

## Estudio y aplicación de la microalga *Neochloris oleoabundans* para producir biodiésel

Cruz Colín María del Rocío<sup>1</sup>, Cruz Miguel Doralin, Contreras Larios José Luis<sup>2</sup>, Castañeda Briones María Teresa<sup>1</sup>, Ávila Jiménez Miguel<sup>1</sup>, Chávez Martínez Margarita

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Ciencias Básicas.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Energía.  
Avenida San Pablo No. 180. Colonia Reynosa Tamaulipas, México, D.F., CP 02200.

ccmr@correo.azc.uam.mx

Fecha de aceptación: 20 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

### RESUMEN

En este trabajo se estudió el proceso biológico para obtener biodiésel utilizando un cultivo de la microalga *Neochloris oleoabundans*, por su capacidad de sintetizar un alto contenido de lípidos. Se seleccionó un diseño de fotobiorreactor de tipo placa plana para garantizar una mayor área de iluminación y se utilizaron 2 para la experimentación. Las variables experimentales fueron aireación, luminosidad, fotoperiodo, temperatura y pH. La biomasa fue obtenida a condiciones fijas de temperatura de 26 °C, pH de 6.6 y un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 horas, durante 15 días. La producción de lípidos totales se determinó con la técnica de Feng, 2011. Para la obtención de biodiésel se realizó una reacción química de transesterificación utilizando como catalizador ácido clorhídrico metanólico (1 N) y como solvente hexano. La concentración de los lípidos extraídos en cada fotobiorreactor fue de 39 mg/L y 49 mg/L en el 1 y en el 2, respectivamente, mientras que la cantidad de biodiésel obtenido en cada biorreactor fue de 1 mL por cada 3 litros de cultivo.

**Palabras clave:** microalga, fotobiorreactores, transesterificación, biodiésel.

### ABSTRACT

By virtue of this work, the biological process to obtain biodiesel was researched using crops of *Neochloris oleoabundans* microalgae due to its ability to synthesize high concentrations of lipid. A flat-plate photobioreactor design was selected and used in two experiments whereby a larger illumination area was warranted. The variables during the experiment were aeration, luminosity, photoperiod, temperature and pH. Biomass was obtained at fixed conditions: 26 °C of temperature, pH of 6.6 and a 16:8-hour light-dark cycle, during fifteen days. The total lipid production from the microalgae was determined with the Feng technique, 2011. For the extraction of biodiesel, a transesterification reaction was made using methanolic hydrochloric acid (1 N) as catalyst and hexane as solvent. The concentration of the extracted lipid in each photobioreactor was 39 mg/L and 49 mg/L, respectively; while the amount of biodiesel obtained was 1 mL for every three liters of crop.

**Key words:** microalgae, photo bioreactor, transesterification reaction, biodiesel.

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un problema ambiental importante en la actualidad, debido a que ha provocado el aumento de la temperatura global a causa de los Gases de Efecto Invernadero (GEI), siendo el principal el Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) (IPCC, 2007). En México se generan casi 500 millones de toneladas de GEI, de los cuales alrededor del 31% son emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y las principales fuentes son de origen antropogénico (INEGI, 2009).

Por lo anterior, el uso de biocombustibles puede desempeñar un papel importante para evitar la dependencia excesiva de los combustibles fósiles y mejorar la sostenibilidad ambiental (Karampudi y Chowdhury, 2011). El término biocombustible se aplica a los combustibles líquidos o gaseosos para el sector del transporte que se producen predominantemente a partir de biomasa. Una variedad de biocombustibles pueden ser producidos a partir de recursos de biomasa incluyendo los combustibles líquidos como el bioetanol, metanol, biodiésel, diésel *Fischer-Tropsch* y combustibles gaseosos, como el hidrógeno y metano (Balat y Balat, 2010).

Entre los biocombustibles que actualmente se han desarrollado, destaca el biodiésel por tener las ventajas de ser una fuente de energía potencialmente renovable y biodegradable, que durante su combustión produce menos emisiones nocivas de sulfuros, hidrocarburos aromáticos y partículas de hollín (Balat y Balat, 2010). Asimismo, el biodiésel es un biocombustible líquido compuesto de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable, tal como los aceites vegetales, grasas animales y aceites de microalgas (Fernández *et al.*, 2012).

En cuanto a las microalgas, se sabe que son organismos fotosintéticos porque convierten al CO<sub>2</sub> en biomasa y oxígeno, utilizando la luz solar, por lo que son actores importantes dentro del Ciclo del Carbono (Chisti, 2008). A nivel global, contribuyen a mitigar el cambio climático, debido que el CO<sub>2</sub> es uno de los principales GEI (Fernández *et al.*, 2012). Chisti, 2007, menciona que aproximadamente la mitad del peso de la biomasa de las microalgas es carbono, derivado típicamente del dióxido de carbono fijado, por lo tanto la producción de 100 toneladas de biomasa algal, consume aproximadamente 183 toneladas de dióxido de carbono. Por lo anterior, las microalgas representan una opción viable como materia prima para producir biodiésel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables. Además, su biomasa puede tener hasta el 80% de contenido de lípidos de peso seco, siendo este el más deseable para la producción de biodiésel.

Por otro lado, uno de los atractivos de las microalgas como materia prima para biocombustibles es que se pueden cultivar de manera efectiva en condiciones que requieren entrada de agua dulce mínima a diferencia de muchos cultivos de biocombustibles a base de plantas que utilizan las tierras de otro modo no productivo para plantar cultivos (Pittman, 2010).

La biotecnología moderna busca hacer un uso inteligente, respetuoso y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes en sectores como la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente (Bolívar, 2004).

Este estudio sirvió para conocer las condiciones de cultivo a nivel laboratorio que necesita la cepa de la microalga *N. oleoabundans*, para producir lípidos de manera óptima, los cuales son transformados a biodiésel por el proceso de transesterificación (Cruz, 2015).

## METODOLOGÍA

### Diseño y construcción de los fotobiorreactores con iluminación

Se diseñaron y construyeron 2 fotobiorreactores de acrílico tipo placa plana, con capacidad de 3 litros cada uno. Como fuente de luz se utilizaron 3 lámparas fluorescentes de 13 W de tubo proporcionando 1,150 lm en un ciclo de luz oscuridad de 16:8 h. La alimentación de aire se llevó a cabo de manera continua con bombas para pecera de 2.5 watts con un flujo volumétrico de aire atmosférico de 3 L/min y presión de 0.02 MPa. El cultivo se mantuvo a 26 °C durante 15 días con un pH de 6.68.

### Preparación del inóculo

Para la inoculación de los fotobiorreactores se utilizó un cultivo de *N. oleoabundans* desarrollado en el medio BBM cuya composición en g/L es: NaNO<sub>3</sub>, 0.625; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0625; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1875; K<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>, 0.1875; NaCl, 0.4375 y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0625. El cultivo para los inóculos se desarrolló durante 12 días en condiciones estériles con un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 h, a una temperatura de 26 °C agitando los matraces cada tercer día para su oxigenación y evitar el asentamiento del cultivo. El volumen de los inóculos fue de 600 mL, que representó el 20% V/V del volumen de cada biorreactor. En la figura 1, se observan los fotobiorreactores y los cultivos de inoculación.



Figura 1. Fotobiorreactores y cultivos para su inoculación

### Desarrollo de la biomasa algal

Para el desarrollo de la biomasa algal se prepararon 2 fotobiorreactores conteniendo un volumen total de 3 litros cada uno, de los cuales 2,400 mL fueron de medio BBM y 600 mL fueron del inóculo. Los fotobiorreactores se mantuvieron dentro de una incubadora durante 15 días a 26 °C con aireación continua, en un ciclo de luz oscuridad 16:8 h. El sistema de cultivo, se observa en la figura 2.



Figura 2. Fotobiorreactores para el desarrollo de la biomasa algal

### Determinación la concentración de la biomasa algal

Para realizar la curva de calibración a fin de determinar la concentración de la biomasa algal, se utilizaron las técnicas de obtención de peso seco y la de determinación de la absorbancia UV-Visible, para lo cual

hubo que preparar un cultivo de la microalga y desarrollarlo durante 16 días en las mismas condiciones que los fotobiorreactores. Una vez propagada la biomasa se realizaron cinco diluciones del cultivo, en matraces aforados de 50 mL, para posteriormente determinar su concentración en g/L por el método de peso seco. Para determinar la concentración por absorbancia de las 5 diluciones de biomasa, se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer. Las lecturas se realizaron por cuadruplicado a 620 nm. Para calibrar el equipo se usó el medio BBM como blanco (Levine *et al.*, 2011).

### **Determinación de la cinética de crecimiento de la microalga**

Para determinar la curva de crecimiento de la microalga en el proceso, se tomaron muestras por duplicado de los dos biorreactores cada 3 días y se les midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer; los valores obtenidos se buscaron en la correspondiente curva de calibración de crecimiento de *N. oleoabundans*, preparada para el caso, y así obtener la concentración en g/L de cada muestra.

### **Separación de la biomasa algal del medio de cultivo**

La separación de la biomasa algal de cada biorreactor, se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Shen *et al.*, 2012, utilizando cloruro férrico hexahidratado como floculante, preparado en una solución 438.1  $\mu\text{M}$  para ser agregada a 100 mL de medio de desarrollo, ajustando el pH a un valor de 7.9 para una mejor aglomeración de los flóculos. Una vez obtenido el concentrado de biomasa, se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos, retirándose el sobrenadante para eliminar el exceso de agua. Los pellets obtenidos se pusieron a secar a 100 °C durante 5 horas. Posteriormente, se raspó y molió la biomasa con una varilla de vidrio, dejándose secar una vez más, esta vez, a 65 °C durante 24 horas.

### **Extracción de los lípidos de la biomasa algal**

Para la extracción de lípidos se utilizó la técnica de Feng *et al.*, 2011, para lo cual se pesaron 50 mg de la biomasa seca y molida obtenida previamente a partir de cada reactor, colocándose en dos tubos de vidrio. En la campana de extracción se les adicionaron 1.8 mL de agua destilada, 4 mL de metanol y 2 mL de cloroformo, homogeneizando perfectamente en un *vórtex* durante 30 segundos. La mezcla obtenida se centrifugó por 10 minutos a 4,500 rpm. De cada uno de los tubos se extrajo la base clorofórmica, la cual se pasó a tubos previamente puestos a peso constante. Ambos tubos se colocaron a 60 °C con la tapa ligeramente floja por 24 horas para la eliminación total del cloroformo. Posteriormente, se llevaron a peso constante en una estufa a 100 °C. Los lípidos totales se calcularon con la siguiente relación: *Lípidos totales = peso final - peso inicial*.

### **Reacción de transesterificación para la obtención del biodiésel**

La obtención del biodiésel se realizó de acuerdo a lo descrito por Ortega *et al.*, 2004. A los lípidos extraídos se les adicionó 1 mL de una solución de HCl metanólico 1 N, homogeneizando en *vórtex* durante 30 segundos. Después se colocaron en un termobloque a 65 °C durante 1 h, manteniendo la tapa ligeramente floja. Al final, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada para detener la reacción y de nuevo, se agitaron en *vórtex* hasta homogeneizar. Se añadió 1 mL de hexano a cada tubo y se dejaron reposar por 15 minutos, separando la fase superior (correspondiente al biodiesel) y desechando la capa inferior (la glicerina).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Curva de calibración para la determinación de biomasa por diferencia de pesos**

En la Tabla 1, se muestran los pesos de las membranas limpias y con biomasa.

**Tabla 1.** Pesos de las membranas antes y después de la filtración, así como la biomasa obtenida.

Numero de Membrana	Porcentaje de dilución (%)	Peso final Pf, (g)	Peso inicial Pi, (g)	Diferencia de pesos (g)
1	20	0.12290	0.12285	0.000050
2	40	0.12280	0.12255	0.000250
3	60	0.12295	0.12250	0.000450
4	80	0.12280	0.12235	0.000450
5	100	0.12470	0.12400	0.000700

### Curva de calibración para la determinación de biomasa por absorbancia

Los porcentajes de las diluciones se realizaron por cuadruplicado, leyéndose la Absorbancia de cada una y obteniendo al final su promedio. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Mediciones de absorbancia de las 5 diluciones a 620 nm.

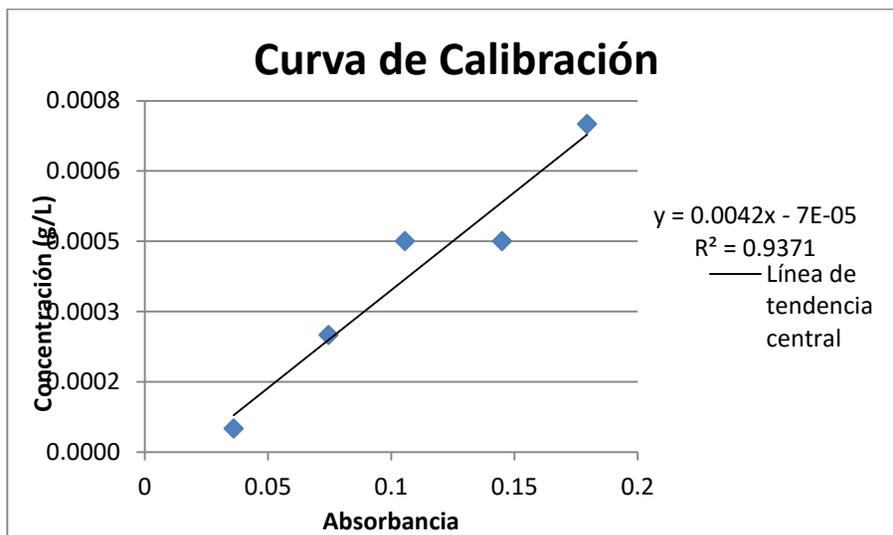
Porcentaje de dilución (%)	Mediciones de Absorbancia				PROMEDIO
	A1	A2	A3	A4	
20%	0.039	0.034	0.037	0.034	0.036
40%	0.081	0.07	0.071	0.076	0.0745
60%	0.1082	0.1082	0.104	0.102	0.1056
80%	0.134	0.14	0.152	0.154	0.145
100%	0.192	0.176	0.174	0.176	0.1795

Para obtener la cantidad de biomasa, se realizaron los cálculos de acuerdo a la tabla 3. Los resultados se muestran en la tabla 4, en donde se relacionan la absorbancia con la concentración de la biomasa.

**Tabla 3.** Concentración de la Biomasa en g/L en relación con la Absorbancia.

Numero de Membrana	Absorbancia promedio	Biomasa (g/L)
1	0.036	0.0050
2	0.0745	0.0250
3	0.1056	0.0450
4	0.145	0.0450
5	0.1795	0.070

Para la realización de la curva de calibración (figura 2), se utilizaron los datos de concentración en g/L vs Absorbancia, dicha curva se utilizó para determinar la concentración de biomasa final de los fotobiorreactores.

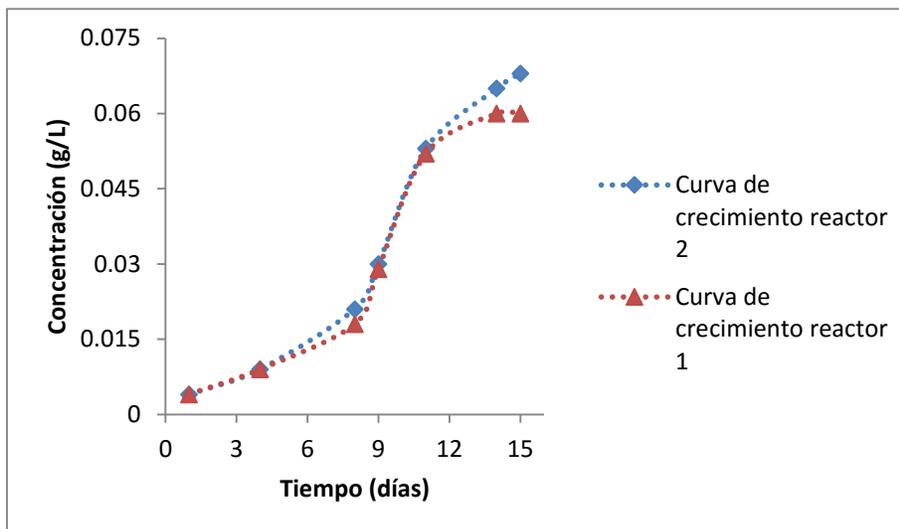


**Figura 2.** Curva patrón de referencia para medir el desarrollo del cultivo de microalga *Neochloris oleoabundans*.

### Determinación de la cinética de crecimiento de la microalga

Las muestras tomadas a partir de los dos reactores fueron leídas en el espectrofotómetro UV-VIS. Para obtener los resultados de la biomasa, se utilizó la curva de calibración que se muestra en la figura 2, para hacer la curva de crecimiento en términos de la concentración en g/L.

En la Figura 3, se muestra la curva de crecimiento de la microalga de los reactores 1 y 2. La concentración máxima que se observa para el reactor 1 es de 0.06 g/L y en el reactor 2 de 0.068 g/L. En ambos reactores se tuvieron las mismas condiciones de temperatura, pH, aireación constante y ciclo de luz - oscuridad de 16:8 h. La fase logarítmica de desarrollo se prolongó de las 3 a las 12 horas de incubación. No se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento por no ser importante en el proceso de obtención de la biomasa.



**Figura 3.** Curvas de crecimiento de los reactores 1 y 2 para *Neochloris oleoabundans*.

### Extracción de los lípidos totales de la biomasa algal

La determinación de lípidos totales se llevó a cabo por diferencia de pesos entre los tubos limpios y los tubos con lípidos. En el reactor 1 se tuvieron 49 mg/L y en el reactor 2 se obtuvieron 39 mg/L. Cabe mencionar que solo tuvieron implementación de aire atmosférico continuo con un porcentaje de CO<sub>2</sub> de 0.03%.

Lípidos totales= peso final del tubo - peso inicial

**Tabla 4.** Determinación de lípidos totales.

Tubo	Peso inicial del tubo (g)	Peso final del tubo (g)	Lípidos Totales (g)
1	20.703	20.752	0.049
2	17.973	18.012	0.039

### Obtención del biodiésel

La extracción de biodiésel se realizó cuidadosamente, ya que al extraerlo con la pipeta Pasteur se podía llevar un poco de glicerol, lo cual no era conveniente, por lo que se dejó un poco para tener una muestra más limpia, lográndose obtener un volumen aproximado de 1 mL de biodiésel por cada reactor. La cantidad de biodiésel obtenido fue de 1 mL por cada 3 L del cultivo de *N. oleabundans* en los biorreactores. En la figura 3 se observa el biodiésel extraído del fotobiorreactor 1.



**Figura 3.** Biodiésel extraído del fotobiorreactor 1.

## CONCLUSIONES

- Se comprobó la eficiencia del diseño seleccionado para los fotobiorreactores, ya que la cinética de crecimiento de la biomasa de *N. oleabundans*, fue la esperada para este tipo de proceso.
- En las condiciones de cultivo utilizadas, las concentraciones de biomasa algal obtenidas fueron de 0.06 g/L y de 0.068 g/L para el reactor 1 y el reactor 2, respectivamente. Dichos resultados, fueron aceptables, comparados con los valores reportados en la bibliografía (Gouveia *et al.*, 2009), en donde se reporta una productividad de biomasa de 0.04 g/L en un cultivo sin suministro de CO<sub>2</sub>.
- La concentración de los lípidos extraídos en cada fotobiorreactor fue de 39 mg/L y 49 mg/L en el 1 y en el 2, respectivamente.
- El rendimiento de biodiesel fue 1 mL por cada 3 L del cultivo de *Neochloris oleoabundans*.
- La cepa utilizada de *Neochloris oleoabundans* demostró ser capaz de producir un buen contenido de lípidos.
- Se confirma que las microalgas son herramientas biotecnológicas potenciales para ser utilizados en la producción de biodiésel.

## RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se tienen para este estudio son:

- Es importante que se caracterice el biodiésel obtenido por la técnica descrita en este trabajo, para poder determinar su calidad.
- Es necesario perfeccionar el diseño de los fotobiorreactores, para poder realizar el escalamiento del proceso.
- Contemplar la adición de CO<sub>2</sub> a los biorreactores para mejorar los rendimientos tanto de biomasa algal como de biodiésel.

## REFERENCIAS

- Balat M., Balat H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*. 87: 1815-1835.
- Bolívar Z. (2004). Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna. 1ª Ediciones Campos de la Rosa, México. Página 698.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- Chisti Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26: 126-131.
- Cruz, M.D. (2014). Obtención de Biodiesel a partir de la microalga *Neochloris oleoabundis* Proyecto de Integración de la Licenciatura de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.
- Fernández L., Montiel J., Millan A. y Badillo J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*. 3b: 101-115.
- Feng D. (2011). Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhanjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technol*. 102: 6710-6716.
- Gouveia L., Marques A., Lopes T., Reis, A. (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Ind Microbiol Biotechnol*. 36: 821-826.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Emisiones de bióxido de carbono derivadas de la quema de combustibles fósiles, por países seleccionados.
- IPCC. *Intergovernmental Panel on Climate Change*. (2007). Informe del Grupo Intergubernamental de expertos sobre el Cambio Climático. Organización Meteorológica Mundial (OMM). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).
- Karampudi S., Chowdhury K. (2011). Effect of Media on Algae Growth for Bio-Fuel Production. *Notulae Scientia Biologicae*. 3: 33-34.
- Levine R., Robinson C., Spatafora G. (2011). *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy*. 35: 40-49.
- Ortega J., López A., García H. S., Hill C. G. (2004). Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid. *J Food Sci*. 69: 1-6.
- Pittman J. (2010). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 94: 17-25.
- Shen Y., Cui Y., Yuan W. (2013). Flocculation Optimization of Microalga *Nannochloropsis oculata*. *Appl Biochem Biotechnol*. 169: 2049-2063.