.2.** Contenido de aceite de algunas especies de microalgas (16)

Microalga	Contenido de aceite (% PS)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Por otro lado, debido al alto consumo de combustibles (8), en especial en el sector de transporte, el desarrollo a gran escala de biodiesel a partir de plantas oleaginosas no

logra satisfacer la demanda total de combustibles existente, debido a limitaciones de área cultivable; tal no es el caso de las microalgas. La Tabla 1.3 detalla los requerimientos de área cultivable que sería necesario dedicar al cultivo de diferentes fuentes oleosas para satisfacer las necesidades de combustible para transporte de Estados Unidos (16; 59). Como se aprecia en dicha tabla, aún para contenidos de aceites bajos, las microalgas requerirían menores áreas que la palma africana.

**Tabla 1.3** Comparación de algunas fuentes de biodiesel, para suplir el 50% de la demanda de combustible en USA (16)

Cultivo	Rendimiento en Aceite (L·ha <sup>-1</sup> ·año <sup>-1</sup> )	Área de cultivo requerida (Mha)	Porcentaje del área cultivable en USA (%)
Maíz	172	1540	846
Soya	446	594	326
Colza	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalgas (70% PS)	136900	2	1,1
Microalgas (30% PS)	58700	4,5	2,5

En adición, las microalgas, a diferencia de las plantas oleaginosas, no requieren ser cultivadas en zonas fértiles, crecen considerablemente rápido duplicando su biomasa en aproximadamente 24-72 horas y no comprometen la producción de alimentos, forraje u otro producto derivado de los cultivos tradicionales. Las microalgas a pesar de ser cultivadas en agua requieren mucha menor cantidad de agua que los cultivos terrestres (21).

### 1.3 Producción de biomasa microalgal

La producción de biomasa microalgal es, por lo general, más costosa que los cultivos tradicionales, pues requiere luz, aireación con CO<sub>2</sub>, agua, sales inorgánicas y la temperatura de cultivo no debe superar los 30°C. Por consiguiente, para reducir los costos los cultivos deben realizarse preferiblemente con el empleo de luz solar mientras que el CO<sub>2</sub> puede ser obtenido de la quema de los combustibles empleados en lugares

como termoeléctricas; dicho CO<sub>2</sub> debe ser previamente enfriado, filtrado y lavado (51; 72; 73; 74; 75). Los factores que afectan la producción de biomasa son el medio cultivo (compuesto por agua, sales inorgánicas y en algunos casos vitaminas) y los parámetros de cultivo como iluminación, aireación y temperatura (16; 76).

### 1.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo debe contener todos los elementos constituyentes de la célula como lo son el nitrógeno (N), el fósforo (P), el hierro (Fe) y algunos metales traza (21). Para estimar los requerimientos mínimos de estos nutrientes se puede emplear la fórmula aproximada de la biomasa CH<sub>1,83</sub>O<sub>0,48</sub>N<sub>0,11</sub>P<sub>0,01</sub> (16).

#### 1.3.1.1 Nitrógeno

El nitrógeno es necesario para la formación de ácidos nucleicos y proteínas; sin embargo, una deficiencia de aquel favorece la producción y acumulación de lípidos (73; 77; 78). Las fuentes más comunes de nitrógeno son el nitrato, nitrito, urea y amoníaco; las dos últimas son preferidas en cultivos masivos gracias a su bajo costo (31). El nitrato es empleado usualmente en microalgas como *Botryococcus* por encima del nitrito, urea o el amoníaco, ya que este último puede resultar nocivo para dichas algas (79). Microalgas como *Isochrysis* han demostrado mayor afinidad por la urea (80). En el caso de microalgas como *Chlorella* y *Scenedesmus* se ha observado su capacidad de crecer en cualquier fuente de nitrógeno (31).

#### 1.3.1.2 Fósforo

Requerido para el crecimiento microalgal y la formación del ADN y el ARN, usualmente es suministrado en exceso en forma de fosfatos ya que éstos forman complejos con los iones metálicos, ocasionando que no todo el fósforo esté disponible para la producción de biomasa (16). Al igual que el nitrógeno, hay reportes de mayores acumulaciones de lípidos con una limitación de fósforo (78; 81).

#### 1.3.1.3 Hierro

Es el micronutriente más importante, pues es vital para el funcionamiento del metabolismo; es usado para el transporte de electrones, reducción de nitritos y nitratos,

reducción de sulfatos, fijación del nitrógeno molecular y eliminación de especies reactivas como radicales libres y peróxidos. El requerimiento de hierro aumenta con la disminución de la intensidad de luz y decrece con el aumento de la duración del fotoperiodo. Por otro lado, el requerimiento de hierro depende de la fuente de nitrógeno; es más alto cuando se usa el ión nitrato en lugar del ión amonio (76). El efecto del hierro en la acumulación en la producción de biomasa y lípidos es característico en cada microalga (77), sin embargo un exceso de éste inhibe el crecimiento algal de manera considerable (82).

#### **1.3.1.4 Micronutrientes**

Para el adecuado crecimiento de las microalgas, éstas requieren de los metales trazas, entre los que se destacan manganeso, zinc, cobalto, cadmio, cobre, molibdeno y níquel, lo cuales hacen parte de enzimas necesarias para el transporte de electrones, la fijación y transporte del CO<sub>2</sub>, la transcripción del ADN, fijación y transporte del nitrógeno entre otras (76; 83).

### **1.3.2 Parámetros de cultivo**

Los principales parámetros de cultivo son el CO<sub>2</sub> presente en la aireación, la irradiación, el fotoperiodo, la temperatura, el pH y la agitación.

#### **1.3.2.1 CO<sub>2</sub>**

Es la fuente de carbono para los organismos autotróficos, como es el caso de las algas y las plantas; sin embargo, se estima que anualmente estas últimas tan sólo fijan el 10% de lo que fijan las microalgas (21). Aproximadamente el 50% de la biomasa algal en peso seco es carbono (C); por consiguiente, para producir 100 kg de biomasa seca se está fijando aproximadamente 183 kg de CO<sub>2</sub> (16). El CO<sub>2</sub> debe ser alimentado constantemente durante las horas de luz y puede ser obtenido directamente de las industrias que queman combustibles fósiles (16; 73; 75). Sin embargo, un exceso de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo de las microalgas afecta negativamente el desempeño de las mismas, pues ocasiona una disminución dramática de pH del medio de cultivo cuando éste no cuenta con mezclas tampones (84).



Actualmente se estima que el contenido de CO<sub>2</sub> en el aire está en alrededor de 392 ppm (48); al usar aire enriquecido con CO<sub>2</sub> en valores cercanos al 2% la cantidad de lípidos que puede producir microalgas como *Scenedesmus*, *Chlorella* o *Nannochloropsis* pueden incrementarse hasta 12, 8 ó 5 veces, respectivamente (40). El bicarbonato de sodio y sales similares también pueden ser empleadas como fuente de carbono; sin embargo, dichas sales suelen ser más costosas que el CO<sub>2</sub> gaseoso (85).

### 1.3.2.2 Temperatura

El cultivo de microalgas, y en general el de cualquier microorganismo, exhibe 3 valores claves de temperatura: una temperatura mínima, aproximadamente 16°C, por debajo de la cual no es posible el crecimiento; una temperatura óptima, entre 16 y 27°C dependiendo de la microalga, a la que se produce el crecimiento más rápido, y una temperatura máxima, alrededor de 35°C, por encima de la cual no es posible el crecimiento, dado que algunas proteínas pueden sufrir daños irreversibles (86). Los cultivos de microalgas que crecen por debajo de la temperatura óptima generalmente son más sensibles a la fotoinhibición, que aquellos que se mantienen en el valor ideal. La temperatura de crecimiento también afecta la composición bioquímica de las células (22; 85); para el caso de microalgas como *Nannochloropsis*, *Chlorella* o *Scenedesmus*, se ha encontrado que temperaturas entre 20°C y 25°C son óptimas para la producción de lípidos, mientras que mayores temperaturas reducen sensiblemente la cantidad de lípidos (73; 87).

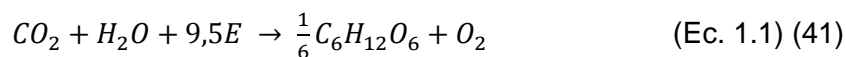
### 1.3.2.3 Iluminación

La iluminación se divide en dos componentes: la irradiancia, la cual se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las microalgas, y el fotoperiodo, el cual es la cantidad de horas durante el día en la que las microalgas son sometidas a dicha irradiación (22; 76). Las microalgas utilizan sólo la luz en intervalo comprendido entre 300 a 700 nm, región del espectro conocida como la radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés); este intervalo constituye alrededor de un 43% de la radiación solar total y su energía es equivalente a la de la luz monocromática a 575 nm (84; 88). Para la medición de esta energía es utilizado el Einstein (E): 1 E o 1 mol de fotones de 575 nm (5750 Å) contiene 208,25 kJ de energía. Cuando algunos cultivos de microalgas se exponen a un cierto nivel elevado de irradiación, los componentes

celulares internos encargados de la absorción de energía lumínica, comúnmente denominados antenas (22), sufren daño debido al exceso de energía; éste nivel de irradiancia se conoce como el punto de saturación lumínica, y por encima de él la velocidad de fotosíntesis se puede ver reducida; este fenómeno se conoce como fotoinhibición (55). El punto de saturación lumínica para microalgas generalmente es característico de cada cepa, como es el caso de la microalga *Chlorella* éste puede variar entre 85 y 400  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , lo que equivale a valores entre 5 y 20% de la irradiación solar a mediodía en zonas tropicales como Colombia (16; 41; 44; 89).

En el caso del fotoperiodo, normalmente se utilizan ciclos de iluminación constantes que se expresan en horas de Luz/Oscuridad (LO) que van desde 12:12 LO hasta 18:6 LO pasando por valores intermedios como 14:10 cuando se emplea irradiación artificial (22).

Las microalgas requieren un estimado de 9,5 E para convertir 1 mol de  $\text{CO}_2$  en 30 g de biomasa seca, como se presenta en la Ec. 1.1 (41). Esto quiere decir que si se llevara a cabo un cultivo microalgal en una zona tropical como Colombia cuya radiación solar media es 4,5  $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  (33), lo que corresponde a 6700  $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  PAR ( $\sim 33,45 \text{ E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  o  $387 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), el consumo teórico máximo de  $\text{CO}_2$  sería unos 155  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  ( $\sim 566 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ ) y el máximo rendimiento de biomasa seca que se podría alcanzar es 105  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$ ; no obstante, parte de la energía es consumida en los procesos propios de mantenimiento celular, por lo cual el rendimiento de biomasa máximo se reduce a valores entre 76-82  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  ( $\sim 277\text{-}300 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ ). Con un contenido de aceites en la microalga del 15%, la productividad de estos sería hasta 9 veces superior a la productividad de aceites de la palma africana. Dado que las anteriores estimaciones no tienen en cuenta la saturación lumínica, si ésta sucede a unos 190  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y no hay fotoinhibición, tan sólo se aprovecharía el 50% de la radiación PAR, es decir que se produciría 150  $\text{ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$  de biomasa y se consumiría 283  $\text{ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , es decir 10% más que lo reportado (16; 21; 41).



#### 1.3.2.4 pH

Cada microorganismo crece en un intervalo de pH particular y normalmente existe un pH óptimo bien definido; en el caso de las microalgas, el pH óptimo se encuentra apenas por encima de la neutralidad, por lo que son clasificados como microorganismos neutrófilos. En medios de cultivos cerrados el pH tiende a variar debido al consumo de algunos nutrientes y al CO<sub>2</sub> que se solubiliza y consume; para evitar esto, se emplean tampones. El tampón más común es el de fosfatos que funciona bien a valores de pH cercanos a 7 (22; 85).

#### 1.3.2.5 Agitación

Un adecuado mezclado favorece una distribución homogénea de las células, de los metabolitos, el calor y la transferencia de gases a través de la interfase gas-líquido (36; 85). Cuando los requerimientos nutricionales se satisfacen y las condiciones ambientales se optimizan, la agitación se constituye como la condición más importante para obtener un alto rendimiento de biomasa microalgal; esto usualmente se logra mediante un flujo turbulento dentro del fotobiorreactor (85).

La evidencia indica, que tanto la velocidad o magnitud, como el modo o patrón de mezcla, pueden afectar significativamente la velocidad global de producción de biomasa en cultivos con altas densidades celulares

El objetivo principal de la aireación y la agitación, es mantener las células en suspensión, lo cual permite que éstas se acerquen a la fuente de luz, ya sea en la superficie del recipiente, o en las paredes transparentes, disminuyendo el tiempo de ausencia de luz en el seno del cultivo cada vez más denso, y a la vez, evitar una excesiva exposición que pueda conducir a la fotoinhibición. Otros efectos de la agitación son el facilitar la difusión y homogeneización de nutrientes y eliminar gradientes térmicos, salinos o de densidad según el volumen del cultivo, sin embargo una agitación excesiva ya sea por burbujeo o empleando agitadores puede causar un estrés hidrodinámico llevando a una disminución en la tasa de crecimiento (84; 85).

## 1.4 Métodos de cultivo

Las algas pueden ser cultivadas de diferentes maneras, el cultivo en interiores permite el control en variables como la iluminación, la temperatura, los niveles de nutrientes, la contaminación; mientras que en el cultivo en exteriores hace muy difícil el crecimiento de microalgas durante amplios periodos (40; 90). Los cultivos abiertos, ya sean en interiores o exteriores, son más propensos a contaminación que los cultivos cerrados (37; 85; 91). El cultivo de microalgas también puede ser continuo, semicontinuo o por lotes, este último es el método de cultivo más común debido a su simplicidad y bajo costo (22; 36; 52).

El cultivo comercial de microalgas van desde 100 L hasta  $10^9$  L, en el caso de los cultivos a gran escala predominan los estanques largos exteriores, estanques circulares con aleta de rotación, estanques *raceway* o simplemente bolsas grandes (85). En la selección del método de cultivo deben ser tenidas en cuenta muchas condiciones como la biología de la microalga, el tipo de producto, el costo de la tierra, la mano de obra, la energía, el agua, los nutrientes e incluso el clima (36; 52). También es necesario considerar la eficiencia en la utilización de la luz, la habilidad de controlar la temperatura, el estrés hidrodinámico al que es sometida la microalga, la habilidad de mantener el cultivo unialgal (22). Actualmente los costos de producción de microalgas van desde los US\$ 4 el kilogramo de biomasa seca, haciendo aún poco viable económicamente la producción de biocombustibles a partir de ésta, ya que los costos deben estar por debajo de US\$ 1 kg<sup>-1</sup> (20).

### 1.4.1 Estanques exteriores

Han sido diseñados diferentes tipos de estanques para el cultivo de microalgas que varían en tamaño, forma, materiales usados, forma de mezclado etc, sin embargo todos se caracterizan por ser más sencillos y baratos tanto en la construcción como en la operación que los fotobiorreactores (18). Operacionalmente su principal característica es el empleo de luz solar como fuente de energía para las microalgas, aunque las densidades celulares alcanzadas son usualmente bajas, lo que hace que los costos de recolección de biomasa se incrementen (20; 40; 85). Los primeros experimentos para el cultivo masivo de algas datan de los 40s en Alemania y Estados Unidos (18; 85; 92).

#### 1.4.1.1 Estanques largos exteriores

Generalmente no cuentan con una cobertura superior y pueden estar hechos con materiales tan simples como arcilla, ladrillo o cemento o más costosos como polietileno, PVC, fibra de vidrio o poliuretano. Sin embargo cuando no se tiene una cobertura superior los estanques sufren de suspensión de fango, percolación, gran contaminación y evaporación de agua (18). Este tipo de estanques es limitado a unas pocas especies de algas. En Australia se encuentra los estanques más grandes con extensiones de hasta 460 hectáreas, profundidad aproximada de 50 cm y productividad media de  $1 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  de biomasa de *Dunaliella*. Cultivos realizados al sur de España de *Dunaliella* en un área de  $20 \text{ m}^2$  y profundidad de 20 cm logró una productividad de  $1,5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  en invierno y  $2,7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  en verano (51; 93).

#### 1.4.1.2 Lagos o cuencas naturales

Estos sistemas naturales también pueden ser aprovechados para el cultivo de microalgas siempre que se cuente con las condiciones climáticas adecuadas y los suficientes nutrientes. Uno de los mejores ejemplos son los estanques en Caracol (México) con una producción aproximada de 300 toneladas de *Spirulina* por año en un área de alrededor 40 hectáreas durante los 70s y 80s y una productividad estimada de  $10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  (22; 94).

#### 1.4.1.3 Sistemas inclinados

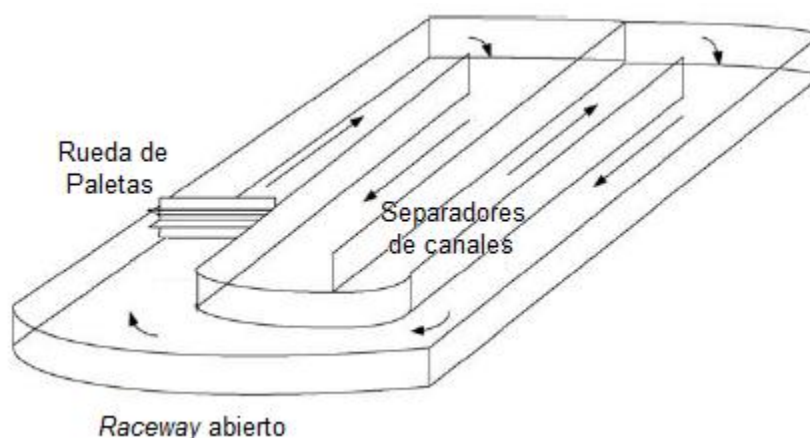
En este caso la turbulencia es creada por la gravedad, este tipo de sistema alcanza flujos altamente turbulentos en capas de cultivo muy delgadas, no más de 5 mm, alcanzando concentraciones de biomasa más altas (hasta  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y mayor relación superficie volumen (s/v) comparado con estanques *raceway*. Sin embargo sus principales desventajas son grandes pérdidas por evaporación, altas velocidades de desorción de  $\text{CO}_2$ , el alto requerimiento energético para el bombeo hasta la parte superior de la superficie. Un ejemplo es la planta instalada en Roupite (Bulgaria) con un área de  $2.600 \text{ m}^2$  y productividad de 18 y  $25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  de biomasa de *Arthrospira* y *Scenedesmus* respectivamente, cultivos de *Chlorella* y *Scenedesmus* reportan también productividades de  $25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  (20; 95).

#### 1.4.1.4 Estanques circulares

Es el tipo de estanques menos empleado comercialmente por su alto requerimiento de concreto para su construcción y el alto consumo energético para el mezclado. Sin embargo es utilizado en Japón, Taiwán e Indonesia para la producción de biomasa de *Chlorella* (94; 95). La profundidad de estos estanques va desde los 30 hasta los 70 cm. Las productividades de *Chlorella* y *Spirulina* están entre 10 y 20  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  (20).

#### 1.4.1.5 Estanques Raceway

Consiste en una zanja excavada en el suelo cubierta con plástico en el caso más barato, pero a veces es necesario que se refuerce con concreto para evitar el desplazamiento ocasionado por los vientos, (96). La agitación se logra gracias a una paleta que gira por el estanque asimilando un auto en una pista de carreras, Figura 1.10. Las principales desventajas de este tipo de estanques es que no puede ser operada a niveles inferiores a los 15 cm debido a que el flujo y la turbulencia se pueden reducir drásticamente. Se ha encontrado productividades entre 20 y 25  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  de biomasa para cultivos en periodos cortos, mientras que para periodos largos la productividad rara vez supera los 13  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$ . El costo de la producción en este tipo de estanques oscila entre los US\$ 8 y 15 el kilogramo de biomasa seca, lo cual aún no lo hace competitivo con cultivos como la palma africana (85; 90; 91; 97; 98).



**Figura 1.10** Esquema estanque abierto *Raceway* (96).

## 1.4.2 Fotobiorreactores

Se entiende por fotobiorreactor como un sistema cerrado diseñado para el cultivo de algas, el cual no permite que la luz incida directamente sobre la superficie de cultivo, sin embargo permite el paso de ésta a través de las paredes transparentes del reactor. Tampoco permite el intercambio directo de gases con la atmósfera, esto permite una mayor protección del cultivo a la contaminación, los fotobiorreactores pueden ser interiores o exteriores, en donde la fuente de luz es artificial o solar, respectivamente (37; 40; 75; 96; 99).

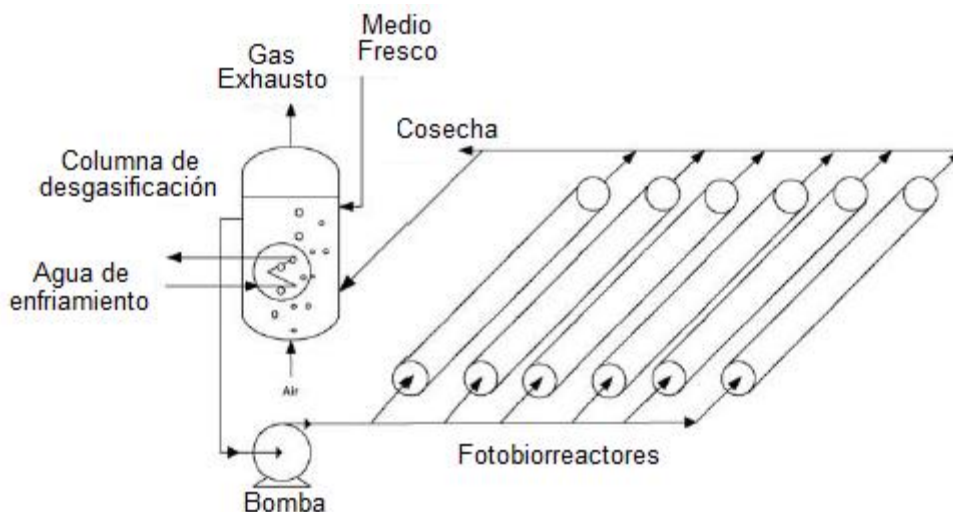
Los fotobiorreactores se caracterizan por controlar parámetros como pH, temperatura, concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en valores conocidos; además reducen la evaporación de agua y la pérdida de CO<sub>2</sub> ocasionada por la desgasificación, permitiendo valores más altos en la concentración celular. Sin embargo, estos sistemas son más costosos de construir y operar que los estanques, debido a que requiere refrigeración y estricto control, por lo tanto el uso de los fotobiorreactores está limitado a componentes de alto valor que no pueden ser obtenidos en el cultivo en estanques (40; 90; 99; 100).

Los fotobiorreactores pueden ser clasificados según tanto el diseño como el modo de operación. Según el diseño los fotobiorreactores pueden ser: [1] plano, tubular o de columna; [2] horizontal, inclinado, vertical o en espiral; [3] múltiples tubos o en serpentín. Según una clasificación operacional pueden ser: [4] aireados o con bomba de mezclado; [5] una sola fase (el intercambio de gases se lleva a cabo en un lugar por separado) o de dos fases (la transferencia de gases se realiza dentro del mismo reactor). Según el material de construcción pueden ser [6] vidrio o plástico y [7] rígido o flexible. Sin embargo a escala industrial sólo son adecuados tres tipos de fotobiorreactores: tubular horizontal, panel plano y de columna vertical (20; 36; 37; 38; 91; 95; 100).

### 1.4.2.1 Fotobiorreactor tubular

En un fotobiorreactor tubular el cultivo es bombeado a través de un tubo largo que puede estar dispuesto horizontal o inclinado, en serpentín o múltiple tubo, y posteriormente es recirculado a un tanque pulmón, Figura 1.11. Usualmente son elaborados en vidrio, teflón claro o PVC claro (20). La aireación se lleva a cabo empleando una bomba de aire o por tecnología *airlift*. Entre las ventajas está la alta área superficial que permite la

iluminación, adecuado para cultivo exterior, alta productividades de biomasa y relativamente barato; las desventajas son gradientes de pH, transferencia de masa pobre, aglomeración de biomasa en las paredes y requiere grandes extensiones de tierra (36; 37; 75; 90).



**Figura 1.11** Esquema fotobiorreactor tubular (96)

El escalamiento de este tipo de reactores se puede llevar a cabo aumentando el diámetro del tubo o la longitud de éste, sin embargo ambas rutas presentan inconvenientes, un aumento en la longitud conlleva al aumento de oxígeno disuelto, mientras que un aumento en el diámetro ocasiona una estratificación en la luz (38).

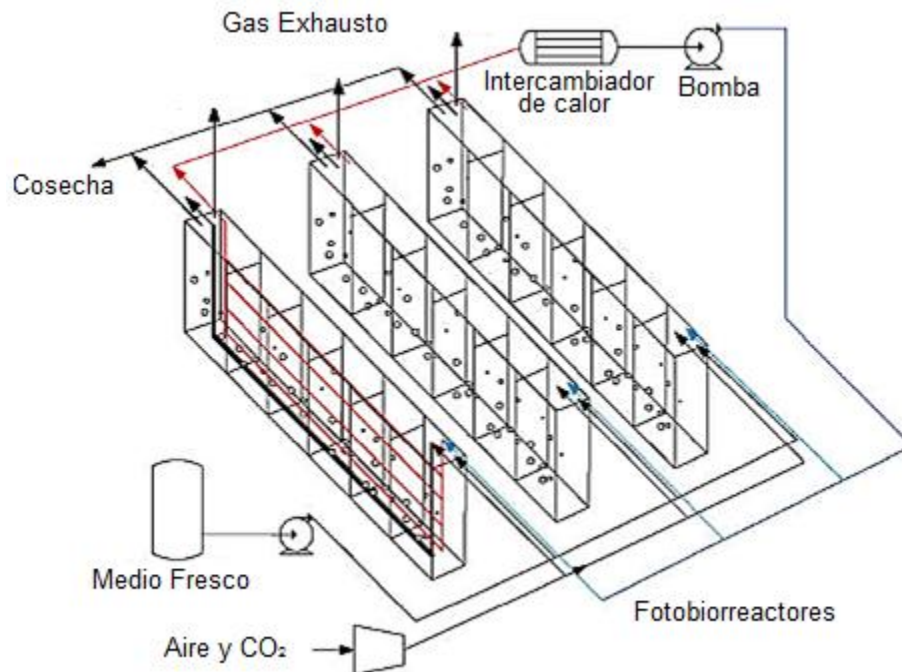
Hay reportes de productividades de 20, 21,5, 27 y hasta  $40 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  para las microalgas *Porphyridium*, *Chlorella*, *Spirulina*, entre otras, en fotobiorreactores con tubos de diámetro que van desde los 1,2 cm hasta los 30 cm y flujos de  $0,97 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , volúmenes de cultivo de 10 L a  $130 \text{ m}^3$ . (38; 92; 95; 97; 101).

#### 1.4.2.2 Fotobiorreactor de panel plano

Tipo de fotobiorreactor que aplica el principio de disposición de luz que aplica las plantas, pues las células están en permanente contacto con ésta, Figura 1.12. A diferencia de un



fotobiorreactor tubular, uno de panel no cuenta con un tanque pulmón donde se realice la alimentación del aire (101).



**Figura 1.12** Esquema fotobiorreactor de panel plano (96)

El modelo más simple de fotobiorreactor de panel son bolsas plásticas dispuestas verticalmente, sin embargo también son empleados materiales más costosos como policarbonato o acrílico. Algunas de las ventajas son una mayor relación entre el volumen cultivado y el área ocupada, una menor acumulación de  $O_2$  disuelto, alta eficiencia fotosintética, práctico para el empleo de células inmovilizadas, altas productividades de biomasa, relativamente barato y de fácil limpieza. Sus principales desventajas son dificultad para el control de temperatura, el escalado requiere muchos compartimentos y materiales de soporte, crecimiento celular en las paredes y posible estrés hidrodinámico en algunas microalgas (36; 37; 75; 90).

Microalgas como *Tetraselmis*, *Chlorella*, *Synechocystis*, *Spirulina*, *Nannochloropsis* e *Isochrysis* fueron cultivadas en fotobiorreactores de placa, alcanzando productividades

de biomasa que van desde 12 hasta 130 g·m<sup>-2</sup>·día<sup>-1</sup>, mientras que la capacidad de los fotobiorreactores está entre 10 L a 6000 L y espesor entre 1,3 y 10,4 cm (92; 95; 101).

### **1.4.2.3 Fotobiorreactor de columna**

Consiste de un tubo transparente de hasta 20 cm de diámetro dispuesto verticalmente en donde se lleva a cabo el cultivo y el suministro de aire simultáneamente (37). Son fotobiorreactores compactos, de bajo costo, bajo consumo energético, fáciles de operar, tienen las mejores tasas transferencia de masa volumétrica, buen mezclado con bajo estrés de corte, bajo consumo de energía, alto potencial para escalabilidad, fáciles de esterilizar, útiles en el empleo de células inmovilizadas y reduce la fotoinhibición; sin embargo sus limitaciones son baja área superficial de iluminación, su construcción requiere materiales sofisticados y a medida que se escala se reduce el área superficial para la iluminación (36; 37; 38; 75).

## **1.5 Recuperación de biomasa**

Una vez es cultivada la microalga, es necesario la posterior recuperación de ésta y la extracción del metabolito de interés. Los métodos comunes de recuperación de biomasa son filtración, centrifugación, floculación o incluso la sedimentación (43). La recuperación de la biomasa puede llegar a ser una etapa difícil y costosa, debido al tamaño de las microalgas, entre 3 y 30 µm, y la densidad celular final que en algunos casos no supera los 0,5 kg·m<sup>-3</sup>, lo cual podría llevar a que los costos de recuperación de biomasa estén entre el 20 y el 30% de los costos totales de producción de biomasa, por esto la factibilidad económica es uno de los factores más importantes en la selección del método de recuperación de biomasa (20; 23; 39; 52; 91).

### **1.5.1 Sedimentación**

Proceso que aprovecha la gravedad, la densidad y radio de las microalgas para separarla del medio de cultivo, cuya principal característica es el bajo costo de operación, pero en contrapartida el tiempo de operación puede llegar a ser bastante prolongado, haciendo que la sedimentación sea una opción poco viable para la obtención de biodiesel (40; 95). Para mejorar la eficiencia de la sedimentación, esta es usualmente combinada con la floculación (39).

### **1.5.2 Floculación**

Proceso en el cual las células dispersas son aglomeradas para aumentar el radio efectivo y así permitir una sedimentación más rápida. La floculación puede dividirse en autofloculación, floculación química (orgánica o inorgánica) y electrolítica (40). La floculación química es la más común, en la cual las algas son cargadas negativamente empleando sales inorgánicas como la de aluminio, sin embargo en un proceso altamente sensible al pH y en algunos casos la biomasa sobrante no puede ser empleada en procesos posteriores como alimento para animales o digestión anaerobia (91). También son empleados polímeros para la floculación, como el quitosano o el praestol. Las principales ventajas de los polímeros son el uso de menores cantidades, la posibilidad de trabajar a diferentes pH y menor impacto ambiental (20; 23; 39; 40; 91; 97; 102).

### **1.5.3 Centrifugación**

Proceso en el cual se reduce considerablemente el tiempo que toma la sedimentación de las microalgas aprovechando la fuerza centrífuga obtenida con una rotación a alta velocidad, aumentando la gravedad que experimenta las microalgas, haciendo que sea quizá el método más rápido para la recuperación de biomasa algal (39; 97). Se ha demostrado su alta eficiencia, >90%, sin embargo es un proceso altamente costoso, lo cual lo hace inviable a escala industrial para la recuperación de biomasa de acuerdo con estudios realizados por el Departamento de Energía de E.U. (20; 23; 51; 97; 98).

### **1.5.4 Filtración**

Este método de separación emplea un medio permeable a través del cual la suspensión es forzada a pasar empleando un gradiente de presión, el medio permeable retiene las células mientras que el medio líquido pasa a través de él. La filtración puede ser superficial, en donde se forma una torta de sólidos en el medio filtrante, o tangencial en donde la suspensión fluye tangencialmente al medio permeable y es recirculado con el objetivo de concentrar la suspensión celular. Sin embargo la filtración puede llegar a ser poco eficiente, no más del 90%, debido a la baja densidad que alcanzan los cultivos microalgales, adicionalmente la filtración puede llegar a ser un proceso costoso (20; 23; 39; 40; 97). La filtración puede ser un proceso eficiente para microalgas como

*Coelastrum proboscideum* y *S. platensis* pero en el caso de microalgas más pequeñas como *Scenedesmus*, *Dunaliella*, o *Chlorella* la filtración no es un proceso eficiente (52).

## 1.6 Recuperación de lípidos

A escala laboratorio existe una gran cantidad de procesos disponibles para la extracción de los lípidos producidos por las microalgas, sin embargo para un potencial escalamiento a nivel industrial este proceso representa todo un reto debido a los altos costos que este proceso implica, pues la extracción de aceite algal cuesta al menos tres veces más que la extracción del aceite de soya, debido principalmente al alto contenido de humedad de las microalgas (20; 51). Después de la recuperación de la biomasa, usualmente se realizan tres procesos, una deshidratación, rompimiento celular y finalmente la extracción de lípidos, sin embargo, la clave de un proceso eficiente de recuperación de lípidos es tener la menor cantidad de etapas como sea posible. (23; 51).

### 1.6.1 Deshidratación biomasa

Una vez la biomasa algal es recuperada, en algunos casos es necesario realizar una deshidratación de ésta con el fin de evitar una descomposición. La deshidratación se utiliza comúnmente para extender la vida útil de la biomasa, especialmente si la biomasa es el producto final. Los métodos de secado que se han utilizado para microalgas incluyen secado por atomización, secado en tambor, liofilización y secado al sol (23; 52). En el caso de la producción de biodiesel a partir de microalgas, es necesario realizar una extracción en húmedo, es decir omitir la deshidratación debido a sus altos costos. La deshidratación empleando secado solar ha sido propuesto para evitar dichos costos, pero debido a los grandes volúmenes que deben ser procesados, los requerimientos de tierra para el secado hacen que este proceso sea también inviable económicamente (20; 98).

### 1.6.2 Rompimiento celular

Posterior a la deshidratación celular, debido a la pared celular de algunas especies de las microalgas es necesario realizarle disrupción celular para liberar los lípidos y realizar una extracción más económica evitando el uso de temperaturas y presiones altas (20). Las microalgas *Chlorella* y *Nannochloropsis* son algunas de las especies con paredes celulares más gruesas haciendo necesario el rompimiento celular de ellas (20). Los

mecanismos de disrupción pueden ser mecánicos o no mecánicos. Los mecánicos pueden ser como el homogenizador, el molino de perlas, autoclave y cavitación, y los no mecánicos como congelado, empleo de ácidos, bases, solventes orgánicos, choque osmótico y el empleo de enzimas, sin embargo ninguno de estos procesos han sido empleados a escala industrial debido a su gran consumo energético (20; 52).

### **1.6.3 Extracción lípidos**

Los lípidos se clasifican en apolares y polares, por lo cual para una extracción efectiva de éstos es necesario el empleo de dos tipos de solventes, un solvente no polar como dietileter, cloroformo, benceno o hexano y un solvente polar como el metanol, etanol o isopropanol. A escala laboratorio son empleados una gran cantidad de métodos de extracción como Soxhlet, Folch, Bligh & Dyer, (20; 26; 103; 104). Muchos de los solventes empleados a escala laboratorio son tóxicos, por lo cual también se ha propuesto otros métodos de extracción como la subcrítica y supercrítica empleando CO<sub>2</sub>, sin embargo es un proceso altamente costoso para su empleo a escala industrial (20; 105; 106)



## 2. Comparación de cinco métodos gravimétricos y uno colorimétrico para la medición de lípidos totales en la microalga *Chlorella vulgaris*

### RESUMEN

Se compararon los métodos gravimétricos de extracción Soxhlet, Bligh & Dyer, Bligh & Dyer modificado por Inouye, Bligh & Dyer modificado por Manirakiza y un método colorimétrico para la determinación del contenido de lípidos totales en la microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002. La extracción Soxhlet tuvo la más baja eficiencia, mientras que el procedimiento original propuesto por Bligh & Dyer para la medición de lípidos en peces tuvo la mayor eficiencia en la determinación de lípidos totales microalgales. Se encontró que la sonicación a 20 kHz es un método efectivo para la disrupción celular de las microalgas, el porcentaje máximo de ruptura encontrado fue del 92% después de 18 minutos. El método espectrofotométrico de Marsh & Weinstein dio resultados equivalentes a los del método original de Bligh & Dyer (p-valor 66%), pero usa menos muestra, por lo que resulta más adecuado para la medición del contenido de lípidos totales de pequeñas cantidades de biomasa algal.

**Palabras clave:** *Chlorella vulgaris*, lípidos totales, rompimiento celular, gravimetría, espectrofotometría.

### ABSTRACT

Five gravimetric methods (Soxhlet extraction, Bligh & Dyer, Bligh & Dyer modified by Inouye, Bligh & Dyer modified by Manirakiza I and II) and a colorimetric method for the determination of total lipids content in the microalgae *Chlorella vulgaris* LAUN 002 were compared. Soxhlet extraction had the lowest efficiency in the determination of total microalgal lipids, while the original method proposed by Bligh & Dyer for the measurement of lipids in fish had the highest efficiency. Sonication at 20 kHz was found

to be an effective method for microalgae cells disruption, the maximum percentage of disruption was 92% after 18 minutes. The spectrophotometric method of Marsh & Weinstein gave equivalent results to the original method of Bligh & Dyer (p-value 66%), but it requires smaller samples, making it more suitable for measuring the total content of lipids from small amounts of algal biomass.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*, total lipids, cell disruption, sonication, gravimetry, spectrophotometry.

## 2.1 Introducción

En la actualidad es de gran interés encontrar fuentes de energía alternas a los combustibles fósiles, como lo son los biocombustibles, a causa de la inestabilidad del precio del petróleo y del incremento de concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, uno de los principales gases responsables del calentamiento global (2; 48). Los biocombustibles de primera generación son obtenidos de materias primas como la palma africana, la soya o la colza, sus principales desventajas incluyen la limitación en la capacidad de producción, alto consumo de agua dulce y la necesidad de tierras fértiles para su cultivo. Los biocombustibles de segunda generación son obtenidos empleando materiales lignocelulósicos, los cuales tienen una capacidad de producción mayor; sin embargo, aún necesitan zonas fértiles para su cultivo. Por su parte, los biocombustibles de tercera generación, como los obtenidos a partir de las microalgas no presentan ninguna de las anteriores desventajas (14; 15; 16).

Una de las principales dificultades de obtención de lípidos intracelulares a partir de microalgas radica en su pared celular, dura y de difícil penetrabilidad (20; 22), haciéndola un obstáculo a superar para una recuperación efectiva de sus lípidos, por ello se ha estudiado una gran cantidad de métodos de rompimiento de células microalgales que incluyen métodos térmicos, enzimáticos, mecánicos y químicos (20; 23; 24; 25). Ni los métodos químicos (ácidos, bases o choques osmóticos), ni los térmicos (autoclave o el horno microondas), ni los enzimáticos han sido eficientes para el rompimiento de microalgas (23; 24); por el contrario, la sonicación como técnica de disrupción mecánica,



ha probado ser eficiente para la disrupción de biomasa microalgal a escala de laboratorio (107; 108).

Una vez que la integridad de la pared celular de la microalga ha sido comprometida, es posible realizar la extracción y cuantificación de los lípidos producidos por aquella durante su etapa de crecimiento; para tal fin es común el uso de métodos gravimétricos gracias a su simplicidad y confiabilidad; tales métodos, sin embargo, presentan una desventaja: para lograr resultados precisos y reproducibles es necesario el uso de cantidades considerables de biomasa, lo cual no sucede con los métodos colorimétricos, en los cuales se pueden emplear desde 30 mg de muestra (26). En este último caso, es posible realizar cultivos microalgales en volúmenes no mayores que un litro para la obtención de la biomasa requerida para la cuantificación de los lípidos producidos, lo cual es muy ventajoso para microalgas con bajo rendimiento de biomasa como *Botryococcus braunii*, para la cual se han reportado concentraciones celulares que llegan hasta 370 mg·L<sup>-1</sup> después de 14 días de cultivo (27). Entre los métodos colorimétricos sobresalen la espectrofotometría con ácido sulfúrico (109), colorimetría con sulfo-fosfo-vainillina (110) y espectrofluorometría con rojo de Nilo (111); de todos ellos, el primero resalta por su simplicidad.

Uno de los factores más importantes para la medición del contenido total de lípidos usando métodos gravimétricos es el solvente empleado; en el caso de las microalgas han sido probados solventes como la mezcla cloroformo-metanol (26; 24; 103; 104), la mezcla ciclohexano-isopropanol, acetona, hexano, benzina (104) y CO<sub>2</sub> supercrítico (105; 106) entre otros; donde el criterio de selección del solvente va desde la búsqueda de una alta eficiencia de extracción hasta la búsqueda de solventes de baja toxicidad (104).

El objetivo del presente estudio fue la estandarización de un método espectrofotométrico de cuantificación del contenido total de lípidos producidos por la microalga *Chlorella vulgaris* y contrastarlo con cinco métodos gravimétricos de determinación lípidos; durante este proceso también se evaluó la efectividad de la sonicación como técnica de disrupción de *Chlorella vulgaris*.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Mantenimiento de microalgas

En el presente trabajo se utilizó la cepa colombiana de microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002, obtenida del Laboratorio de Cultivo de Algas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. La microalga fue mantenida en medio líquido *BBM* estándar (Anexo A) (112) esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Las condiciones de cultivo incluyeron temperatura de  $24 \pm 2$  °C, lámparas fluorescentes *Sylvania Daylight F48T12/D 39W* como fuente de iluminación artificial con irradiancia de  $40 \pm 2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad (18:6 LO), aireación de 0,7 vvm empleando aire atmosférico filtrado a 0,22  $\mu\text{m}$ . El mantenimiento se realizó en botellas de vidrio planas de 4,5 cm de espesor y capacidad de 330 mL con volumen de cultivo de 200 mL, se realizó resiembra semanalmente empleando inóculo del 5% v/v.

### 2.2.2 Condiciones de cultivo

La microalga fue cultivada en dos estanques comerciales con capacidad de 1000 L cada uno, marca *Ecoplast*, ubicados en la estación La Terraza, sede piscícola de la Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio (Meta), ciudad ubicada a 467 m.s.n.m., con condiciones medias de temperatura de 27°C, irradiación solar de  $4,5 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$  ( $\sim 390 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y fotoperiodo de 12:12 LO (33; 34). Se utilizó inóculo de 6% v/v, aireación de 0,7 vvm empleando aire atmosférico. Como medio de cultivo se usó agua filtrada del río Meta enriquecida con *BBM/2*. El tiempo de cultivo fue 7 días.

### 2.2.3 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos grado analítico en los ensayos de recuperación de biomasa y cuantificación de lípidos totales: hidróxido de sodio (Panreac 131687, Barcelona, España), azul de metileno (Merck 115943, Darmstadt, Alemania), bencina de petróleo (Merck 101775, Darmstadt, Alemania), cloroformo (JT Baker 9180, Central Valley, PA, USA), metanol, (JT Baker 9070, PA, USA), ciclohexano (Merck 109666, Darmstadt, Alemania), isopropanol (Panreac 141090, Barcelona, España) y ácido sulfúrico (Merck 100731, Darmstadt, Alemania).

### 2.2.4 Rendimiento de peso seco

Al finalizar el cultivo, el pH fue llevado de 6,5 a 8,0 empleando una solución acuosa 0,1 M de NaOH, y se adicionó alumbre comercial ( $Al_2(SO_4)_3$ ) hasta ajustar una concentración de 350 ppm para permitir la floculación de la biomasa. La biomasa floculada fue centrifugada a 4000 rpm en centrifuga *Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32* de 14 cm de radio (2500×g) durante 10 minutos, posteriormente fue lavada con agua destilada y recentrifugada hasta reducir la concentración teórica del alumbre en un 99%. La biomasa se secó en liofilizador *Labconco FreeZone 4.5* operado a temperatura de  $-52^{\circ}C$  y presión de 0,8 mBar durante 72 horas (113).

### 2.2.5 Disrupción celular

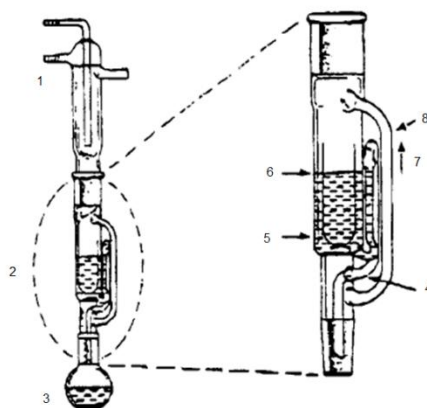
Se tomaron alícuotas de biomasa liofilizada y se resuspendieron en 10 mL de agua destilada en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm, hasta alcanzar concentraciones celulares entre  $8,9 \times 10^{07}$  y  $1,2 \times 10^{09}$  células·mL<sup>-1</sup>, para posterior disrupción celular por ultrasonido mediante un sonicador *Branson Sonifier 450 Digital* y cuerno de ½", cuya frecuencia sonicación es 20 kHz; se varió el porcentaje de amplitud entre 40 y 70% y se determinó la cinética de rompimiento celular, midiendo directamente el número de células viables mediante el empleo de un Microscopio y azul de metileno como colorante. La temperatura se mantuvo por debajo de los 20°C empleando un baño de agua con hielo. Durante la disrupción se realizó ciclos de 60 segundos de sonicación y 20 segundos de pausa para evitar sobrecalentamiento en el sonicador. Las amplitudes estudiadas fueron 40%, 50%, 60% y 70%, las amplitudes inferiores no fueron tenidas en cuenta debido al bajo porcentaje de disrupción, mientras que las amplitudes superiores no fueron realizadas debido a especificaciones técnicas del sonicador empleado. Las potencias específicas evaluadas fueron 1,4, 1,9, 2,4 y 2,9 W·mL<sup>-1</sup> para las amplitudes 40, 50, 60 y 70% respectivamente.

### 2.2.6 Medición del contenido total de lípidos por métodos gravimétricos

A continuación se describen los cinco métodos gravimétricos usados para la medición de lípidos:

### 2.2.6.1 Extracción Soxhlet

Una muestra de 4 g de biomasa liofilizada fue depositada en el dedal del extractor Soxhlet, Figura 2.1, 120 mL de bencina de petróleo empleados como solvente fueron cargados en el balón y calentados a ebullición a 60 °C empleando montaje *Soxhlet E&Q* con control de temperatura; el solvente evaporado es condensado y cae en el dedal, donde entra en contacto con la biomasa. Una vez el dedal se llenaba de solvente, éste se descargaba en el balón a través de un sifón; dicho proceso constituye un ciclo. La extracción se suspendió después de 20 ciclos para intentar maximizar la extracción de lípidos (114).



**Figura 2.1** Diagrama del equipo de extracción Soxhlet. 1, Condensador; 2, Zona de Extracción; 3, Balón; 4, Sifón; 5, Muestra; 6, Dedal; 7, Vapor de solvente; 8, Solvente condensado (114).

### 2.2.6.2 Método Bligh & Dyer original

Se siguió el método propuesto por Bligh & Dyer (1959), el cual consistió en realizar la disrupción por sonicación de 0,5 g de biomasa liofilizada resuspendida en 4 mL de agua destilada en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm, siguiendo procedimiento descrito en 2.2.5. Posteriormente se transfirió la suspensión a un tubo tipo Falcon de 50 mL se añadió 5 mL de cloroformo, y 10 mL de metanol, y se agitó con vortex a 2000 rpm durante 30 segundos, seguidamente se adicionaron otros 5 mL de cloroformo y 5 mL de agua destilada y se mezcló con vortex. Las fases fueron separadas por centrifugación a 900xg. Finalmente se adicionó 5 mL de cloroformo a la fase acuosa para separar los lípidos remanentes, las fases se separaron nuevamente por

centrifugación, 900×g. La fase acuosa fue descartada, mientras que las fases orgánicas obtenidas de las dos centrifugaciones fueron mezcladas. Se tomaron dos alícuotas de 5 mL de la solución de lípidos en cloroformo en sendas cajas de Petri y se evaporó el cloroformo en cabina de extracción empleando una plancha de calentamiento *Thermo Scientific CIMAREC* y se determinó la cantidad de lípidos extraídos gravimétricamente empleando balanza analítica *Mettler Toledo AB204-s* (103).

### **2.2.6.3 Método Bligh & Dyer modificado por Inouye**

A 0,5 g muestra liofilizada se le adicionó 5 mL de cloroformo y 5 mL de metanol en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm y se realizó la disrupción celular por sonicación, como se describe en 2.2.5, posteriormente se adicionó 5 mL de cloroformo y se realizó una segunda disrupción en iguales condiciones que la primera sonicación. A continuación se transfirió muestra a tubo tipo Falcon de 50 mL y se agregó 5 mL de agua destilada, se mezcló con vortex a 2000 rpm y se separaron las fases por centrifugación a 900×g. A la fase acuosa se adicionaron 5 mL de cloroformo para separar lípidos remanentes y se mezcló con vortex a 2000 rpm, se separó nuevamente las fases por centrifugación a 900×g. Las fases orgánicas se mezclaron, se evaporó el cloroformo y se determinó la cantidad de lípidos extraídos de igual manera que el método de Bligh & Dyer (26).

### **2.2.6.4 Método Bligh & Dyer modificado por Manirakiza**

A 0,5 g muestra liofilizada se le adicionó 10 mL de metanol y 5 mL de cloroformo en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm y se realizó la disrupción celular por sonicación, como se describe en 2.2.5. Seguidamente se transfirió la totalidad de la muestra en tubo tipo Falcon de 50 mL y se adicionó 5 mL de cloroformo y 9 mL de agua destilada y se agitó con vortex a 2000 rpm; en seguida se centrifugó a 900×g con el fin de recuperar la fase orgánica. A la fase acuosa se agregó 1 mL de metanol y 9 mL de cloroformo para recuperar los lípidos que aún remanentes en esta fase, a continuación se agitó y se centrifugó nuevamente a 900×g y se recuperó la fase orgánica, la cual fue mezclada con la primera fase orgánica obtenida, mientras que la fase acuosa fue descartada. Finalmente se evaporó el cloroformo y se determinó la cantidad de lípidos extraídos de igual manera que el método de Bligh & Dyer (104).

### 2.2.6.5 Segunda modificación de método Bligh & Dyer por Manirakiza

El procedimiento es muy similar al de la primera modificación realizada por Manirakiza, pero con solventes diferentes; el cloroformo fue reemplazado por ciclohexano mientras que el isopropanol sustituyó el metanol; esta modificación de reactivos fue propuesta debido a su menor toxicidad (104).

### 2.2.7 Medición de lípidos por colorimetría

30 mg biomasa liofilizada fueron agregados en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm junto a 10 mL de mezcla de los solventes cloroformo-metanol (1:2 v/v) y se realizó la disrupción celular por sonicación como se describe en 2.2.5, para la posterior extracción de lípidos y su correspondiente cuantificación por el método modificado de espectrofotometría propuesto por Marsh & Weinstein (1966). La biomasa estuvo en reposo durante 5 horas con la mezcla de solventes a temperatura ambiente para intentar aumentar la extracción. Posterior a la extracción de los lípidos, se agitó a 2000 rpm con vortex durante 30 segundos y se retiró la biomasa residual por centrifugación a 800×g, a la cual se adicionó 5 mL de la mezcla de solventes y realizó una segunda extracción a la biomasa durante 15 horas bajo las mismas condiciones para recuperar los lípidos remanentes en ésta, la biomasa fue centrifugada nuevamente a 800×g y descartada mientras que los solventes recuperados fueron mezclados con los obtenidos de la primera extracción. A continuación se adicionó 5 mL de agua y 5 mL cloroformo a los solventes para formar una relación de cloroformo-metanol-agua 2:2:1; la fase acuosa liviana que contiene el metanol, se retiró después de centrifugar a 800×g empleando pipeta Pasteur. Finalmente de la solución de lípidos en cloroformo se tomó alícuotas de 300 µL en tubos de ensayo de 10 mL, se les evaporó el solvente mediante baño de agua a 90°C y se les carbonizó los lípidos con 2 mL de ácido sulfúrico, a 90°C durante 30 minutos; seguidamente, las muestras se enfriaron y se diluyeron con 4 mL de agua destilada y se les midió la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 20*, empleando celda de absorbancia plástica de 2 mL de capacidad y trayectoria de luz de 1 cm (109).

La curva de calibración se realizó empleando una solución de aceite de *Chlorella vulgaris* en cloroformo con concentración de 0,78 mg·mL<sup>-1</sup>; la evaporación del cloroformo y la

carbonización de lípidos se realizó a alícuotas de solución de 50, 100, 150, 200, 300, 500 y 1000  $\mu\text{L}$ , como blanco se empleó 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo.

### 2.2.8 Diseño experimental, análisis estadístico y modelo cinético

Se realizó un experimento totalmente aleatorizado para disrupción celular y medición de lípidos. La disrupción celular se realizó por duplicado, los métodos gravimétricos de cuantificación de lípidos se realizaron por triplicado y se hizo 7 repeticiones del método colorimétrico. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se realizó análisis de varianza (ANAVA) con un nivel de significancia del 5% a los datos de contenido de lípidos obtenidos por los seis métodos de extracción y al porcentaje de disrupción obtenido bajo las diferentes condiciones de sonicación. Se establecieron las diferencias entre tratamientos mediante prueba de Tukey con una significancia del 5%.

La cinética de ruptura celular se ajustó al modelo mostrado en la Ec. 2.1, donde  $M$  es el porcentaje de mortalidad en el instante de tiempo  $t$ , en minutos,  $M_{\max}$  es el porcentaje máximo teórico de disrupción celular, mientras que  $k$  es la constante de proporcionalidad de primer orden de la velocidad de disrupción (115). Para el ajuste se empleó el software TableCurve 2D<sup>®</sup> (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

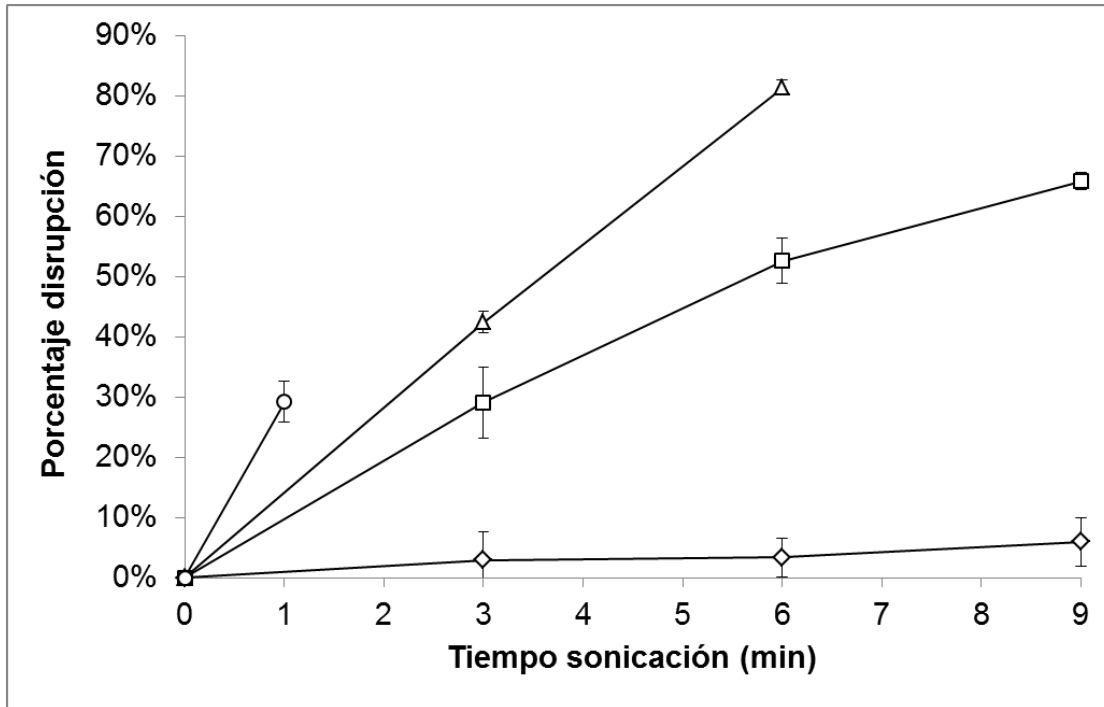
$$M = M_{\max} (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (\text{Ec. 2.1})$$

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Disrupción celular

La Figura 2.2 muestra el efecto positivo en el aumento de la potencia específica sobre el porcentaje de células rotas; sin embargo para la máxima potencia específica estudiada, 2,9  $\text{W} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ocasionaba una alta cavitación provocando la formación de una gran cantidad de espuma, obligando a pausas prolongadas en la sonicación en espera que ésta desapareciera, ya que la espuma generada causaba una disminución en la potencia de sonicación en hasta un 50%, llevando a que las condiciones de disrupción no fueran

constantes para la amplitud evaluada. Por lo anterior se escogió la potencia específica  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$  para estudios posteriores.

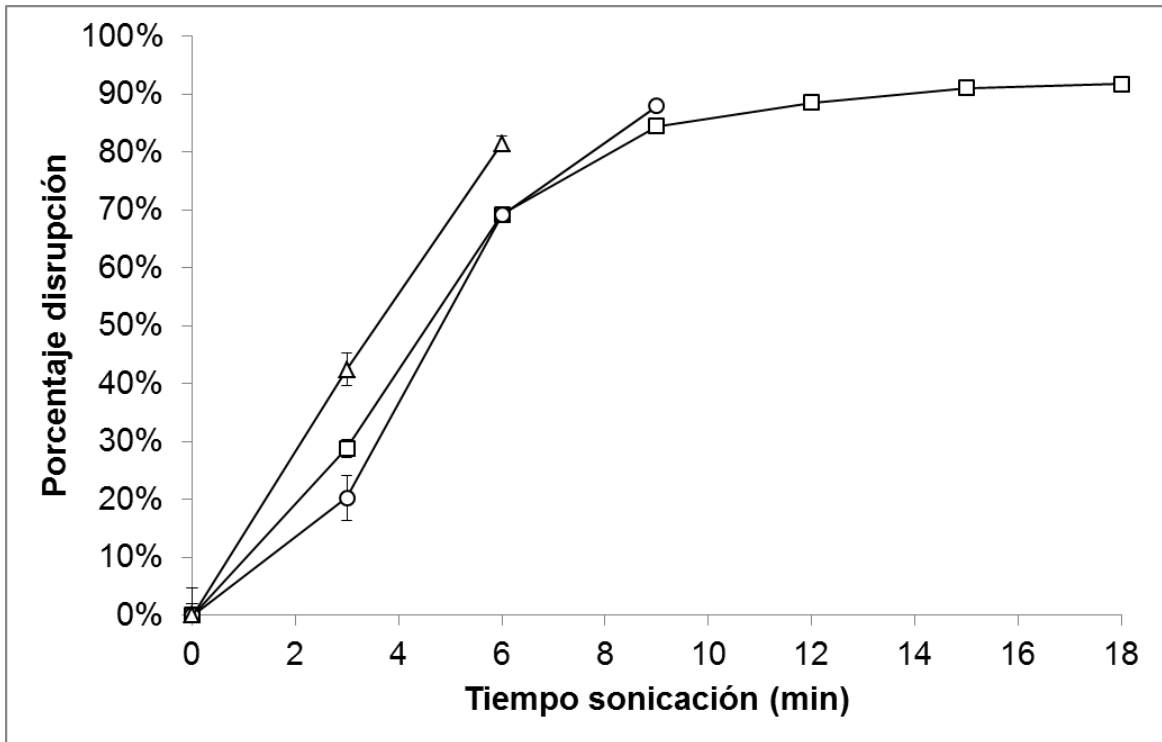


**Figura 2.2** Efecto de la amplitud de sonicación en la cinética de disrupción celular de la microalga *Chlorella vulgaris* suspendida en agua destilada. Densidad celular:  $1,2 \times 10^9$  células·mL<sup>-1</sup>. Potencia específica de sonicación: (◇):  $1,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; (□):  $1,9 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; (Δ):  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; (○):  $2,9 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ . n=2 Barra error: 1 Desv. Estándar

La Figura 2.3 muestra el efecto de la concentración inicial de células suspendidas en agua en la ruptura por sonicación; se observa que la máxima pendiente en la disrupción, durante los primeros 6 minutos de la suspensión más concentrada es tan sólo un 15% mayor a la suspensión de mínima concentración durante el mismo tiempo, a pesar que es aproximadamente 14 veces mayor la densidad celular, estadísticamente, según el análisis de varianza, Tabla 2.1, el p-valor del efecto de la concentración celular sobre la disrupción celular es del 15,06%, mientras que el p-valor del efecto del tiempo es de 0,027%, de lo cual se concluye que dentro el intervalo estudiado de concentración celular, ésta no incide en la ruptura en los primeros 6 minutos de disrupción, lapso en el cual el tiempo sí incidió en la disrupción celular; esto quizá debido a que para el rango de concentración celular estudiado, ésta no fue lo suficientemente alto para incidir en el



peso seco de la solución, por lo cual se recomienda para estudios posteriores tomar un intervalo más amplio del porcentaje de biomasa seca en la suspensión a sonicar al estudiado, el cual estuvo entre 0,13% y 1,9% w/v.



**Figura 2.3** Efecto de la concentración celular inicial en la disrupción de microalga suspendida en agua destilada; potencia específica de sonicación  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (○):  $8,9 \times 10^7$  células·mL<sup>-1</sup>; (□):  $1,6 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup>; (Δ):  $1,2 \times 10^9$  células·mL<sup>-1</sup>. n = 2. Barra error: 1 Desv. Estándar

**Tabla 2.1** ANAVA efecto de la concentración celular y el tiempo sobre el porcentaje de disrupción en los primeros 6 minutos de sonicación

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Concentración	0,0214	2	0,0107	3,154	15,06%
Tiempo	0,8125	2	0,4062	119,6	0,027%
Error	0,0135	4	0,0033		
Total	0,8475	8			

En la Figura 2.3 también puede apreciarse que el porcentaje máximo de disrupción celular alcanzado fue de aproximadamente 92%, después de 18 minutos de disrupción, sin embargo el p-valor del efecto del tiempo a partir de los 12 minutos para una regresión lineal es del 19%, ver Tabla 2.2. Debido a lo anterior se concluyó que el mejor tiempo de sonicación que debía ser empleado estaba alrededor de los 10 minutos para una potencia específica de sonicación de  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El porcentaje de rompimiento celular demuestra la eficiencia de la sonicación para tal fin, pues las microalgas se caracterizan por una gruesa pared celular, la cual hace que éstas presenten mayor dificultad para su rompimiento en comparación con otros seres unicelulares como las bacterias o las levaduras (22).

**Tabla 2.2.** Coeficientes de regresión lineal porcentaje de disrupción celular en función del tiempo, después de 12 minutos de sonicación

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>p-valor</b>
Intercepto	0,825	0,025	32,7873	1,91%
Pendiente	0,0053	0,0017	3,2243	19,1%

El modelo propuesto de la cinética de disrupción celular, Ec. 2.1, ajustó con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 0,987 para una potencia específica de sonicación de  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$  y densidad celular de  $1,6 \times 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Donde los valores ajustados de  $M_{max}$  y  $k$  fueron  $92,7 \pm 1,0\%$  y  $0,258 \pm 0,043 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente con una confianza del 95%. Para las concentraciones celulares de  $8,9 \times 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $1,2 \times 10^9 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se determinaron el parámetro  $k$  de  $0,258 \pm 0,029 \text{ min}^{-1}$  y  $0,332 \pm 0,043 \text{ min}^{-1}$ , es decir que para un regresión lineal, el p-valor de la pendiente en el efecto de la concentración celular en el parámetro  $k$  es 6,2%, Tabla 2.3, lo cual ratifica la no incidencia de la concentración celular en la disrupción para el intervalo estudiado.

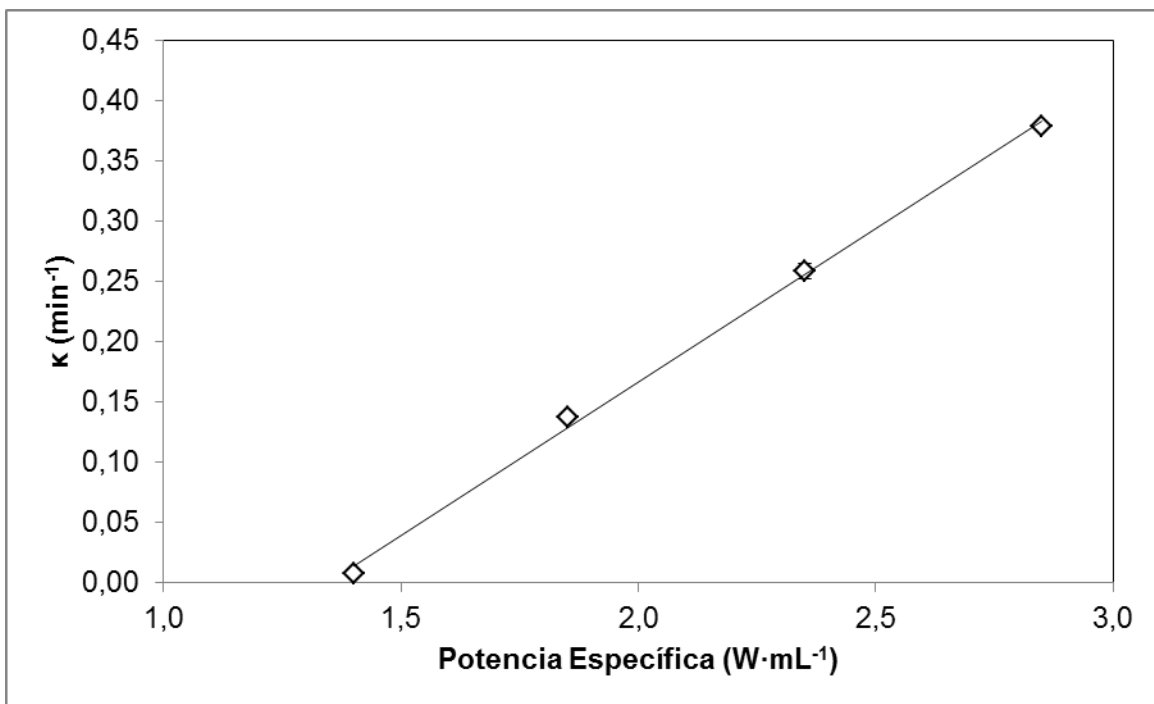
**Tabla 2.3.** Coeficientes de regresión lineal del parámetro  $k$  en función de la densidad celular inicial de sonicación

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>p-valor</b>
Intercepto	0,250	0,018	13,6167	0,0168%
Pendiente	$6,45 \times 10^{-11}$	$2,50 \times 10^{-11}$	2,5818	6,12%

Adicionalmente, se correlacionó de manera lineal el efecto de la potencia específica sobre el parámetro  $k$ , Tabla 2.4 y Figura 2.4, con un coeficiente  $R^2$  de 0,994, dando como pendiente e intercepto  $0,254 \pm 0,019 \text{ mL}\cdot\text{W}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $-0,342 \pm 0,042 \text{ min}^{-1}$  con una significancia del 5%, respectivamente; de lo cual se concluye que para potencias específicas por debajo de  $1,35 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$  no hay disrupción celular para el caso de la microalga *Chlorella vulgaris*.

**Tabla 2.4.** Coeficientes de regresión lineal del parámetro  $k$  en función de la potencia específica de sonicación

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>p-valor</b>
Intercepto	-0,342	0,017	-20,0867	$9,89 \times 10^{-05}\%$
Pendiente	0,254	0,0078	32,6015	$5,54 \times 10^{-06}\%$



**Figura 2.4** Efecto de la potencia específica de sonicación en el parámetro  $k$ , para microalga *Chlorella vulgaris*. Barra error: 1 error estándar de regresión

Furuki *et al.* (2003) reportan para la microalga *Spirulina* también una tendencia lineal del parámetro  $k$  en función de la potencia específica, reportando valores aproximados entre  $0,2$  y  $1,5 \text{ min}^{-1}$  para valores de potencias específicas entre  $10$  y  $80 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,

respectivamente, empleando frecuencia de sonicación de 20 kHz (116), es decir que para una potencia específica de  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el valor de  $k$  está estimado en aproximadamente  $0,11 \text{ min}^{-1}$ , dando a entender que la microalga *Chlorella vulgaris* presentó menor resistencia a la disrupción esto quizá debido a la forma de crecimiento colonial de la microalga *Spirulina*, lo cual actúa a manera de protección, en este caso de la disrupción (117). Por otro lado, Choonia & Lele (2011) empleando también un sonicador *Branson Sonifier 450* y la bacteria *Lactobacillus acidophilus*, la cual no cuenta con pared celular, encontraron un comportamiento lineal en el efecto de la potencia específica sobre  $k$ , sin embargo para esta bacteria se estimó  $k$  en aproximadamente  $1,0 \text{ min}^{-1}$  y la mortalidad máxima en 100% para una potencia específica de  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$  (118), lo cual demuestra el efecto protector de la pared celular con la que cuenta las microalgas como *Chlorella vulgaris*.

Gavand *et al.* (2007) reportan una disrupción celular máxima de 33% para la microalga *Dunaliella salina* empleando sonicación durante 20 minutos, sin embargo la frecuencia empleada por ellos fue 1,4 kHz, es decir 14 veces menor a la empleada en la presente investigación (115). La disrupción celular de eritrocitos, cuya estructura celular no cuenta con pared celular, mediante sonicación también es reportada, alcanzando un porcentaje de ruptura celular del 91% con tan sólo 10 segundos de sonicación, sin embargo con una frecuencia de 360 kHz (107).

### **2.3.2 Comparación métodos gravimétricos de medición de lípidos**

Bligh & Dyer (1959) propusieron un método gravimétrico para la determinación de lípidos totales a partir de tejido fresco de pez, el cual se caracterizó por su simplicidad, rapidez y reproducibilidad. A pesar que las células animales no presentan pared celular, se determinó que la extracción óptima de lípidos se obtenía cuando la muestra era homogenizada junto con los solventes (103), por lo cual se propuso originalmente una simple homogenización empleando una licuadora. Para el caso de las modificaciones por Inouye y por Manirakiza, se sugirieron alteración al procedimiento original, sin embargo la extracción se realizó a células animales, pero esta vez la disrupción celular se llevó a cabo empleando un homogenizador (26; 104). Lee *et al.* (2010) y Zheng *et al.* (2011) siguieron la metodología propuesta por Bligh & Dyer para la determinación de lípidos

totales de diferentes microalgas, con una modificación similar a la propuesta por Inouye, donde evaluaron diferentes tipos de técnicas de disrupción celular, entre ellas la sonicación, sin embargo no determinaron el porcentaje de disrupción de estos métodos bajo las condiciones estudiadas (24; 25).

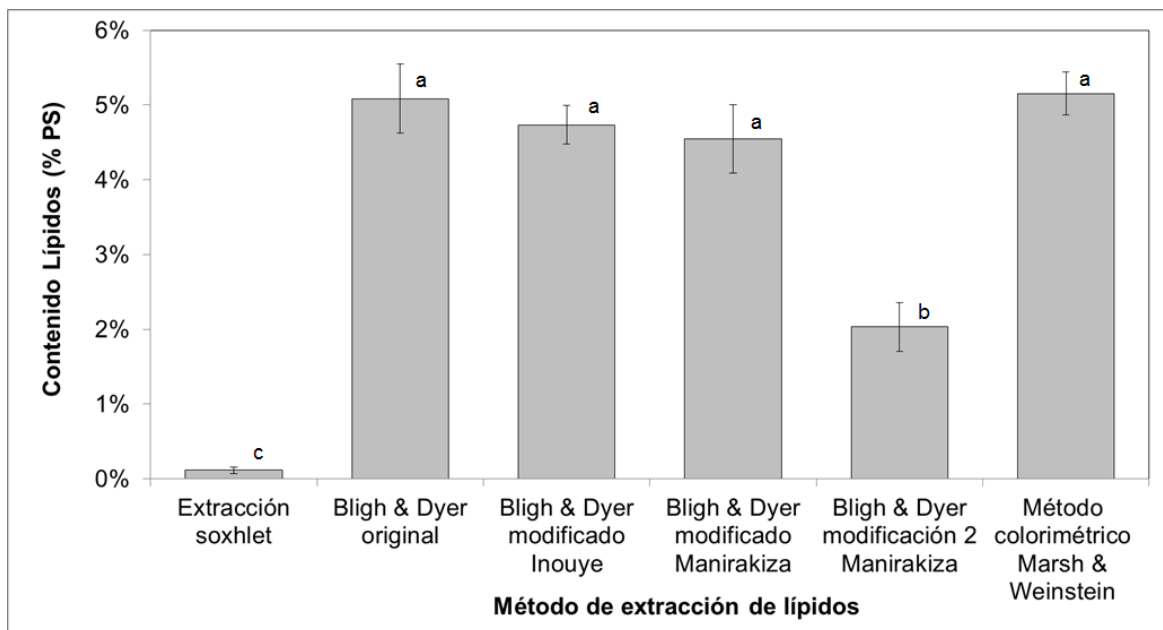
La Figura 2.5 detalla los resultados del contenido de lípidos extraídos de la microalga a partir de los diferentes métodos gravimétricos estudiados, adicionalmente la Tabla 2.5 muestra el análisis de varianza del efecto del método de extracción sobre el contenido de lípidos extraídos. Se observa la baja eficiencia de la extracción Soxhlet y la segunda modificación de Manirakiza del método de Bligh & Dyer, métodos que tienen en común el empleo de solventes diferentes a la mezcla cloroformo-metanol, pues usan bencina de petróleo y ciclohexano-isopropanol, respectivamente, lo cual lleva a concluir que la selección del solvente para la extracción es un factor importante para realizar la extracción, debido a la baja eficiencia para la extracción de lípidos de microalgas a partir de dichos solventes en comparación a la mezcla metanol-cloroformo. Otras investigaciones también reportan la menor eficiencia de solventes como hexano, éter de petróleo, DMC-hexano, acetona-hexano con respecto a la mezcla metanol-cloroformo para la extracción de lípidos de diferentes fuentes como leche en polvo, margarina, huevos, harina de pescado o incluso microalgas (104; 119)

**Tabla 2.5.** ANAVA efecto de método de extracción sobre el contenido de lípidos extraído

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Método de extracción	0,005709	5	0,001142	129,16	$8,83 \times 10^{-10}\%$
Error	0,000133	15	$8,840 \times 10^{-6}$		
Total	0,005842	20			

Según la Tabla B.2, del Anexo B, El método de Bligh & Dyer, así como su modificación por Inouye y su modificación por Manirakiza tienen resultados de extracción estadísticamente iguales con una significancia del 5% de acuerdo a la prueba de Tukey, de lo cual se concluye que las alteraciones al método propuesto en 1959, segunda disrupción celular y menor empleo de solventes para el caso de la modificación de

Inouye, o el empleo de una mayor cantidad de solventes para el caso de la modificación de Manirakiza, o incluso el orden de la adición de los solventes de estas dos modificaciones, no aportan diferencias significativas en la extracción de lípidos para la microalga utilizada. Por lo cual se concluye que para extracciones gravimétricas de lípidos de microalgas el método de Inouye es el más conveniente debido que el costo correspondiente al empleo de solventes, según precios ICIS es un 27% y 38% menor que los métodos Bligh & Dyer original y Bligh & Dyer modificado por Manirakiza (120), respectivamente, pero realizando una sola disrupción celular, pues la segunda disrupción no tiene efecto positivo sobre la extracción, debido a que se demostró la saturación en el porcentaje de mortalidad después de los 12 minutos de sonicación bajo las condiciones de estudio.



**Figura 2.5** Porcentaje de lípidos extraídos en peso seco de la microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002 con cada método de extracción evaluado. Métodos gravimétricos n=3, método colorimétrico n=7. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

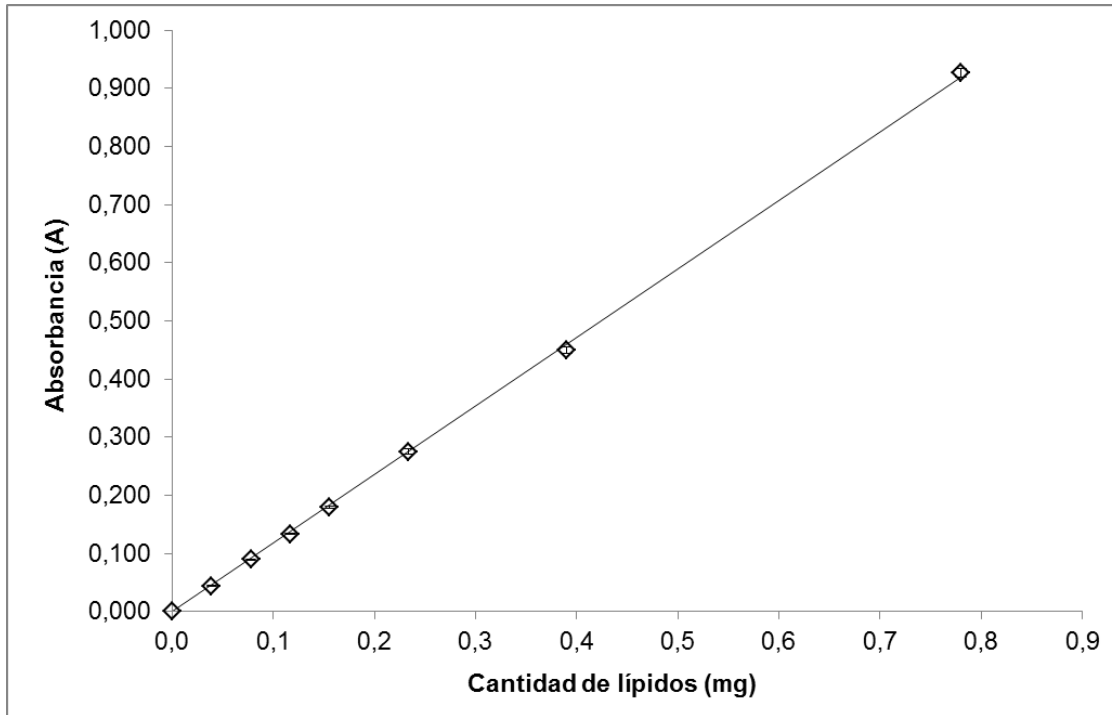
El empleo de la extracción Bligh & Dyer modificada por Inouye como técnica industrial de recuperación de lípidos es un proceso altamente costoso, haciéndolo poco factible como técnica de recuperación de aceites de microalgas para la producción de biodiesel pues el

sólo proceso de disrupción y extracción tendrían un costo estimado entre US\$ 1,0 y 1,1 por 1 kg de biomasa de microalga seca bajo las condiciones estudiadas, por lo cual sería fundamental que ésta tenga un alto contenido de lípidos en peso seco para hacer menos costoso el proceso, es decir que con un estimado de 30% PS, para cada kilogramo de lípidos los costos asociados a la sola extracción sería de US\$ 3,6, valor que no incluye costos de cultivo y recuperación de biomasa, es decir 3 veces el precio de venta del aceite de palma crudo en Colombia (US\$ 1,19 el kilogramo) (121), por lo cual sería necesario optimizar el uso de los solventes, además de considerar su reutilización, en especial el metanol, por su mayor costo.

Finalmente, la extracción Soxhlet arrojó el resultado más bajo, esto debido a dos motivos, el primero de ellos la selección del solvente empleado, es decir la bencina de petróleo, la cual fue escogida gracias a su baja toxicidad, alta volatilidad y su bajo costo; y el segundo es la ausencia de un método de disrupción celular, debido a que éste fue reemplazado por el uso de calor y mayor tiempo de extracción, aproximadamente 5 horas, haciéndolo así un proceso lento en comparación a la extracción propuesta por Bligh & Dyer (104; 114). A pesar que la extracción Soxhlet es un proceso energéticamente más costoso que la extracción de Bligh & Dyer, la eficiencia para recuperar los lípidos de la microalga del primero no superó el 2,5% en relación a este último, convirtiéndolo así en un proceso poco atractivo para la recuperación gravimétrica de lípidos de las microalgas.

### **2.3.3 Calibración método colorimétrico para medición de lípidos de microalga**

Para la medición de lípidos por espectrofotometría, se realizó curva de calibración de absorbancia a una longitud de onda de 375 nm debido a la mayor sensibilidad en la detección de aceites a dicha longitud de onda en función de la cantidad de lípidos (109), Figura 2.6. Se empleó como patrón los mismos lípidos extraídos en los métodos previos gravimétricos, pues el tipo de patrón empleado tiene incidencia al realizar la curva de calibración de la absorbancia (109).



**Figura 2.6** Curva de calibración Absorbancia a 375 nm en función de la cantidad de lípidos, microalga *Chlorella vulgaris*, n=3, Barra error: 1 Desv. Estándar

La Figura 2.5 muestra adicionalmente la similitud en la cantidad de los lípidos extraídos por el método de Bligh & Dyer (1959) con la cantidad de lípidos estimada por espectrofotometría, estadísticamente iguales con una significancia del 5%, lo cual permite concluir la confiabilidad del método colorimétrico propuesto por Marsh & Weinstein en 1966 para medir lípidos totales en la microalga utilizada. Finalmente, lo anterior resulta ser esperado, dado que a partir de los resultados de los métodos gravimétricos evaluados las diferencias en el procedimiento no dieron aportes significativos en el contenido de lípidos extraídos como si lo hizo el solvente empleado, los cuales fueron los mismos entre el método colorimétrico estudiado y los propuestos por Bligh & Dyer.



### **3. Microalgas *Scenedesmus ovalternus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis sp.*, *Isochrysis sp.* y *Botryococcus braunii* como fuentes potenciales de biodiesel**

#### **RESUMEN**

La presente investigación evaluó la composición y capacidad de acumulación de lípidos en cuatro microalgas nativas de Colombia y un alga de referencia (*Botryococcus braunii*), como fuentes potenciales para la producción de biodiesel. Las microalgas de agua dulce (*Scenedesmus*, *Chlorella* y *Botryococcus*) fueron cultivadas en medio *BBM*, mientras que las microalgas marinas (*Nannochloropsis* e *Isochrysis*) se cultivaron en medio *f/2*; los cultivos fueron realizados a  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ciclo de luz y oscuridad de 18:6 LO, 24°C y aireación con aire atmosférico. *Scenedesmus* y *Chlorella* presentaron las mayores productividades de lípidos con 18,8 y 18,7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente, mientras que las microalgas marinas *Nannochloropsis* e *Isochrysis* tuvieron las menores productividades de lípidos: 10,8 y 4,9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente. La productividad de lípidos de la microalga *Botryococcus* fue 10,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ . Las anteriores productividades de lípidos son entre 1,1 y 4,1 veces mayores que la productividad de aceite de la palma africana, actual materia prima empleada en Colombia para la producción industrial de biodiesel. De acuerdo con la caracterización de los ácidos grasos producidos por las microalgas estudiadas, todas pueden ser empleadas en la producción de biodiesel, debido a la similitud de estos con aceites ya empleados en la producción de biodiesel.

**Palabras claves:** Microalga, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Botryococcus*, lípidos, biodiesel

## Abstract

This research evaluated the ability to accumulate lipids and their composition of five microalgae, four of them native from Colombia and one reference alga (*Botryococcus braunii*), as potential feedstocks for biodiesel production. The freshwater microalgae (*Scenedesmus*, *Chlorella* and *Botryococcus*) were cultured in BBM, whereas the seawater microalgae (*Nannochloropsis* and *Isochrysis*) were cultured in *f/2*; the cultures were maintained at  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 18:6 hours of light and dark cycle, 24°C and aeration with atmospheric air. *Chlorella* and *Scenedesmus* had the highest lipid productivity: 18.8 and 18.7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , respectively, while seawater microalgae *Isochrysis* and *Nannochloropsis* had the lowest productivity of lipids: 4.9 and 10.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , respectively; the lipid productivity of the microalga *Botryococcus* was 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ . The above productivities are among 1.1 and 4.1 times longer than the productivity of palm oil, current feedstock for the industrial production of biodiesel in Colombia. According to the characterization of the fatty acids produced by the microalgae studied, the five microalgae can be employed in the production of biodiesel because their oils have similarity with the oils used in the production of biodiesel.

**Keywords:** Microalgae, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Botryococcus*, lipids, biodiesel.

## 3.1 Introducción

En los últimos años ha sido de gran interés el desarrollo de nuevas tecnologías para la obtención de biocombustibles, las cuales permitirían disminuir la dependencia al petróleo, uno de los combustibles responsables de la emisión al medio ambiente de  $\text{CO}_2$ , causante del efecto de calentamiento global (8; 48; 49). Los biocombustibles actualmente empleados como el biodiesel, sin embargo, presentan serias desventajas. De un lado, la generación de sus materias primas tradicionales requiere de grandes extensiones de tierra, lo que reduce el área disponible para otros cultivos necesarios y puede causar una crisis en la seguridad alimentaria (10). Asimismo, la producción de estos biocombustibles también tiene potenciales impactos negativos en el ambiente, los cuales incluyen deforestación y pérdida de biodiversidad (12; 13; 57; 69).

Las microalgas son seres capaces de asimilar el CO<sub>2</sub> presente en el aire empleando luz solar, agua y algunos nutrientes para producir diversos productos naturales de alto valor agregado, tales como proteínas y lípidos (16; 42; 122). Muchas especies de microalgas acumulan durante su crecimiento significativas cantidades de lípidos que pueden extraerse y destinarse a usos diversos de acuerdo con su composición (16; 79). Dentro de la enorme variedad de lípidos producidos por las microalgas, se destacan los triglicéridos de cadenas saturadas y poliinsaturadas, lípidos variados de alto peso molecular (hasta C<sub>40</sub>) y ácidos grasos libres (como los ácidos eicosapentanoico, linolénico y docosahexaenoico) de alto valor nutricional y farmacéutico (73; 123). De esta manera, los triglicéridos producidos hacen de las microalgas una fuente alterna a las convencionales, como la palma africana, para la obtención de biodiesel (16).

Las microalgas tienen una serie de ventajas comparadas con plantas oleaginosas como la palma africana, entre las cuales están una mayor productividad de aceites por unidad de tiempo y área (hasta 23 veces) (16), posibilidad de cultivo en zonas no aptas para la agricultura como los desiertos, e incluso pueden ser cultivadas con agua de mar (30). Algunas de las microalgas que son capaces de acumular grandes cantidades de aceite son *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis sp.* y *Scenedesmus sp.*, para los cuales se han reportado concentraciones de aceite de hasta 75%, 68%, 56%, 33% y 27% de la biomasa seca, respectivamente (16; 31; 32)

El cultivo masivo de microalgas para la producción de biodiesel debe superar una gran cantidad de retos, el primero de ellos es quizá la adaptación a las condiciones ambientales del ecosistema local, por lo cual se prefiere estudiar cepas nativas a cepas modificadas genéticamente, pues aquellas se caracterizan por tener mayor tolerancia a la contaminación y a las condiciones medioambientales, permitiendo que el control de las condiciones de cultivo sea menos riguroso (28; 29). Las cepas de microalgas mencionadas previamente además de acumular altos niveles de lípidos, se caracterizan por su rápido crecimiento y comprobada adaptación a las condiciones climatológicas colombianas gracias a que se han encontrado cepas nativas de dichas microalgas en el territorio nacional, lo cual las hace idóneas para la evaluación como potencial fuente de

biodiesel a nivel de Colombia, país que cuenta con una alta riqueza hídrica y lumínica, propicio para el cultivo de microalgas (33; 34; 35)

Colombia es un país tropical con condiciones adecuadas para el cultivo de microalgas, haciendo necesario realizar estudios que permitan seleccionar microalgas con perspectivas para su uso como posible materia prima de aceites para la producción de biodiesel, el anterior fue el objetivo de esta investigación, en la cual se cultivaron a escala laboratorio las microalgas colombianas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ovalternus*, *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.* y la cepa foránea *Botryococcus braunii* UTEX 572, esta última empleada como microalga de referencia.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Mantenimiento de microalgas

Fueron utilizadas las cepas de microalgas nativas colombianas *Scenedesmus ovalternus* LAUN 001, *Chlorella vulgaris* LAUN 002, *Nannochloropsis sp.* LAUN 004 e *Isochrysis sp.* LAUN 011, mantenidas en el Laboratorio de Cultivo de Algas de la Universidad Nacional de Colombia y la microalga *Botryococcus braunii* UTEX 572, obtenida de la Universidad de Texas, Estados Unidos. Las cepas de agua dulce LAUN 001, LAUN 002 y UTEX 572 fueron mantenidas en medio *BBM* estándar, mientras que las cepas de agua marina LAUN 004 y LAUN 011 se incubaron en medio *f/2* estándar (salinidad media  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Anexo A) (112); ambos medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Las condiciones de cultivo incluyeron una temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , lámparas fluorescentes *Sylvania Daylight F48T12/D 39W* como fuente de iluminación artificial con irradiancia de  $40 \pm 2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad (18:6 LO), aireación de 0,7 vvm empleando aire atmosférico filtrado a  $0,22 \mu\text{m}$ . El cultivo de mantenimiento se realizó en botellas de vidrio planas de 4,5 cm de espesor y capacidad de 330 mL con volumen de cultivo de 200 mL, se realizó resiembra semanalmente empleando inóculo del 5% v/v, en el caso de la cepa *Botryococcus* la resiembra fue quincenal.

### 3.2.2 Condiciones de cultivo

El cultivo de las diferentes microalgas se realizó por triplicado en botellas de vidrio y medio de cultivo según se describe en 3.2.1. Las condiciones de crecimiento fueron: volumen de medio de cultivo  $100,0 \pm 0,5$  mL, densidad celular inicial:  $\sim 1 \times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup> para las microalgas LAUN 001, LAUN 002, LAUN 004 y UTEX 572 y  $\sim 1 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup> para la microalga LAUN 011; Temperatura  $24 \pm 2$  °C; 2 lámparas fluorescentes *Sylvania Daylight F48T12/D 39W* como fuente de iluminación artificial con fotoperiodo 18:6 LO e irradiancia de  $40 \pm 2$   $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y aireación a 0,7 vvm con aire atmosférico filtrado a 0,22  $\mu\text{m}$  (CO<sub>2</sub> estimado en 350 ppm). El tiempo de cultivo fue hasta llegar a fase estacionaria.

### 3.2.3 Medición de crecimiento

El crecimiento en los diferentes cultivos fue determinado mediante conteo celular directo diario empleando una cámara de *Neubauer* y un microscopio LEICA DME.

### 3.2.4 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos grado analítico en los ensayos de cuantificación y caracterización de lípidos totales: cloroformo (JT Baker 9180, Avantor Performance Material, Central Valley, PA, USA), metanol, (JT Baker 9070 Avantor Performance Material, Central Valley, PA, USA), ácido sulfúrico al 97% (Merck 100731, Darmstadt, Alemania), tolueno (Merck 108323, Darmstadt, Alemania), dimetilsulfóxido DMSO (Merck 802912, Darmstadt, Alemania), n-hexano (Merck 104368, Darmstadt, Alemania), diclorometano (Merck 106054, Darmstadt, Alemania) y FAME Mix 35077 (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA).

### 3.2.5 Rendimiento de peso seco

Al finalizar el cultivo, la totalidad de la biomasa fue centrifugada a 4000 rpm en centrifuga *Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32* de 14 cm de radio (2500xg) durante 10 minutos, lavada 2 veces con agua destilada, recentrifugada, recuperada y secada en liofilizador *Labconco*

*FreeZone 4.5* operado a temperatura de  $-52^{\circ}\text{C}$  y presión de 0,8 mBar durante 72 horas (113).

### 3.2.6 Contenido de lípidos totales

La biomasa liofilizada se rompió mediante sonicación empleando *Branson Sonifier 450 Digital* y cuerno de  $\frac{1}{2}$ " en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm empleando 10 mL de una mezcla de solventes cloroformo-metanol (1:2 v/v) durante 10 minutos con una potencia específica de  $2,4 \text{ W}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; la temperatura se mantuvo por debajo de los  $20^{\circ}\text{C}$  empleando un baño de agua con hielo. Durante la disrupción se realizó ciclos de 60 segundos de sonicación y 20 segundos de pausa para evitar sobrecalentamiento en el sonicador. Seguida de la disrupción, la biomasa estuvo en reposo durante 5 horas con la mezcla de solventes a temperatura ambiente para intentar aumentar la extracción. Posterior a la extracción de los lípidos, se agitó a 2000 rpm con vortex durante 30 segundos y se retiró la biomasa residual por centrifugación a  $800\times g$ , a la cual se adicionó 5 mL de la mezcla de solventes y realizó una segunda extracción a la biomasa durante 15 horas bajo las mismas condiciones para recuperar los lípidos remanentes en ésta, la biomasa fue centrifugada nuevamente a  $800\times g$  y descartada mientras que los solventes recuperados fueron mezclados con los obtenidos de la primera extracción. A continuación se adicionó 5 mL de agua y 5 mL cloroformo a los solventes para formar una relación de cloroformo-metanol-agua 2:2:1; la fase acuosa liviana que contiene el metanol, se retiró después de centrifugar a  $800\times g$  empleando pipeta Pasteur. Finalmente de la solución de lípidos en cloroformo se tomó alícuotas de 300  $\mu\text{L}$  en tubos de ensayo de 10 mL, se les evaporó el solvente mediante baño de agua a  $90^{\circ}\text{C}$  y se les carbonizó los lípidos con 2 mL de ácido sulfúrico, a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; seguidamente, las muestras se enfriaron y se diluyeron con 4 mL de agua destilada y se les midió la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 20*, empleando celda de absorbancia plástica de 2 mL de capacidad y trayectoria de luz de 1 cm (109).

### 3.2.7 Caracterización lípidos

Para la caracterización de lípidos se realizó la derivatización de éstos por catálisis ácida a  $90^{\circ}\text{C}$  como se describe a continuación. La totalidad de la solución de lípidos obtenida

de la extracción se depositó en un tubo de ensayo con tapa rosca de 30 mL y se le retiró por arrastre el cloroformo empleando una corriente de CO<sub>2</sub>; seguidamente a la muestra se le agregó 2148 µL de metanol, 990 µL de tolueno, 66 µL de ácido sulfúrico, 1000 µL de DMSO y 2000 µL de n-hexano. A continuación se selló el tubo y se mantuvo en reposo durante 2 horas en un baño de agua hirviendo (~92°C) para permitir la metilación; al finalizar dicho periodo se enfrió y se tomó una alícuota de 1000 µL de la fase liviana de n-hexano donde se encontraban solubilizados los metil ésteres de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés), a la cual también se le separó por arrastre el solvente empleando una corriente de CO<sub>2</sub>. Los FAME fueron redisueltos empleando 300 µL de Diclorometano, de los cuales 200µL fueron inyectados para cromatografía de gases.

Los FAME se analizaron en un cromatógrafo de gases *Shimadzu GC-14A* equipado con un detector de ionización de llama (260°C). La separación se llevó a cabo con una columna Supelco® Omegawax 320, de 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm de grosor de película. La separación se realizó mediante una rampa de temperatura (temperatura inicial de 80°C, 10°C/min hasta 190°C, 20 min a 190°C, 2°C/min hasta 220°C y 10 min 220°C). Se utilizó helio pureza 99.999% como gas transportador y la inyección se hizo en modo "split" (relación 1:50). Los FAME se identificaron por comparación con los tiempos de retención de una mezcla estándar de ácidos grasos FAME Mix 35077. Cada ácido graso se reporta como porcentaje del total de ácidos grasos identificados en cada microalga analizada.

### 3.2.8 Ajuste cinéticas de crecimiento

A cada cultivo se le ajustó el modelo de crecimiento logístico descrito en la Ec. 3.1.

$$X = \frac{X_0 X_{max} e^{\mu t}}{X_{max} + X_0 (e^{\mu t} - 1)} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

En la Ec. 3.1.  $X$  es la densidad celular (células·mL<sup>-1</sup>),  $X_0$  y  $X_{max}$  son las densidades celulares inicial y máxima, respectivamente (células·mL<sup>-1</sup>),  $\mu$  es la Velocidad específica de crecimiento aparente (día<sup>-1</sup>) y  $t$  es el tiempo de cultivo (día). Para el ajuste se empleó el *software* TableCurve 2D® (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

### 3.2.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental totalmente aleatorizado de clasificación con tres repeticiones por cada microalga evaluada. Se realizaron análisis de varianza (ANAVA) con una confianza del 95%, se establecieron las diferencias entre las microalgas estudiadas mediante prueba de Tukey con una significancia del 5% y se determinaron los intervalos de confianza para los valores de velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , productividad de biomasa, contenido de lípidos y productividad de lípidos mediante prueba *t de Student* con un nivel de significancia del 5%. Las barras de error presentadas en las figuras corresponden a una desviación estándar.

## 3.3 Resultados y discusión

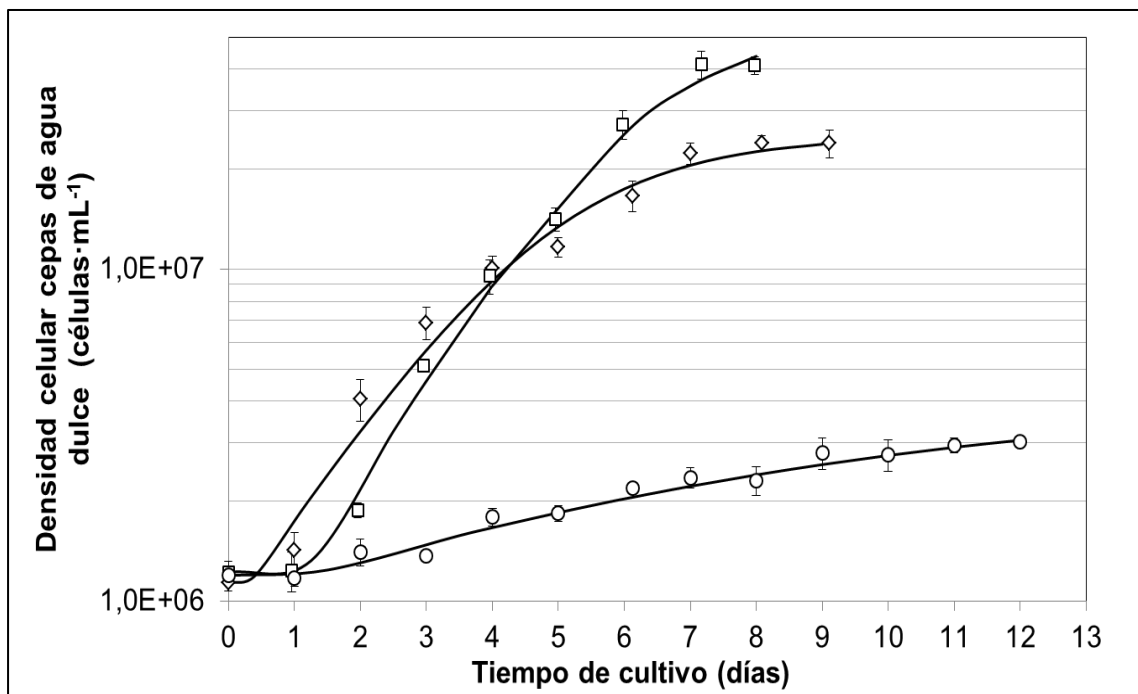
### 3.3.1 Crecimiento microalgas

Las curvas de crecimiento de las microalgas son mostrados en la Figura 3.1 y la Figura 3.2, donde se observa la fase exponencial de cada una de ellas. En el caso de las microalgas de agua dulce *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris*, la fase exponencial se extiende durante 6 días, la etapa exponencial de las microalgas marinas *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.* es más corta, de sólo 3 días; lo anterior es un primer indicio que lleve a pensar que todas las microalgas sean aptas para su cultivo masivo, dada los altos tiempos de duplicación. Finalmente para la cepa *Botryococcus braunii* UTEX 572, se aprecia una lenta velocidad de crecimiento como lo han descrito investigaciones previas, debido principalmente a la gran cantidad de lípidos sintetizados por ella (79), haciendo que durante 11 días su densidad celular tan sólo se triplicase, muy inferior a las microalgas *Scenedesmus ovalternus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.*, las cuales aumentaron su densidad celular al cabo de su crecimiento 21, 34, 16 y 33 veces respectivamente.

Otras investigaciones reportan para la microalga *Scenedesmus* un aumento aproximado de la densidad celular de 16 veces en 15 días (87) y 22 veces en 7 días (31); para la microalga *Chlorella sp.* se reporta un crecimiento cercano a las 50 veces en 14 días (124), 10 veces en 24 días empleando agua de mar (32), 15 veces en 15 días (125), 16 veces en 6 días empleando un medio heterotrófico con glucosa (126). En el caso de la microalga *Nannochloropsis sp.* se ha reportado un aumento de 128 veces su biomasa en



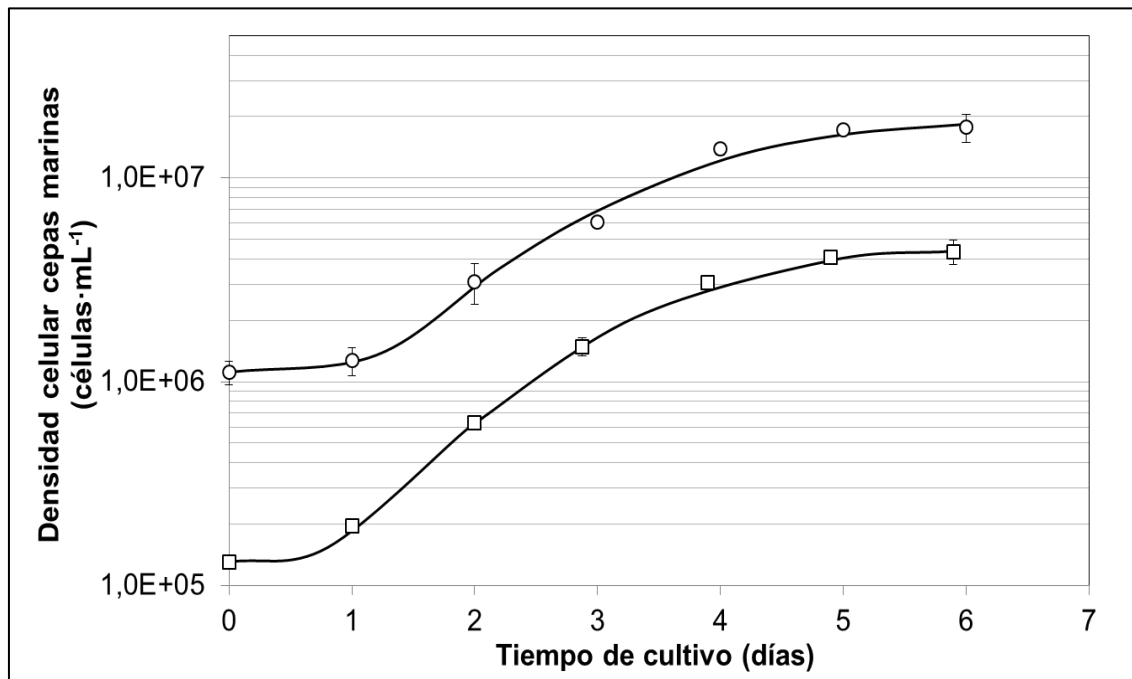
7 días empleando aire con CO<sub>2</sub> al 2% y 26,8 veces empleando aire atmosférico (127). Para la microalga *Isochrysis sp.* se reporta aumentos estimados de 40 veces en 10 días (128), 10 veces en 14 días (80) y 21 veces en 7 días (129). En último lugar, para la cepa *Botryococcus braunii* UTEX 572 se reportan aumentos de su biomasa desde 2,5 veces en 15 días (130) hasta 5,5 veces en 10 días (131), es decir que para la cepa de referencia *Botryococcus braunii*, el aumento de biomasa obtenido, tres veces después de 12 días, está dentro de valores reportados para la misma cepa bajo condiciones de cultivo similares a las evaluadas, lo cual permite el planteamiento de la hipótesis de reproducibilidad en la experimentación bajo las condiciones de cultivo estudiadas.



**Figura 3.1** Curvas de crecimiento de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (◇), *Chlorella vulgaris* (□), *Botryococcus braunii* (○). Medio BBM, Temperatura 24°C, irradiancia 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 18:6 LO, aireación 0,7 vvm, aire atmosférico (CO<sub>2</sub> ~0,03%), n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar.

Adicionalmente, en la Figura 3.1 y la Figura 3.2 y los modelos de crecimiento ajustados son mostrados en la Tabla 3.1 se observa una fase de adaptación para todas las

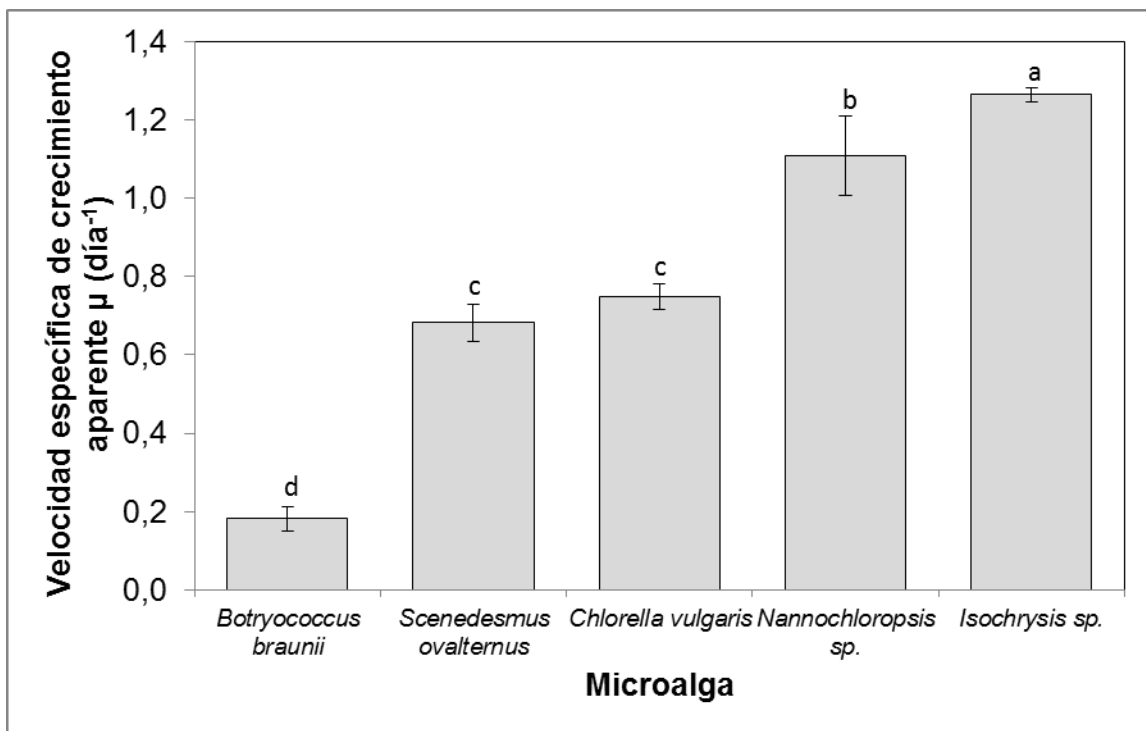
microalgas, la cual va entre 12 y 24 horas, lo cual es debido a que el inóculo empleado para cada microalga estaba en una fase posterior a la de crecimiento exponencial, es decir la fase estacionaria o la fase de muerte, dado que la edad de los inóculos de las cepas nativas era 7 días y de la cepa foránea 15 días; es por esto que se puede concluir que para las cepas *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* se recomienda una edad de inóculo no superior a 4 días y para las cepas *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.* de 3 días con el objetivo que las cepas no experimenten de nuevo una fase de adaptación y éstas inicien su crecimiento inmediatamente en la fase exponencial, permitiendo que los costos asociados al cultivo se reduzcan.



**Figura 3.2** Curvas de crecimiento de las microalgas *Nannochloropsis sp.* (○), *Isochrysis sp.* (□). Medio *f/2*, Temperatura 24°C, irradiancia 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 18:6 LO, aireación 0,7 vvm, aire atmosférico ( $\text{CO}_2 \sim 0,03\%$ ),  $n=3$ . Barra error: 1 Desv. Estándar.

La Figura 3.3 y la Tabla 3.1 muestran el parámetro  $\mu$  ajustado para las cinco microalgas, donde se detalla la mayor rapidez para crecer de la microalga *Isochrysis sp.*, 1,26 día<sup>-1</sup>, seguida de la cepa *Nannochloropsis sp.*, 1,11 día<sup>-1</sup>, y a su vez la baja tasa de crecimiento de la microalga *Botryococcus braunii* UTEX 572, 0,18 día<sup>-1</sup>. Finalmente se observa la similitud entre las microalgas de agua dulce *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris*

para duplicarse, lo anterior, coincide con lo mostrado en análisis de varianza y prueba de Tukey, Tabla 3.2 y Tabla B.3, respectivamente. Otras investigaciones reportan valores de  $0,62 \text{ día}^{-1}$  (132) y  $0,75 \text{ día}^{-1}$  (31) para *Scenedesmus*;  $0,14 \text{ día}^{-1}$  (73),  $0,25 \text{ día}^{-1}$  empleando aire o  $0,61 \text{ día}^{-1}$  con  $\text{CO}_2$  al 2% (42),  $0,40 \text{ día}^{-1}$  (133),  $1,17 \text{ día}^{-1}$  empleando  $\text{CO}_2$  al 10% (134) y  $1,32 \text{ día}^{-1}$  empleando  $\text{NaHCO}_3$  como fuente de carbono (44) para *Chlorella*; en el caso de *Nannochloropsis* los valores reportados son  $0,57 \text{ día}^{-1}$  con  $\text{CO}_2$  al 2% y  $0,20 \text{ día}^{-1}$  con aire (127); para *Isochrysis* se reportan  $0,78 \text{ día}^{-1}$  (80) y  $1,30 \text{ día}^{-1}$  (128); finalmente para *Botryococcus braunii*  $0,18 \text{ día}^{-1}$  (131), es decir que para todas las microalgas estudiadas el parámetro  $\mu$  estuvo dentro de los intervalos descritos en otras investigaciones.



**Figura 3.3** Velocidad específica de crecimiento aparente para las diferentes microalgas estudiadas  $n=3$ . Barra error: 1 Error Estándar de regresión. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

**Tabla 3.1** Matriz de coeficientes de modelos logísticos ajustados a las cepas evaluadas según Ec. 3.1. con sus respectivos errores estándar (EE) y coeficiente de determinación

$R^2$ : Unidades:  $X_{max}$  y  $X_0$  en Células·mL<sup>-1</sup> y  $\mu$  en día<sup>-1</sup>

Microalga	$X_{max}$	EE. $X_{max}$	$X_0$	EE. $X_0$	$\mu$	EE. $\mu$	$R^2$
<i>Botryococcus</i>	$4,10 \times 10^6$	$7,37 \times 10^5$	$1,02 \times 10^6$	$3,78 \times 10^4$	0,182	0,031	93,2%
<i>Scenedesmus</i>	$2,52 \times 10^7$	$1,59 \times 10^6$	$9,18 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$	0,682	0,048	97,1%
<i>Chlorella</i>	$5,52 \times 10^7$	$6,39 \times 10^6$	$5,27 \times 10^5$	$4,88 \times 10^4$	0,749	0,034	97,0%
<i>Nannochloropsis</i>	$1,96 \times 10^7$	$1,46 \times 10^6$	$3,77 \times 10^5$	$8,79 \times 10^4$	1,108	0,101	97,1%
<i>Isochrysis</i>	$4,58 \times 10^6$	$2,22 \times 10^5$	$5,71 \times 10^4$	$1,22 \times 10^3$	1,264	0,019	99,6%

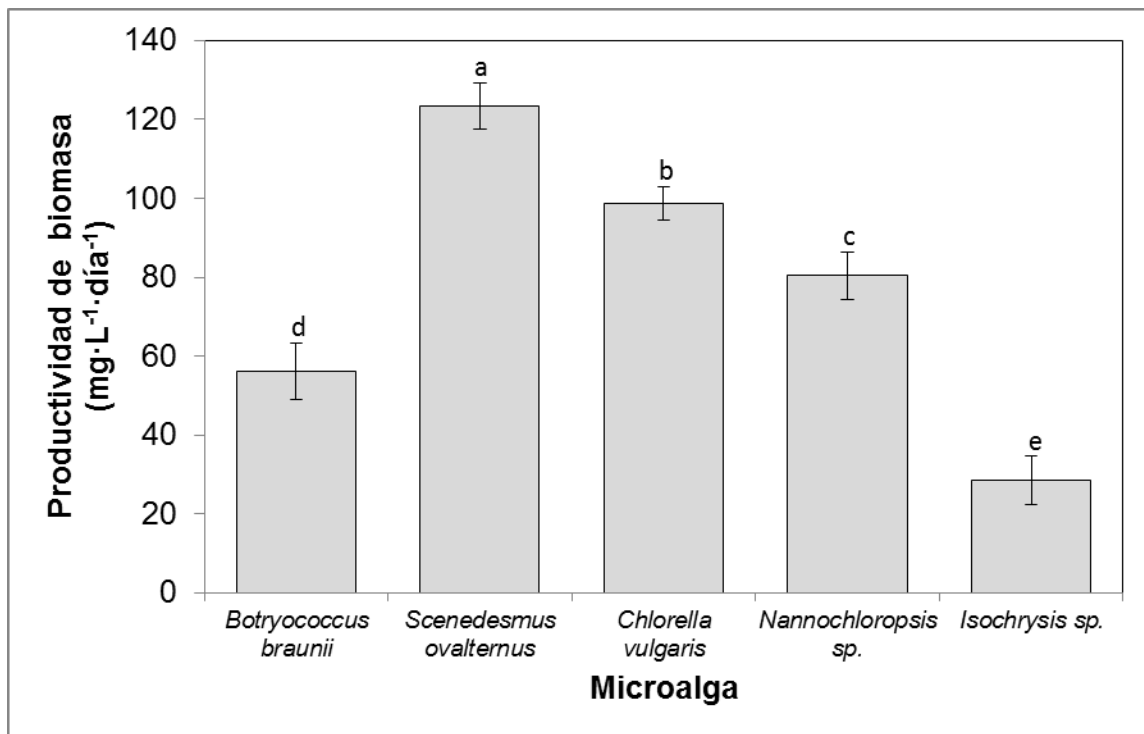
**Tabla 3.2** ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en la tasa de crecimiento de éstas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Microalgas evaluadas	2,1257	4	0,53142	177,34	$3,08 \times 10^{-07}\%$
Error	0,0300	10	0,00300		
Total	2,1557	14			

### 3.3.2 Productividad de biomasa

La productividad de la biomasa de las diferentes microalgas estudiadas es mostrada en la Figura 3.4; la productividad de biomasa es expresada como la relación entre la variación de la biomasa seca obtenida durante el cultivo y el producto entre el tiempo y volumen empleado para dicho cultivo, Ec. 3.2. Se aprecian valores de productividad que van desde 28,5 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> (*Isochrysis sp.*) hasta 123,4 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> (*Scenedesmus ovalternus*). Todas las productividades obtenidas fueron significativamente diferentes entre ellas según el análisis de varianza de la Tabla 3.3 y la prueba de Tukey de la Tabla B.4. Adicional a lo anterior es de resaltar que a pesar que las cepas *Nannochloropsis sp.* e *Isochrysis sp.* tuvieron menores tiempos de cultivo y por consiguiente mayores tasas aparentes de crecimiento, presentaron las productividades de biomasa más bajas, lo cual era de esperarse debido a que sus tamaños celulares son inferiores al de las cepas de agua dulce, entre 15 y 200 veces más pequeñas (21; 135).

$$P_{bio} = \frac{\text{peso seco final} - \text{peso seco inicial}}{(\text{tiempo de cultivo}) \times (\text{volumen de cultivo})} \quad (\text{Ec. 3.2})$$



**Figura 3.4** Productividad de biomasa de microalgas cultivadas al final del periodo de crecimiento, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

**Tabla 3.3** ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en la productividad de biomasa de éstas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Microalgas evaluadas	16275,8	4	4069,0	114,9	2,58×10 <sup>-06</sup> %
Error	354,2	10	35,4		
Total	16630,0	14			

Chen *et al.* (2011) recopilan las productividades de biomasa de microalgas en diferentes investigaciones; las productividades de las microalgas de interés en cultivos autotróficos son mostradas en Tabla 3.4 (40). Se observa que para cuatro de las microalgas, con una significancia del 5%, la productividades de biomasa obtenidas están dentro del rango esperado (*Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.*), o por encima de éste (*Scenedesmus*

*ovalternus* y *Botryococcus braunii*). La productividad de biomasa obtenida de la cepa de *Isochrysis sp.* fue un 21% de la máxima reportada (80), pero es de resaltar que Fidalgo *et al.* (1998) reportan una concentración celular 5,75 veces mayor a la obtenida utilizando agua de mar con una salinidad un 28% menor, lo que sugiere que la salinidad es un factor que tiende a reducir la acumulación de biomasa al igual que en microalgas como *Chlorella* o *Botryococcus* (130; 136), las cuales disminuyeron su capacidad de fotosíntesis debido a un aumento de la salinidad.

**Tabla 3.4** Productividades biomasa ( $P_{bio}$ ) mínima y máxima de microalgas burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con  $CO_2$ ; productividades en  $mg \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$  (\*)

Microalga	Aire con $CO_2$		Aire Atmosférico		Este trabajo
	$P_{bio}$ mínima	$P_{bio}$ máxima	$P_{bio}$ mínima	$P_{bio}$ máxima	
<i>B. braunii</i> UTEX 572	27	27	-	-	56,2
<i>Scenedesmus</i>	190	539 <sup>a</sup>	60	90	123,4
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	200	20	180	98,8
<i>Nannochloropsis</i>	170	480	90	90	80,4
<i>Isochrysis</i>	140	170	85 <sup>b</sup>	136 <sup>b</sup>	28,5

<sup>a</sup> (31); <sup>b</sup> (80); \*(40)

Por otro lado, es de destacar la alta productividad de biomasa de la cepa *Botryococcus braunii* UTEX 572 a pesar de su baja tasa de crecimiento en comparación con las otras microalgas evaluadas, lo cual es debido principalmente a su mayor tamaño celular y producción de lípidos más complejos (21; 79; 130).

Finalmente, la Tabla 3.4 muestra también el intervalo de productividades de biomasa mínima y máxima de las cepas evaluadas, esta vez cultivadas con aire enriquecido con  $CO_2$  con porcentajes entre 2 y 10%, y se aprecia que para todas las cepas el máximo valor reportado de productividad de biomasa es obtenido empleando aire enriquecido, es decir que para las microalgas evaluadas la productividad de biomasa es también susceptible a aumentar con la optimización de los parámetros de cultivo, entre ellos el  $CO_2$  y luz (40).

### 3.3.3 Contenido de lípidos

La Figura 3.5 muestra los porcentajes de lípidos obtenidos en el presente trabajo, los que varían entre 13,4% y 18,9% del peso seco, lo cual junto con el análisis de varianza de la Tabla 3.5 y la prueba de Turkey de la Tabla B.5 muestran la variabilidad de dicha respuesta según la cepa estudiada. Mientras que la Tabla 3.6 recopila los valores máximos y mínimos de contenido de lípidos reportados para cultivos autotróficos de las microalgas de interés burbujeando aire atmosférico o aire enriquecido. Se observa porcentajes dentro del rango para todas las microalgas nativas estudiadas. En el caso de la cepa *Botryococcus braunii* UTEX 572 la acumulación alcanzada fue un 14,9% menor a la reportada por Yoo *et al* (2010), quienes emplean aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 10% (27), lo cual lleva a pensar en el efecto positivo de tal enriquecimiento en la acumulación de lípidos en el peso seco microalgal.

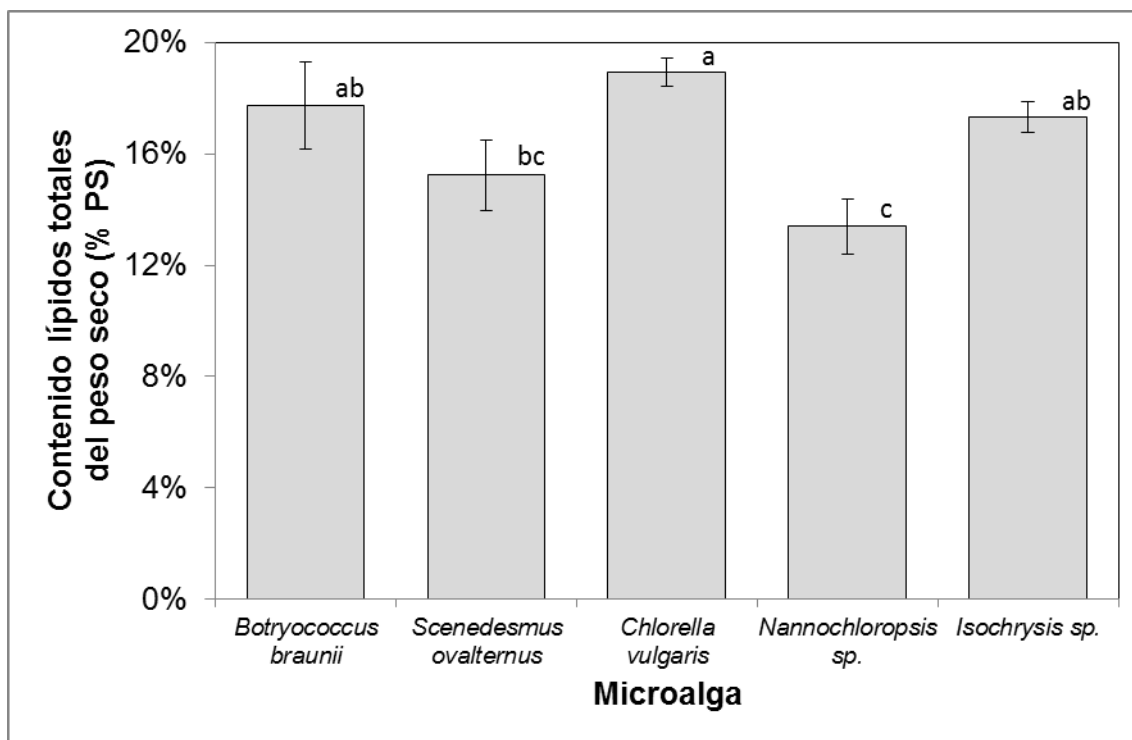
**Tabla 3.5** ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en el contenido de lípidos del peso seco de éstas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Microalgas evaluadas	0,00582	4	0,001455	10,55	0,13%
Error	0,00138	10	0,000138		
Total	0,00720	14			

**Tabla 3.6** Porcentaje de lípidos mínimo y máximo de microalgas del peso seco burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con CO<sub>2</sub> (\*)

Microalga	Aire con CO <sub>2</sub>		Aire Atmosférico		Este trabajo
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
<i>B. braunii</i> UTEX 572	20,8%	20,8%	-	-	17,7%
<i>Scenedesmus</i>	9,5%	26,7% <sup>a</sup>	12,7%	17,7%	15,2%
<i>Chlorella vulgaris</i>	6,6%	40,0%	5,1%	58,0%	18,9%
<i>Nannochloropsis</i>	21,6%	50,4% <sup>b</sup>	12,1% <sup>c</sup>	28,7%	13,4%
<i>Isochrysis</i>	22,4%	27,4%	15,7% <sup>c</sup>	32,3% <sup>d</sup>	17,3%

<sup>a</sup> (31); <sup>b</sup> (127); <sup>c</sup> (135); <sup>d</sup> (80); \*(40)



**Figura 3.5** Contenido de lípidos del peso seco de las microalgas estudiadas al finalizar el periodo de crecimiento, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

### 3.3.4 Productividad de lípidos

Las productividades de lípidos conseguidas a escala laboratorio de las diferentes microalgas cultivadas son mostradas en la Figura 3.6. Las productividades máximas obtenidas fueron 18,8 y 18,7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  para las microalgas *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente, las cuales son estadísticamente iguales con una confianza del 95%, Tabla 3.7 y Tabla B.6, mientras que la microalga *Isochrysis sp.* tuvo la mínima productividad lipídica con 4,9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ .

En la Tabla 3.8 se muestran los valores máximos y mínimos de productividad de lípidos reportados en otras investigaciones para las microalgas de interés. En el caso de las microalgas de agua dulce *Scenedesmus ovalternus*, *Chlorella vulgaris* y *Botryococcus braunii* UTEX 572 las productividades obtenidas son superiores a las reportadas por otros investigadores, incluso en el caso de la cepa *Botryococcus braunii*, para la cual se reporta la productividad de lípidos de un cultivo en el cual se empleó aire enriquecido con



CO<sub>2</sub> al 10% (27); caso contrario sucede en las microalgas marinas cultivadas, pues en el caso de la microalga *Nannochloropsis sp.*, la productividad máxima reportada con aire es 5,7 veces superior a la obtenida (135), mientras que la mínima productividad reportada por Fidalgo *et al.* (1998) es 2,4 veces mayor que la obtenida por la microalga *Isochrysis sp.* en el presente estudio (80), esto posiblemente debido a la alta salinidad del agua de mar empleada, un 28% mayor, en comparación con la empleada por Fidalgo *et al.* (1998) para el caso de la microalga *Isochrysis sp.* y un 34% mayor en comparación con la empleada por Zittelli *et al.* (1999) quienes cultivaron la microalga *Nannochloropsis sp.* Es de resaltar que el agua de mar empleada en el presente estudio tuvo una salinidad cercana a los 50 g·L<sup>-1</sup> y provenía de la bahía de Santa Marta, Costa Caribe Colombiana, la cual se caracteriza por una baja población microbiana en comparación con el Océano Pacífico Colombiano, en el cual la proliferación de fitoplancton es mayor debido a la mayor riqueza de nutrientes en este último (137; 138), por lo cual se sugeriría para estudios posteriores con cepas marinas el empleo de agua de mar de la costa Pacífica.

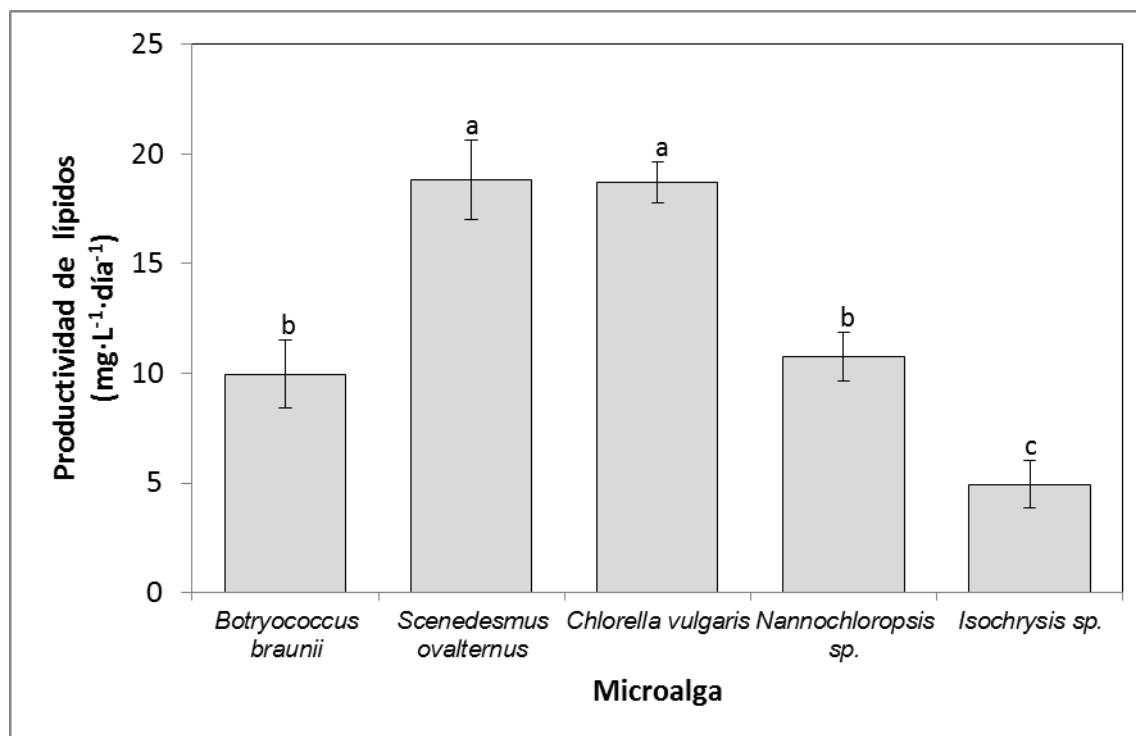
**Tabla 3.7** ANAVA efecto de la cepas de microalgas evaluadas en el contenido de lípidos del peso seco de éstas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Microalgas evaluadas	435,55	4	108,89	87,32	9,79×10 <sup>-06</sup> %
Error	12,47	10	1,247		
Total	448,02	14			

**Tabla 3.8** Productividades de lípidos (P<sub>lip</sub>) mínima y máxima de microalgas burbujeadas con aire atmosférico o aire enriquecido con CO<sub>2</sub>, productividades en mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> (\*)

Microalga	Aire con CO <sub>2</sub>		Aire Atmosférico		Este trabajo
	P <sub>lip</sub> mínima	P <sub>lip</sub> máxima	P <sub>lip</sub> mínima	P <sub>lip</sub> máxima	
<i>B. braunii</i> UTEX 572	5,5	5,5	-	-	10,0
<i>Scenedesmus</i>	20,7	133,0 <sup>a</sup>	7,14	15,9	18,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	4,0	178,8	7,4	13,9	18,7
<i>Nannochloropsis</i>	37,6	142,0	25,8	61,2 <sup>c</sup>	10,8
<i>Isochrysis</i>	37,7	37,8	13,3 <sup>b</sup>	43,9 <sup>b</sup>	4,9

<sup>a</sup> (31); <sup>b</sup> (80), <sup>c</sup> (135); \*(40)



**Figura 3.6** Productividad de lípidos de las microalgas estudiadas, n=3. Barra error: 1 Desv. Estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa con una confianza del 95% acorde a prueba de Tukey.

### 3.3.5 Caracterización de los lípidos derivados de las microalgas

La Tabla 3.9, detalla la composición de los ácidos grasos producidos por las microalgas evaluadas; se observa el alto contenido de poliinsaturados (PUFAs) de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.*, 59% y 43% respectivamente, mientras que la cepa *Botryococcus braunii* presenta en su mayoría monoinsaturados (MUFAs) con un 80%, finalmente las cepas *Scenedesmus ovalternus* e *Isochrysis sp.* tienen valores superiores al 72% de ácidos grasos saturados (SFAs), de lo cual se concluye que estas últimas son las más adecuadas para la obtención de biodiesel caso contrario a las dos primeras, debido a que un alto contenido de ácidos grasos insaturados disminuye la estabilidad oxidativa, el calor de combustión y índice de cetano del biodiesel, pero también disminuye el punto de nube, la viscosidad cinemática y la lubricidad de éste (59).

**Tabla 3.9** Composición de los ácidos grasos de lípidos de las microalgas estudiadas

<b>FAMES</b>	<b><i>Botryococcus braunii</i></b>	<b><i>Scenedesmus ovalternus</i></b>	<b><i>Chlorella vulgaris</i></b>	<b><i>Nannochloropsis sp.</i></b>	<b><i>Isochrysis sp.</i></b>
C12:0	0,5	3,6	3,5	2,9	9,8
C14:0	0,3	1,8	0,8	0,3	11,4
C16:0	6,9	49,1	17,2	15,7	32,8
C16:1	0,6	0	0	0	0
C17:0	0,4	0	0	0	0
C17:1	0,8	0	0	0	0
C18:0	0,9	17,1	7,4	2,9	21,5
C18:1n-9t	0	4,4	0	3,8	0
C18:1n-9c	78,2	17,4	3,5	15,7	18,8
C18:1n-7	0	0	8,6	11,1	0
C18:2n-6c	3,3	2,6	21,4	20,5	3,0
C18:3n-3	6,0	1,6	37,6	22,8	2,7
C18:3n-6	0	2	0	0	0
C20:0	0,3	0,4	0	4,2	0
C20:1	0,4	0	0	0	0
C20:5n-3	0,7	0	0	0	0
C22:1n-9	0,2	0	0	0	0
C23:0	0,3	0	0	0	0
PUFAs	10,1	6,2	59,0	43,3	5,7
MUFAs	80,2	21,8	12,1	30,5	18,8
SFAs	9,7	72,0	28,9	26,2	75,5
ω3	6,8	1,6	37,6	22,8	2,7
ω6	3,7	2,6	21,4	20,5	3,0
ω6/ω3	0,6	1,6	0,6	0,9	1,1

En el caso de la microalga *Scenedesmus*, Lin & Lin (2011) encontraron que aproximadamente el 90% de los ácidos grasos eran entre C16 y C18, destacándose el C16:0 con un 20% y el C18:1 con un 45% (31). Por otro lado, Xin *et al.* (2011) reportan un contenido aproximado de 18% de C16:0, 20% de C18:2 y el porcentaje restante en C22:3 (87). Finalmente, Yoo *et al.* (2010) determinaron que el contenido de C16:0 estaba en 28, 25 y 36%, C18:1 en 30, 25 y 26% y C18:2 en 20, 25 y 31% empleando aire, CO<sub>2</sub> al 5,5% y 10%, respectivamente (27). En las tres investigaciones resalta un contenido cercano al 20% de ácidos grasos saturados, y el 80% restante se distribuyen de manera

diferente entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, lo cual difiere de manera considerable con los resultados obtenidos en la presente investigación, en donde se encontró que el 72,0%, 21,8% y 6,2% eran ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente, sin embargo Krienitz & Wirth (2006) encontraron para la microalga *Scenedesmus* burbujeada con aire sin enriquecer con CO<sub>2</sub> 56,7% de C16:0, 24,6% de C18:1 y porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del 63,1%, 25,4% y 11,5% respectivamente (139), es decir valores más cercanos a la presente investigación, de lo cual se puede concluir que la composición de ácidos grasos de una microalga tiene una alta dependencia con la especie estudiada.

Para la microalga *Chlorella* se reportan las siguientes composiciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente: 35,5%, 23,4% y 41,1% (140), 38,3%, 18,9% y 34,2% (141), 80,2%, 8,8% y 11,0% (139) y 41,3% 43,6% y 14% (142). De lo cual se concluye, que al igual que la microalga *Scenedesmus*, la composición de ácidos grasos de *Chlorella* está fuertemente relacionada con la especie estudiada, dado que en el presente estudio se encontró una composición de 28,9%, 12,1% y 59,0% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

Gouveia & Oliveira (2009) caracterizaron los ácidos grasos producidos por la microalga *Nannochloropsis* y encontraron una composición de 34,3%, 44,4% y 21,2% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente (140). Zittelli *et al.* (1999) reportan 32,7%, 31,6% y 34,1% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (135). Krienitz & Wirth (2006) encontraron 29,1%, 45,4% y 25,5% de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente (139). Las anteriores composiciones se asemejan a la obtenida en el presente estudio para la microalga *Nannochloropsis sp.* con 26,2%, 30,5% y 43,3% de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

En el caso de la microalga *Isochrysis*, última microalga nativa estudiada se reportan las siguientes composiciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente: 28,9%, 26,9% y 44,0% (143); 37,4%, 29,5% y 31,6% (128), 29,5%, 24,5% y 46% (144) Finalmente, Liu & Lin (2001) evaluaron 4 cepas

diferentes de *Isochrysis* y los intervalos obtenidos para cada tipo de ácido graso fueron 25,3 - 31,8%, 21,4 - 35,9% y 36,5 - 50,1% (142). En el caso de la cepa estudiada, los resultados fueron: 75,5%, 18,8% y 5,7% de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente, es decir muy diferente a lo reportado en diferentes investigaciones, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, lo cual pudo deberse a una degradación de estos, debido a la alta sensibilidad de estos y la poca cantidad producida por dicha microalga.

Al comparar la composición de los ácidos de las microalgas evaluadas con los aceites de palma, colza, soya y girasol, principales materias primas empleadas en la producción de biodiesel (56; 59) y el aceite de oliva, apetecido principalmente para el consumo humano, los cuales son mostrados en la Tabla 3.10, se puede concluir que todos los aceites algales obtenidos pueden ser aptos para la producción de biodiesel, gracias a la similitud con uno u otro aceite empleado en la elaboración de biodiesel; sin embargo, para las microalgas *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis sp.* y *Chlorella vulgaris*, la aplicación más apropiada sería para el consumo humano, en especial esta última gracias a su alto contenido de ácidos grasos  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6.

**Tabla 3.10** Composición típica de ácidos grasos de algunos aceites vegetales (55)

<b>FAMES</b>	<b>Aceite Palma</b>	<b>Aceite Colza</b>	<b>Aceite Soya</b>	<b>Aceite Girasol</b>	<b>Aceite oliva</b>
C16:0	47,9	3,5	10,6	6,0	9,2
C16:1	-	-	-	-	0,8
C18:0	4,2	0,9	4,8	4,2	3,4
C18:1	37,0	64,4	22,5	18,7	80,4
C18:2	9,1	22,3	52,3	69,3	4,5
C18:3	0,3	8,2	8,2	-	0,6
PUFAs	9,4	30,5	60,5	69,3	5,1
MUFAs	37	64,4	22,5	18,7	81,2
SFAs	52,1	4,4	15,4	10,2	12,6

Finalmente, Osman *et al.* (2001) determinaron la composición de ácidos grasos para 10 especies diferentes de peces de agua de mar de alto consumo humano, donde se obtuvo

valores entre 30 y 48% de  $\omega 3$  y entre 11 y 20% de  $\omega 6$ , sin embargo su contenido de lípidos no superó el 6% (145), es decir al comparar los anteriores resultados con los obtenidos por las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.* se podría sugerir que éstas, en especial la primera, son fuentes altamente viables para la obtención de ácidos grasos  $\omega 3$  y  $\omega 6$ , en especial cuando se sugiere un mayor consumo de  $\omega 3$  con respecto al  $\omega 6$  como parte de una dieta balanceada (146).

### 3.3.6 Selección mejor cepa para producción de biodiesel

A partir de los anteriores resultados, la selección de una cepa nativa como fuente potencial para la producción de biocombustibles para su posterior optimización de parámetros de cultivo, está entre las cepas de agua dulce *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus ovalternus*, las cuales con una significancia del 5% presentaron los valores más altos de productividad de lípidos con  $18,7 \pm 0,6$  y  $18,8 \pm 1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , es decir que al realizar la equivalencia de cultivos en estanques abiertos de 30 cm de profundidad supondría valores de  $20,5 \pm 0,7 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$  para *C. vulgaris* y  $20,6 \pm 1,3 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$  para *S. ovalternus*, entre 4,10 y 4,11 veces la productividad de aceites de la palma africana respectivamente; con una confianza del 95% estas productividades son estadísticamente iguales, por lo cual la selección de la mejor de ellas se debe realizar de acuerdo con otros factores.

En primer lugar, dado que la caracterización de aceites de la microalga *Scenedesmus ovalternus* dio como resultado un 72% de ácidos grasos saturados, la hace más adecuada como fuente para la obtención de biodiesel, sin embargo la similitud del aceite de soya, actual segunda fuente mundial empleada en la producción de biodiesel (59), con los producidos por la microalga *Chlorella vulgaris*, hace que ésta también sea propicia para la producción de biodiesel según su relación en la composición de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, por lo cual dicho factor no es significativo para la selección de una sola cepa como fuente potencial para la producción de biodiesel, caso contrario al contenido de lípidos que estas microalgas pueden acumular, debido a que los costos asociados a la extracción están estrechamente relacionados con el contenido que pueda acumular la microalga, dado que una mayor acumulación reduce así mismo dichos costos, es por tal razón que la microalga *Chlorella vulgaris* tiene un

mejor perfil como fuente potencial para la producción de biodiesel pues su acumulación de lípidos fue un 25% mayor con relación a la microalga *Scenedesmus ovalternus*, lo que equivale a que el proceso de extracción de la microalga *Chlorella vulgaris* es un 25% más barato (98).





## 4.Efecto del CO<sub>2</sub>, la luz y la aireación en el crecimiento y acumulación de aceites en la microalga *Chlorella vulgaris*

### RESUMEN

El efecto del CO<sub>2</sub>, la luz y la aireación fueron evaluados como parámetros de producción y acumulación de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*. Los factores estudiados fueron contenido de CO<sub>2</sub>, irradiancia, fotoperiodo y aireación. Para la productividad de biomasa, el único factor que no fue significativo fue la aireación, para la productividad de lípidos todos los factores fueron significativos ( $\alpha = 5\%$ ). La productividad de lípidos óptima predicha por el modelo estadístico dentro del intervalo estudiado fue  $69,7 \pm 5,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , 15,2 veces superior a la productividad de aceites de la palma africana, para un contenido de CO<sub>2</sub> de 2%, irradiancia de  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 24:0 LO y aireación de 1,2 vvm; el contenido de lípidos bajo las condiciones mencionadas fue de  $16,4 \pm 1,4\%$ . La optimización de los factores para maximizar el contenido de lípidos y minimizar la disminución de la productividad de lípidos se logró para un contenido de CO<sub>2</sub> del 1,2%, irradiancia de  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 12:12 LO y aireación de 0,4 vvm con valores de  $32,7 \pm 1,4\%$  y  $42,0 \pm 5,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente, condiciones fácilmente alcanzables en cualquier parte del territorio colombiano.

**Palabras clave:** *Chlorella vulgaris*, cultivo de microalgas, contenido de CO<sub>2</sub>, Irradiancia, Fotoperiodo, aireación, productividad de lípidos, biodiesel.

### ABSTRACT

The effect of CO<sub>2</sub>, light and aeration were evaluated as parameters of production and accumulation of biomass and lipids in the microalgae *Chlorella vulgaris*, the factors studied were CO<sub>2</sub> content, irradiance, photoperiod and aeration. For biomass productivity,

the aeration was the only factor without significant effect, for lipid productivity all factors were significant ( $\alpha=5\%$ ). The optimal lipid productivity predicted by the statistical model in the range studied was  $69.7 \pm 5.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , 15.2 times the oil productivity of African Palm, for  $\text{CO}_2$  content of 2%, irradiance of  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , photoperiod of 24:0 LO and aeration of 1.2 vvm. The content of lipids in those conditions was  $16.4 \pm 1.4\%$ . The optimal conditions of the factors in order to maximize the lipid content and to minimize the reduction in lipid productivity was reached with  $\text{CO}_2$  content 1.2%, photoperiod 12:12 LO, Irradiance  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and aeration 0.4 vvm, these conditions are easily reachable in any part of Colombia. The optimum lipid content and lipid productivity were  $32.7 \pm 1.4\%$  and  $42.0 \pm 5.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*, microalgae culture,  $\text{CO}_2$  content, Irradiance, Photoperiod, Aeration, lipid productivity, biodiesel.

## 4.1 Introducción

Las condiciones climatológicas e hídricas de Colombia hacen de éste un país propicio para el cultivo de masivo de microalgas (33; 34; 35), las cuales gracias al contenido de lípidos y a su elevada velocidad de crecimiento se convierten en una fuente de interés para la obtención de biocombustibles (16; 18; 19; 20).

Para el cultivo masivo de microalgas con el objeto de producir biodiesel se debe tener en cuenta entre otros, los siguientes aspectos: seleccionar la cepa adecuada, la cual debe tener tanto altas productividades de lípidos, como porcentajes de acumulación lipídica intracelular superiores al 30% del peso seco debido a los altos costos asociados con el proceso de extracción de aquellos (16; 28; 29; 30); seleccionar las condiciones del cultivo adecuadas, seleccionar el modo de cultivo indicado (36; 37; 38) y seleccionar el método de recuperación de biomasa y lípidos (20; 23; 39) que permitan que el proceso sea viable económicamente. La microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002 es una cepa promisoría en el contexto colombiano, gracias a que las tasas de crecimiento, los tiempos de cultivo y las productividades de lípidos obtenidos por ésta fueron mejores que en otras microalgas nativas evaluadas, adicionalmente, la composición de los ácidos grasos obtenidos se

asemejó a la composición del aceite de soya (55), ver Capítulo 3, actual segunda fuente mundial empleada en la producción de biodiesel, después de la colza (59).

Las condiciones de cultivo de mayor importancia para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, y en general de cualquier microalga, son el medio de cultivo, la temperatura, la luz y el CO<sub>2</sub> (16; 20; 40). De las anteriores condiciones, las dos últimas pueden ser controladas de manera que optimicen la acumulación de biomasa y lípidos. Además están íntimamente relacionadas, dado que la capacidad fijación de CO<sub>2</sub> por parte de las microalgas está directamente relacionada con la utilización eficiente de la luz (21; 41; 42), haciendo necesario la optimización de estos parámetros de manera conjunta.

El efecto de la luz se puede estudiar desde tres puntos de vista: la irradiancia, la frecuencia y el fotoperiodo; este último es aproximadamente constante a lo largo del territorio colombiano (21; 22; 33; 43); en el caso del CO<sub>2</sub> también hay dos factores, el primero es el flujo de aireación que es suministrado y el segundo es el porcentaje de CO<sub>2</sub> que se suministra en dicho flujo, ambas variables fácilmente controlables (42; 44; 45; 46).

Se ha demostrado que la microalga *Chlorella vulgaris* sigue el modelo de crecimiento de Haldane, modelo de Monod con inhibición por sustrato, cuando el factor limitante es la irradiancia, sin embargo la irradiancia de saturación ha demostrado ser característica de cada cepa; en el caso del contenido del CO<sub>2</sub>, el comportamiento es análogo (42; 44; 45; 46; 89; 134). El fotoperiodo y la aireación no han sido lo suficientemente estudiados en la acumulación de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* como los anteriores dos factores, sin embargo se ha demostrado su efecto positivo de éstos en dicha microalga (46; 147; 148).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la Irradiancia, fotoperiodo, contenido de CO<sub>2</sub> y aireación, además de la interacción entre éstos, sobre el crecimiento, la productividad de biomasa, la acumulación de lípidos y la productividad de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Mantenimiento de microalgas

Fue utilizada la cepa de microalga nativa colombiana *Chlorella vulgaris* LAUN 002, mantenida en el Laboratorio de Microalgas del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La cepa fue mantenida en medio *BBM* estándar (112) esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 minutos (Anexo A). Las condiciones de cultivo incluyeron una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, lámparas fluorescentes *Sylvania Daylight F48T12/D 39W* como fuente de iluminación artificial con irradiancia de  $40 \pm 2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad (18:6 LO), aireación de 0,7 vvm empleando aire atmosférico filtrado a 0,22  $\mu\text{m}$ . El mantenimiento se realizó en botellas de vidrio planas de 4,5 cm de espesor y capacidad de 330 mL con volumen de cultivo de 200 mL, se realizó resiembra cada cinco días empleando inóculo del 2,5% v/v.

### 4.2.2 Diseño experimental

Para el estudio del efecto del CO<sub>2</sub> y la luz sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y su contenido de lípidos totales se analizaron cuatro factores en cinco niveles cada uno, los cuales son mostrados en la Tabla 4.1. Se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta compuesto central 2<sup>4</sup> + estrella rotatable y totalmente aleatorio, se realizaron 34 unidades experimentales (UE), como se detalla en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.1** Factores y sus niveles de diseño experimental de optimización de productividad de biomasa y lípidos

Factor	Unidades	Nivel					
		-2	-1	0	+1	+2	
X <sub>1</sub>	CO <sub>2</sub>	%	0,03*	0,5	1,0	1,5	2,0
X <sub>2</sub>	Irradiancia	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	22	45	68	91	114
X <sub>3</sub>	Fotoperiodo	Horas Luz (HL)	12	15	18	21	24
X <sub>4</sub>	Aireación	vvm	0,40	0,55	0,70	0,85	1,20

(\*) Estimado del contenido CO<sub>2</sub> en aire atmosférico

**Tabla 4.2** Distribución unidades experimentales diseño experimental

Unidad Experimental	Factor				Unidad Experimental	Factor			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	+1	-1	-1	+1	18	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	+1	-1	19	0	0	+2	0
3	0	0	0	-2	20	0	-2	0	0
4	-1	+1	-1	-1	21	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	-1	+1	22	0	0	+2	0
6	+1	-1	+1	+1	23	-1	+1	+1	-1
7	0	0	+2	0	24	+1	-1	-1	-1
8	0	0	0	2	25	0	0	-2	0
9	-1	-1	-1	-1	26	+1	+1	-1	+1
10	0	0	+2	0	27	0	+2	0	0
11	+1	+1	-1	-1	28	0	0	0	0
12	-1	-1	+1	+1	29	0	0	+2	0
13	-1	-1	+1	-1	30	+1	+1	+1	+1
14	0	0	+2	0	31	+2	0	0	0
15	-2	0	0	0	32	+1	-1	+1	-1
16	0	0	+2	0	33	-2	0	0	0
17	0	0	+2	0	34	+2	0	0	0

\*ver Tabla 4.1 para definición de variables y niveles

### 4.2.3 Condiciones de cultivo

El efecto del CO<sub>2</sub>, aireación y la luz se realizó en botellas de vidrio planas de 4,5 cm de espesor y capacidad de 330 mL. Se empleó medio *BBM* esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Las condiciones fijas de crecimiento fueron: volumen de medio de cultivo 100,0 ± 0,5 mL, densidad celular inicial: ~2x10<sup>6</sup> células·mL<sup>-1</sup>, temperatura 24 ± 2 °C, 2 lámparas fluorescentes *Sylvania Daylight F15T12/D 15W* como fuente de iluminación artificial, el flujo de gas aireado fue filtrado a 0,22 µm, tiempo de cultivo fue aproximadamente 5 días. Las variables contenido de CO<sub>2</sub>, irradiancia, fotoperiodo y aireación se fijaron para cada unidad experimental como lo indican las Tabla 4.1 y Tabla 4.2.

La irradiancia se midió empleando los luxómetros *VWR Scientific 21800-014* y *LI-COR LI-1400 Data Logger* y se controló variando la cantidad de lámparas empleadas y la distancia del cultivo a éstas; el fotoperiodo se varió empleando temporizador digital

*Steren*; la aireación fue controlada empleando rotámetro de gas *AALBORG Instruments 112-02* de 0 a 150 mm previamente calibrado. El suministro de CO<sub>2</sub> fue realizado empleando bala gas grado industrial, la presión de salida del CO<sub>2</sub> se ajustó en 8 psi, al igual que el flujo de aire, para permitir el mezclado de estos gases, finalmente se ajustaron los flujos empleando rotámetros *AALBORG Instruments 112-02* de 0 a 150 mm para CO<sub>2</sub> y *Dwyer Instruments VFB* de 4 L para aire, finalmente dichos gases fueron mezclados antes de ingresar al cultivo, ver Figura 4.1.

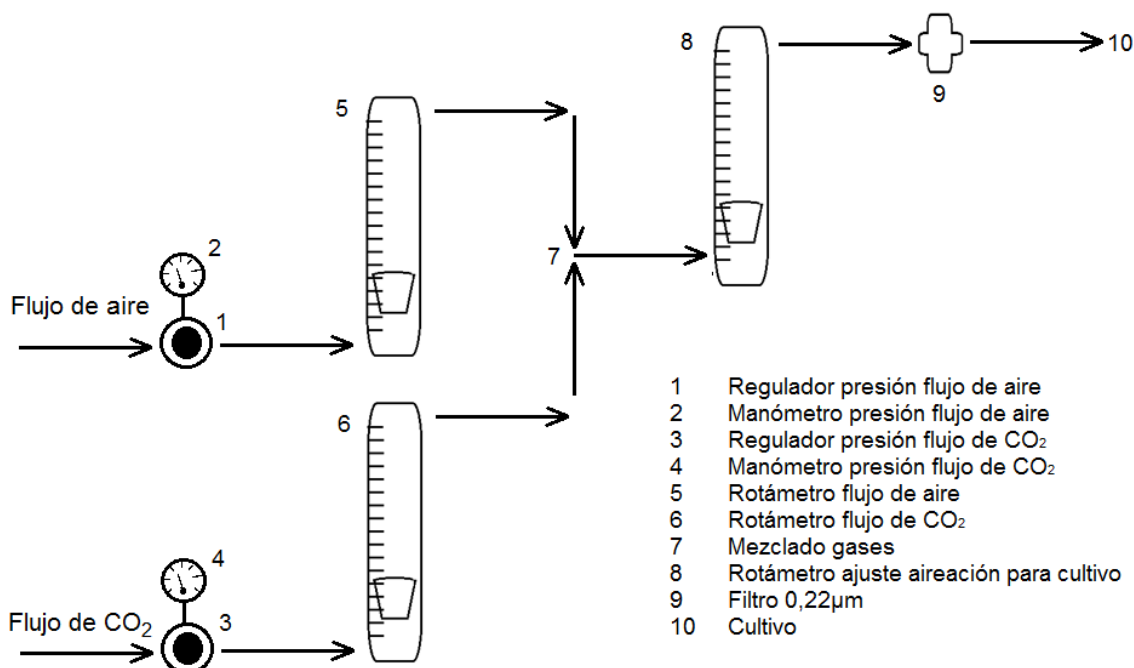


Figura 4.1. Esquema suministro aire enriquecido con CO<sub>2</sub> en cultivo de microalgas

#### 4.2.4 Medición de crecimiento

El crecimiento en las diferentes unidades experimentales se siguió por absorbancia en espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 20* a 380 nm, debido a la mayor sensibilidad de la concentración celular a dicha longitud de onda. La curva de calibración que se ajustó es mostrada en la Ec. 4.1, donde X es la densidad celular (células·mL<sup>-1</sup>) y DO<sub>380</sub> es la densidad óptica a 380 nm. Se empleó celda de absorbancia plástica de 2 mL de capacidad y trayectoria de luz de 1 cm

$$X = 2,235 \times 10^{-8} DO_{380} \quad R^2 = 0,999 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

### 4.2.5 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos grado analítico en los ensayos de cuantificación de lípidos totales: cloroformo (JT Baker 9180, Avantor Performance Material, Central Valley, PA, USA), metanol, (JT Baker 9070 Avantor Performance Material, Central Valley, PA, USA) y ácido sulfúrico (Merck 100731, Darmstadt, Alemania).

### 4.2.6 Rendimiento de peso seco

Al finalizar el cultivo, la totalidad de la biomasa fue centrifugada a 4000 rpm en centrifuga *Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32* de 14 cm de radio (2500×g) durante 10 minutos, lavada 2 veces con agua destilada, recentrifugada, recuperada y secada en liofilizador *Labconco FreeZone 4.5* operado a temperatura de -52°C y presión de 0,8 mBar durante 72 horas (113).

### 4.2.7 Contenido de lípidos totales

La biomasa liofilizada se rompió mediante sonicación empleando *Branson Sonifier 450 Digital* y cuerno de ½” en frasco plástico de tapa rosca capacidad 40 mL y diámetro 3 cm empleando 10 mL de una mezcla de solventes cloroformo-metanol (1:2 v/v) durante 10 minutos con una potencia específica de 2,4 W·mL<sup>-1</sup>; la temperatura se mantuvo por debajo de los 20°C empleando un baño de agua con hielo. Durante la disrupción se realizó ciclos de 60 segundos de sonicación y 20 segundos de pausa para evitar sobrecalentamiento en el sonicador. Seguida de la disrupción, la biomasa estuvo en reposo durante 5 horas con la mezcla de solventes a temperatura ambiente para intentar aumentar la extracción. Posterior a la extracción de los lípidos, se agitó a 2000 rpm con vortex durante 30 segundos y se retiró la biomasa residual por centrifugación a 800×g, a la cual se adicionó 5 mL de la mezcla de solventes y realizó una segunda extracción a la biomasa durante 15 horas bajo las mismas condiciones para recuperar los lípidos remanentes en ésta, la biomasa fue centrifugada nuevamente a 800×g y descartada mientras que los solventes recuperados fueron mezclados con los obtenidos de la primera extracción. A continuación se adicionó 5 mL de agua y 5 mL cloroformo a los solventes para formar una relación de cloroformo-metanol-agua 2:2:1; la fase acuosa liviana que contiene el metanol, se retiró después de centrifugar a 800×g empleando

pipeta Pasteur. Finalmente de la solución de lípidos en cloroformo se tomó alícuotas de 300  $\mu\text{L}$  en tubos de ensayo de 10 mL, se les evaporó el solvente mediante baño de agua a 90°C y se les carbonizó los lípidos con 2 mL de ácido sulfúrico, a 90°C durante 30 minutos; seguidamente, las muestras se enfriaron y se diluyeron con 4 mL de agua destilada y se les midió la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 20*, empleando celda de absorbancia plástica de 2 mL de capacidad y trayectoria de luz de 1 cm (109).

#### 4.2.8 Ajuste cinéticas de crecimiento

A cada cultivo se le ajustó el modelo de crecimiento logístico descrito en la Ec. 4.2.

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{\mu t}}{X_{\max} + X_0 (e^{\mu t} - 1)} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

En la Ec. 4.2  $X$  es la densidad celular ( $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $X_0$  y  $X_{\max}$  son las densidades celulares inicial y máxima, respectivamente ( $\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento aparente ( $\text{día}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de cultivo ( $\text{día}$ ). Para el ajuste se empleó el software TableCurve 2D® (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

#### 4.2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado empleando el software *Statgraphics Centurion XV*® (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA) con una significancia del 5%. Se determinaron los intervalos de confianza para los valores óptimos teóricos de velocidad específica de crecimiento, productividad de biomasa, contenido de lípidos y productividad de lípidos mediante prueba *t de Student* con un nivel de confianza del 95%.

### 4.3 Resultados y discusión

Se establecieron 4 respuestas, las cuales fueron velocidad de específica de crecimiento aparente, productividad de biomasa, Contenido de Lípidos Totales del Peso Seco y productividad de lípidos, simplificados como  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$ , respectivamente, cuyos valores son mostrados para cada unidad experimental en la Tabla 4.3, mientras que la Tabla 4.4 presenta el resumen de los modelos de regresión múltiple ajustados para cada



respuesta. Finalmente la Tabla 4.5 muestra los coeficientes de estos modelos de regresión, según se muestra en la Ec. 4.3.

**Tabla 4.3** Valores de respuestas de unidades experimentales, Unidades: Y<sub>1</sub> en día<sup>-1</sup>, Y<sub>2</sub> y Y<sub>4</sub> en mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> y Y<sub>3</sub> en % PS

UE.	Respuestas				UE.	Respuestas			
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>		Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
1	0,756	139	20,2%	28,1	18	0,673	137	15,3%	20,9
2	1,229	289	13,3%	38,5	19	0,785	201	12,8%	25,6
3	0,888	189	13,8%	26,0	20	0,647	140	22,1%	30,8
4	0,733	137	14,8%	20,2	21	0,857	210	10,9%	23,0
5	0,732	130	12,9%	16,7	22	0,843	237	12,0%	28,5
6	0,897	179	15,4%	27,6	23	0,805	206	10,2%	21,0
7	0,858	241	11,0%	26,6	24	0,749	131	20,7%	27,1
8	1,043	286	13,7%	39,1	25	0,752	157	18,1%	28,5
9	0,655	127	17,5%	22,3	26	0,981	234	12,5%	29,2
10	0,849	238	10,0%	23,8	27	1,168	308	12,6%	38,8
11	1,041	239	12,4%	29,7	28	0,992	219	12,6%	27,6
12	0,735	143	13,4%	19,1	29	0,808	236	12,5%	29,5
13	0,741	125	13,1%	16,4	30	1,210	295	12,8%	37,7
14	0,843	236	11,0%	26,0	31	0,932	234	12,0%	28,1
15	0,607	82	19,6%	16,0	32	0,914	202	17,2%	34,8
16	0,819	234	10,7%	25,1	33	0,609	85	19,4%	16,4
17	0,832	247	12,0%	29,7	34	0,915	236	12,5%	29,4

**Tabla 4.4** Resumen de los modelos de regresión, ( $\alpha=5\%$ , g.l.<sub>modelo</sub>: 14, g.l.<sub>residuo</sub>: 19, F<sub>crítico</sub>= 2,26)

	Respuesta	unidades	R <sup>2</sup>	Error estándar	D	F
Y <sub>1</sub>	Velocidad Específica Crecimiento media ( $\mu$ )	día <sup>-1</sup>	94,20%	0,0501	1,797 (p valor 22,8%)	22,05
Y <sub>2</sub>	Productividad de Biomasa (P <sub>bio</sub> )	mg·L <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup>	93,99%	19,55	1,772 (p valor 20,7%)	19,34
Y <sub>3</sub>	Contenido Lípidos Totales del Peso Seco	% PS	92,95%	0,670	1,512 (p valor 5,6%)	16,02
Y <sub>4</sub>	Productividad de Lípidos (P <sub>lip</sub> )	mg·L <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup>	88,21%	2,76	1,884 (p valor 30,0%)	8,33

$$Y_n = a_{0n} + a_{1n}X_1 + a_{2n}X_2 + a_{3n}X_3 + a_{4n}X_4 + a_{11n}X_1^2 + a_{12n}X_1 \cdot X_2 + a_{13n}X_1 \cdot X_3 + a_{14n}X_1 \cdot X_4 + a_{22n}X_2^2 + a_{23n}X_2 \cdot X_3 + a_{24n}X_2 \cdot X_4 + a_{33n}X_3^2 + a_{34n}X_3 \cdot X_4 + a_{44n}X_4^2 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Tabla 4.5 Matriz coeficientes modelos de regresión ajustados para Ec. 4.3

Factor	Coeficiente	Respuesta			
		Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
Cte	a <sub>0n</sub>	-1,257	1,867×10 <sup>+02</sup>	7,490×10 <sup>+01</sup>	9,855×10 <sup>+01</sup>
X <sub>1</sub>	a <sub>1n</sub>	1,073×10 <sup>-01</sup>	3,507×10 <sup>+01</sup>	5,638	9,553
X <sub>2</sub>	a <sub>2n</sub>	9,253×10 <sup>-04</sup>	-3,302	-5,341×10 <sup>-01</sup>	-1,039
X <sub>3</sub>	a <sub>3n</sub>	1,937×10 <sup>-01</sup>	1,017	-3,365	-3,456
X <sub>4</sub>	a <sub>4n</sub>	-4,237×10 <sup>-02</sup>	-2,505×10 <sup>+02</sup>	-2,515×10 <sup>+01</sup>	-6,530×10 <sup>+01</sup>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	a <sub>11n</sub>	-2,041×10 <sup>-01</sup>	-4,202×10 <sup>+01</sup>	-1,950	-8,885
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	a <sub>12n</sub>	4,461×10 <sup>-03</sup>	1,390	-6,574×10 <sup>-02</sup>	8,306×10 <sup>-02</sup>
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	a <sub>13n</sub>	1,582×10 <sup>-02</sup>	2,883	2,395×10 <sup>-01</sup>	1,051
X <sub>1</sub> *X <sub>4</sub>	a <sub>14n</sub>	-1,261×10 <sup>-01</sup>	-3,283×10 <sup>+01</sup>	3,016×10 <sup>-01</sup>	-6,159
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	a <sub>22n</sub>	-2,261×10 <sup>-05</sup>	8,273×10 <sup>-03</sup>	2,348×10 <sup>-03</sup>	4,359×10 <sup>-03</sup>
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	a <sub>23n</sub>	1,458×10 <sup>-04</sup>	1,308×10 <sup>-01</sup>	8,384×10 <sup>-03</sup>	2,235×10 <sup>-02</sup>
X <sub>2</sub> *X <sub>4</sub>	a <sub>24n</sub>	-5,546×10 <sup>-04</sup>	-3,152×10 <sup>-01</sup>	5,065×10 <sup>-02</sup>	3,583×10 <sup>-02</sup>
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	a <sub>33n</sub>	-5,820×10 <sup>-03</sup>	-1,454×10 <sup>-01</sup>	4,886×10 <sup>-02</sup>	2,804×10 <sup>-02</sup>
X <sub>3</sub> *X <sub>4</sub>	a <sub>34n</sub>	6,593×10 <sup>-03</sup>	-1,111×10 <sup>-01</sup>	4,289×10 <sup>-01</sup>	1,498×10 <sup>-01</sup>
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	a <sub>44n</sub>	1,107×10 <sup>-01</sup>	2,423×10 <sup>+02</sup>	8,179	4,828×10 <sup>+01</sup>

Según la Tabla 4.4, los modelos de regresión múltiple ajustados a las respectivas respuestas fueron adecuados dado que el estadístico de Fisher (F) es mayor en todos los casos que el  $F_{\text{crítico}}$ , el cual es 2,26 para una significancia del 5%; de acuerdo con los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), los modelos de regresión permiten explicar como mínimo el 88,2% de las variaciones experimentales, lo que se considera satisfactorio. Finalmente, para todos los modelos se determinó el estadístico de Durbin y Watson (D), los cuales en una escala de 0 a 4 estuvieron cercanos a 2, además el p-valor de cada uno de ellos fue superior al 5%, lo cual significa que según el estadístico D y su p-valor no hubo autocorrelación serial entre los residuos con una confianza del 95% en ninguno de los modelos, es decir que los errores no están vinculados entre sí, pues si hubiera sido así los modelos ajustados serían inválidos.

### 4.3.1 Velocidad específica de crecimiento aparente (Y<sub>1</sub>)

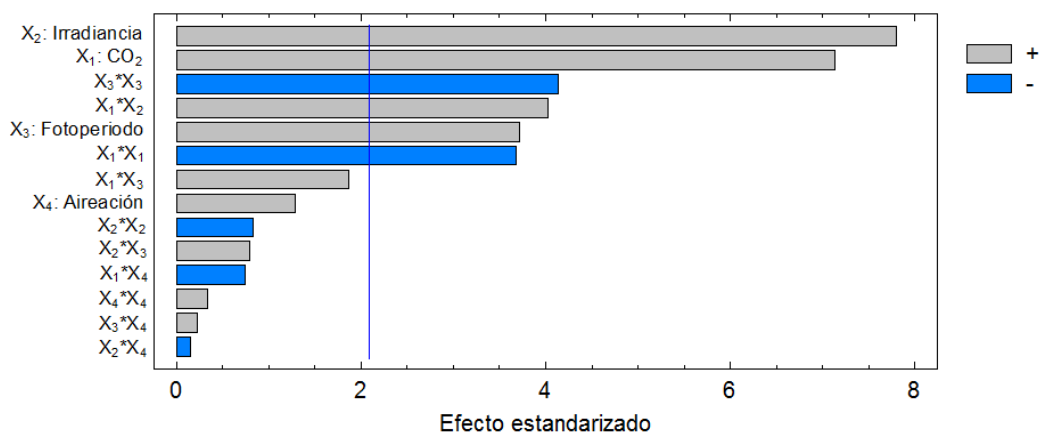
En el Anexo D se muestran los datos de crecimiento de cada una de las unidades experimentales, las líneas continuas corresponden al modelo logístico de crecimiento ajustado a cada unidad experimental. Con el objetivo de simplificar las variables de respuesta los parámetros  $X_0$  y  $X_{\text{max}}$  se ajustaron de manera iterativa y se dejaron

constantes para todas las unidades experimentales en  $2,21 \times 10^6$  y  $7,02 \times 10^7$  células·mL<sup>-1</sup>, respectivamente con R<sup>2</sup> de 98,4%. Adicionalmente en el Anexo D es mostrado el valor de  $\mu$  ajustado para cada unidad experimental con su respectivo intervalo de confianza, el cual fue calculado con una significancia del 5% según el error estándar y número de grados de libertad del modelo ajustado a cada unidad experimental; también son mostrados valores de R<sup>2</sup> de dichos modelos ajustados. Los valores ajustados de  $\mu$  son igualmente mostrados en la Tabla 4.3.

El diagrama de Pareto para  $\mu$  es mostrado en la Figura 4.2, donde se observa la aireación como único factor principal sin efecto significativo sobre  $\mu$ , lo cual se puede deber principalmente, a que la mínima aireación suministrada (0,4 vvm) fue suficiente para suplir la necesidades de turbulencia y remoción de oxígeno, inhibidor del crecimiento, como lo demostró también Sirisansaneeyakul *et al.* (2011) quienes emplearon una aireación mínima de 0,67 vvm (147). Por otro lado, la interacción CO<sub>2</sub> e irradiancia se destaca por ser la única con efecto significativo sobre  $\mu$ , lo cual demuestra la relación directa de estos dos factores sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella* y en general de las microalgas (41). En el caso del CO<sub>2</sub> y del fotoperiodo, se observó efecto significativo del cuadrado de éstos en  $\mu$ , lo cual equivale a decir que el efecto es de segundo orden y por tanto probablemente la microalga experimentó saturación en el crecimiento para el intervalo evaluado de dichas variables.

De la Figura E.1 a la Figura E.6, del Anexo E, se observa el comportamiento de  $\mu$  con respecto a los cuatro factores evaluados, donde se aprecia en primer lugar el fenómeno de saturación en el crecimiento debido al CO<sub>2</sub>, para el caso de la mínima irradiancia estudiada,  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , dicha saturación ocurre a una concentración de CO<sub>2</sub> cercana al 1%, mientras que para la máxima irradiancia evaluada,  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la saturación ocurre a concentraciones superiores al 2% de CO<sub>2</sub>, porcentaje después del cual la microalga experimenta posiblemente inhibición, caso similar a la cepa de *Chlorella* evaluada por Chiu *et al.* (2008), quienes reportan inhibición entre el 2 y el 5% (42) cuya irradiancia estudiada se fijó en  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; para otros estudios, la concentración de saturación de CO<sub>2</sub> encontrada para cepas de *Chlorella* fue 4% a una irradiancia de  $370 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (89) y 10% empleando una irradiancia superior a  $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (134), debido a lo anterior se puede concluir que en el caso del crecimiento, el porcentaje de

saturación de CO<sub>2</sub> está directamente relacionado con la irradiancia a la cual el cultivo es sometido, lo cual coincide con lo mostrado en la Figura 4.2, donde la interacción entre el CO<sub>2</sub> y la irradiancia es la única con efecto significativo en el crecimiento.



**Figura 4.2.** Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Velocidad específica de crecimiento aparente ( $\mu$ )

En el caso del efecto de la irradiancia en el crecimiento, la tendencia es lineal, es decir que la máxima irradiancia evaluada ( $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) no alcanzó la irradiancia de saturación para esta cepa, otros estudios reportan este valor en  $62,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (46),  $86 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (44),  $370 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (89) y por encima de  $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (45), lo cual hace pensar que los valores de saturación tanto del porcentaje de CO<sub>2</sub> como de la irradiancia de saturación sean propios de la cepa evaluada. En el caso del fotoperiodo se apreció un efecto de saturación sobre  $\mu$  con ligera inhibición después de fotoperiodo 22:2 LO, al igual que lo reporta Chen *et al.* (2010) (149).

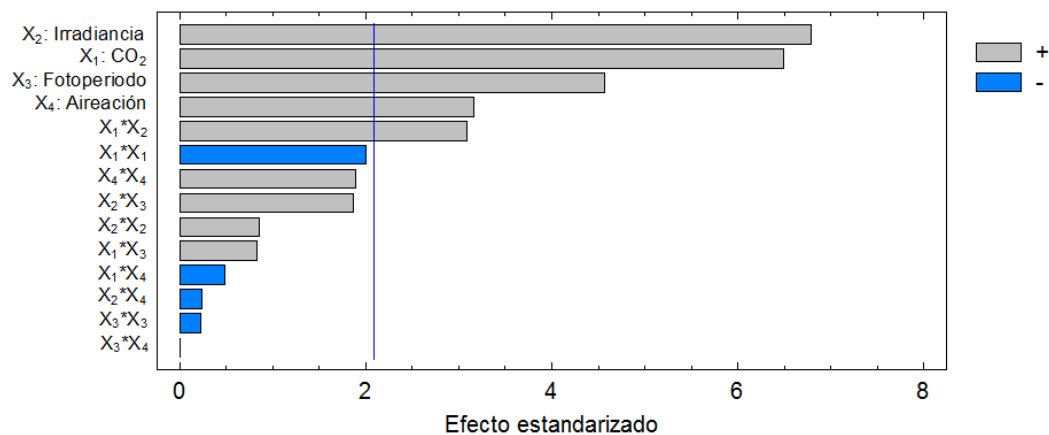
Finalmente, con una significancia del 5% el valor máximo de  $\mu$  predicho por el modelo ajustado es  $1,38 \pm 0,10 \text{ día}^{-1}$ , obtenido a contenido de CO<sub>2</sub> de 2%, irradiancia de  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 22:2 LO y aireación de 1,2 vvm, es decir un 85% superior a la reportada en el Capítulo 3, en donde las condiciones de cultivo fueron contenido de CO<sub>2</sub> de 0,03%, irradiancia de  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 18:6 LO y aireación de 0,7 vvm, condiciones para las cuales el mismo modelo estima  $\mu$  en  $0,63 \pm 0,10 \text{ día}^{-1}$ , es decir que el valor experimental está un 3% por encima del intervalo de confianza. Otros estudios reportan el valor  $\mu$  entre,  $0,25 \text{ día}^{-1}$  empleando aire o  $0,61 \text{ día}^{-1}$  con CO<sub>2</sub> al 2%

(42) hasta 1,17 día<sup>-1</sup> empleando CO<sub>2</sub> al 10% (134) o 1,32 día<sup>-1</sup> empleando NaHCO<sub>3</sub> como fuente de carbono (44), es decir que el presente estudio obtuvo valores de  $\mu$  entre los valores reportados por la literatura para cultivos autotróficos.

### 4.3.2 Productividad de biomasa (Y<sub>2</sub>)

La productividad de biomasa, debido a su estrecha relación con la velocidad específica de crecimiento aparente, presentó resultados equivalentes en el caso de los factores individuales contenido de CO<sub>2</sub>, irradiancia y fotoperiodo, y la interacción del contenido de CO<sub>2</sub> y la irradiancia; sin embargo, el cuadrado del contenido de CO<sub>2</sub> y del fotoperiodo no tuvieron efecto significativo en la productividad de biomasa con una confianza del 95%, caso contrario sucedido con la aireación, como se aprecia en la Figura 4.3. La productividad de biomasa es expresada como la relación entre la variación de la biomasa seca obtenida durante el cultivo y el producto entre el tiempo y volumen de empleado para dicho cultivo, según es mostrado en la Ec. 4.4

$$P_{bio} = \frac{\text{peso seco final} - \text{peso seco inicial}}{(\text{tiempo de cultivo}) \times (\text{volumen de cultivo})} \quad (\text{Ec. 4.4})$$



**Figura 4.3.** Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Productividad de biomasa (P<sub>bio</sub>)

Las superficies de respuesta de la productividad de biomasa son mostradas de la Figura E.7 a la Figura E.12, donde para el CO<sub>2</sub> se observa saturación cercana al 1% para una

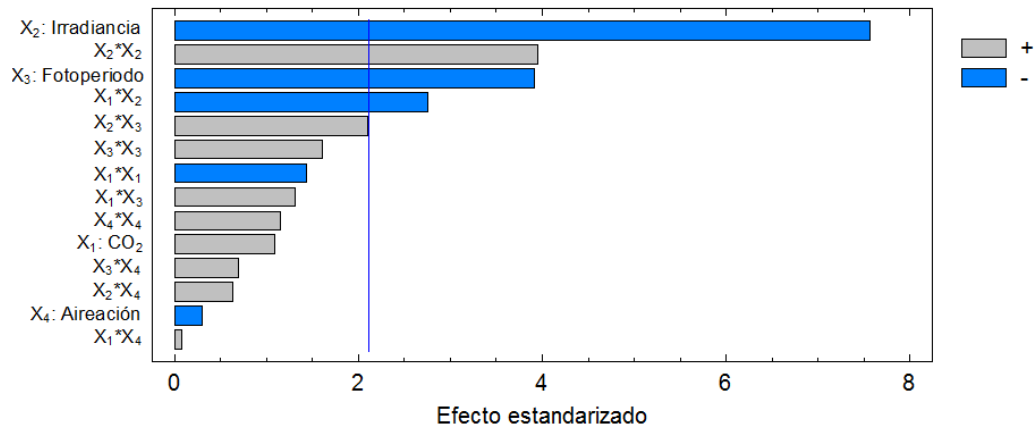
irradiancia del  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mientras que dicha saturación ocurre en cercanías al 2% en la irradiancia de  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , similar a lo obtenido con  $\mu$ ; sin embargo la saturación en la productividad de la biomasa no es igual de marcada que en  $\mu$ , por tal razón el efecto de cuadrado de la concentración de  $\text{CO}_2$  no fue significativo para el intervalo de evaluado (p-valor 6%), adicionalmente se confirma el efecto positivo del  $\text{CO}_2$  en la productividad de biomasa microalgal, como lo reportaron previamente Chen *et al.* (2011), quienes recopilan productividades de biomasa de varias microalgas bajo diferentes condiciones (40).

Por otro lado, se observa mayor sensibilidad de la productividad de biomasa a la aireación para valores bajos de  $\text{CO}_2$ , irradiancia y fotoperiodo que para valores altos de éstos, lo cual lleva a pensar que el efecto significativo de esta variable sobre la productividad de biomasa es cuando la microalga se encuentra en deficiencia de nutrientes, algo que no se observa en  $\mu$ , lo cual se puede deber que para niveles bajos de nutrientes, un aumento en la aireación permite aumentar la biomasa, mas no la densidad celular. En el caso del fotoperiodo se puede apreciar su efecto lineal en la productividad de biomasa, es decir que para fotoperiodos entre 12:12 y 22:2 LO el comportamiento es similar al experimentado en el crecimiento, sin embargo la diferencia está entre fotoperiodos de 22:2 y 24:0 LO, intervalo para el cual sucede algo equivalente a lo descrito previamente para la aireación, es decir que la microalga a pesar de no disminuir su tiempo de duplicación, sí aumenta su acumulación de biomasa en dicho intervalo de fotoperiodo, dado que éste no inhibió la producción de biomasa de la microalga, como también lo reportan otros estudios (46; 150).

### **4.3.3 Contenido y producción de lípidos ( $Y_3$ y $Y_4$ )**

El diagrama de Pareto del contenido de lípidos totales y de la productividad de lípidos son mostrados en la Figura 4.4 y la Figura 4.5, respectivamente, donde se observa el efecto negativo de la irradiancia y del fotoperiodo sobre el contenido de lípidos, únicos factores principales con efecto significativo, sin embargo la interacción entre estos tiene un efecto positivo, la interacción entre el  $\text{CO}_2$  y la irradiancia afectó negativamente la acumulación de lípidos, finalmente el cuadrado de la irradiancia tuvo efecto positivo, lo

que implica una saturación del contenido de lípidos para el intervalo estudiado de irradiancia.

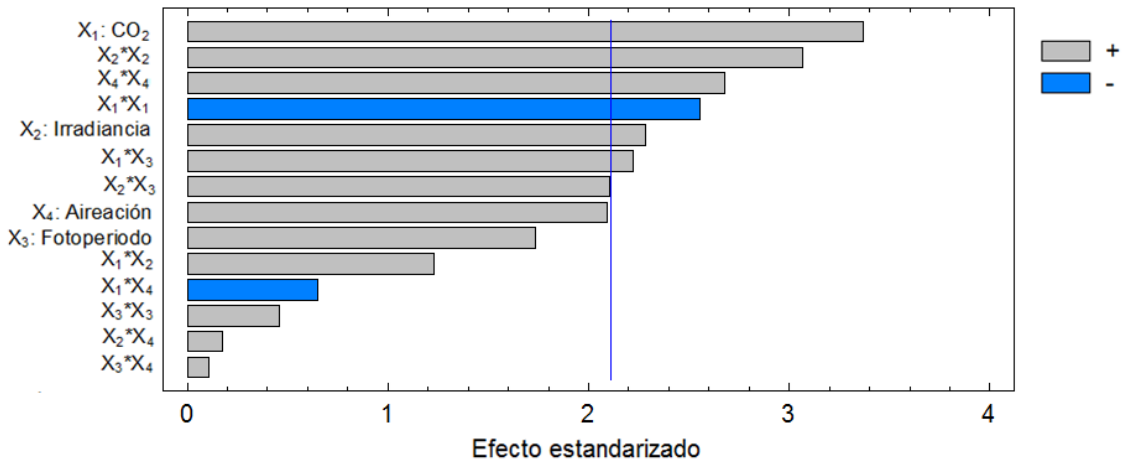


**Figura 4.4.** Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre contenido de lípidos totales del peso seco (% PS)

Lo anterior, al compararlo con la productividad de biomasa, se puede concluir que los valores máximos de productividad de biomasa y acumulación de lípidos se logran en condiciones opuestas de irradiancia y fotoperiodo, lo cual significa que la microalga tiende a acumular más biomasa y menos lípidos bajo condiciones altas de luz y acumular menos biomasa y más lípidos a condiciones bajas de luz, resultado equivalente a lo obtenido para otros nutrientes como el nitrógeno, el fósforo o el hierro (73; 77; 81; 82; 124; 151), la conclusión no es la misma al emplear aire enriquecido con CO<sub>2</sub>, dado que éste no tiene efecto significativo en la acumulación de lípidos, es decir que para concentraciones de CO<sub>2</sub> cercanas al 2%, la productividad de biomasa será mayor que para concentraciones inferiores, sin embargo el contenido de lípidos será similar para ambas condiciones.

En el caso de la productividad de lípidos, Figura 4.5, algunos efectos que fueron positivos en la productividad de biomasa y negativos en la acumulación de lípidos (fotoperiodo e interacción CO<sub>2</sub>-irradiancia) fueron contrarrestados, haciendo que no tengan efecto significativo con una confianza del 95%, mientras factores que sólo fueron significativos en una de las anteriores respuestas, lo continúan siendo en la productividad de lípidos,

es decir el contenido de CO<sub>2</sub>, la aireación, el cuadrado de la irradiancia y la interacción irradiancia-fotoperiodo; finalmente los factores cuadráticos del CO<sub>2</sub> y de la aireación y la interacción contenido de CO<sub>2</sub> y fotoperiodo aparecen con efecto significativo, el primero con efecto negativo y los dos últimos con efecto positivo.



**Figura 4.5.** Diagrama de Pareto estandarizado de factores evaluados sobre Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ )

De la Figura E.13 a la Figura E.24 son mostradas las superficies de respuesta tanto de la acumulación de lípidos como de la productividad de lípidos, en las cuales destaca el efecto de saturación de la productividad de lípidos a concentraciones de CO<sub>2</sub> cercanas al 2%, la tendencia lineal de la productividad de lípidos con respecto al fotoperiodo y la poca variación de dicha productividad de lípidos en los intervalos de irradiancia entre 22 y 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y de aireación entre 0,4 y 0,8 vvm, después de los cuales la productividad aumenta sensiblemente, en otras palabras, se evidencia el efecto negativo del cuadrado del CO<sub>2</sub> y el efecto positivo del cuadrado de la irradiancia y de la aireación en la productividad de lípidos, como se mencionó previamente.

Finalmente, Chiu *et al.* (2008) reportan la máxima productividad de lípidos empleando aire enriquecido con CO<sub>2</sub>, 178,8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , es decir 2,5 veces la máxima productividad de lípidos predicha por el modelo ajustado, sin embargo a diferencia del presente estudio, dicha productividad fue alcanzada realizando el cultivo de manera semicontinua, es decir que diariamente cosechaban la mitad del volumen de cultivo, el cual era



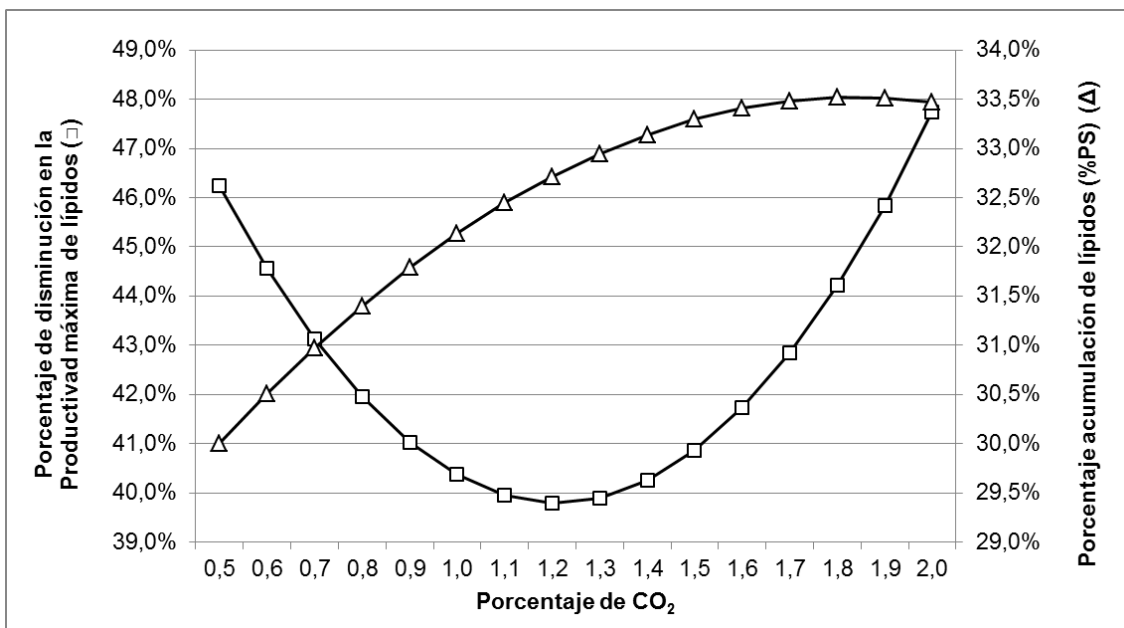
reemplazado por medio de cultivo nuevo, lo que podría llevar a pensar que tal manera de cultivo sea apropiada para mejorar la productividad de lípidos (42).

#### 4.3.4 Optimización productividad de lípidos

Dentro del intervalo estudiado de los diferentes factores evaluados, con una significancia del 5%, la máxima productividad de lípidos posible predicha por el modelo es de  $69,7 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , es decir  $15,2 \pm 1,2$  veces la productividad de aceite de la palma africana, correspondiente a valores de CO<sub>2</sub> de 2%, irradiancia de  $114 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 24:0 LO y aireación de 1,2 vvm; para estas condiciones la productividad de biomasa y el contenido de lípidos estimados son respectivamente  $525\pm 40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  y  $16,4 \pm 1,4\%$  PS. Tal óptimo tiene dos limitaciones de tipo económico para un escalamiento industrial: el primero de ellos es el fotoperiodo: el fotoperiodo óptimo de 24:0 LO no resulta conveniente puesto que el uso de luz artificial impone una carga económica representada en el costo de la energía eléctrica y de la infraestructura de iluminación. La condición deseable incluye el uso exclusivo de luz solar como fuente lumínica (16; 19; 28; 122), la cual para Colombia tiene un fotoperiodo aproximadamente constante de 12:12 LO (33), lo cual fija externamente dicha condición para el cultivo. En segundo lugar, el contenido de lípidos no alcanza el mínimo de 30% PS recomendado por otras investigaciones para poder lograr que el proceso de extracción sea factible económicamente (16; 23; 28; 152). Es decir que el fotoperiodo se debe fijar en 12:12 LO y el contenido de lípidos debe ser al menos del 30% del peso seco.

Como se observa de la Figura E.13 a la Figura E.18 del Anexo E, los óptimos de irradiancia, fotoperiodo y aireación en la acumulación de lípidos son los valores mínimos evaluados, es decir  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 12:12 LO y 0,4 vvm, respectivamente, por encima de los cuales el contenido de lípidos decae sensiblemente por debajo del valor mínimo aceptable (30%); consecuentemente el único factor a optimizar es el contenido de CO<sub>2</sub>. La Figura 4.6 detalla el efecto del contenido de CO<sub>2</sub> en el aire sobre el porcentaje de acumulación de lípidos en peso seco y sobre el porcentaje de disminución de la productividad máxima posible ( $69,7 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ); resulta obvio que la disminución en la productividad de lípidos deber ser minimizada; pese a lo anterior, la función real que debería minimizarse es el costo. Tal costo se ve afectado por muchos factores, que

incluyen el costo de extracción, de aireación, de producción o adecuación del  $\text{CO}_2$ , entre otros, como no es posible conocer dicha función a esta escala, optimizar la reducción de productividad de lípidos tiene sentido, en el entendido que el contenido de  $\text{CO}_2$  no tendría mucho efecto en un esquema industrial en donde el  $\text{CO}_2$  puede ser tomado de una termoeléctrica sin mayores diferencias de costo para el intervalo evaluado. Por tal razón la óptima concentración de  $\text{CO}_2$  está cercana al 1,2%, en donde los valores de contenido de lípidos y la productividad de lípidos son  $32,7 \pm 1,4\%$  y  $42,0 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , respectivamente. Las condiciones restantes de irradiancia, fotoperiodo y aireación están en  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 12:12 LO, 0,4 vvm, los cuales son los valores inferiores estudiados, por lo cual se recomienda para estudios posteriores ampliar el intervalo a evaluar, en especial para el caso de la aireación, con el objetivo de encontrar el óptimo real.



**Figura 4.6** Efecto del contenido de  $\text{CO}_2$  en el aire sobre el porcentaje de acumulación de lípidos del peso seco ( $\Delta$ ) y sobre la disminución de la productividad de lípidos ( $\square$ ), respecto con la máxima obtenida ( $69,7 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ). Irradiancia  $22 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 12:12 LO, aireación 0,4 vvm,

Gracias a que las anteriores condiciones de iluminación de cultivo son alcanzables en cualquier parte del país, dado que la irradiancia media es  $387 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (33), valor que puede ser reducido al óptimo empleando sombreado, haciendo de Colombia un territorio

adecuado para el cultivo masivo de microalgas. La productividad de lípidos bajo las nuevas condiciones tiene una equivalencia de  $9,1 \pm 1,2$  veces la productividad de aceites de la palma africana, es decir tan sólo un 9% por debajo de lo reportado por la literatura para un porcentaje de acumulación de lípidos del 30% (16). Adicionalmente, para la nueva productividad de lípidos comparada con la máxima posible, los costos asociados con la extracción de lípidos son reducidos en un 51% gracias al aumento del contenido de lípidos en dicho porcentaje (98); además por unidad de área cultivada y tiempo de cultivo los costos relacionados con aireación, suministro de CO<sub>2</sub> y suministro de luz artificial son reducidos en un 67%, 40% y 100%, respectivamente.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Ante la necesidad de determinar los lípidos producidos por las microalgas como fuente potencial para la producción de biodiesel fueron estudiados un método de rompimiento celular, cinco métodos de terminación gravimétrica de lípidos y una técnica espectrofotométrica. La disrupción celular por sonicación resultó ser bastante eficiente, rompiendo cerca del 90% de las células microalgales después de 10 minutos, lo cual lo hace un método eficiente a nivel laboratorio para tal fin.

Mientras que para los métodos de extracción sólo fueron eficientes aquellos que usaron como solvente la mezcla cloroformo-metanol, siendo en concreto el método propuesto por Bligh & Dyer en 1959 el mejor, sin embargo con una significancia del 5% las modificaciones propuestas por Inouye y Manirakiza dieron resultados satisfactorios, haciendo que la modificación propuesta por Inouye sea más adecuada gracias a ser la menos costosa. En cuanto al método espectrofotométrico formulado por Marsh & Weinstein también fue eficaz para la medición de lípidos obtenidos a partir de microalgas.

Las microalgas cultivadas resultaron tener productividades de lípidos lo suficientemente altas como para ser consideradas como una fuente potencial para la obtención de biodiesel, en especial las microalgas de agua dulce. Pues para el caso de la microalga *Chlorella* tuvo una productividad equivalente a 4,1 veces la productividad de la palma africana, actual materia prima empleada en Colombia para la obtención de biodiesel. La anterior productividad es claramente susceptible de mejora, dado que ha sido demostrado que el empleo de aire enriquecido con CO<sub>2</sub> aumenta considerablemente la producción de lípidos (40). La anterior microalga, adicionalmente presentó una relación de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados similar a los del aceite de

soya, actual segunda fuente mundial empleada en la producción de biodiesel (59), haciéndola potencialmente propicia para obtención de biodiesel.

La optimización de los parámetros contenido de CO<sub>2</sub>, irradiancia, fotoperiodo y aireación para un potencial cultivo masivo de la microalga *Chlorella vulgaris* como fuente viable de biodiesel se logró en los valores de 1,2%, 22 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 12:12 LO y 0,4 vvm, respectivamente, donde los valores estimados de contenido de lípidos y la productividad de lípidos son 32,7 ± 1,4% y 42,0 ± 5,6 mg·L<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup>, respectivamente. En el caso de los valores ajustados de iluminación, es decir irradiancia y fotoperiodo, son factibles de alcanzar en el territorio colombiano, mientras que los factores de CO<sub>2</sub> y aireación pueden ser controlados a escala industrial.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis se presentaron 2 ponencias en el Tercer Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (III CLABA), realizado entre el 16 y 18 de enero del 2012 en la ciudad de Concepción:

- “Uso de las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galvana* y *Botryococcus braunii* como fuentes potenciales de biodiesel”.
- “Comparación de cinco métodos gravimétricos y uno colorimétrico para la medición de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*”

## 5.2 Recomendaciones

En la evaluación de la sonicación como técnica de disrupción, se recomienda un estudio más detallado del efecto de la concentración celular sobre su efectividad en el porcentaje de células rotas, con el objetivo de optimizar el consumo energético de ésta, además de minimizar el uso de solventes empleados por unidad de biomasa.

En el caso de continuarse estudiando cepas de agua de mar, se recomienda emplear tanto agua proveniente de la costa Pacífica como la costa Caribe colombiana con el objetivo de determinar el efecto de la procedencia del agua marina empleada.

Dado que las microalgas *Nannochloropsis* y *Chlorella* presentaron en su composición un alto contenido de ácidos grasos  $\omega 3$  y  $\omega 6$ , se recomienda su uso con fines alimenticios, más aún cuando esta última microalga presenta resultados mejores de dichos aceites de alto valor agregado en comparación con otras fuentes empleadas para tal fin.

En caso de ser empleado los lípidos de microalgas para fines alimenticios se recomienda evaluar nuevas técnicas de extracción de dichos lípidos, dado que tanto el cloroformo como el metanol son tóxicos. Como técnica de extracción se recomienda la extracción supercrítica, la cual a pesar de ser más costosa, es de mayor factibilidad dado que permite aumentar el valor agregado de los lípidos extraídos.

Dado que la mejor combinación de productividad de lípidos y contenido de lípidos se logró para los valores inferiores de aireación e irradiación se recomienda hacer estudios posteriores que permitan encontrar el óptimo real, en especial en el caso de la aireación, dado que los costos asociados a éste se podrían reducir significativamente.

Se recomienda hacer modificaciones en la manera de cultivo con el objetivo de mejorar la productividad de lípidos, como puede ser cambiar el cultivo discontinuo empleado en el presente estudio, por cultivos semicontinuos o continuos o incluso probar cultivos por etapas, en donde en una primera etapa la microalga está a condiciones óptimas de crecimiento y una segunda etapa donde la microalga es sometida a condiciones de estrés para favorecer la acumulación de lípidos.

Finalmente se recomienda realizar estudios que permitan encontrar maneras viables económicamente para la obtención de biocombustibles a partir de las microalgas como puede ser la pirolisis.





# Anexo A Elaboración medios de cultivos empleados

## Medio f/2

Este es un común y ampliamente utilizado medio de cultivo de agua de mar enriquecido, diseñado para el cultivo de algas marinas costeras, especialmente las diatomeas. La concentración de la formulación original, denominado "medio f", se ha reducido a la mitad. En 950 ml de agua de mar natural filtrada, agregar los siguientes componentes, según se muestra en Tabla A.1. Llevar el volumen final a 1 litro con agua de mar natural filtrada. Esterilizar. Si el silicato no es necesario, omitir para reducir la precipitación.

**Tabla A.1.** Nutrientes necesarios elaboración medio de cultivo f/2 estándar (112)

Componente	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> )	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
NaNO <sub>3</sub>	75	1 mL	8,82 ×10 <sup>-04</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	1 mL	3,62 ×10 <sup>-05</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	30	1 mL	1,06 ×10 <sup>-04</sup>
Solución metales traza		1 mL	
Solución de vitaminas		0,5 mL	

**Tabla A.2.** Solución metales traza f/2 estándar (112)

Componente	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> )	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	3,15 g	1,17 ×10 <sup>-05</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	-	4,36 g	1,17 ×10 <sup>-05</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180,0	1 mL	9,17 ×10 <sup>-07</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0	1 mL	7,65 ×10 <sup>-08</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10,0	1 mL	4,20 ×10 <sup>-08</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9,8	1 mL	3,93 ×10 <sup>-08</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,3	1 mL	2,60 ×10 <sup>-08</sup>

**Tabla A.3.** Solución vitaminas f/2 estándar (112)

Componente	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> )	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
Tiamina (B1)	-	200 mg	2,96 ×10 <sup>-07</sup>
Biotina (H)	1,0		2,05 ×10 <sup>-09</sup>
Cianocobalamina (B12)	1,0		3,69 ×10 <sup>-10</sup>

**Bold's Basal Medium (BBM)**

Este se deriva de una versión modificada de solución de Bristol. El medio carece de vitaminas, mientras que algunas concentraciones de metales traza son altas. Este es un medio útil para muchas algas, especialmente algas *chlorococcales* o algas *volvocales*. Sin embargo, la formulación es inadecuada para las algas que requieren vitaminas. Varios medios modificados se han desarrollado. En 936 ml de agua destilada, agregar nutrientes según se describe en la Tabla A.4. Esterilizar. El pH final debe ser 6,6 (112).

**Tabla A.4.** Nutrientes necesarios elaboración medio de cultivo BBM estándar (112)

Componente	Solución Stock (g·L <sup>-1</sup> )	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
Macronutrientes			
NaNO <sub>3</sub>	25	10 mL	2,94 ×10 <sup>-03</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5	10 mL	1,70 ×10 <sup>-04</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,5	10 mL	3,04 ×10 <sup>-04</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	10 mL	4,31 ×10 <sup>-04</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	10 mL	1,29 ×10 <sup>-03</sup>
NaCl	2,5	10 mL	4,28 ×10 <sup>-04</sup>
Solución alcalina de EDTA		1 mL	
EDTA	50		1,71 ×10 <sup>-04</sup>
KOH	31		5,53 ×10 <sup>-04</sup>
Solución ácida de Hierro		1 mL	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,98		1,79 ×10 <sup>-05</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1 mL	
Solución Boro		1 mL	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42		1,85 ×10 <sup>-04</sup>
Solución metales traza		1 mL	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82		3,07 ×10 <sup>-05</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44		7,28 ×10 <sup>-06</sup>
MoO <sub>3</sub>	0,71		4,93 ×10 <sup>-06</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57		6,29 ×10 <sup>-06</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49		1,68 ×10 <sup>-06</sup>

## Anexo B Pruebas de Tukey realizadas.

**Prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre métodos de extracción de lípidos sobre el contenido de lípidos cuantificado**

Significancia: 5%

Tratamientos: 6

Grados de libertad de error (Tabla 2.5): 15

Promedio cuadrado del error (Tabla 2.5):  $8,840 \times 10^{-06}$

Valor q: 4,59

**Tabla B.1.** DSH críticos de acuerdo a número de repeticiones para tratamientos pareados

Repeticiones tratamiento a	Repeticiones tratamiento b	DSH crítico
2	3	0,881%
3	3	0,788%
2	7	0,774%
3	7	0,666%

**Tabla B.2.** Diferencias de valores medios de contenido de lípidos para tratamientos pareados. Valores subrayados corresponden a DSH menores a DSH crítico correspondiente, es decir sin diferencia significativa

	Bligh & Dyer original	Bligh & Dyer modificado Inouye	Bligh & Dyer modificado Manirakiza	Bligh & Dyer modificación 2 Manirakiza	Extracción soxhlet
método colorimétrico	<u>0,067%</u>	<u>0,42%</u>	<u>0,61%</u>	3,12%	5,04%
Bligh & Dyer original		<u>0,35%</u>	<u>0,54%</u>	3,05%	4,97%
Bligh & Dyer modificado Inouye			<u>0,19%</u>	2,70%	4,62%
Bligh & Dyer modificado Manirakiza				2,51%	4,43%
Bligh & Dyer modificación 2 Manirakiza					1,92%

**Prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre microalgas estudiadas sobre la velocidad específica de crecimiento de éstas.**

Significancia: 5%

Tratamientos: 5

Grados de libertad de error (Tabla 3.2): 10

Promedio cuadrado del error (Tabla 3.2): 0,00300

Valor q: 4,65

DSH crítico: 0,147

**Tabla B.3.** Diferencias de valores medios de velocidad de crecimiento de microalgas evaluadas para tratamientos pareados. Valores subrayados corresponden a DSH menores a DSH crítico, es decir sin diferencia significativa

	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Botryococcus</i>
<i>Isochrysis</i>	0,156	0,515	0,582	1,082
<i>Nannochloropsis</i>	-	0,359	0,426	0,926
<i>Chlorella</i>	-	-	<u>0,067</u>	0,567
<i>Scenedesmus</i>	-	-	-	0,500

**Prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre microalgas estudiadas sobre la productividad de biomasa de éstas.**

Significancia: 5%

Tratamientos: 5

Grados de libertad de error (Tabla 3.3): 10

Promedio cuadrado del error (Tabla 3.3): 35,4

Valor q: 4,65

DSH crítico: 16,0

**Tabla B.4.** Diferencias de valores medios de productividad de biomasa de microalgas evaluadas para los tratamientos pareados. Valores subrayados corresponden a DSH menores a DSH crítico, es decir sin diferencia significativa

	<i>Chlorella</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Botryococcus</i>	<i>Isochrysis</i>
<i>Scenedesmus</i>	24,7	43,0	67,2	94,9
<i>Chlorella</i>	-	18,4	42,6	70,3
<i>Nannochloropsis</i>	-	-	24,2	51,9
<i>Botryococcus</i>	-	-	-	27,7

**Prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre microalgas estudiadas sobre el contenido de lípidos del peso seco de éstas.**

Significancia: 5%

Tratamientos: 5

Grados de libertad de error (Tabla 3.5): 10

Promedio cuadrado del error (Tabla 3.5): 0,000138

Valor q: 4,65

DSH crítico: 3,15%

**Tabla B.5.** Diferencias de valores medios de contenido de lípidos de microalgas evaluadas para tratamientos pareados. Valores subrayados corresponden a DSH menores a DSH crítico, es decir sin diferencia significativa

	<i>Botryococcus</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Nannochloropsis</i>
<i>Chlorella</i>	<u>1,20%</u>	<u>1,62%</u>	3,70%	5,55%
<i>Botryococcus</i>	-	<u>0,42%</u>	<u>2,50%</u>	4,35%
<i>Isochrysis</i>	-	-	<u>2,07%</u>	3,93%
<i>Scenedesmus</i>	-	-	-	<u>1,85%</u>

**Prueba de Tukey para establecer diferencias significativas entre microalgas estudiadas sobre la productividad de lípidos de éstas.**

Significancia: 5%

Tratamientos: 5

Grados de libertad de error (Tabla 3.7): 10

Promedio cuadrado del error (Tabla 3.7): 1,25

Valor q: 4,65

DSH crítico: 3,0

**Tabla B.6.** Diferencias de valores medios de productividad de lípidos de microalgas evaluadas para tratamientos pareados. Valores subrayados corresponden a DSH menores a DSH crítico, es decir sin diferencia significativa

	<i>Chlorella</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Botryococcus</i>	<i>Isochrysis</i>
<i>Scenedesmus</i>	<u>0,11</u>	8,05	8,84	13,88
<i>Chlorella</i>	-	7,94	8,73	13,77
<i>Nannochloropsis</i>	-	-	<u>0,79</u>	5,83
<i>Botryococcus</i>	-	-	-	5,04



## **Anexo C Informe composición ácidos grasos microalgas cultivadas**



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA – EDIFICIO DE INVESTIGACIONES AVÍCOLAS  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA Y NUTRICIÓN AVIAR  
Ciudad Universitaria- Edificio 561B  
labtoxv\_finvzbog@unal.edu.co

Remitente o propietario:  
**LABORATORIO DE INGENIERIA QUÍMICA**  
Atn. Luis Miguel Serrano.  
Dirección: Edificio 412 Laboratorio 213

Resultado No: 02-IN 2012  
Fecha: Marzo 09 de 2012  
Teléfono: 3165000 Etx 14322  
Celular:

**ACIDOS GRASOS (%)**

**PAG 1 DE 1**

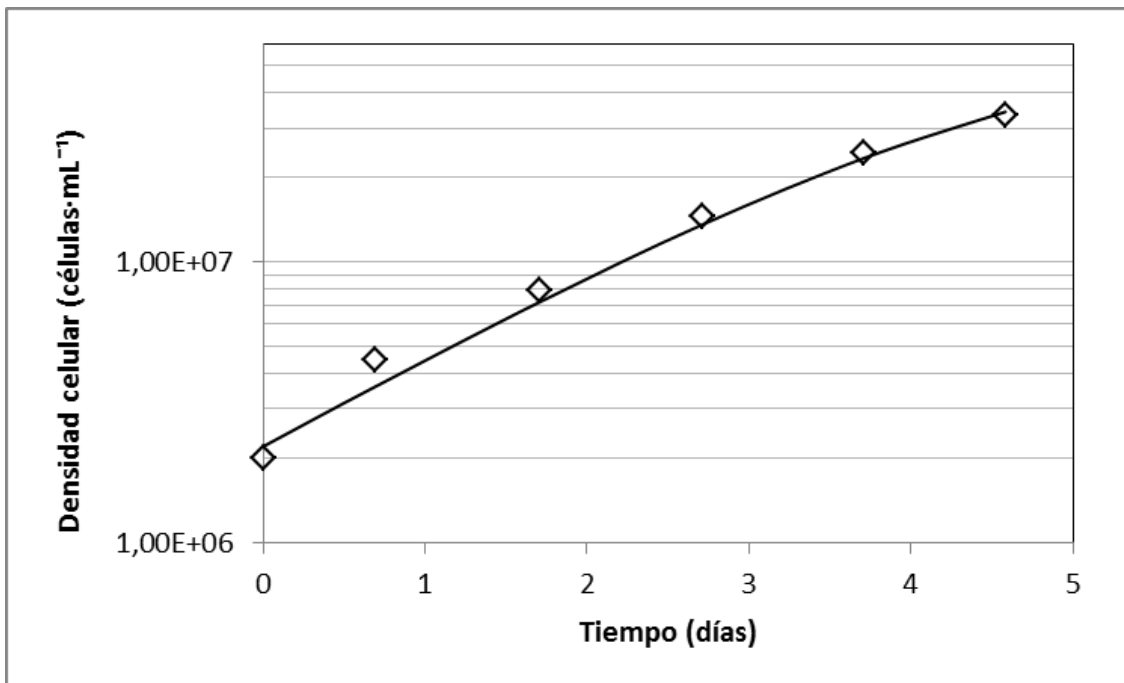
FAMES	O1	O2	O4	11	UT
C12:0	3,6	3,5	2,9	9,8	0,5
C14:0	1,8	0,8	0,3	11,4	0,3
C16:0	49,1	17,2	15,7	32,8	6,9
C16:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
C17:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
C17:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
C18:0	17,1	7,4	2,9	21,5	0,9
C18:1n-9t	4,4	0,0	3,8	0,0	0,0
C18:1n-9c	17,4	3,5	15,7	18,8	78,2
C18:1n-7	0,0	8,6	11,1	0,0	0,0
C18:2n-6c	2,6	21,4	20,5	3,0	3,3
C20:0	0,4	0,0	4,2	0,0	0,3
C18:3n-6	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
C18:3n-3	1,6	37,6	22,8	2,7	6,0
C22:1n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
C23:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
C20:5n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PUFAS	6,2	59,0	43,3	5,7	10,1
MUFAS	21,8	12,1	30,5	18,8	80,2
SFAS	72,0	28,9	26,2	75,5	9,7
n-3	1,6	37,6	22,8	2,7	6,8
n-6	2,6	21,4	20,5	3,0	3,7
n6/n-3	1,6	0,6	0,9	1,1	0,6

Realizado por:  
Milena Cepeda Amado  
Analista

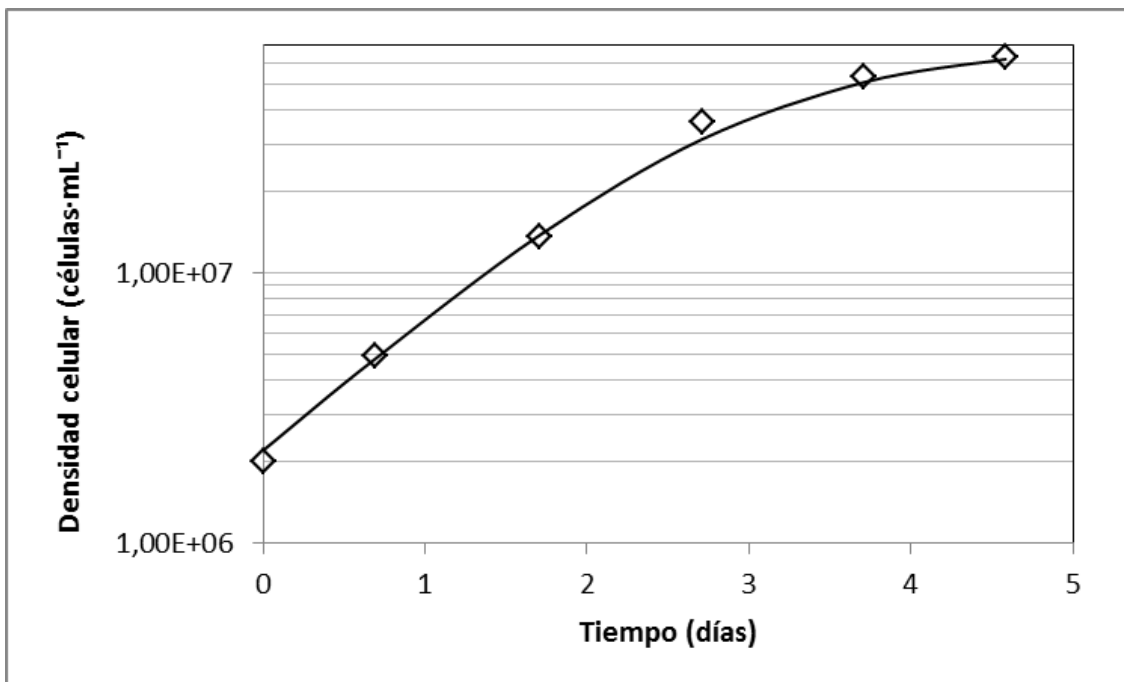
Este resultado no es valido sin el sello seco del laboratorio de Toxicología



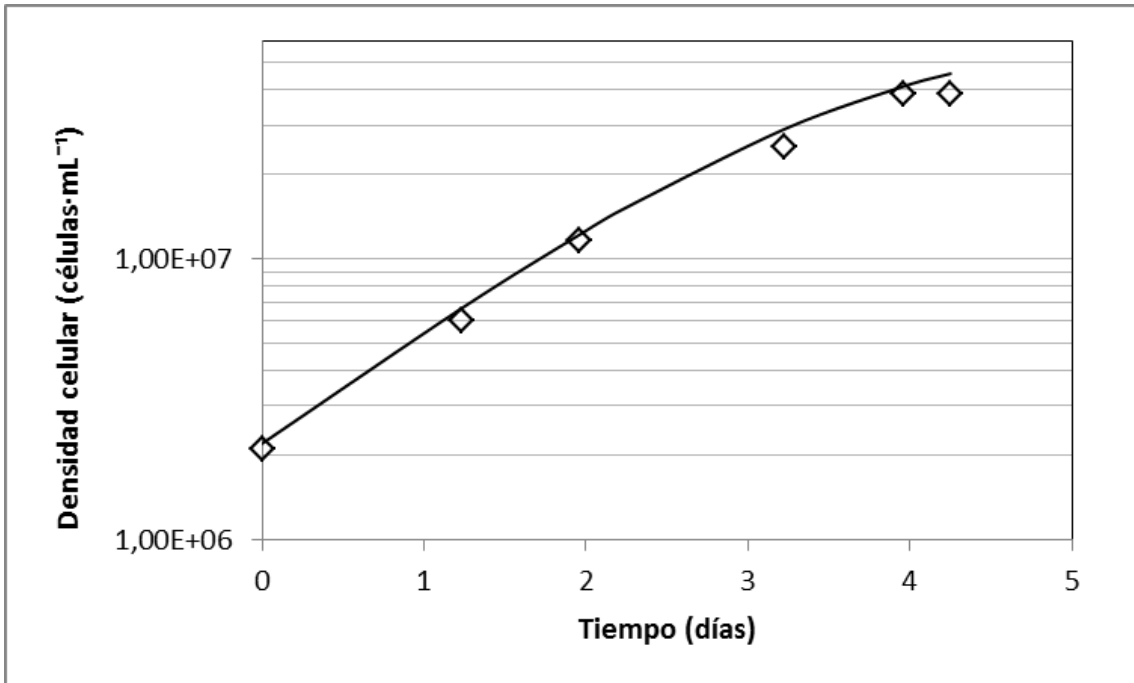
**Anexo D Efecto del CO<sub>2</sub>, la luz y la aireación en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* LAUN 002**



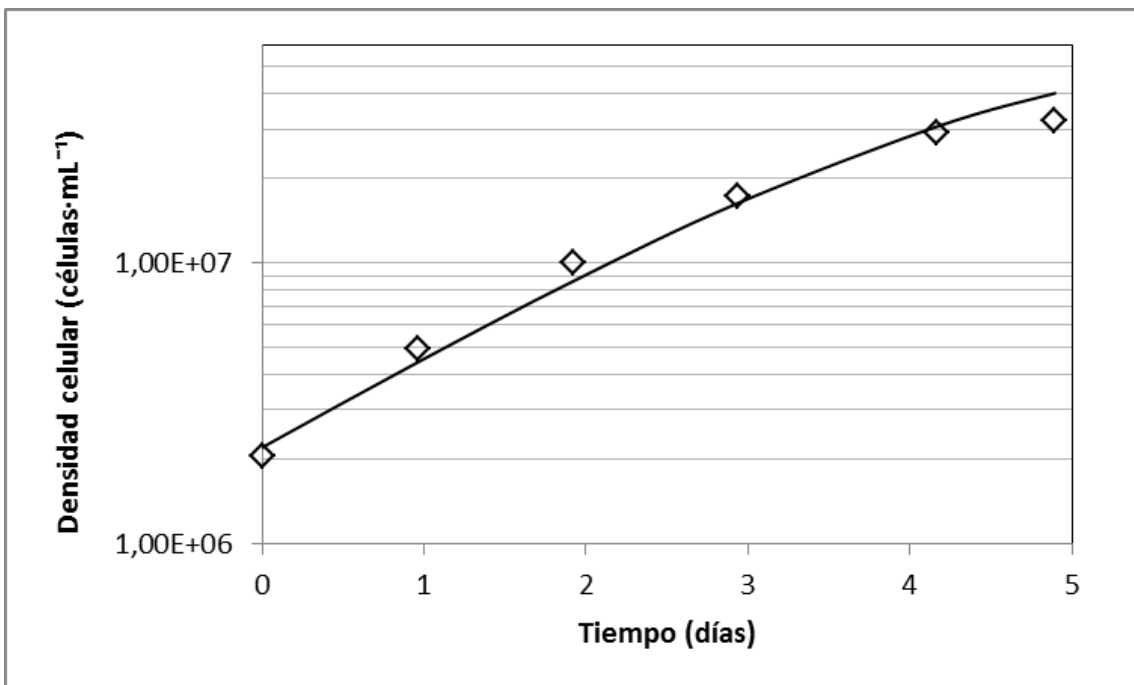
**Figura D.1** UE 1: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,756 \pm 0,058 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,986$ )



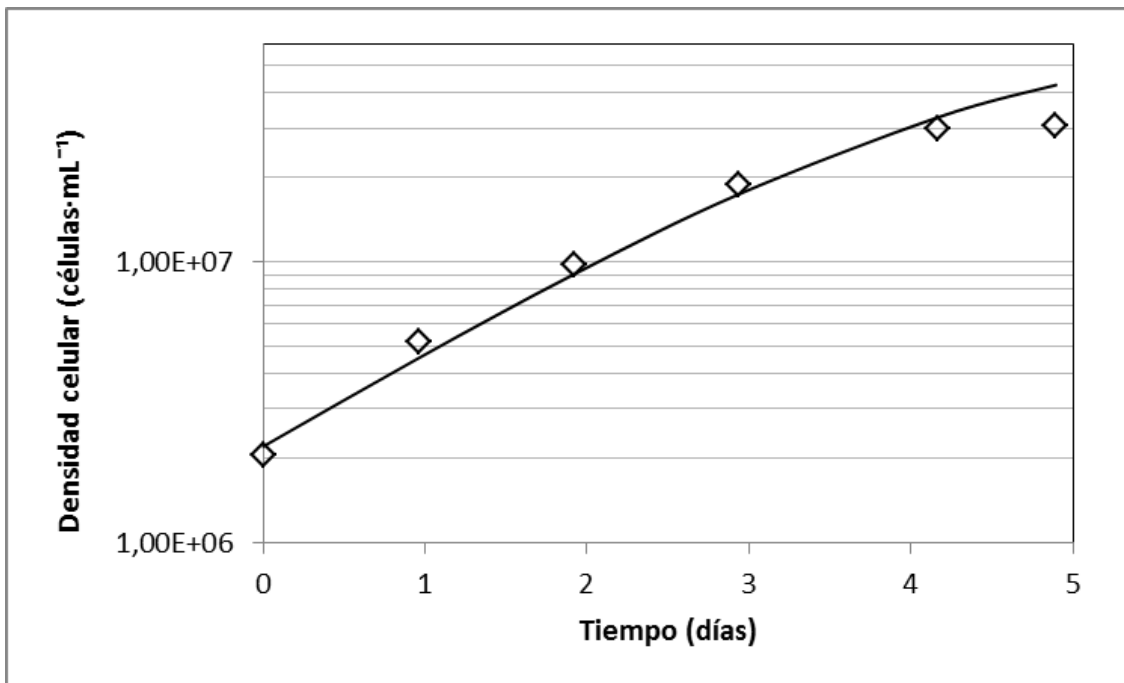
**Figura D.2** UE 2: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 1,229 \pm 0,074 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,995$ )



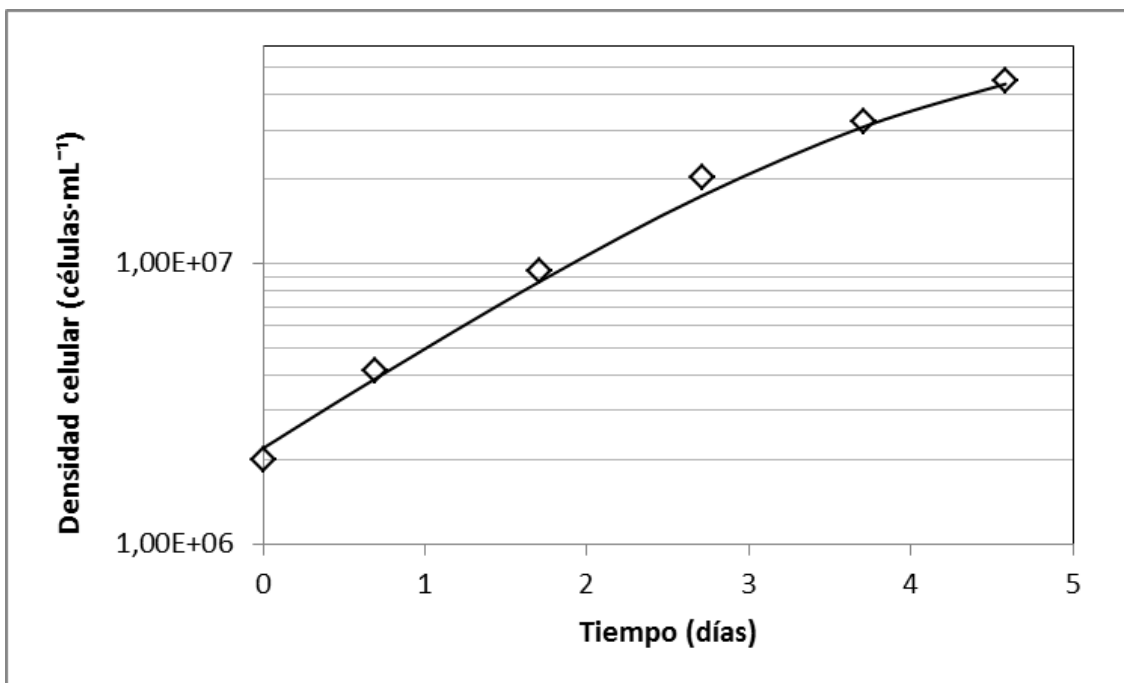
**Figura D.3** UE 3: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,40 vvm.  $\mu = 0,888 \pm 0,036 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,996$ )



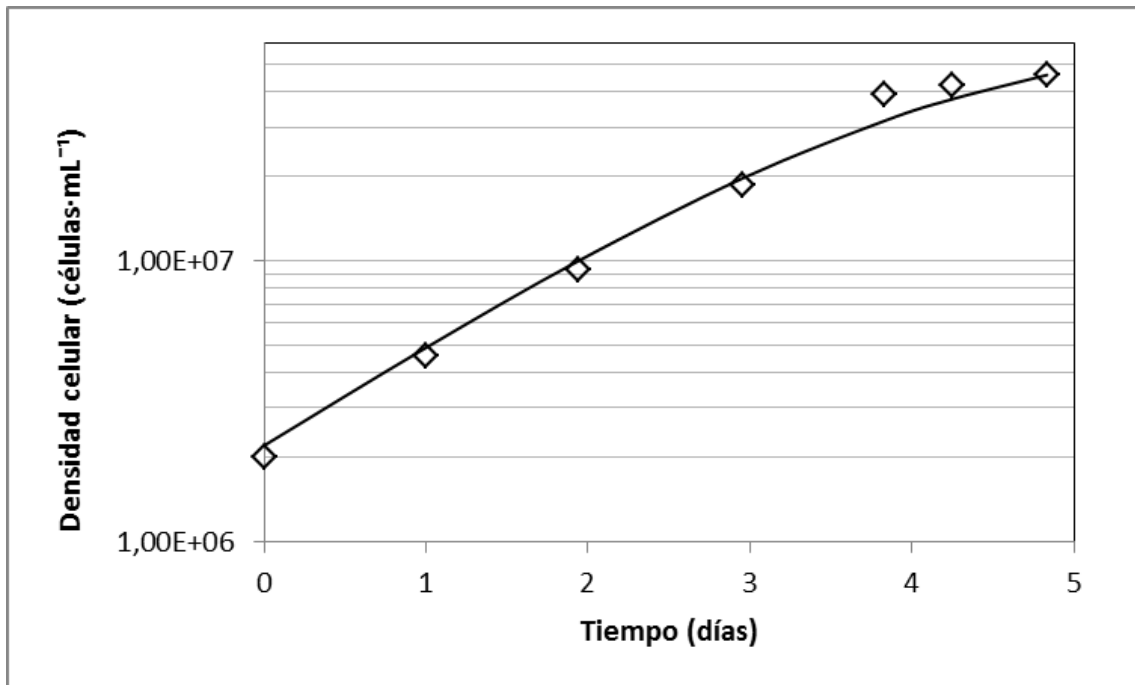
**Figura D.4** UE 4: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,733 \pm 0,083 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,970$ )



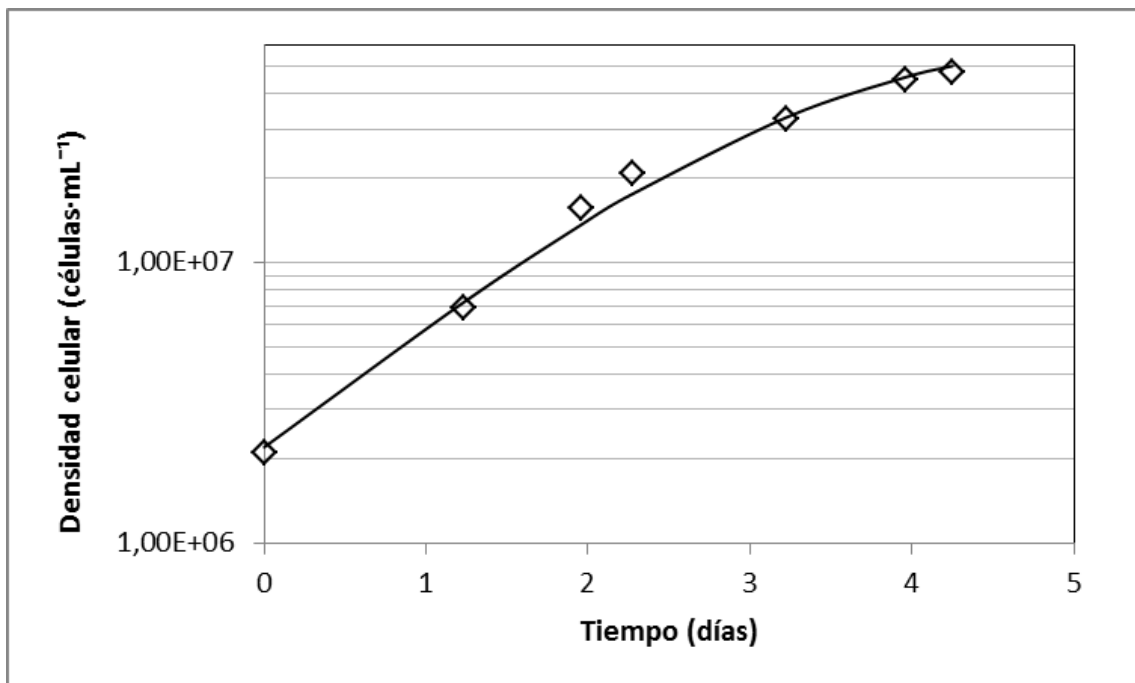
**Figura D.5** UE 5: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,732 \pm 0,106 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,952$ )



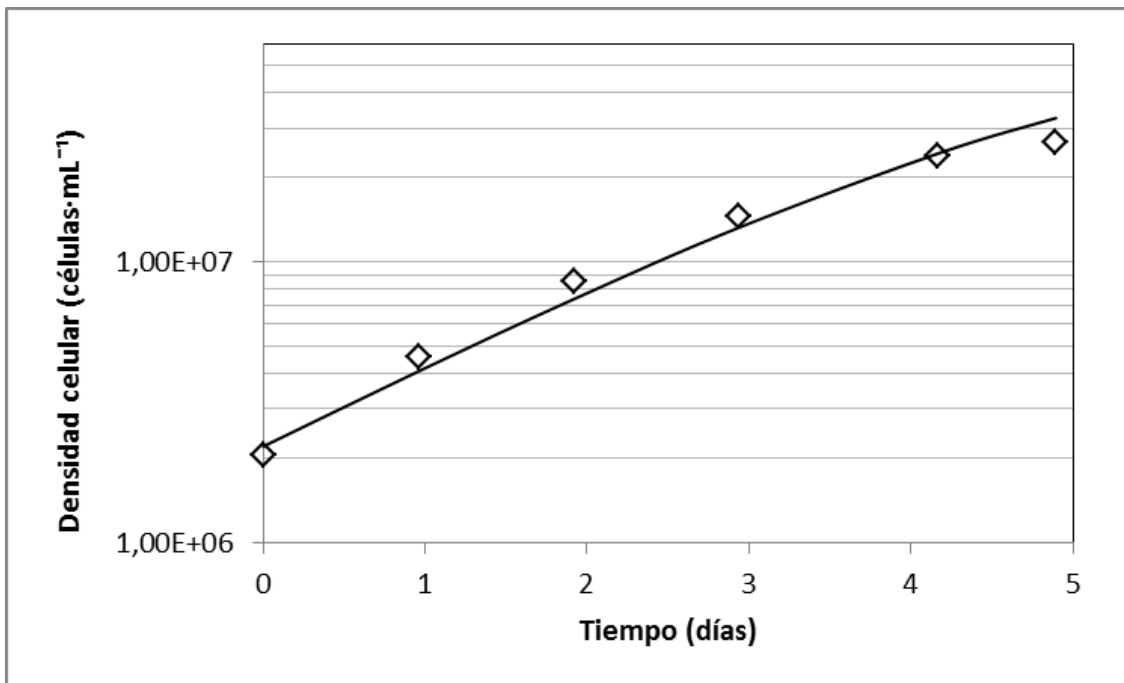
**Figura D.6** UE 6: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,897 \pm 0,043 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,995$ )



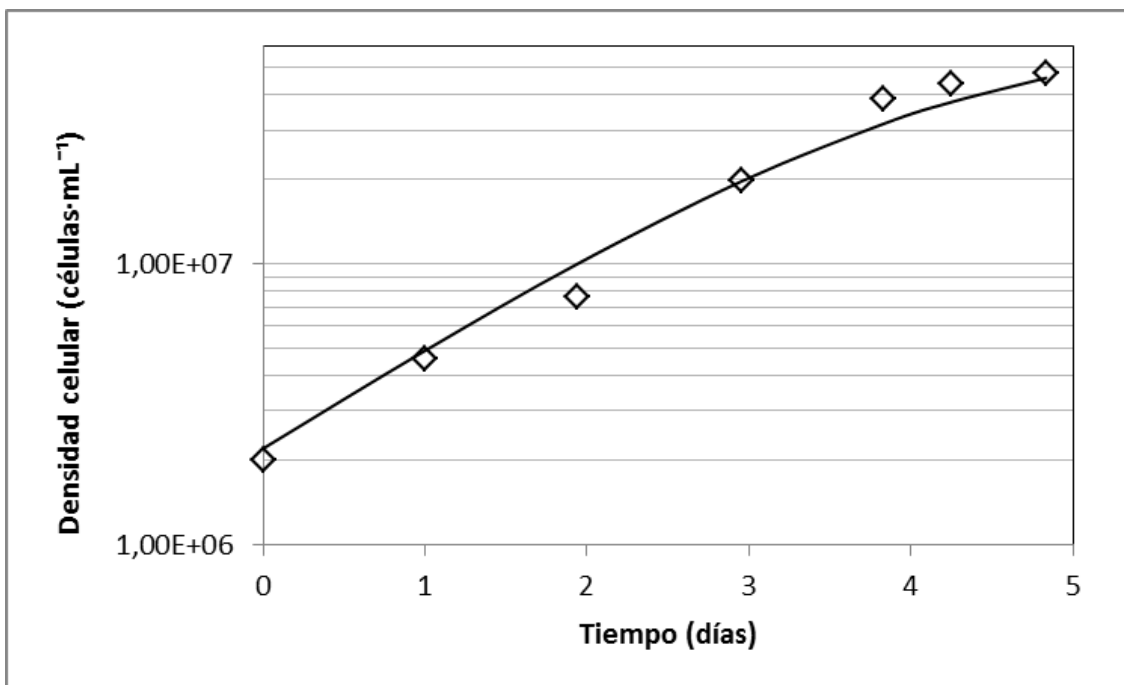
**Figura D.7** UE 7: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,858 \pm 0,063 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,984$ )



**Figura D.8** UE 8: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 1,20 vvm.  $\mu = 1,043 \pm 0,064 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,990$ )



**Figura D.9** UE 9: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,655 \pm 0,071 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,970$ )



**Figura D.10** UE 10: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,849 \pm 0,092 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,966$ )

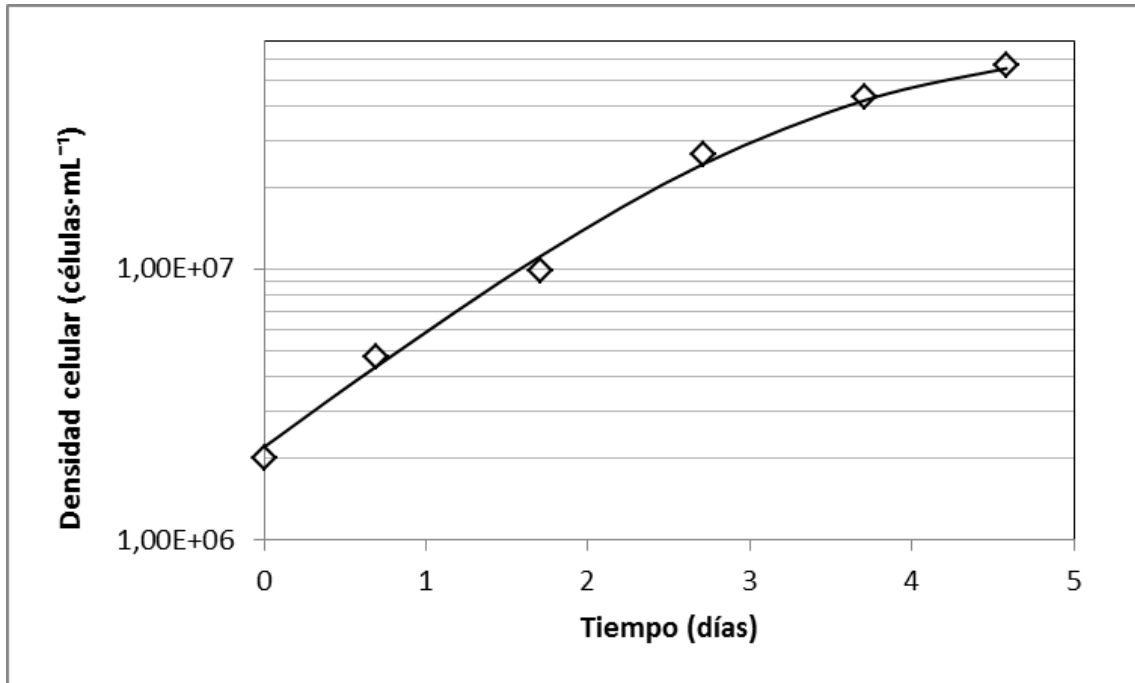


Figura D.11 UE 11: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 1,041 \pm 0,078 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,990$ )

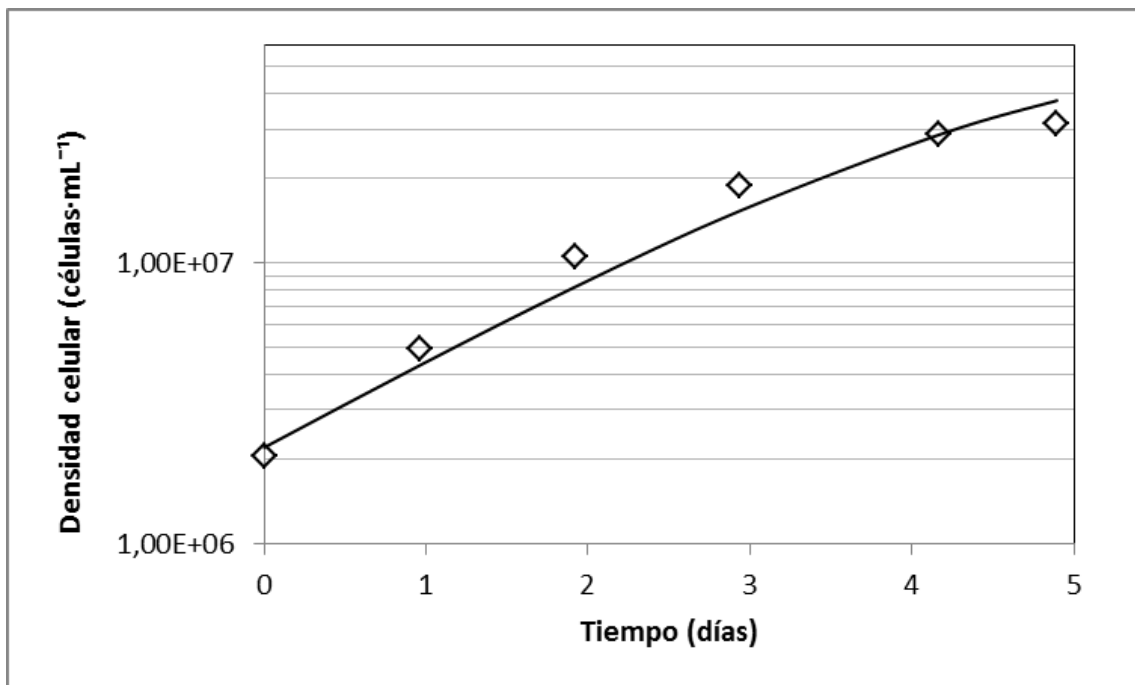
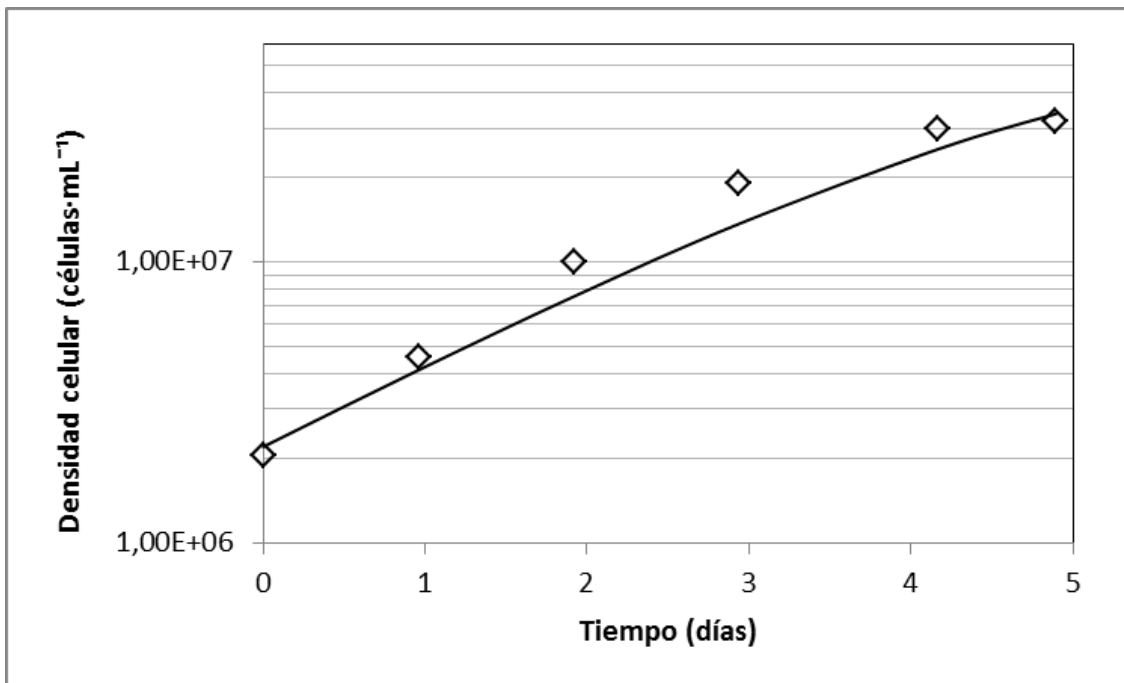
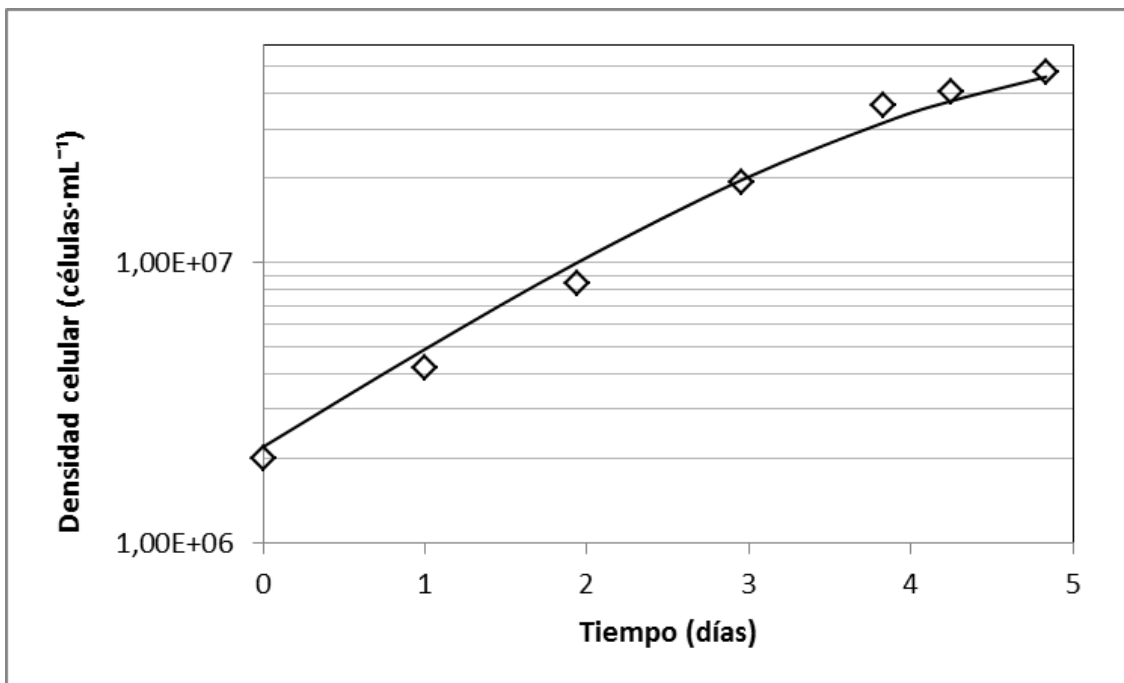


Figura D.12 UE 12: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,735 \pm 0,105 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,953$ )

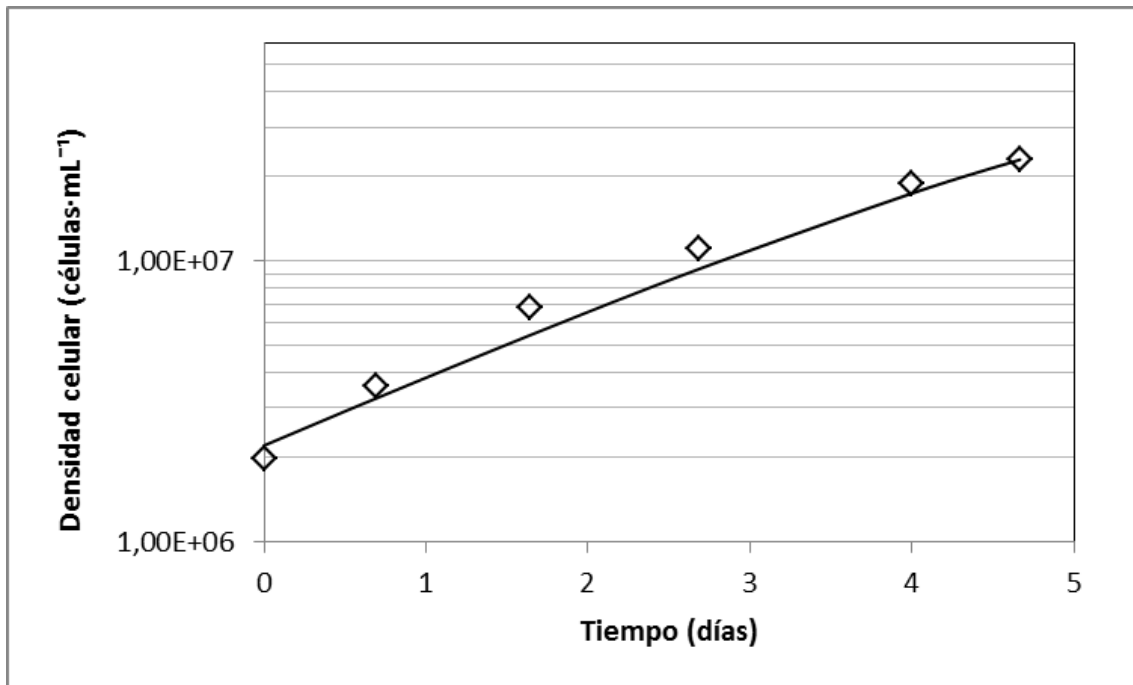


**Figura D.13** UE 13: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,741 \pm 0,094 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,963$ )

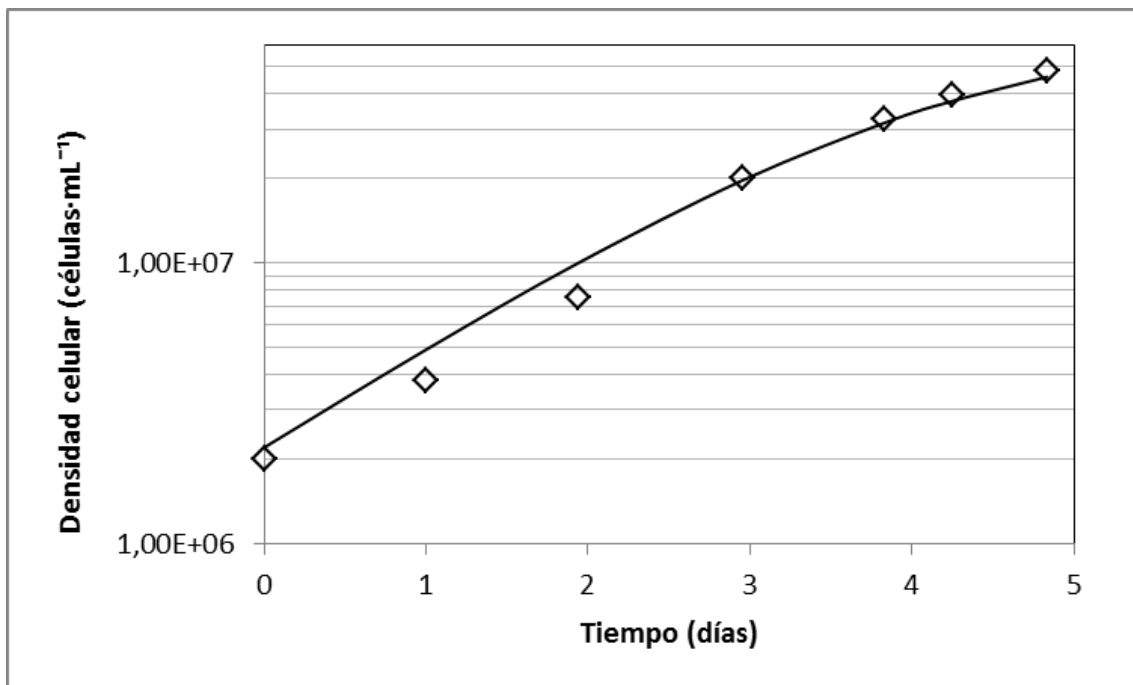


**Figura D.14** UE 14: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,843 \pm 0,067 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,981$ )





**Figura D.15** UE 15: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,03%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,607 \pm 0,052 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,981$ )



**Figura D.16** UE 16: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,819 \pm 0,087 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,966$ )

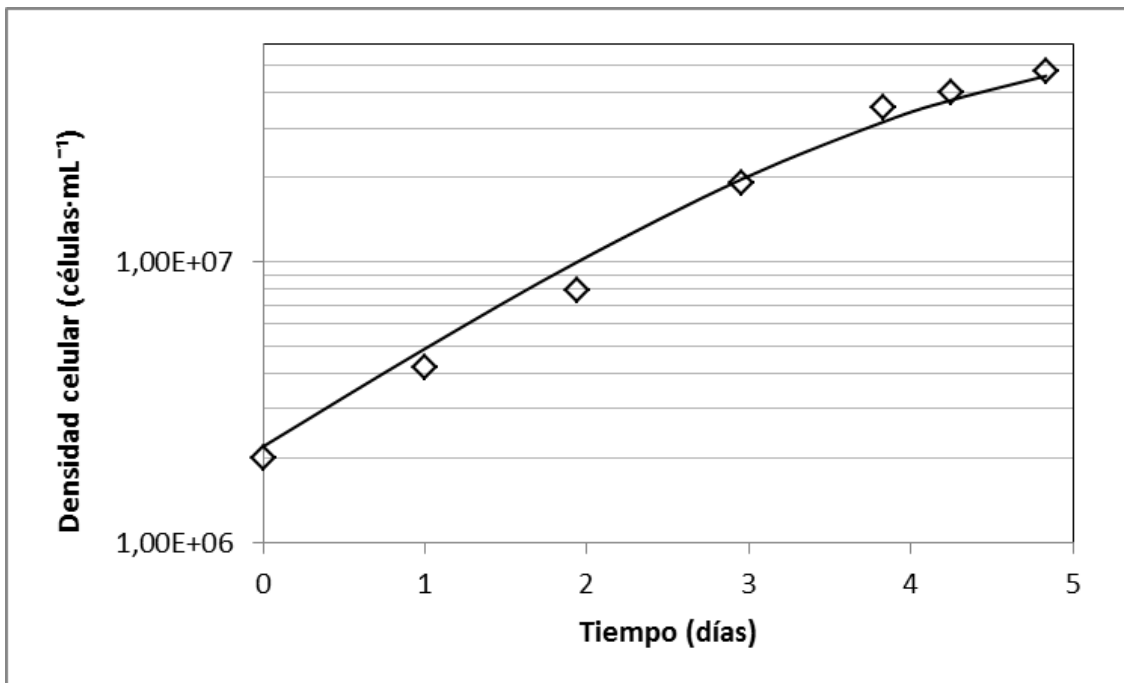


Figura D.17 UE 17: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,832 \pm 0,073 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,977$ )

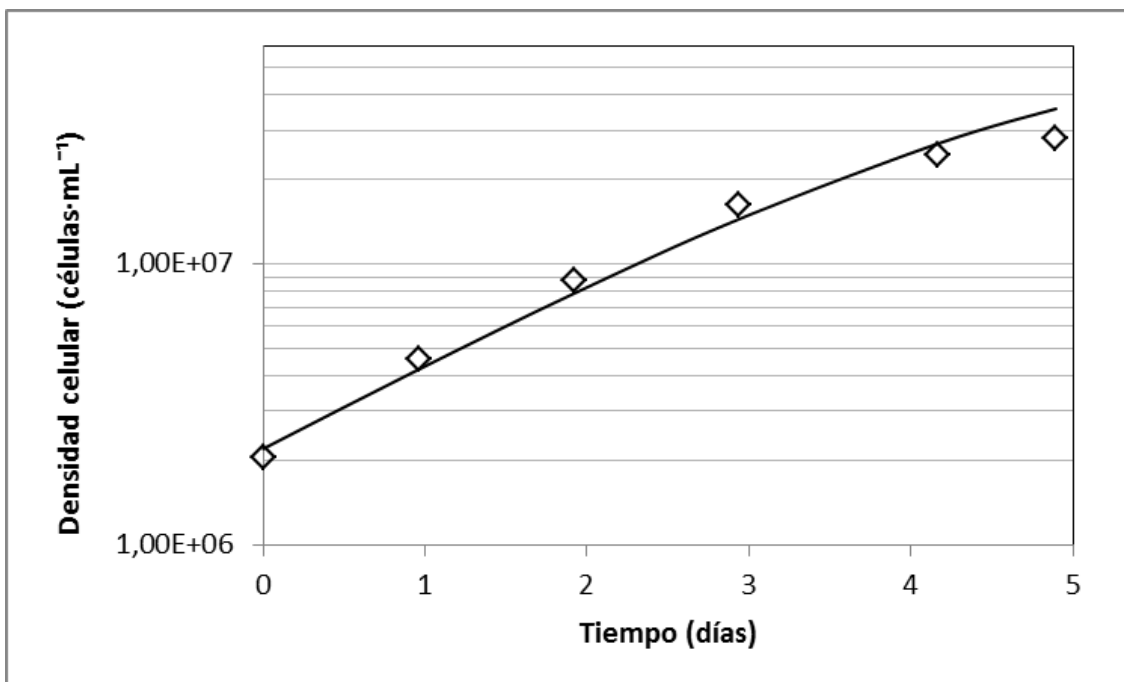
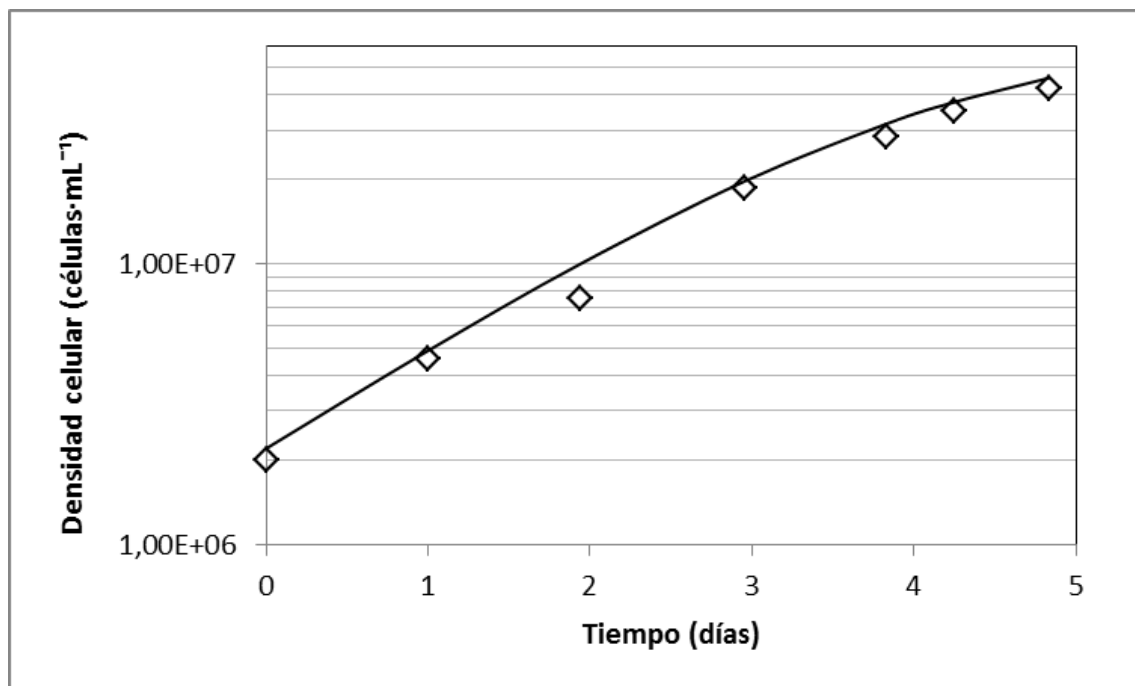
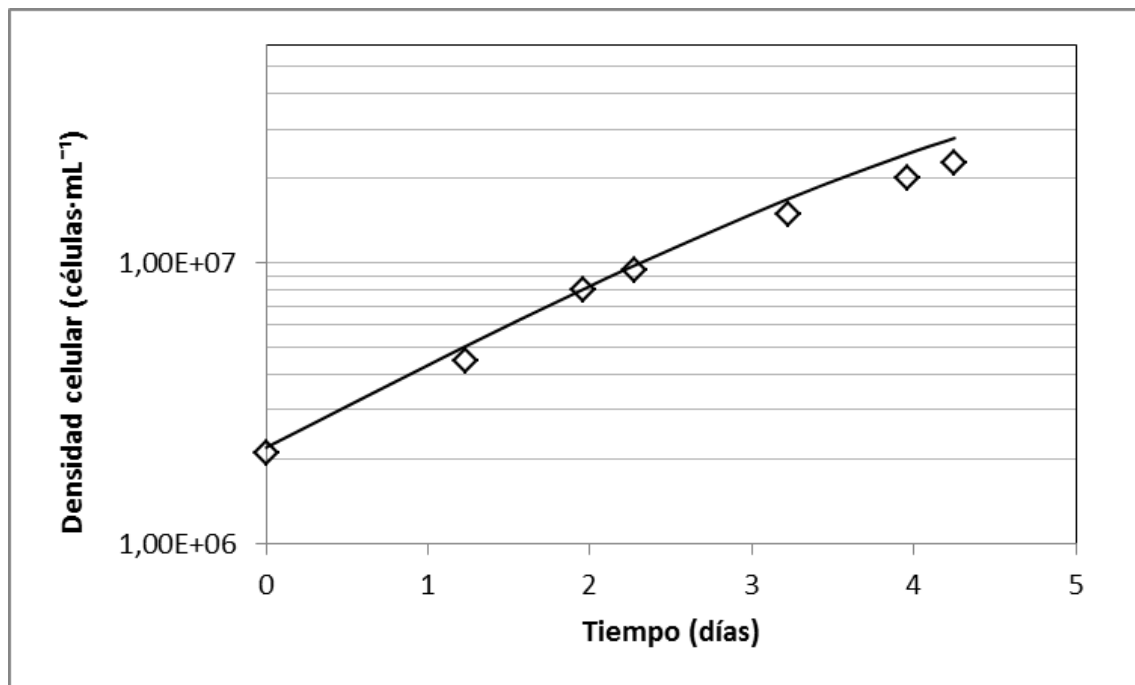


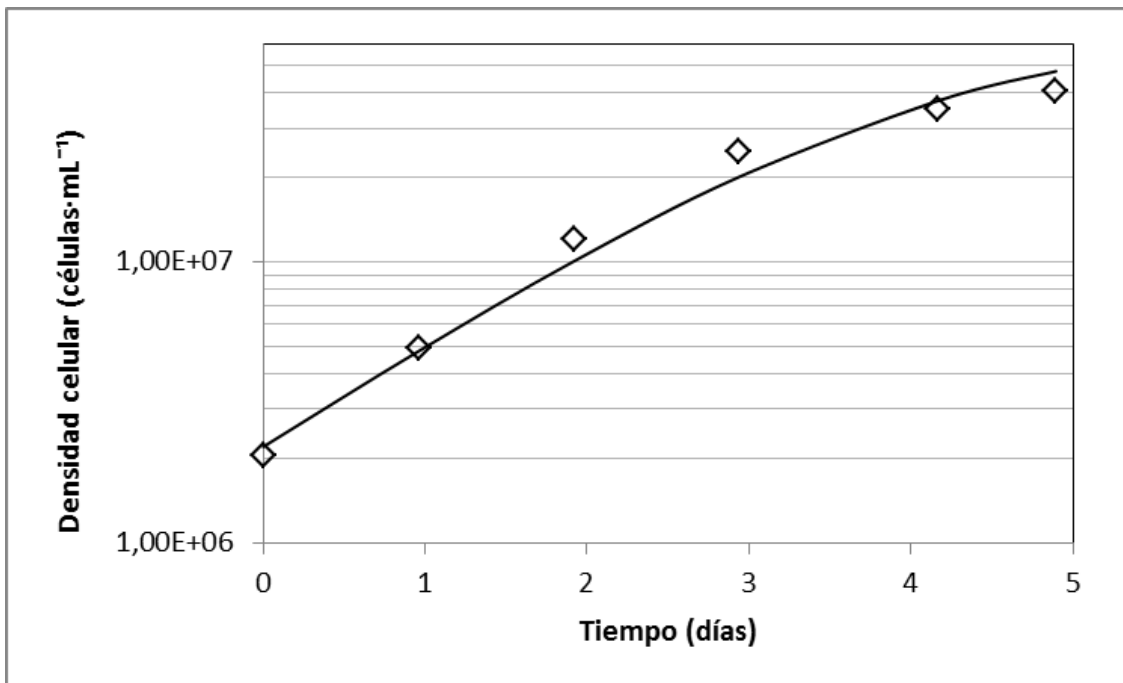
Figura D.18 UE 18: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,673 \pm 0,079 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,966$ )



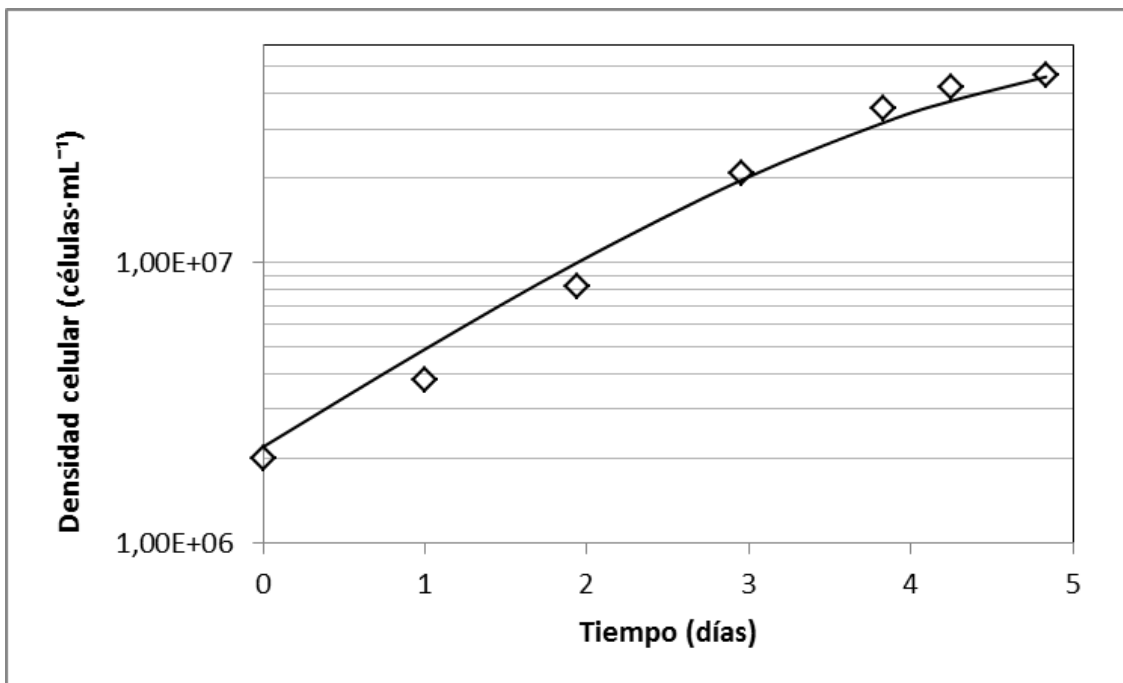
**Figura D.19** UE 19: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,785 \pm 0,047 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,988$ )



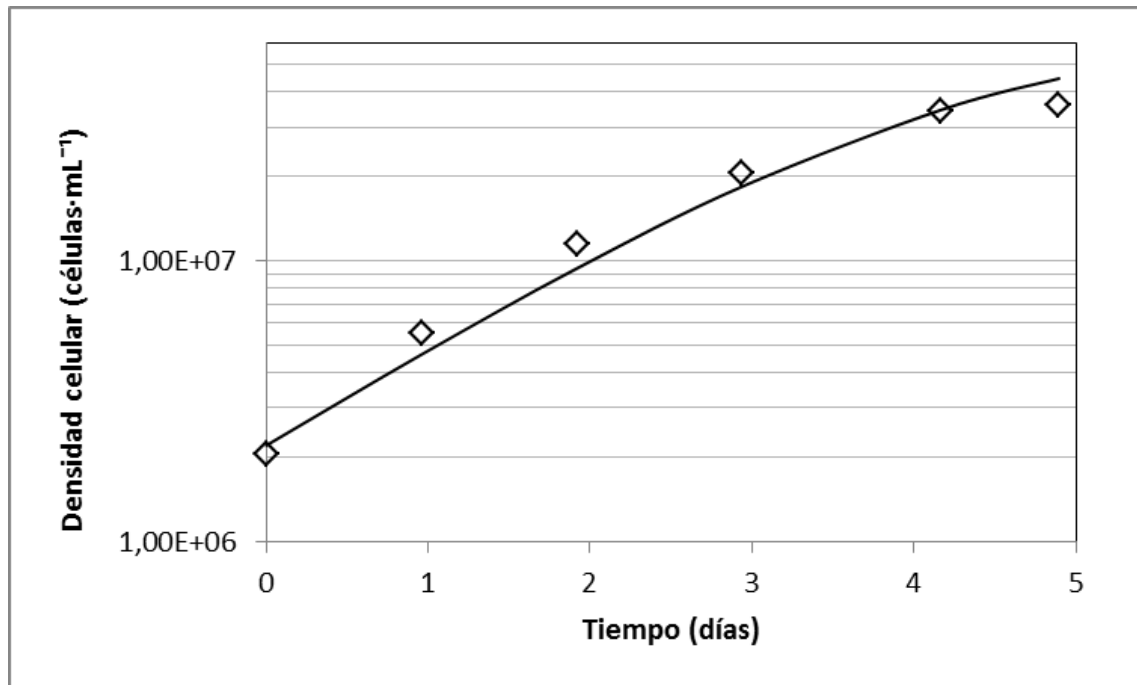
**Figura D.20** UE 20: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 22  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,647 \pm 0,028 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,993$ )



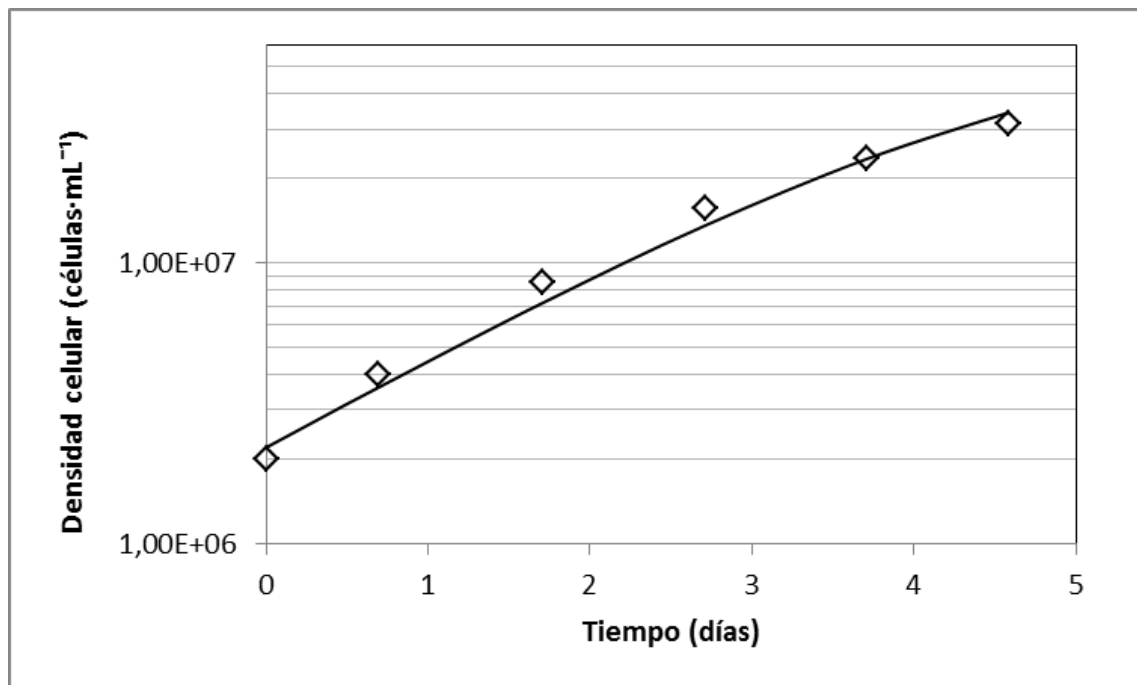
**Figura D.21** UE 21: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,857 \pm 0,108 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,969$ )



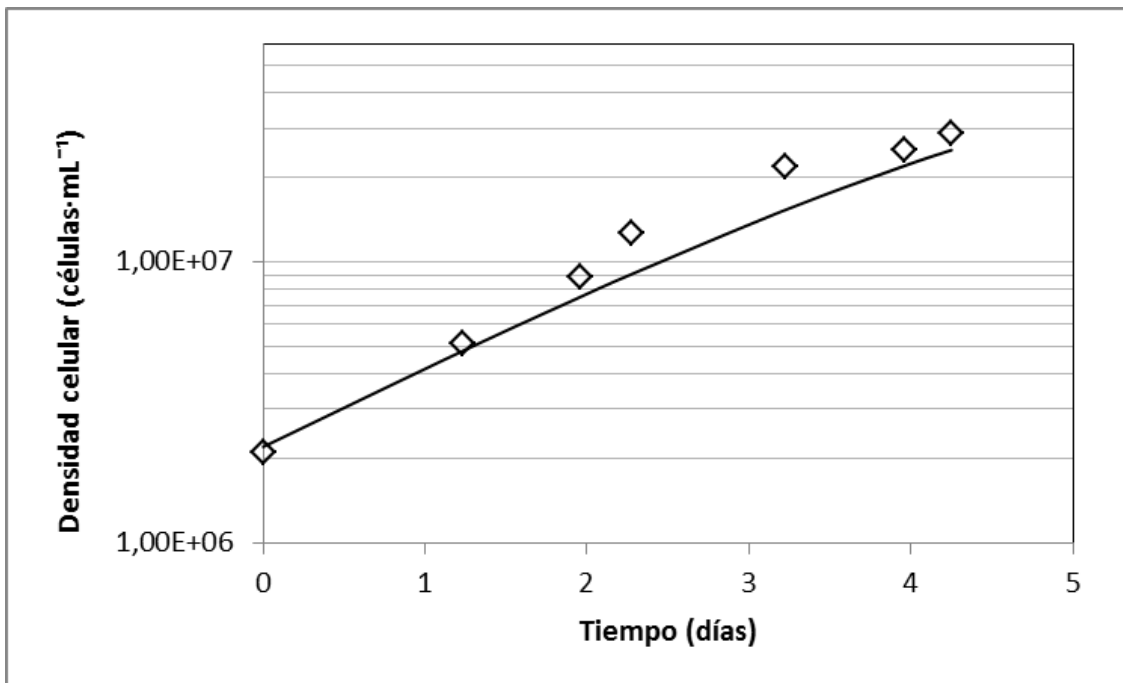
**Figura D.22** UE 22: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,843 \pm 0,087 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,969$ )



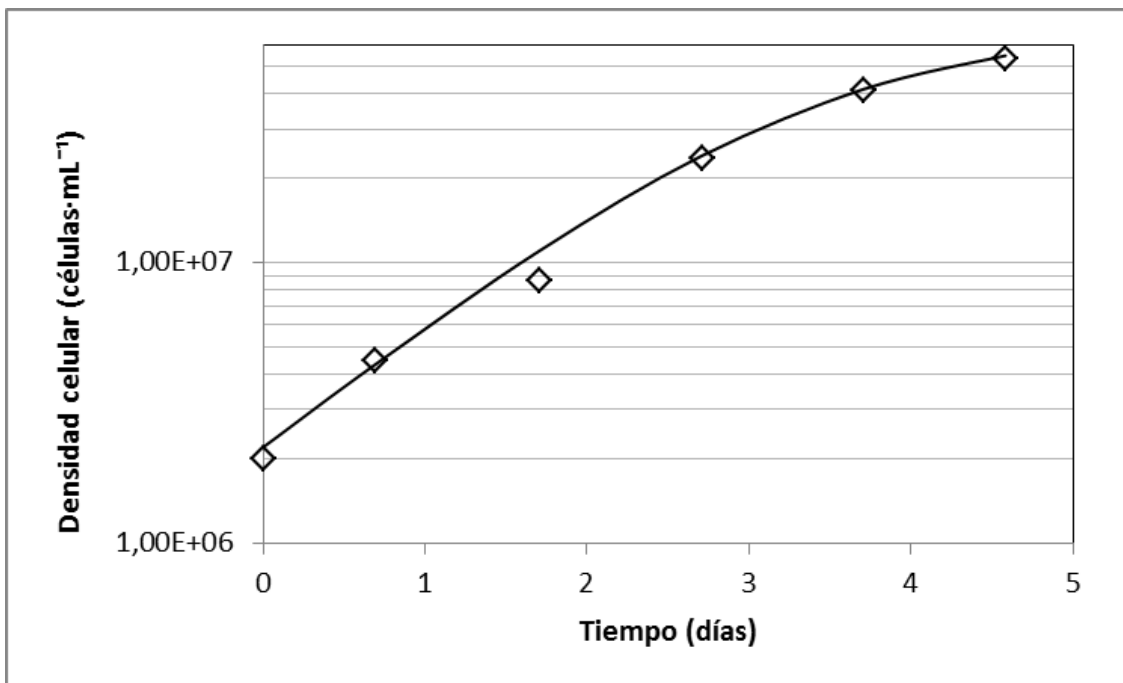
**Figura D.23** UE 23: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,805 \pm 0,109 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,962$ )



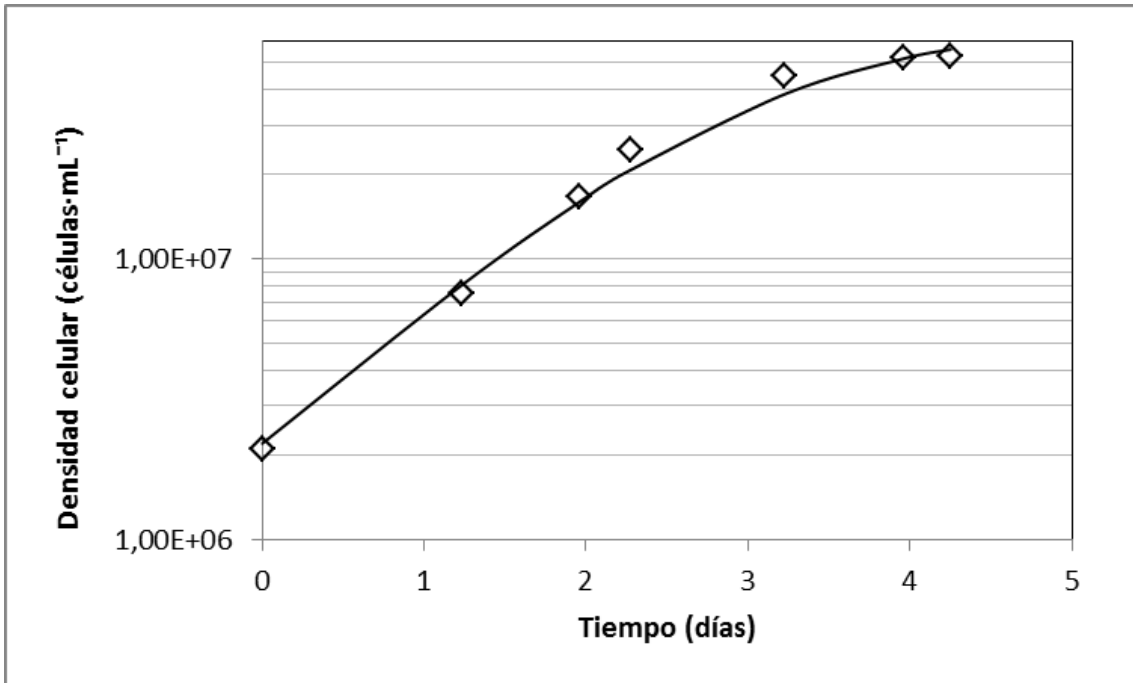
**Figura D.24** UE 24: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,749 \pm 0,068 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,980$ )



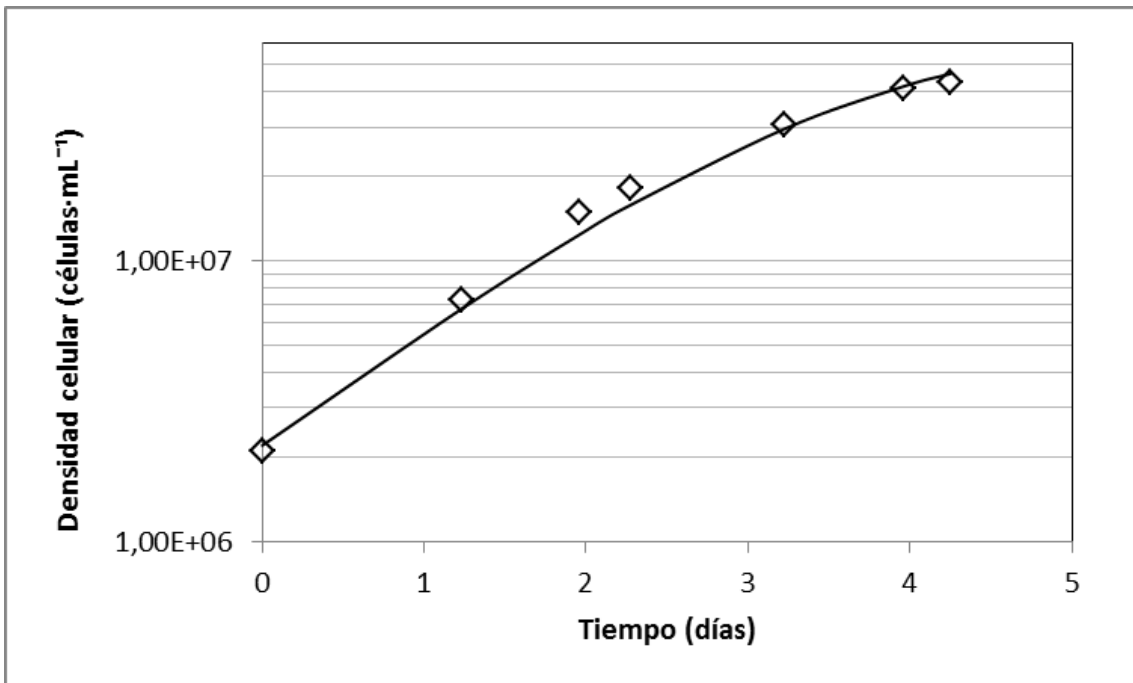
**Figura D.25** UE 25: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 12:12 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,752 \pm 0,053 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,982$ )



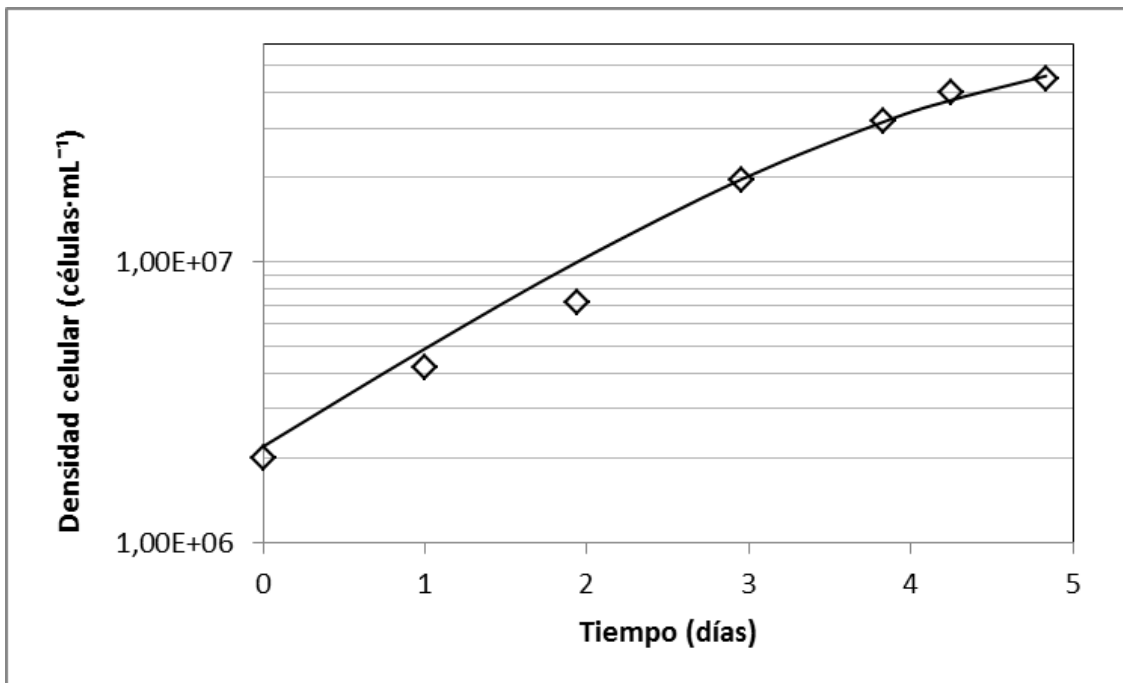
**Figura D.26** UE 26: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 15:9 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 0,981 \pm 0,086 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,986$ )



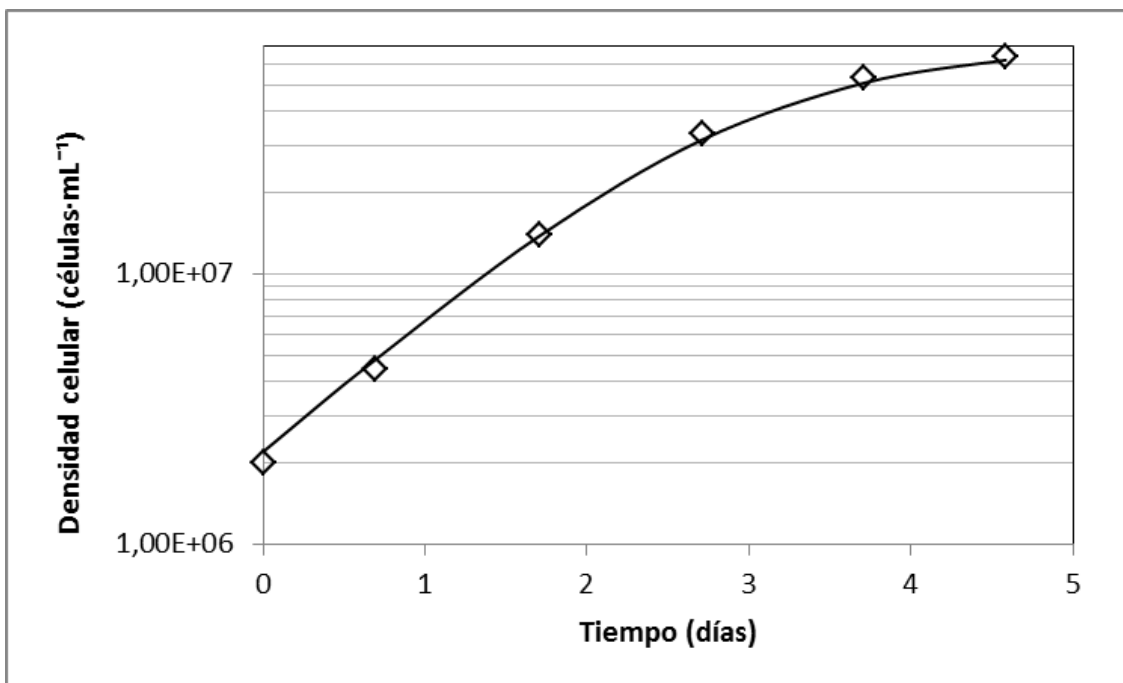
**Figura D.27** UE 27: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 1,168 \pm 0,071 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,992$ )



**Figura D.28** UE 28: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,992 \pm 0,060 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,990$ )

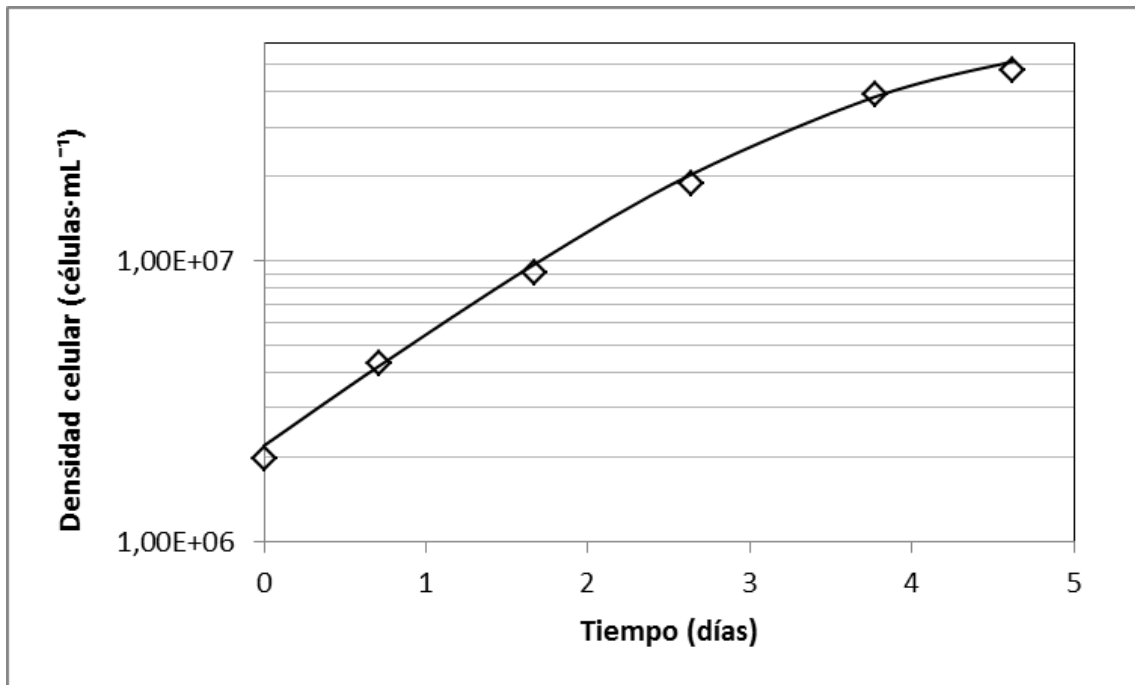


**Figura D.29** UE 29: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,808 \pm 0,081 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,969$ )

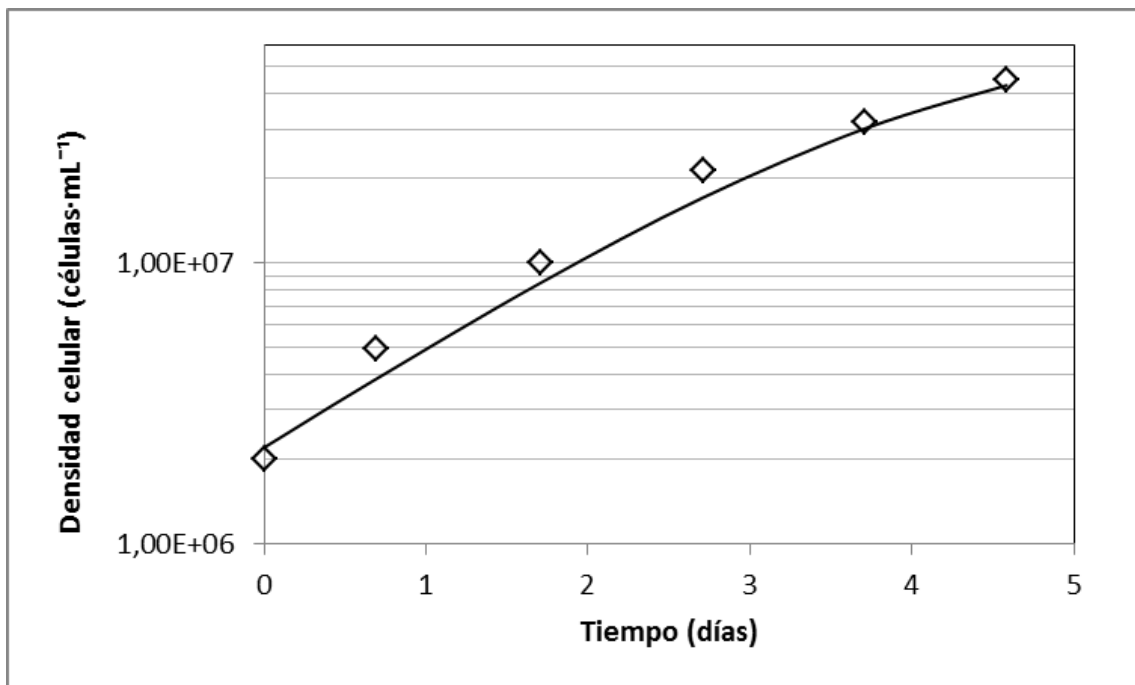


**Figura D.30** UE 30: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 91  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,85 vvm.  $\mu = 1,210 \pm 0,060 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,997$ )

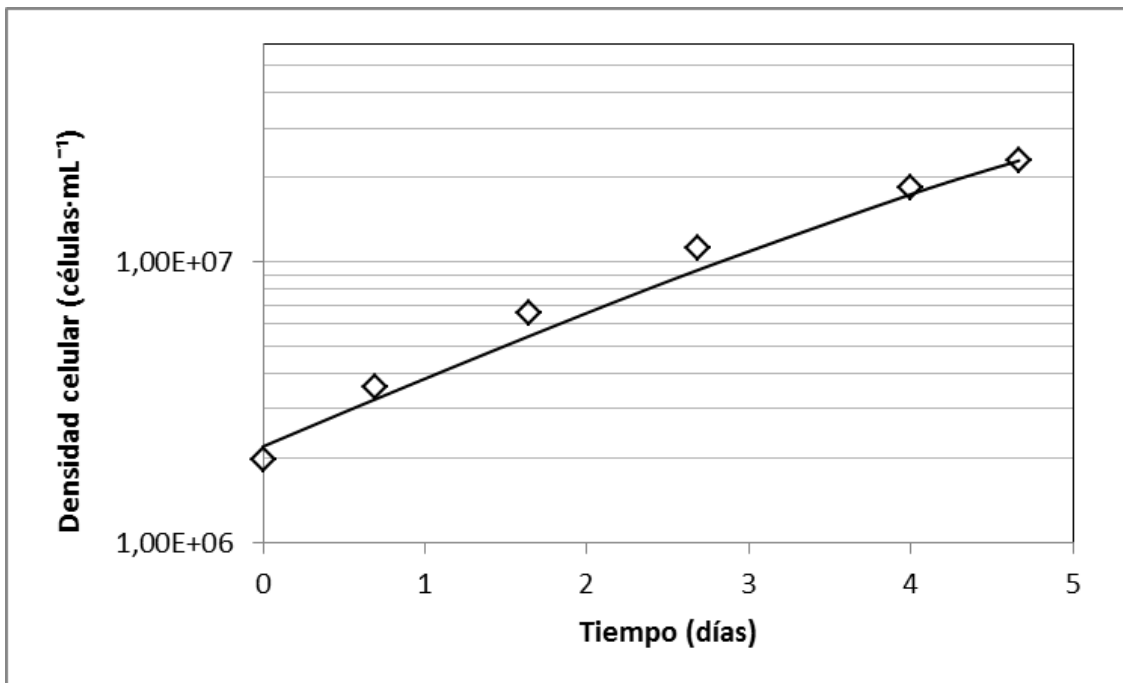




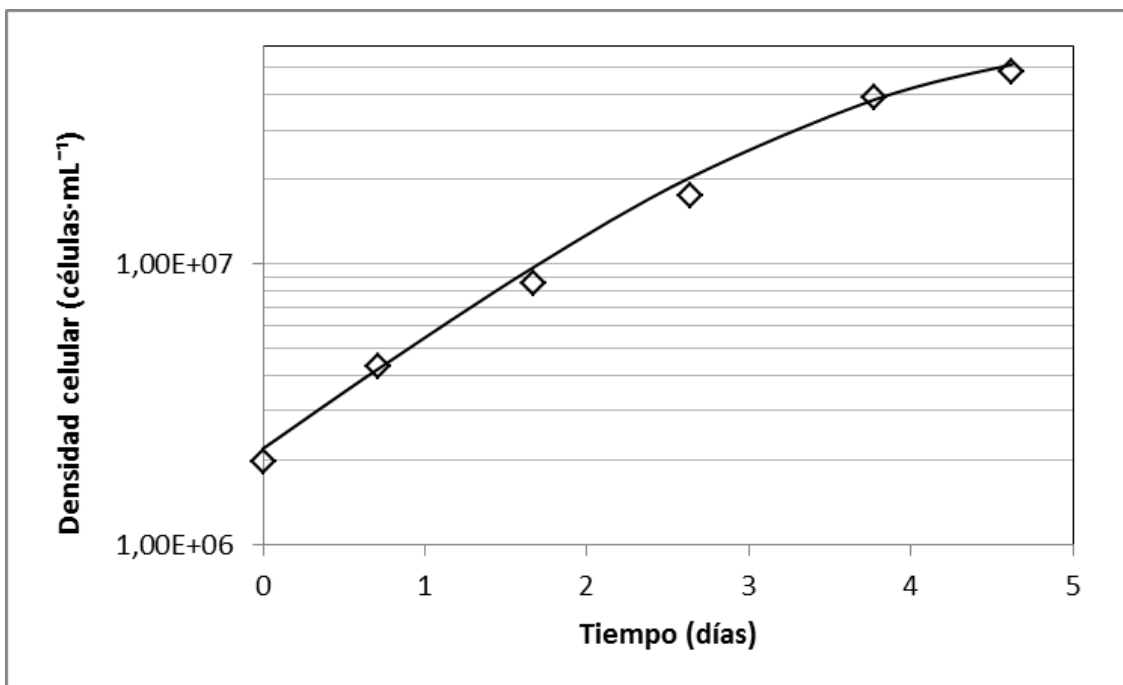
**Figura D.31** UE 31: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,932 \pm 0,050 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,994$ )



**Figura D.32** UE 32: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 1,5%, Irradiancia 45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 21:3 LO, Aireación 0,55 vvm.  $\mu = 0,914 \pm 0,080 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,984$ )

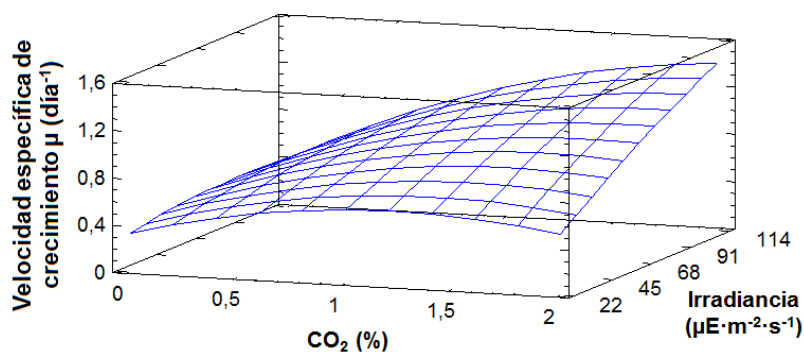


**Figura D.33** UE 33: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 0,03%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,609 \pm 0,056 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,978$ )

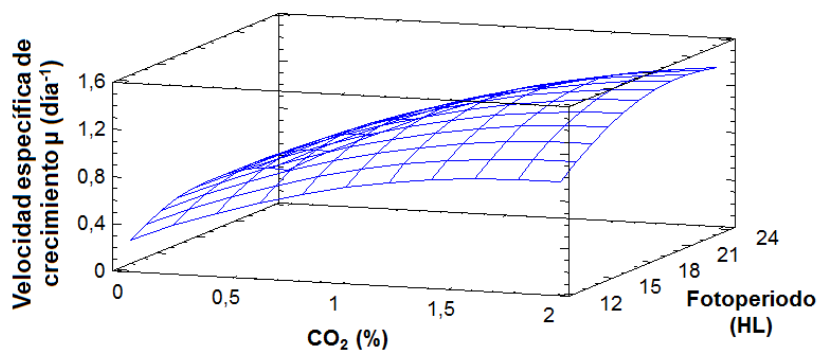


**Figura D.34** UE 34: Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 68  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 18:6 LO, Aireación 0,70 vvm.  $\mu = 0,915 \pm 0,062 \text{ día}^{-1}$  ( $R^2 = 0,991$ )

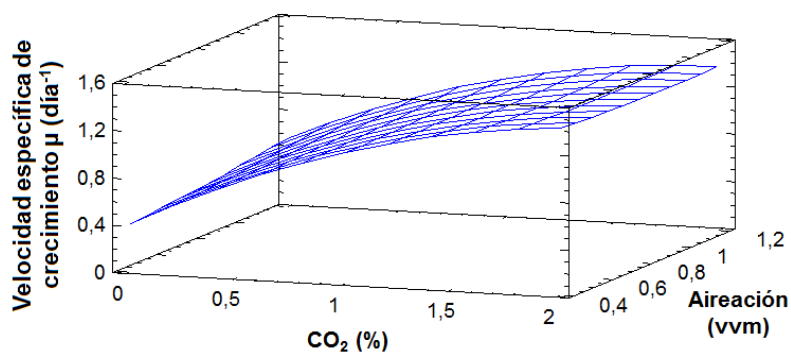
**Anexo E Modelos de superficies de respuesta del efecto del CO<sub>2</sub> y la luz sobre el crecimiento y acumulación de lípidos en *Chlorella vulgaris* LAUN 002**



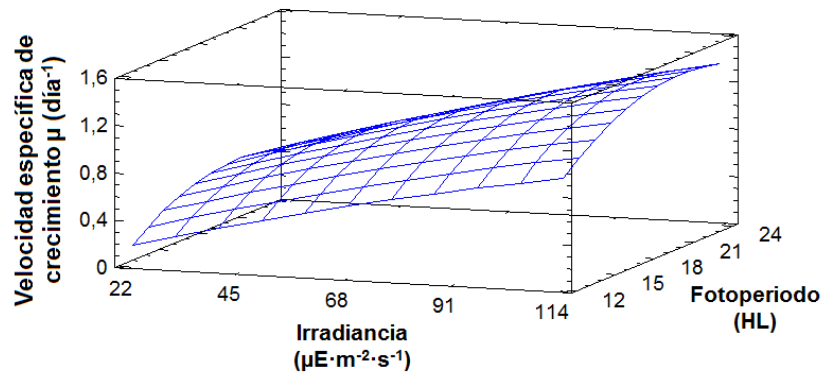
**Figura E.1** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, Fotoperiodo 22:2 LO, Aireación 1,20 vvm



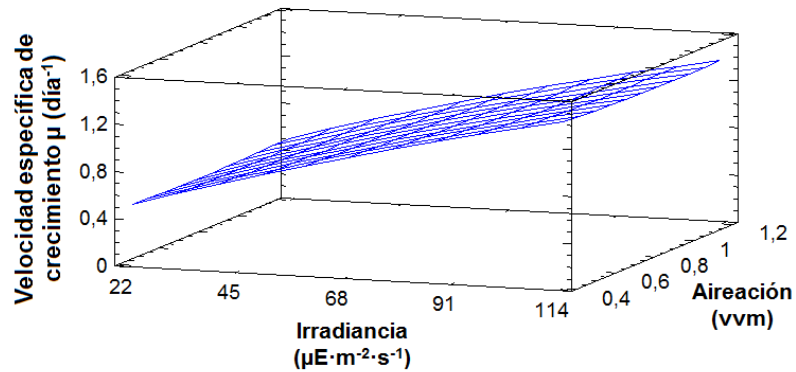
**Figura E.2** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Aireación 1,20 vvm



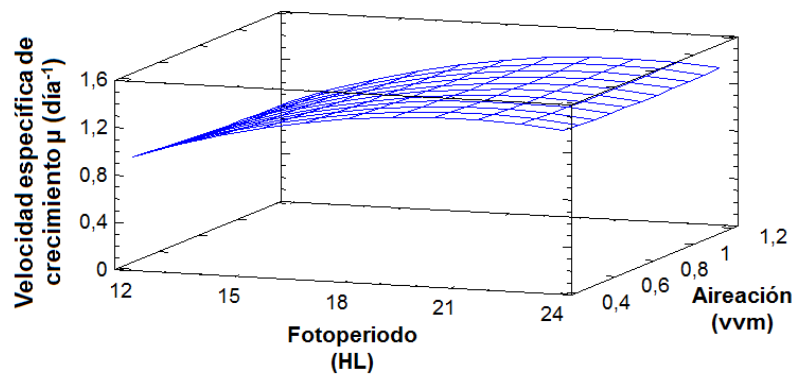
**Figura E.3** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Aireación 1,20 vvm



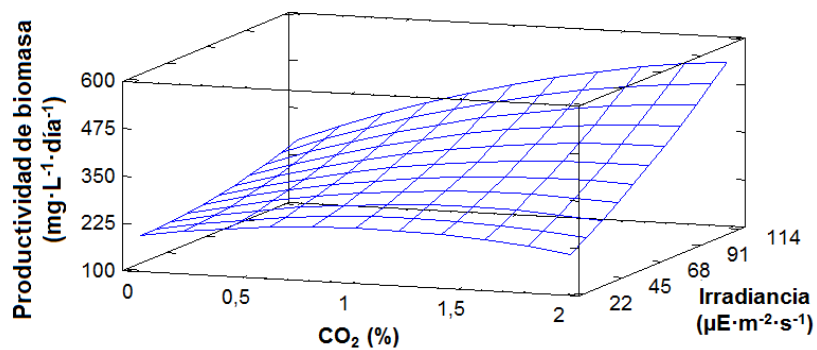
**Figura E.4** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Fotoperiodo 22:2 LO



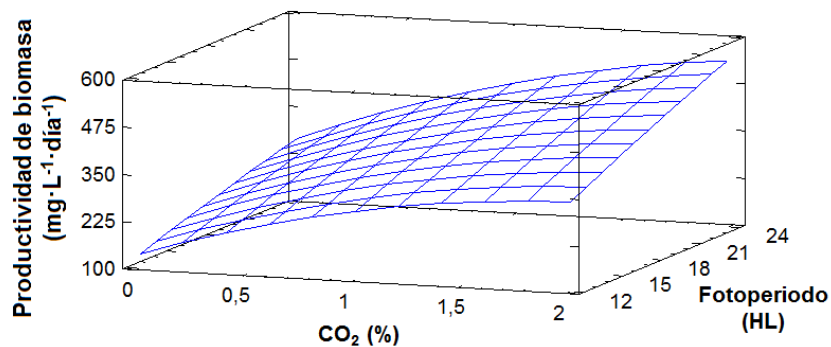
**Figura E.5** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Fotoperiodo 22:2 LO



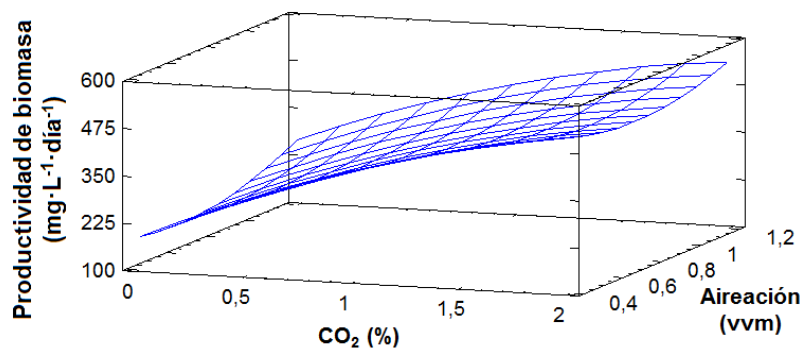
**Figura E.6** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



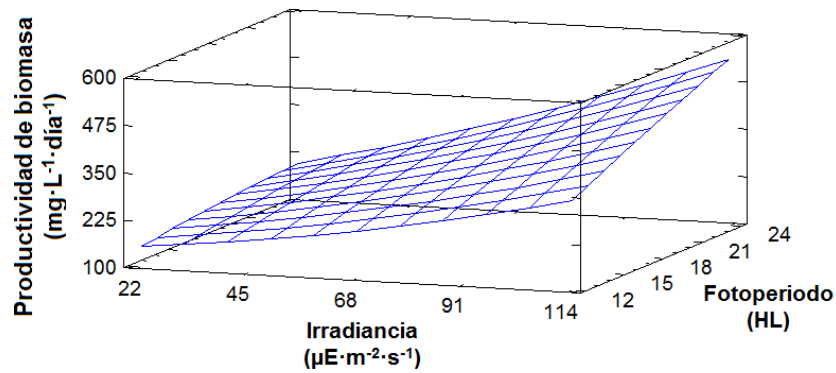
**Figura E.7** Productividad de biomasa ( $P_{bio}$ ), Temperatura 24°C, Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 1,20 vvm



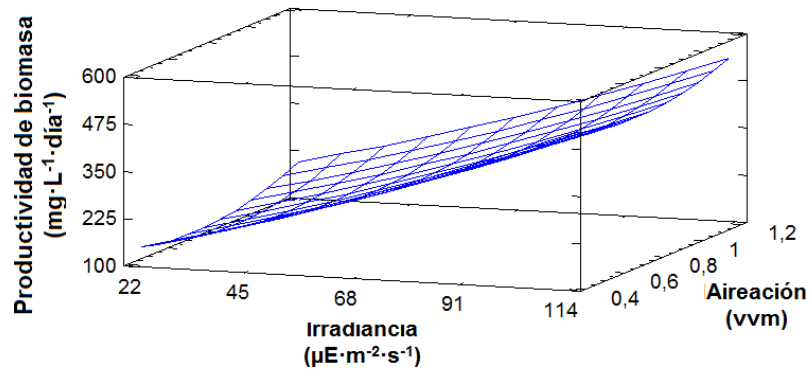
**Figura E.8** Productividad de biomasa ( $P_{bio}$ ), Temperatura 24°C, Irradiance 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Aireación 1,20 vvm



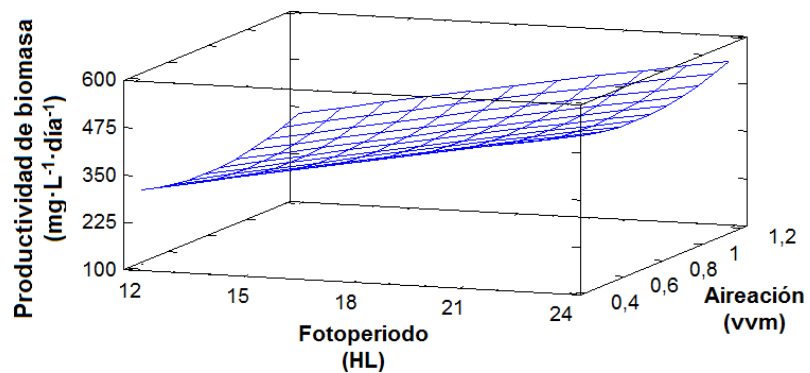
**Figura E.9** Productividad de biomasa ( $P_{bio}$ ), Temperatura 24°C, Irradiance 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO



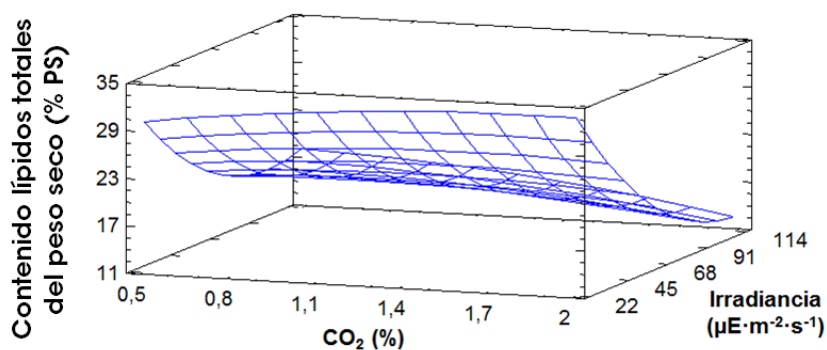
**Figura E.10** Productividad de biomasa (P<sub>bio</sub>), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Aireación 1,20 vvm



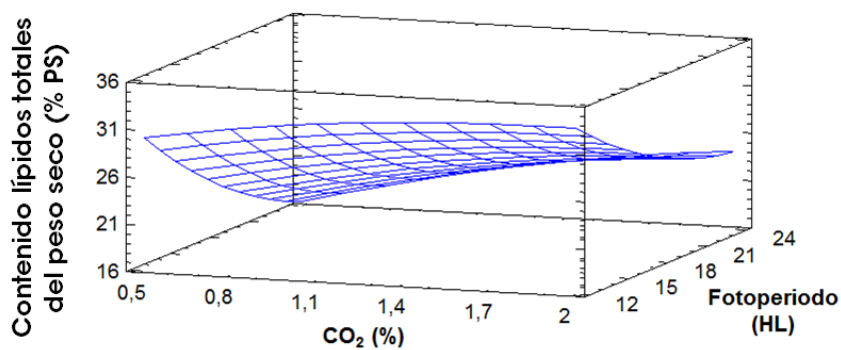
**Figura E.11** Productividad de biomasa (P<sub>bio</sub>), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Fotoperiodo 24:0 LO



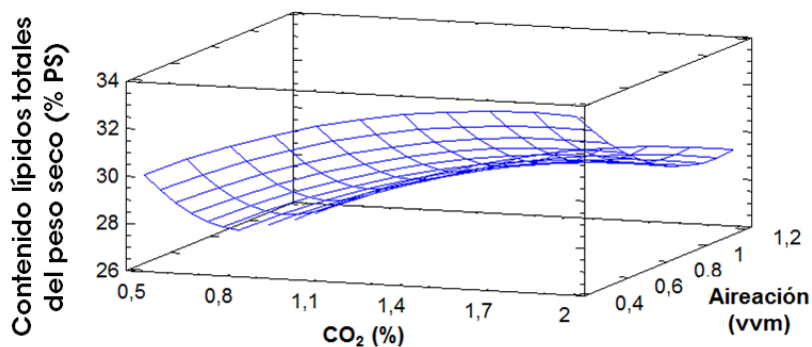
**Figura E.12** Productividad de biomasa (P<sub>bio</sub>), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 114 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>



**Figura E.13** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, Fotoperiodo 12:12 LO, Aireación 0,40 vvm

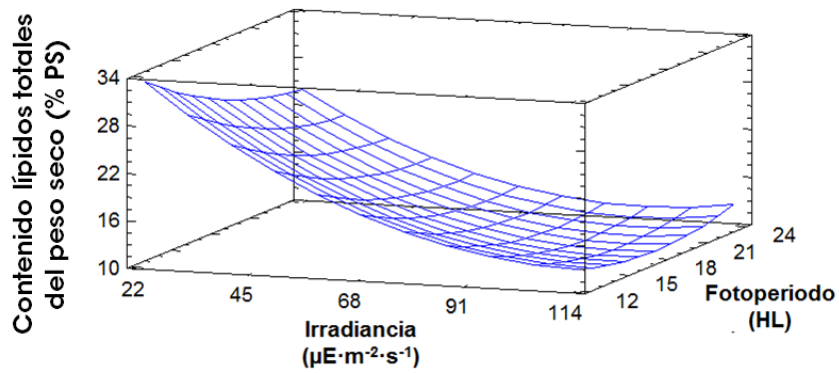


**Figura E.14** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, Irradiancia 22  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Aireación 0,40 vvm

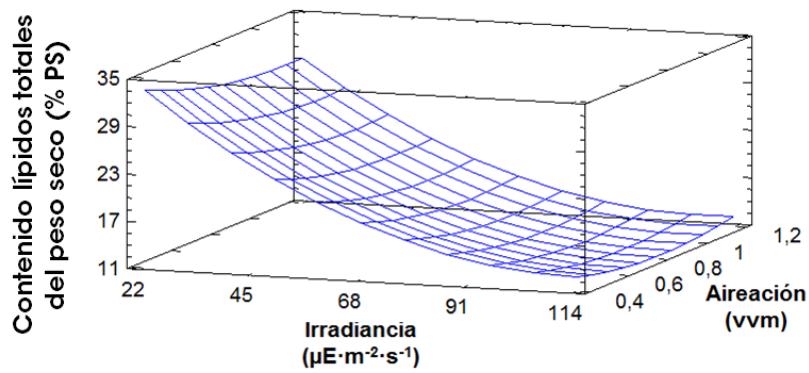


**Figura E.15** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, Irradiancia 22  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 12:12 LO

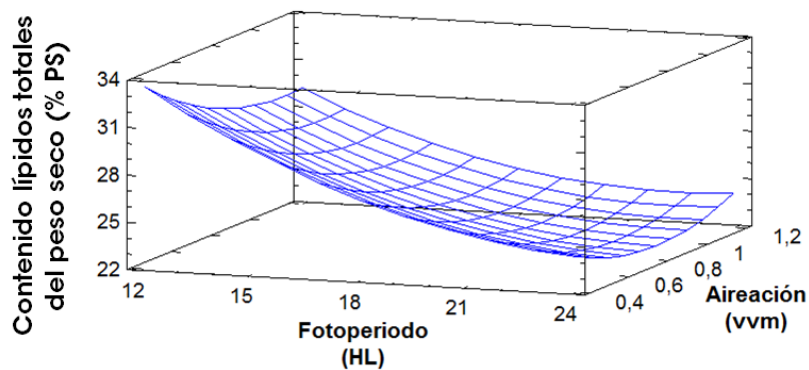




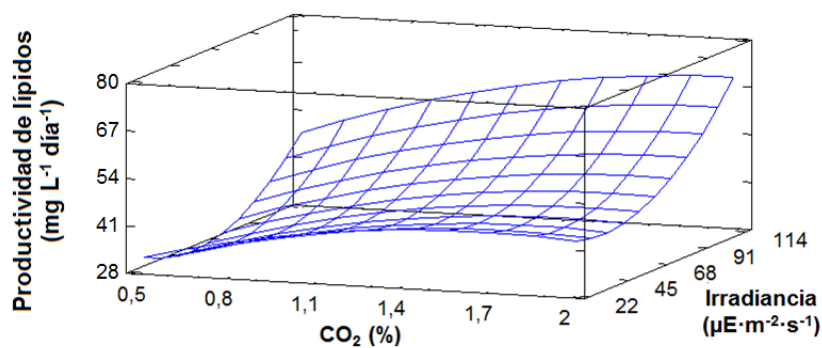
**Figura E.16** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Aireación 0,40 vvm



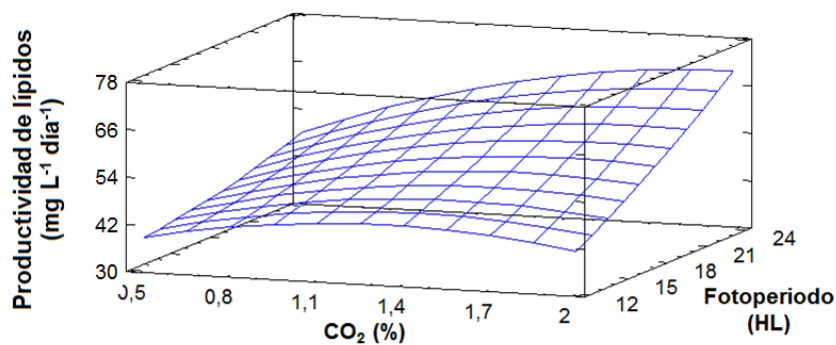
**Figura E.17** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Fotoperiodo 12:12 LO



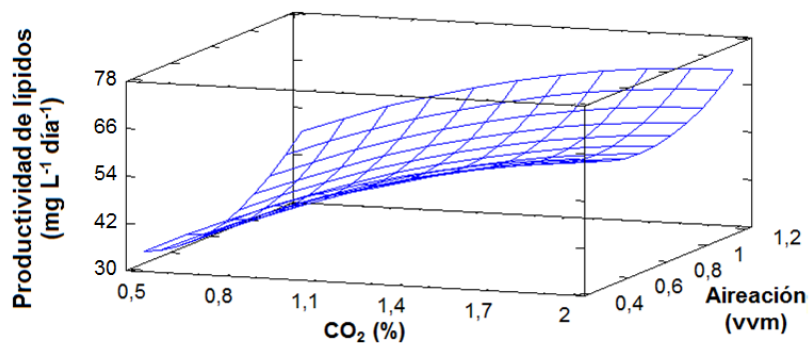
**Figura E.18** Contenido de lípidos totales del peso seco (% PS), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 22  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



**Figura E.19** Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, Fotoperiodo 24:0 LO, Aireación 1,20 vvm



**Figura E.20** Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Aireación 1,20 vvm



**Figura E.21** Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, Irradiancia 114  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Fotoperiodo 24:0 LO

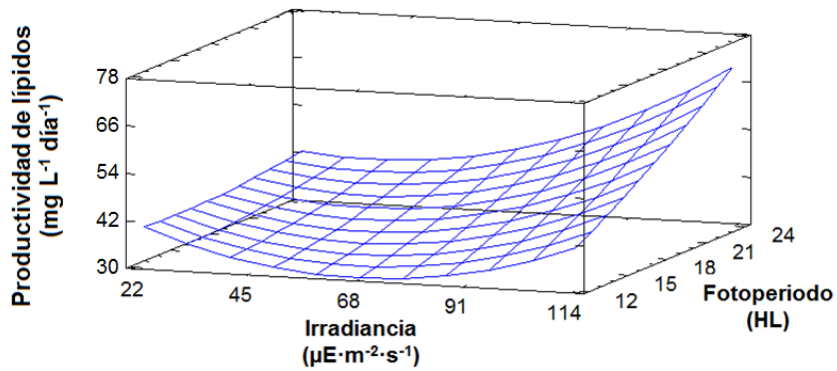


Figura E.22 Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Aireación 1,20 vvm

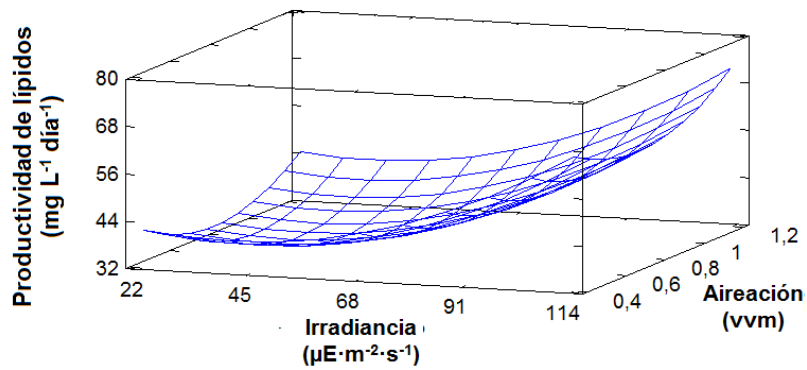


Figura E.23 Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Fotoperiodo 24:0 LO

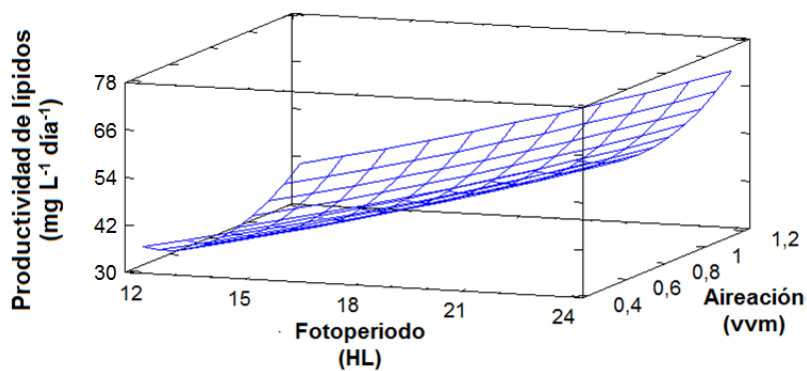


Figura E.24 Productividad de lípidos ( $P_{lip}$ ), Temperatura 24°C, CO<sub>2</sub> 2,0%, Irradiancia 114 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>



# Anexo F Comentarios jurados sustentación pública tesis

**Jurado Ing. Qco MSc. Dr. Juan Guillermo Cadavid Estrada**

- *Qué sigue?*
  - Escoger una zona en Colombia promisorio para el cultivo de microalgas para realizar cultivos que permitan establecer condiciones restantes de cultivo como el agua empleada.
  - Establecer la manera más adecuada de cultivo, es decir seleccionar un cultivo discontinuo, semicontinuo, continuo o por etapas, de tal manera que la productividad de lípidos sea optimizada
  - Buscar un proceso rentable para la recuperación de esos lípidos como puede ser la pirolisis
- *Se hizo estimativo de costos?*

No, debido a que se realizaron sólo ensayos a escala laboratorio, a la cual aún no se puede realizar un estimado de costos fiable.
- *La curva patrón del método colorimétrico se pudiera hacer con algo más estándar?*

Dado que en ensayos preliminares al igual que lo reporta la literatura, cada aceite tiene una curva característica, no se podría escoger un patrón único, lo ideal hubiera sido realizar la curva de calibración para cada microalga estudiada, sin embargo los costos asociados a obtener la biomasa necesaria para tal fin hacía de esto inviable, por tal razón se optó por aceptar la curva obtenida con aceite de *Chlorella vulgaris* como estándar para los ensayos realizados
- *En cromatografía se usó un FAMEMIX. Ya están estándares?*

Para realizar la caracterización de los aceites producidos por las microalgas se empleó el estándar FAMEMIX 35077, el cual cuenta con un alto número de metilesteres, exactamente 37, que van desde C4:0 hasta C22:6, adicionalmente el

cromatógrafo empleado tenía la sensibilidad adecuada para la detección de ellos. En cuanto al protocolo de derivatización que se siguió también pertenece al laboratorio de Toxicología de Veterinaria de la Universidad Nacional, quienes tienen estandarizado el protocolo empleado para muestras como las obtenidas en la presente tesis.

- *Salinidad del agua de mar.*

La salinidad fue medida desde un comienzo, a pesar que se sabía que ésta era alta se decidió continuar los ensayos debido a que por un error se pensó que el agua provenía de CENIACUA, sin embargo mucho tiempo después se confirmó que el agua en realidad era procedente de la bahía de Santa Marta. El agua resultó siendo de la bahía, lo cual podría explicar la alta salinidad.

- *Cuál es el efecto de fijar  $X_0$  y  $X_{max}$ ?*

En el último objetivo dado que se ajustó el modelo logístico para determinar el efecto de las diferentes variables sobre el crecimiento, se decidió ajustar  $X_0$  para todas las unidades experimentales, lo significaba que en realidad dichas variables tendrían efecto sobre los parámetros restantes del modelo, es decir  $\mu$  y  $X_{max}$ , sin embargo se decidió fijar este último, dado que no fijar  $X_{max}$  en efecto conllevaría a una variación de éste en función de las variables estudiadas, haciendo que el análisis del crecimiento microalgal fuera más complejo y dado que la literatura raramente menciona  $X_{max}$  como un parámetro de importancia en el crecimiento se decidió fijar la respuesta de crecimiento en función de sólo  $\mu$ , el cual sí es ampliamente reportado en la literatura. Finalmente, los  $R^2$  obtenidos al fijar este parámetro fueron superiores al 95% como se observa en el Anexo D, lo cual fue satisfactorio.

- *La composición de los ácidos grasos cambia con las diferentes condiciones?*

En efecto se tiene esa hipótesis, para lo cual para estudios posteriores de tiene planeado realizar la caracterización de los aceites obtenidos.

### **Jurado Ing. Qco MSc. Dr. Mario Enrique Velásquez Lozano**

- *Que llevo a pensar desde el inicio la ecuación de primer orden en la cinética de disrupción?*

EL modelo de disrupción empleado es el resultado de una revisión bibliográfica, en la cual tanto artículos de investigación como libros de bioseparación coinciden en que es un modelo cinético adecuado para la disrupción celular.

- *Cómo determinó la eficiencia de extracción?*

La razón principal de realizar la cinética de disrupción fue poder calcular la eficiencia de extracción, dado que si se alcanzaba una disrupción del 90% de las células después de 10 minutos de sonicación y se realizaba la extracción se podría suponer que el 90% de los lípidos intracelulares podrían ser despojados de manera satisfactoria, lo anterior se pudo comprobar visualmente, pues el alga quedaba blanca y la fase orgánica verde.

- *Al realizar la sonicación experimentó formación de emulsión?*

La formación de emulsión sólo sucedía si la sonicación se realizaba a una muestra con dos fases presentes: fase orgánica y fase acuosa, lo cual lo observé en ensayos preliminares, sin embargo para los métodos de extracción seguidos, la disrupción por sonicación de las microalgas se hacía en sólo una de las fases, por lo cual para dichos procesos de extracción no hubo formación de emulsión.

- *Por qué se usó cloroformo si hay restricción de uso?*

La mezcla de solventes cloroformo – metanol es la que mayor eficiencia de extracción reporta la literatura, por lo cual fue necesario su uso. Con el objetivo de contrarrestar su efecto negativo en el medio ambiente, más exactamente en la capa de ozono, se decidió trabajar con la menor cantidad de solventes posible. Adicional a lo anterior se seleccionó una mezcla de solvente con menor impacto en la salud y el medio ambiente, sin embargo su eficiencia de extracción no fue la misma, por lo cual se recomendaría para estudios posteriores evaluar solventes con características similares a las del cloroformo, como la polaridad, pero con un menor impacto en el medio ambiente.

- *Injusto con el Soxhlet: por qué no se realizó disrupción?*

No se realizó disrupción dado que el protocolo no lo exigía, dado que la extracción Soxhlet emplea el suministro de calor como facilitador de la extracción. Sin embargo para estudios posteriores podría realizarse una disrupción celular previa a la extracción, sin embargo considero poco eficiente la extracción Soxhlet dado que es un proceso que requiere mayor cantidad de solvente y además es un proceso lento pues tarda alrededor de las 7 horas, en comparación con el propuesto por el Bligh & Dyer, el cual no tarda más de 1 hora.

- *Chlorella hay mucha diferencia entre la literatura. Por qué?*

La literatura reporta una gran variabilidad con respecto a la microalga *Chlorella*, esto es debido principalmente a que este género de microalga cuenta con un gran número

de especies, las cuales pueden crecer en una gran variedad de condiciones, como la salinidad, pues existen cepas marinas y de agua dulce.

- *El seguimiento del crecimiento celular se hizo por microscopía o por absorbancia? Por qué no uno solo?*

En el segundo objetivo dado que eran pocas muestras el seguimiento por microscopía y cámara de Neubauer era viable, sin embargo en el tercer objetivo la cantidad de muestras aumentó considerablemente, por lo cual realizar el mismo método de seguimiento era impracticable, por lo cual se realizó una curva de calibración por espectrofotometría la tuvo un  $R^2$  de 99,9%, lo cual fue satisfactorio.

- *La aireación es importante, porque si no hay aireación, no hay transferencia de  $CO_2$  ni eliminación de oxígeno, ni siquiera respiración en el proceso cuando está en la etapa de condición oscura.*

En efecto la aireación fue importante, en el único momento en que el intervalo evaluado de ésta no tuvo efecto fue en la tasa de crecimiento, sin embargo para la acumulación y productividad de lípidos si tuvo efecto, por tal razón se propone ampliar el intervalo estudiado, con el objetivo de encontrar un óptimo real de esta variable y así reducir sus costos.



# Bibliografía

- [1] He, Y., Wang, S. and Lai, K. K. (2009). Physical market determinants of the price of crude oil and the market premium. *Energy Economics*, 31(4), 537-549.
- [2] EIA. (2011). *The ABCs of crude supply disruptions*. (U.S. Energy Information Administration) Retrieved March 03, 2011, from <http://www.eia.doe.gov/oog/info/twip/twip.asp>
- [3] WashingtonPost. (2011). *Prices of crude oil and gasoline rise as violence in Libya upsets markets*. Retrieved March 03, 2011, from <http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2011/02/24/AR2011022404720.html>
- [4] Kaufmann, R. K. (2011). The role of market fundamentals and speculation in recent price changes for crude oil. *Energy Policy*, 39(1), 105-115.
- [5] Acosta, A. (2009, February 12). Biocombustibles: Oportunidad o Amenaza. *SEMINARIO INTERNACIONAL DE BIOCMBUSTIBLES 2009 CORPODIB*.
- [6] BP. (2011). *Statistical Review of World Energy 2011*. Retrieved January 23, 2012, from <http://www.bp.com/sectionbodycopy.do?categoryId=7500&contentId=7068481>
- [7] ANH. (2009). *Mega de la ANH 2020*. Recuperado el 16 de Junio de 2009, de <http://www.anh.gov.co/media/ANH/mega.pdf>
- [8] IEA. (2011). *Key World Energy Statistics*. (International Energy Agency) Retrieved January 23, 2012, from [http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2011/key\\_world\\_energy\\_stats.pdf](http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2011/key_world_energy_stats.pdf)
- [9] Rodriguez, C., Andrade, J. and Luz, J. (2009). Biodiesel CO<sub>2</sub> emissions: A comparison with the main fuels in the Brazilian market. *Fuel Processing Technology*, 90(2), 204-211.
- [10] Razo, C., Astete Miller, S., Saucedo, A. and Ludeña, C. (2007). *Biocombustibles y su impacto potencial en la estructura agraria, precios y empleo en América Latina*. Santiago de Chile: División de Desarrollo Productivo y Empresarial CEPAL.
- [11] Balat, M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 1479–1492.

- 
- [12] CONPES. (2008). *COMPES 3510 Lineamientos de política para promover la producción sostenible de biocombustibles en Colombia*. Bogotá: Departamento Nacional de Planeación.
- [13] Wilcove, D. S. and Koh, L. P. (2010). Addressing the threats to biodiversity from oil-palm agriculture. *Biodiversity and Conservation*, 19(4), 999-1007.
- [14] Sander, K. and Murthy, G. S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 15(7), 704-714.
- [15] Nigam, P. S. and Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
- [16] Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- [17] Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416.
- [18] Brennan, L. and Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- [19] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. and Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38-46.
- [20] Fon Sing, S., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A. and Reza Moheimani, N. (2011). Production of biofuels from microalgae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, Article in Press.
- [21] Berberoglu, H., Gomez, P. S. and Pilon, L. (2009). Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 110(17), 1879-1893.
- [22] Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy Biochemistry and Biotechnology*. New York: Taylor & Francis Group.
- [23] Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A. and Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491-515.
- [24] Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y. and Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1), S75-S77.

- [25] Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X. and Dou, C. (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(7), 1215-1224.
- [26] Inouye, L. S. and Lotufo, G. R. (2006). Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. *Talanta*, 70(3), 584-587.
- [27] Yoo, C., Jun, S.-Y., Lee, J.-Y., Ahn, C.-Y. and Oh, H.-M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 101(1), S71-S74.
- [28] Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M. R. (2009). Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- [29] Griffiths, M. J. and Harrison, S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
- [30] Doan, T. T., Sivaloganathan, B. and Obbard, J. P. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 2534-2544.
- [31] Lin, Q. and Lin, J. (2011). Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, 102(2), 1615-1621.
- [32] Liu, Z.-Y., Wang, G.-C. and Zhou, B.-C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4717-4722.
- [33] UPME. (2010). *Atlas de Radiación Solar de Colombia*. Retrieved January 25, 2012, from [http://www.upme.gov.co/Docs/Atlas\\_Radiacion\\_Solar/1-Atlas\\_Radiacion\\_Solar.pdf](http://www.upme.gov.co/Docs/Atlas_Radiacion_Solar/1-Atlas_Radiacion_Solar.pdf)
- [34] TodaColombia. (2007). *Radiación Solar de Colombia*. Retrieved August 18, 2011, from <http://www.todacolombia.com/geografia/radiacion.html>
- [35] TodaColombia. (2011). *Hidrografía de Colombia*. Retrieved February 28, 2012, from <http://www.todacolombia.com/geografia/hidrografiacolombia.html>
- [36] Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525-1536.
- [37] Ugwu, C., Aoyagi, H. and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021-4028.

- 
- [38] Kunjapur, A. M. and Eldridge, R. B. (2010). Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(8), 3516–3526.
- [39] Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M. and Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1).
- [40] Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J. and Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81.
- [41] Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 177(4), 272-280.
- [42] Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Chen, C.-H., Kuan, T.-C., Ong, S.-C. and Lin, C.-S. (2008). Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389-3396.
- [43] Behrens, P. W. (2005). Chapter 13 Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae. In R. Andersen, *Algal Culturing Techniques* (Vol. I, pp. 189-204). Guangzhou, China: Elsevier Inc.
- [44] Yeh, K.-L., Chang, J.-S. and Chen, W.-m. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 201-208.
- [45] Ugwu, C. U., Aoyagi, H. and Uchiyama, H. (2007). Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica*, 45(2), 309-311.
- [46] Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J. and Ramezanpour, Z. (2011). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41-49.
- [47] EIA. (2012). *World Crude Oil Prices*. (U.S. Energy Information Administration) Retrieved April 09, 2012, from [http://tonto.eia.doe.gov/dnav/pet/pet\\_pri\\_spt\\_s1\\_d.htm](http://tonto.eia.doe.gov/dnav/pet/pet_pri_spt_s1_d.htm)
- [48] NOAA. (2012). *National oceanic and atmospheric administration*. Retrieved January 23, 2012, from <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>
- [49] EPA. (2012). *Climate Change*. (United States Environmental Protection Agency) Retrieved January 23, 2012, from <http://www.epa.gov/climatechange/basicinfo.html>

- [50] Sims, R. E., Mabee, W., Saddler, J. N. and Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570-1580.
- [51] Packer, M. (2009). Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy*, 37(9), 3428-3437.
- [52] Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- [53] Demirbas, A. and Demirbas, M. F. (2010). *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. London: Springer.
- [54] Bulushev, D. A. and Ross, J. R. (2011). Catalysis for conversion of biomass to fuels via pyrolysis and gasification: A review. *Catalysis Today*, 171(1), 1-13.
- [55] Drapcho, C. M., Nhuan, N. P. and Walker, T. H. (2008). *Biofuels Engineering Process Technology* (Vol. I). New York: McGraw Hill.
- [56] Feofilova, E. P., Sergeeva, Y. E. and Ivashechkin, A. A. (2010). Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(4), 369-378.
- [57] Mekhilef, S., Siga, S. and Saidur, R. (2011). A review on palm oil biodiesel as a source of renewable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(4), 1937-1949.
- [58] Basha, S. A., Gopal, K. R. and Jebaraj, S. (2009). A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7), 1628-1634.
- [59] Moser, B. R. (2009). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(3), 229-266.
- [60] Narváez, P. C., Sánchez, F. J., Torres, J. A. and Ponce de León, L. F. (2004). Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos: variables asociadas al proceso de transformación. *Ingeniería e Investigación*, 55, 41-50.
- [61] Sharma, Y. and Singh, B. (2009). Development of biodiesel: Current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7), 1646-1651.
- [62] Yusuf, N., Kamarudin, S. and Yaakub, Z. (2011). Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52(7), 2741-2751.
- [63] EPA. (2002). *A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions*. United States Environmental Protection Agency.

- 
- [64] Fedepalma. (2008). *Oferta y consumo aparente mundial de los 17 principales aceites y grasas*. Retrieved October 3, 2009, from [http://www.fedepalma.org/documen/2008/consumo\\_mundial.pdf](http://www.fedepalma.org/documen/2008/consumo_mundial.pdf)
- [65] FAO. (2011). *Food and Agricultural commodities production*. (Food and Agriculture Organization) Retrieved January 23, 2012, from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- [66] EIA. (2011). *International Energy Statistics*. Retrieved January 29, 2012, from <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/IEDIndex3.cfm?tid=79&pid=79&aid=1>
- [67] Hernández, E. B. (2008). Investigación en materias primas para biocombustibles. *Plan Biocom CORPODIB*. Bogotá.
- [68] Carlsson, A. S. (2009). Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie*, 91(6), 665-670.
- [69] Tan, K., Lee, K., Mohamed, A. and Bhatia, S. (2009). Palm oil: Addressing issues and towards sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(2), 420-427.
- [70] UPME. (2009). *Cadena de Petróleo 2009*. Retrieved January 29, 2012, from [http://www.upme.gov.co/Docs/CADENA\\_PETROLEO\\_2009.pdf](http://www.upme.gov.co/Docs/CADENA_PETROLEO_2009.pdf)
- [71] Fedebiocombustibles. (2011). *Cifras Informativas del Sector Biocombustibles - BIODIESEL*. Retrieved January 23, 2012, from <http://www.fedebiocombustibles.com/files/Cifras%20Informativas%20del%20Sector%20Biocombustibles%20-%20BIODIESEL%2823%29.pdf>
- [72] Benemann, J. R. (1997). CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion and Management*, 38(1), S475-S479.
- [73] Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. and Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- [74] Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C. Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707-718.
- [75] Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Lee, D.-J. and Chang, J.-S. (2011). Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems — A review. *Biotechnology Advances*, 29(2), 189-198.
- [76] Watanabe, M. M. (2005). Chapter 2: Freshwater Culture Media A. In R. Andersen, *Algal culturing techniques* (Vol. I, pp. 13-20). Guangzhou, China: Elsevier Inc.

- [77] Yeesang, C. and Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034-3040.
- [78] Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B. and Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499-4507.
- [79] Banerjee, A., Sharma, R. and Chisti, Y. (2002). *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3), 245-279.
- [80] Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. and Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166(1-2), 105-116.
- [81] Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500.
- [82] Serrano, L. M., Ramírez, D. M., Sierra, E. R., Scott, O. M., Álvarez, C. A., Torres, J. M., Narváez, P.C. and Godoy R.D. (2011). Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella vulgaris* LAUN 0019. *ITECKNE*, 8(1), 15-22.
- [83] Merchant, S. S., Allen, M. D., Kropat, J., Moseley, J. L., Long, J. C., Tottey, S. and Terauchi, A. M. (2006). Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 578-594.
- [84] Medina, M. (2003). *Montaje de un Fotobiorreactor a Escala Banco, tesis presentada a la Universidad Nacional, para optar al grado de Ingeniero Químico*. Bogotá.
- [85] Suh, I. S. and Lee, C.-G. (2003). Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), 313-321.
- [86] Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2004). *Brock, Biología de los microorganismos* (Vol. II). Madrid: Pearson Prentice Hall.
- [87] Xin, L., Hong-ying, H. and Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), 3098-3102.
- [88] Johnson, E. T. and Schmidt-Dannert, C. (2008). Light-energy conversion in engineered microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 26(12), 682-689.

- 
- [89] Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E. and Bux, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 377–382.
- [90] Singh, A., Singh Nigam, P. and Murphy, J. D. (2011). Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 26-34.
- [91] Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. and Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20-43.
- [92] Lee, Y.-K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13(4), 307-315.
- [93] Del Campo, J. A., García, M. and Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1163-1174.
- [94] Habib, M. A., Parvin, M., Huntington, T. C. and Hasan, M. R. (2008). *A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [95] Scheper, T. (1998). *Advances in biochemical engineering biotechnology: Bioprocess and alge reactor technology, apoptosis* (Vol. 59). Berlin: Springer.
- [96] Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M. and Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *101*(4), 1406-1413.
- [97] Christenson, L. and Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686-702.
- [98] Lardon, L., Hlias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P. and Bernard, O. (2009). Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6475-6481 .
- [99] Molina Grima, E., Ación Fernández, F. G., García Camacho, F. and Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 231-247.
- [100] Muñoz, R. and Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40(15), 2799-2815.
- [101] Sato, T., Usui, S., Tsuchiya, Y. and Kondo, Y. (2006). Invention of outdoor closed type photobioreactor for microalgae. *Energy Conversion and Management*, 47(6), 791-799.



- [102] Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R. and Frampton, D. M. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313.
- [103] Bligh, E. and Dyer, W. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- [104] Manirakiza, P., Covaci, A. and Schepens, P. (2001). Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 93-100.
- [105] Mendes, R. L., Fernandes, H. L., Coelho, J. P., Reis, E. C., Cabral, J. M., Novais, J. M. and Palavra, A. F. (1995). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53(1), 99-103.
- [106] Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.
- [107] Borthwick, K., Coakley, W., McDonnell, M., Nowotny, H., Benes, E. and Gröschl, M. (2005). Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *Journal of Microbiological Methods*, 60(2), 207-216.
- [108] Piyasena, P., Mohareb, E. and McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.
- [109] Marsh, J. B. and Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *The Journal of Lipid Research*, 7(4), 574-576.
- [110] Cheng, Y.-S., Zheng, Y. and VanderGheynst, J. S. (2011). Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids*, 46(1), 95-103.
- [111] Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47.
- [112] Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. and Watanabe, M. M. (2005). Appendix A Recipes for Freshwater and Seawater Media. In R. Andersen, *Algal Culturing Techniques* (Vol. I, pp. 429- 538). Guangzhou, China: Elsevier Inc.
- [113] Labconco. (2004). *A Guide to Freeze Drying for the Laboratory*. Kansas: Labconco Corporation.
- [114] ASTM. (2008). *ASTM C 613/C 613M – 97. Standard Test Method for Constituent Content of Composite Prepreg by Soxhlet Extraction*.

- [115] Gavand, M. R., McClintock, J. B., Amsler, C. D., Peters, R. W. and Angus, R. A. (2007). Effects of sonication and advanced chemical oxidants on the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta* and cysts, larvae and adults of the brine shrimp *Artemia salina*: A prospective treatment to eradicate invasive organisms from ballast water. *Marine Pollution Bulletin*, 54(11), 1777-1788.
- [116] Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., Ito, K. and Nozawa, H. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, 15(4), 319-324.
- [117] Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): 20 physiology, cell-biology, and biotechnology* (Vol. 1). Taylor & Francis.
- [118] Choonia, H. S. and Lele, S. (2011).  $\beta$ -Galactosidase release kinetics during ultrasonic disruption of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented Eleusine coracana. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 288-293.
- [119] Ranjan, A., Patil, C. and Moholka, V. S. (2010). Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(6), 2979-2985.
- [120] ICIS. (2012). *Indicative Chemical Prices A-Z*. Retrieved March 15, 2012, from <http://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-a-z/>
- [121] Fedepalma. (2012). *Indicadores económicos*. Retrieved April 09, 2012, from <http://www.fedepalma.org/>
- [122] Smith, V. H., Sturm, B. S., deNoyelles, F. J. and Billings, S. A. (2010). The ecology of algal biodiesel production. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(5), 301-309.
- [123] Petkov, G. and Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(5), 281-285.
- [124] Illman, A. M., Scragg, A. H. and Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631-635.
- [125] Widjaja, A., Chien, C.-C. and Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13-20.
- [126] Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 31(7), 1043-1049.

- [127] Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Tsai, M.-T., Ong, S.-C., Chen, C.-H. and Lin, C.-S. (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*, 100(2), 833-838.
- [128] Lin, Y.-H., Chang, F.-L., Tsao, C.-Y. and Leu, J.-Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2), 166-176.
- [129] Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. and Núñez-Cebrero, F. (2002). Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, 25(4), 207-216.
- [130] Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. and Ravishankar, G. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98(3), 560-564.
- [131] Choi, G.-G., Kim, B.-H., Ahn, C.-Y. and Oh, H.-M. (2010). Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*.
- [132] Nalewajko, C., Colman, B. and Olaveson, M. (1997). Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. *Environmental and Experimental Botany*, 37(2-3), 153-160.
- [133] Scragg, A., Illman, A., Carden, A. and Shales, S. (2010). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biotechnology Progress*, 26(3), 679-686.
- [134] Sasi, D., Mitra, P., Vigueras, A. and Hill, G. A. (2011). Growth kinetics and lipid production using *Chlorella vulgaris* in a circulating loop photobioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(6), 875-880.
- [135] Zittelli, G. C., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M. and Tredici, M. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 299-312.
- [136] Cho, S. H., Ji, S.-C., Hur, S. B., Bae, J., Park, I.-S. and Song, Y.-C. (2007). Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fisheries Science*, 73(5), 1050-1056.
- [137] Peña, V. and Pinilla, G. A. (2002). Composición, distribución y abundancia de la comunidad fitoplanctónica de la ensenada de Utría, Pacífico colombiano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37(1), 67-81.
- [138] Ramírez Barón, J., Franco Herrera, A., García Hoyos, L. and López, D. (2010). La comunidad fitoplanctónica durante eventos de surgencia y no surgencia, en la zona

- costera del Departamento del Magdalena, Caribe colombiano. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*, 39(2), 233-263.
- [139] Krienitz, L. and Wirth, M. (2006). The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*, 36(3), 204-210.
- [140] Gouveia, L. and Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269-274.
- [141] Cleber Bertoldi, F., Sant'Anna, E., da Costa Braga, M. V. and Barcelos Oliveira, J. L. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated. *Grasas y Aceites*, 57(3), 270-274.
- [142] Liu, C.-P. and Lin, L.-P. (2001). Ultrastructural Study and Lipid Formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42(3), 207-214.
- [143] George, S. B., Fox, C. and Wakeham, S. (2008). Fatty acid composition of larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata) might reflect FA composition of the diets. *Aquaculture*, 285(1-4), 167-173.
- [144] Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E. and Roussy, M. (2003). Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221(1-4), 393-406.
- [145] Osman, H., Suriah, A. and Law, E. (2001). Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chemistry*, 73(1), 55-60.
- [146] Simopoulos, A. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
- [147] Sirisansaneeyakul, S., Singhasuwan, S., Choorit, W., Phoopat, N., Garcia, J. L. and Chisti, Y. (2011). Photoautotrophic Production of Lipids by Some *Chlorella* Strains. *Marine Biotechnology*, 13(5), 928-941.
- [148] Chen, F. and Johns, M. R. (1991). Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 3(3), 203-209.
- [149] Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Su, H.-M., Lo, Y.-C., Chen, W.-M. and Chang, J.-S. (2010). Strategies to enhance cell growth and achieve high-level oil production of a *Chlorella vulgaris* isolate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 26(3), 679-686.
- [150] Jacob-Lopes, E., Gimenes Scoparo, C. H., Ferreira Lacerda, L. M. and Teixeira Franco, T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass

- production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306-310.
- [151] Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. and Volova, T. G. (2005). Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(3), 311–319.
- [152] Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131.