



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**CULTIVO DE MICROALGAS EN
FOTOBIORREACTOR DE 20 L PARA LA SÍNTESIS
DE BIO-KEROSENO PARAFÍNICO SINTETIZADO**

Tesis que presenta:

IBA. ANDRÉS EDUARDO PEDRERO ÁLVAREZ

En opción al título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA
RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, México, Julio 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven de lo correspondiente a dicha información, le pertenece patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal de Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán

Junio de 2017



Andrés Eduardo Pedrero Álvarez

Agradecimientos

Agradezco con toda sinceridad a mi asesor, Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por brindarme su apoyo a lo largo de mi trabajo de investigación, por creer en mí y darme el empuje necesario para finalizar mis estudios de maestría, sin lugar a dudas su conocimiento y experiencia fue una ayuda invaluable para lograr llevar a cabo el trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Chavarría por sus consejos y conocimientos en el área de síntesis de BioKPS y por brindarme el equipo necesario para realizar dicha labor.

A mi compañera Anel Castillo por asesorarme en el uso del reactor de lecho fijo.

A la Dra. Liliana María Alzate Gaviria por sus consejos y observaciones en el proceso de secado de biomasa.

Al M en C Jorge Domínguez Maldonado por el asesoramiento en el uso de equipos de laboratorio.

A la Dra. Virginia Herrera, a la Dra. Myriam Amezcua y al Dr. Julio Sacramento por su asesoramiento, consejos, críticas y apoyo, muchas gracias por brindarme la guía para concluir este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 394757) otorgada para los estudios de maestría.

A la QI Tanit Toledano Thompson por su apoyo técnico incondicional, tiempo, conocimiento y sobre todo su bonita amistad, sin dudas un gran pilar que fortaleció y ayudo en demasía a finalizar mis estudios.

A la Bióloga Katia Ancona por su apoyo en la experimentación, técnicas del laboratorio, trabajos alternos y sin lugar a dudas por su buena amistad.

A mis compañeros de laboratorio Rodrigo López, Ricardo Nava, Rayito Serrano, Carlos Hernández, gracias por compartir sus experiencias y sobre todo amistad.

El presente trabajo fue financiado por el fondo ASA-CONACYT bajo el proyecto "Aprovechamiento de terpenos para la producción de bikeroseno parafínico sintetizado" con clave 243145.

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada de lo más profundo de mi corazón con todo mi amor y cariño a mis padres Andrés Eduardo Pedrero Sánchez y Moraima Álvarez Rovirosa que me han enseñados que con perseverancia y esfuerzo se llega a donde uno desee y me han brindado su apoyo incondicional a cada momento, a mi hermosa esposa Luz del Alba Urrgo Romero que ha estado en cada momento importante de mi vida apoyándome y animándome a ser mejor cada día, a mi abuelita Moraima Rovirosa Gardusa un ejemplo de trabajo arduo con amor sin barreras, a mi hermano Diego Pedrero Álvarez esperando ser una fuente de orgullo para cumplir sus sueños y por último en especial y de lo más profundo de mi ser a mi angelito y hermano Ricardo Pedrero Álvarez que me vio empezar este camino aquí en la tierra y me ve finalizarlo muy arriba allá en el cielo, gracias por guiarme mi Richi.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Las microalgas.....	3
1.2 <i>Scenedesmus obliquus</i>	6
1.3 Fotobiorreactores.....	8
• De placa plana	9
• Tubular horizontal.....	10
• Tubular helicoidal	11
• De columna	12
1.4 Parámetros de cultivo.....	14
• Intensidad lumínica	15
• Micro y macro nutrientes	15
• Temperatura.....	16
• pH.....	16
• Aireación	17
1.5 recuperación de biomasa	17
• Floculación.....	17
• Flotación.....	18
• Sedimentación por gravedad.....	18
• Centrifugación	18
• Secado	19
1.6 Métodos de extracción de lípidos.....	24

1.7 Caracterización y utilidad de los metabolitos secundarios.....	27
• Isoprenoides.....	28
• Terpenos.....	29
• Triglicéridos.....	30
• Producción de biocombustibles a partir de metabolitos secundarios de microalgas.....	31
1.8 Bioturbosina.....	32
1.9 Síntesis de la bioturbosina.....	35
• Hidrocraqueo catalítico.....	35
• Catalizadores en el proceso de hidrocraqueo.....	37
• Hidrodesoxigenación catalítica.....	37
• Catalizadores del proceso de hidrodesoxigenación.....	39
• Procesos utilizados para la síntesis de bioturbosina.....	39
I. Hipótesis.....	42
II. Objetivo general.....	42
III. Objetivos particulares.....	42
CAPITULO 2.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1 Material biológico.....	44
2.2 Medio de cultivo.....	44
2.3 Melaza.....	44
2.4 Purificación de la cepa.....	44
2.5 Cultivo de la microalga.....	45
2.6 Conteo celular.....	46
2.7 Recolección de biomasa.....	46
2.8 Extracción y determinación de lípidos.....	47
2.9 Cromatografía de capa fina.....	47
2.10Fotobiorreactor de 20 L.....	47
2.11Aireación /Agitación.....	49

2.12 Iluminación.....	49
2.13 Era de secado	50
2.14 Síntesis de bioturbosina	50
2.15 Condiciones de reacción	51
2.16 Cromatografía de gases – espectrometría de masas.....	52
CAPITULO III	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1 Purificación de la cepa de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	53
3.2 Cambio del medio de cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	55
3.3 Aumento del volumen de cultivo	58
3.4 Recuperación de la biomasa microalgal y utilización de la era de secado	69
3.5 Extracción de los lípidos totales.....	74
3.6 Perfil lipídico de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	77
3.7 Síntesis de bioturbosina	79
3.8 Caracterización de los productos de reacción	81
CONCLUSIONES.....	87
PERSPECTIVAS	88
BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXOS.....	101

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> [24].	6
Figura 2. Fotobiorreactor de placa plana [37].	10
Figura 3. Fotobiorreactor tubular horizontal [41].	11
Figura 4. Fotobiorreactor tubular helicoidal [31].	12
Figura 5. Fotobiorreactor de columna [45].	13
Figura 6. Sistema de secado Flash.	20
Figura 7. Secado en tambor rotatorio.	21
Figura 8. Secado por aspersion.	22
Figura 9. Liofilización.	23
Figura 10. Era de secado [27].	23
Figura 11. Diagrama de punto crítico de fluidos supercríticos.	25
Figura 12. Extracción Húmeda.	27
Figura 13. Estructura química del isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalilo difosfato (DMAPP) y su interconversión por la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI).	28
Figura 14. Estructura química del ácido giberélico y del fitol que forma parte de la clorofila.	30
Figura 15. Proceso UOP para la síntesis de bioturbosina.	31
Figura 16. Proceso de hidrocraqueo catalítico en petróleo.	36
Figura 17. Diagrama del proceso experimental.	43
Figura 18. Cámara de Neubauer.	46
Figura 19. Diagrama del fotobiorreactor.	48
Figura 20. Fotobiorreactor de 20 L.	48
Figura 21. Sistema de aireación del fotobiorreactor.	49
Figura 22. Diseño de era de secado.	50
Figura 23. Reactor de lecho fijo	51
Figura 24. Aislamiento por el método de diluciones seriadas.	53
Figura 25. Cajas Petri con cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> .	54
Figura 26. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio líquido.	55
Figura 27. Cultivo de microalgas en ARS con azúcar.	56

Figura 28. Cultivo de microalgas en ARS sin azúcar con melaza.....	57
Figura 29. Cultivo de microalgas en ARS con azúcar y melaza.....	57
Figura 30. Cultivo de microalgas en matraces celstir de 500 mL y 1 L.	58
Figura 31. Cultivo de microalgas en botellas de 2 L con ARS y dextrosa.....	59
Figura 32. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en botellas PET de 2 L con ARS y Dextrosa.....	60
Figura 33. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en fotobiorreactor de 20 L con ARS y dextrosa.....	61
Figura 34. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en fotobiorreactor de 20 L con ARS y Dextrosa.	62
Figura 35. Cultivo de microalgas en botellas de 2 L con ARS y melaza al 1%	63
Figura 36. Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio ARS y melaza al 1% en botellas PET de 2 L.....	63
Figura 37. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en fotobiorreactor de 20 L con ARS y melaza al 1%.	64
Figura 38. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio ARS y melaza al 1% en fotobiorreactor de 20 L.....	65
Figura 39. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio ARS y melaza al 0.1% en botellas PET de 2 L	66
Figura 40. Cultivo de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en fotobiorreactor de 20 L con ARS y melaza al 0.1%	67
Figura 41. Curva de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio ARS y melaza al 0.1% en fotobiorreactor de 20 L.....	68
Figura 42. Observación al microscopio de los cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> en A) ARS con melaza al 1%; B) ARS con dextrosa y C) ARS con melaza al 0.1%.	69
Figura 43. Era de secado utilizada en [27].	70
Figura 44. Inicio del secado de la biomasa obtenida en cultivos de 20 L.....	71
Figura 45. Lodo microalgal después de una semana en la era de secado.	71
Figura 46. Biomasa recuperada de la era de secado después de la centrifugación.	72
Figura 47. De izquierda a derecha: primera, segunda y tercera extracción de lípidos totales.....	75
Figura 48. Cromatografía de capa fina de los extractos lipídicos de la biomasa de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> . A= aceite comercial (referencia); B= Extracto de la	

biomasa proveniente de matraz Celstir de 1 L; C y D= Extractos de los fotobiorreactores de 20 L.....	76
Figura 49. Espectro de IR de la fracción 4 del extracto de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	79
Figura 50. Disolución del extracto lipídico en dodecano.....	80
Figura 51. Productos de síntesis de bioturbosina a partir del extracto de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> . De izquierda a derecha, las muestras a 1, 2 y 3 h de reacción. .	80
Figura 52. Cromatografía de capa fina de los productos de reacción.....	81
Figura 53. Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de bioturbosina.	83
Figura 54. Compuestos óptimos de interés energético para bioturbosina.	85
Figura 55. Curva de calibración de azúcares totales.	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microalgas más abundantes y sus productos[12]	3
Tabla 2. Concentración de CO ₂ por especie de microalga.....	5
Tabla 3. Producción lipídica de diferentes tipos de microalgas [12].	7
Tabla 4. Requerimientos principales en el cultivo de microalgas [48].	14
Tabla 5. Aerolíneas que han utilizado biocombustibles.	34
Tabla 6. Condiciones de cultivo en el fotobiorreactor de 20 L.....	60
Tabla 7. Contenido de biomasa en botellas PET de 2 L. Exp. ARS con melaza al 0.1% .	73
Tabla 8. Contenido de biomasa en fotobiorreactores de 20 L. Exp. ARS con melaza al 0.1%.	73
Tabla 9. Extracción lipídica de 2.72g de biomasa.....	75
Tabla 10. Extracción lipídica de 13.78g de biomasa de reactores de 20 L.....	76
Tabla 11. Fracciones del extracto lipídico de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	77
Tabla 12. Compuestos de la primera fracción del extracto lipídico.	77
Tabla 13. Compuestos identificados en la segunda fracción del extracto lipídico.	78
Tabla 14. Compuestos identificados en la tercera fracción del extracto lipídico.....	78
Tabla 15. Compuestos presentes en el producto de reacción de síntesis de bioturbosina.	84

RESUMEN

La contaminación atmosférica, del suelo y de los cuerpos de agua por el uso de los combustibles fósiles ha generado que el hombre considere a las fuentes alternas de energía como son los biocombustibles.

El estudio de biocombustibles para el transporte terrestre ha ido incrementando con los años, generando trabajos con una amplia gama de materias primas y procesos, algunos de ellos con producciones a escala comercial (bioetanol, biodiesel). Por lo contrario, el uso de combustibles verdes para el transporte aeroespacial es un campo que no ha sido explotado a gran escala y aún hay importantes avances que se pueden generar, siendo uno de ellos la producción de bioturbosina. Las materias primas con las que se puede generar éste y otros biocombustibles han sido criticadas a nivel mundial por la competencia en el uso de suelo con los alimentos. Esto ha generado un interés hacia fuentes de tercera generación como son las microalgas ya que presentan ventajas en comparación a los cultivos energéticos, como alta eficiencia fotosintética, fijación de CO₂, alta productividad y cultivo en espacios confinados, he aquí donde entra el papel fundamental de los fotobiorreactores. En este trabajo se implementó el cultivo en un fotobiorreactor de 20 L de la microalga *Scenedesmus obliquus*. utilizando agua residual sintética como medio de cultivo y melaza como fuente de carbono. Se logró una densidad celular de 2.5×10^6 cel·mL⁻¹ y una producción de biomasa de 0.30 ± 0.05 g·L⁻¹. Mediante la extracción de los lípidos totales, se determinó que bajo las condiciones de cultivo es posible obtener una concentración de lípidos de 0.07 ± 0.01 g·L⁻¹. La síntesis de bioturbosina realizada en un reactor de lecho fijo a 330°C, 30 bar de presión, con el catalizador Pt-HZSM22 γ -Al₂O₃ generó parafinas saturadas y ramificadas con número de carbonos dentro del rango de la bioturbosina, aunque también se generaron compuestos dentro del rango del diesel verde.

ABSTRACT

Air, soil and water pollution due to the use of fossil fuels has turned the interest of man to alternative sources of energy such as biofuels.

The study of biofuels for terrestrial transport has been increasing over the years generating data using several feedstocks and processes, some of them at a commercial scale (bioethanol, biodiesel). On the other hand, the use of green fuels for aerospace transport is a field that has not been exploited at large scale and there are still important advances to generate, one of them being the production of biojet fuel. The feedstock to synthesize this and other biofuels have been criticized worldwide for their competition with land use for food production. This has generated a new interest for third generation sources such as microalgae, as they have the advantage of high photosynthetic efficiency, CO₂ fixation, high productivity and growth in small spaces compared to energy crops.

In this work, the culture of the microalga *Scenedesmus obliquus*. in a 20 L photobioreactor was developed using synthetic waste water as culture medium and molasses as carbon source. A cell density of 2.5×10^6 cel·mL⁻¹ was achieved with a biomass production of 0.30 ± 0.05 g·L⁻¹. After total lipid extraction, the lipid production of the culture was 0.07 ± 0.01 g·L⁻¹. Biojet fuel synthesis was carried out in a fixed bed reactor at 330 °C, a 30 bar pressure with Pt-HZSM22 γ -Al₂O₃ as catalyst. Saturated paraffins and isoparaffins with size carbon chains within the range of biojet fuel were generated. Compounds within the range of green diesel were also produced.

INTRODUCCIÓN

El uso de los combustibles fósiles aumenta año con año y consecuentemente la emisión de GEI. Por otro lado, las reservas de petróleo están disminuyendo y el costo del mismo aumenta, haciendo que las fuentes de biomasa y materia orgánica animal o vegetal para la producción de energías alternas y biocombustibles sea una mirada al futuro para acabar con esta problemática. Para ayudar a disminuir los problemas ambientales, se han buscado fuentes de energía alternas que sean capaces de satisfacer nuestras necesidades, pero deben ser más económicas que las tradicionales y que nos brinden un espacio natural sano y saludable, es ahí donde entra el papel de los biocombustibles [1].

El uso de los biocombustibles tiene más de 100 años pero las ideas de implementarlos y hacerlos un producto comercializado como los hidrocarburos son prácticamente recientes ya que en diferentes países del mundo se ha visualizado la situación actual y el aumento del daño ocasionado al ambiente por el uso de combustibles de origen fósil [2].

Desde hace ya algunos años se ha venido proponiendo el uso de biocombustibles para la aviación, específicamente la bioturbosina, que es un tipo de combustible ecológico diseñado especialmente para los aviones. La bioturbosina es un biocombustible que se puede obtener a partir de los lípidos de diferentes materias primas y está constituida por hidrocarburos con cadenas de 12 a 16 carbonos [3] y con ausencia de oxígeno en la molécula.

El proceso de síntesis de bioturbosina ya se ha llevado a cabo por varias empresas que proponen el uso de triglicéridos (de plantas superiores y microalgas) con catalizadores patentados, sin embargo, en el caso de las microalgas, se está buscando utilizar todo el contenido lipídico de éstas y no sólo la fracción de triglicéridos [4]. Aunque la producción comercial de algas para la generación de biocombustibles se realiza a pequeña y mediana escala [5], hay empresas que tienen desarrollos muy importantes y al parecer, altamente competitivos [3, 6]

En el presente trabajo se estableció un proceso de producción de bioturbosina desde la fase inicial de cultivo y crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus*, en agua residual sintética y utilizando la melaza, un residuo agroindustrial, como fuente de carbono con el fin

de abaratar los costos de proceso. El cultivo se realizó en fotobiorreactores de columna de 20 L con burbujeo para un adecuado uso de espacio y generación de biomasa, finalmente, la síntesis de bioturbosina se realizó utilizando todo el contenido lipídico de la microalga.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Las microalgas

Son llamadas microalgas a una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton que abarca desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados autótrofos. Su posición taxonómica ha sido de gran polémica entre botánicos y zoólogos, como ejemplo se puede mencionar el grupo de los dinoflagelados, conocidos por unos como microalgas y por otros como protozoarios [7, 8].

El término microalga engloba a las algas microscópicas y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas denominadas cianobacterias. Éstas presentan diferentes tipos de organización celular: unicelular, coloniales y filamentosas [9].

Las microalgas actualmente han generado una polémica en el área de la Bioenergía ya que diferentes estudios demuestran que pueden llegar a ser una mejor fuente de producción de biocombustibles comparadas con las fuentes de producción pioneras como la jatropha y la palma aceitera [10] debido a su alta productividad lipídica. En la tabla 1 se presentan las principales microalgas que se utilizan en el campo de los biocombustibles, así como también sus principales productos.

Tabla 1. Microalgas más abundantes y sus productos[11]

Microalgas	Especies conocidas	Material almacenado	Hábitats
Diatomeas (Bacillariophyceae)	100,000	Crisolaminarina (pómeros de carbohidratos) y TAGs (Triacilgliceridos)	Océanos, agua dulce y salobres
Algas Verdes (Chlorophyceae)	8,000	Almidón y TAGs	Agua dulce
Algas Verde-azul (Cyanophyceae)	2,000	Almidón y TAGs	Diferentes hábitats
Algas Doradas (Chrysophyceae)	1,000	TAGs y carbohidratos	Agua dulce

A pesar que se han realizado diversos estudios con diferentes géneros de microalgas, los más utilizados actualmente son: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum* y *Porphyridium*, que producen niveles de aceites en intervalos de 1-85 % con respecto a su peso seco [5, 12]. A continuación, se enumeran algunas de las ventajas de las microalgas:

- Alta eficiencia fotosintética.

Debido a su capacidad fotosintética, en contraste a la mayoría de las bacterias, hongos y levaduras, las microalgas pueden alcanzar grandes rendimientos de producción de lípidos solamente con energía solar adecuada y una fuente de carbono como el CO₂ o bicarbonatos, además de nutrientes de fácil disponibilidad [13].

Las microalgas, gracias a su simplicidad estructural y dependiendo de las condiciones ambientales y de cultivo pueden alcanzar entre 4-8% de eficiencia fotosintética, siendo estos valores superiores a los alcanzados por las plantas superiores (2%). Así, por ejemplo, se tienen estimaciones de productividades de biomasa tan altas como 60-80 t/ha/a; en contraste con cultivos convencionales que presentan producciones del orden de 10-30 t/ha/a. Esta característica las hace extremadamente productivas [14].

- Mayor tasa de crecimiento que cualquier otra fuente.

Las microalgas tienen un perfil de crecimiento similar a las bacterias, es decir, de manera exponencial. Es un crecimiento rápido que va desde los 5 hasta los 11 días, ningún vegetal terrestre presenta un crecimiento de este tipo. Las plantas necesitan un tiempo más prolongado para alcanzar su fase productiva [15].

- Alta productividad de aceite.

El contenido de aceite en las microalgas puede exceder el 80 % de peso de biomasa seca y niveles del 20 al 50 % son bastante comunes [16].

- Requieren poco espacio de cultivo.

El uso de fotobiorreactores puede producir ventajas como 1) facilidad para cosechar la biomasa, 2) mantenimiento del cultivo sin contaminación, 3) mejor control de las

condiciones de cultivo y 4) menor inversión de capital en el fotobiorreactor. Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas. Además los fotobiorreactores proveen mayores rendimientos de aceite por hectárea comparado con los cultivos a mayor escala [17].

- Fijan CO₂.

Muchas especies de microalgas toleran hasta el 100% de concentraciones de CO₂ en el medio de cultivo, lo cual nos arroja datos de fijación muy altos de hasta 1.8 kg de CO₂ por kg de biomasa microalgal [18].

Tabla 2. Concentración de CO₂ por especie de microalga.

Especie	Concentración máxima de CO ₂ (%)
<i>Cyanidium celdanum</i>	100
<i>Scenedesmus sp.</i>	80
<i>Chlorococcum littorale</i>	60
<i>Synechococcus elongates</i>	60
<i>Euglena gracilis</i>	45
<i>Chlorella sp.</i>	40
<i>Eudorine sp.</i>	20
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15
<i>Nannochloris sp.</i>	15
<i>Chlamydomonas sp.</i>	15
<i>Tetraselmis sp.</i>	14

- Pueden utilizar aguas residuales.

Algunas especies pueden crecer en sustratos orgánicos, en presencia o ausencia de luz. La capacidad de estos microorganismos de poder crecer en ambientes diferentes y adversos a muchos otros organismos vegetales, es debido a la variedad excepcional de lípidos y de otros compuestos inusuales que están en condiciones de sintetizar, además los

residuos de biomasa y de medios de cultivo se pueden utilizar como fertilizantes o sustratos para las plantas [19].

- Pueden producir metabolitos secundarios de interés farmacéutico.
La inducción fisiológica para la producción de compuestos de interés comercial como proteínas, lípidos, glicerol, pigmentos, enzimas y biopolímeros es fácilmente realizable [20]. Por ser organismos unicelulares, su biomasa entera posee los productos de interés, a diferencia de las plantas superiores en las que los productos recuperables se encuentran en sitios u órganos específicos, lo que dificulta su extracción.

1.2 *Scenedesmus obliquus*

Es una de las especies de microalgas de agua dulce más comunes, sin embargo, es muy difícil de identificar debido a los múltiples rasgos fisonómicos que presentan en diferentes ambientes. Puede existir de manera unicelular o en forma de cenobios, de manera ovalada y en estado silvestre presentan espinas (Figura 1) que pierden al momento de su cultivo a nivel laboratorio [21, 22].

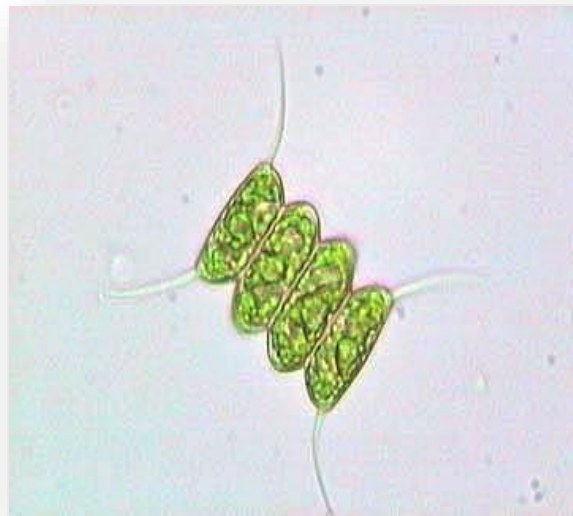


Figura 1. Microalga *Scenedesmus obliquus* [23].

Ha sido ampliamente estudiada para su posible aplicación como materia prima en la producción de biodiesel, esto debido a su perfil lipídico en el que se han reportado como principales componentes el ácido palmítico (24-47%), ácido oleico (43-52%) y el ácido linoleico (7-11%) [24], siendo éstos los que le brindan las propiedades físicoquímicas adecuadas para ser empleados en la fabricación de biodiesel [25].

En un estudio previo [26] se determinaron las mejores condiciones de cultivo de esta microalga y que se resumen como sigue:

- Intensidad lumínica: $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
- Temperatura: $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Nitrógeno: $6.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- CO_2 : 2.5%, 0.2 vvm con bombeo continuo

El mismo estudio demostró que el contenido lipídico de esta cepa fue de 11.0-55.0 % de peso seco de biomasa bajo las condiciones establecidas a nivel laboratorio como se muestra en la tabla 3. En fotobiorreactores de 1 L se ha reportado que la microalga produce $916.24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa seca, con una productividad de lípidos de $137.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ [26] lo cual representa una alta capacidad de producción de lípidos con respecto a otras especies de microalgas [27, 28].

Tabla 3. Producción lipídica de diferentes tipos de microalgas [12].

	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco de biomasa)	Productividad lipídica ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
Agua dulce	<i>Botryococcus sp.</i>	25.0-75.0	-
	<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8
	<i>Chlorella calcitrans</i>	14.6-16.4/39.8	17.6
	<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0
	<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	1214
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0
	<i>Chlorella sp.</i>	10.0-48.0	42.1

	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	-
	<i>Chlorella sp.</i>	18.0-57.0	18.7
	<i>Chlorococcum sp.</i>	19.3	53.7
	<i>Ellipsoidion sp.</i>	27.4	47.3
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	-
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	-
	<i>Scenedesmus quadricuada</i>	1.9-18.4	35.1
	<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1	40.8-53.9
Marinas	<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	116.0
	<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	-
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7-71.0	-
	<i>Dunaliella sp.</i>	17.5-67.0	35.1
	<i>Isochrysis galbana</i>	7.0-40.0	-
	<i>Isochrysis sp.</i>	7.1-33	37.8
	<i>Nannochloris sp.</i>	20.0-56.0	60.9-76.5
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7-29.7	84.0-142.0
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0-53.0	60.9-76.5
	<i>Neochloris oleabundans</i>	29.0-65.0	90.0-134.0
	<i>Pavlonia salina</i>	30.9	49.4
	<i>Pavlonia lutheri</i>	35.5	40.2
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0-57.0	44.8
	<i>Spirulina platensis</i>	4.0-16.6	-

Los resultados obtenidos en el estudio hecho por el departamento de ingeniería química de Taiwán [29], concluyen que la producción lipídica de *Scenedesmus obliquus* es conveniente para implementar su cultivo para la producción de lípidos con el fin de sintetizar bioturbosina.

1.3 Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores se emplean principalmente para cultivos unialgales [17]. Se caracterizan por regular y controlar, casi por completo, los parámetros biotecnológicos

inmersos en el proceso (temperatura, pH, iluminación, agitación), manteniendo bajos riesgos de contaminación. No presentan pérdidas de CO₂, tienen una hidrodinámica y temperatura controlable [30]. De igual manera, presentan una alta productividad con respecto al volumen del reactor y buena eficiencia para mantener el contenido hídrico en los sistemas, es decir, reducen la evaporación del medio. Todo esto, convierte a los fotobiorreactores en sistemas adecuados para el cultivo de las microalgas [31].

Sin embargo al igual que todos los biorreactores, los fotobiorreactores también presentan ciertas desventajas como lo son: contaminación biológica, condensación de agua, y, dependiendo del material con el que sea construido, se verá afectada la penetración de la luz para las reacciones fotosintéticas de las microalgas [32]. Los fotobiorreactores pueden ser de diferentes tipos:

- **De placa plana**

Los reactores de placas planas (*Flat Plate Reactors* o FPR) siguen un concepto de diseño simple que busca un uso eficiente de la luz. Están formados por paneles estrechos construidos para lograr una relación área-volumen alta. Estas placas o paneles forman un sistema mediante la conexión de unas con otras. Dichas conexiones también son utilizadas para introducir gas y sustancias nutritivas. La introducción del CO₂ se suele realizar por la parte baja del panel para asegurar que tenga suficiente tiempo para interaccionar con las algas. En general, las principales ventajas de estos fotobiorreactores son su alta productividad y una distribución uniforme de la luz [33]. En la figura 2 se muestra un fotobiorreactor de placa plana que fue utilizado para el cultivo de diferentes especies de microalgas para la producción masiva de biomasa [34].

Entre las limitantes que presentan estos sistemas están la dificultad de controlar la temperatura del cultivo, cierto grado de crecimiento en las paredes del equipo, la posibilidad de estrés hidrodinámico para algunas cepas de microalgas y dificultades con respecto al tipo de material a la hora de realizar el escalamiento. A escala piloto se presentan tres tipos: los paneles alveolares, placas de acrílico y vidrio, y los paneles desechables [36].

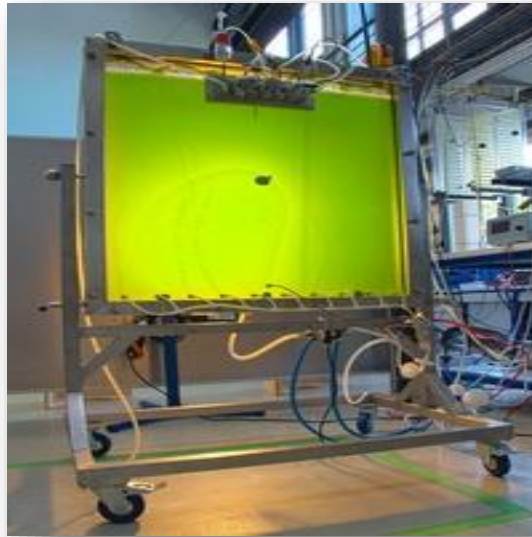


Figura 2. Fotobiorreactor de placa plana [35].

- **Tubular horizontal**

Un reactor tubular horizontal está formado por haces de tubos horizontales conectados como un sistema de tuberías. El fluido algal suspendido es capaz de circular por esta línea de tuberías (Figura 3). Los tubos se suelen fabricar de plásticos transparentes o vidrio de borosilicato y la circulación se mantiene constante mediante una bomba localizada al final del sistema. La transferencia de gas tiene lugar en las conexiones entre tubos o en unidades de intercambio de gas especialmente diseñadas para este propósito.

Uno de los principales problemas operativos que se dan en este tipo de fotobiorreactores, es el calentamiento excesivo durante las horas de calor. La amplitud del salto de temperatura que se produce en un día puede llegar a alcanzar los 20°C. Algunas de las soluciones que se han probado para atajar este problema pasan por rociar la superficie de los tubos con agua de manera regular o sumergir el cultivo en una piscina de agua cuando se considera necesario. Los fotobiorreactores de exteriores pueden ser enfriados de manera efectiva y barata mediante intercambiadores de calor. Otra limitación importante,

ya destacada en el caso de los tubulares verticales, es la fragilidad intrínseca de los vidrios habitualmente empleados en su fabricación [33].

La operación de estos fotobiorreactores es de las más complejas y ha sido estudiada y mejorada con diferentes cultivos de microalgas, en diferentes ambientes y capacidades volumétricas [37].

En estos dispositivos, las microalgas circulan a través de tubos por medio de bombas que permiten un intercambio másico entre el medio líquido y el gas de la aireación, por ejemplo, se ha encontrado que aire enriquecido con 5-10 % de CO₂, a una velocidad de 0.025-0.05 vvm puede minimizar el daño celular [38].



Figura 3. Fotobiorreactor tubular horizontal [39].

- **Tubular helicoidal**

Esta clase de fotobiorreactores son una buena alternativa a los tubulares rectos. La configuración más ampliamente utilizada es la conocida como Biocoil, que fue desarrollada

inicialmente por Robinson [40] (Figura 4). Está compuesto de una serie de tubos de polietileno bobinados en una estructura abierta cilíndrica acompañada de una torre de intercambio de gases y un intercambiador de calor [41]. Las sucesivas mejoras de este diseño lo han colocado como uno de los mejor posicionados debido a que se pueden cultivar volúmenes elevados en porciones pequeñas de terreno [33].

En general, presentan una alta eficiencia área-volumen por lo que no necesitan de grandes áreas para su implementación. El escalamiento de estos dispositivos se lleva a cabo relativamente fácil y el medio es impulsado por una bomba centrífuga a lo largo de la torre. Sin embargo, este tipo de bomba empleada para el mezclado conlleva a un aumento en el efecto de cizallamiento [42].



Figura 4. Fotobiorreactor tubular helicoidal [17].

- **De columna**

Los reactores de columna burbujeante son los ejemplos más típicos de fotobiorreactores tubulares verticales (“Vertical Tubular Reactors” o VTR) (Figura 5). Se trata de una columna

cilíndrica fabricada en un material transparente, normalmente polietileno o vidrio ya que permiten una buena penetración de luz y son relativamente baratos. La introducción de gas se lleva a cabo por la parte inferior de la columna y causa una corriente turbulenta que permite optimizar el intercambio de gas. En la actualidad, estos tipos de reactores se construyen con un diámetro máximo de 20 a 30 cm para asegurar el suministro de energía solar. La disponibilidad de luz en este tipo de columnas está influenciada por la velocidad de aireación, las acumulaciones de gas y la velocidad del líquido. El exceso de oxígeno generado por la actividad fotosintética debe ser retirado.

Aunque el cultivo de microalgas en este tipo de sistemas es simple y su empleo está ampliamente extendido, la tecnología es algo primitiva y presenta ciertas limitaciones derivadas de la fragilidad y de la baja versatilidad de los materiales utilizados. Por otro lado, el escalado de los equipos se preveía muy sencillo inicialmente, pero la experiencia acumulada ha demostrado que el aumento en el volumen de cultivo implica un descenso de la productividad [33].



Figura 5. Fotobiorreactor de columna [43].

Se ha reportado [44] que la productividad volumétrica media anual en una columna de burbujeo con un diámetro de 0.1 m es de aproximadamente $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de cultivo de *Tricornutum phaedactylum*. En un estudio subsecuente, con la misma especie de microalga, pero con un fotobiorreactor de 0.2 m de diámetro y 2.1 m de altura, se reportó una productividad media anual de $0.49 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Los fotobiorreactores de columna sólo pueden extenderse unos pocos metros de altura (4 m máx.) debido a que esto aumenta los costos del equipo y disminuye su productividad [45].

1.4 Parámetros de cultivo

En el escalamiento para el cultivo de las microalgas en fotobiorreactores, a diferencia de los cultivos abiertos, se requiere controlar ciertos parámetros (Tabla 4) para que las microalgas crezcan y produzcan lípidos de manera idónea.

Tabla 4. Requerimientos principales en el cultivo de microalgas [46].

	REQUERIMIENTOS	COMPUESTOS QUIMICOS	VALORES
Físicos	Luz		2,000 – 4,000 lux
	Temperatura		15 – 35°C
	Salinidad		0.37%
	pH		7 – 9
Nutritivos	C	CO ₂ , CO ₃ ⁻²	g/100 mL
	O, H	O ₂ , H ₂ O	g/100 mL
	N	N ₂ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻	g/100 mL
	P	PO ₄ ⁻²	g/100 mL
	S	SO ₄ ⁻²	g/100 mL
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 mL
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 mL
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al	Sales	µg/100 mL
	Vitaminas	B ₁₂ , tiamina, biotina	µg/100 mL

Los principales parámetros de cultivo que se consideran importantes son:

- **Intensidad lumínica**

En los sistemas de cultivo abiertos la intensidad lumínica dependerá únicamente de la irradiación solar que tenga el área, sin embargo, en los sistemas cerrados como lo son los fotobiorreactores, esta dependerá de luces artificiales como lámparas de incandescentes, fluorescentes o LED [47].

La tasa específica de crecimiento de las microalgas es un teórico máximo de 29 % calculado como 8 moles de cuantos de luz por 1 mol de CO₂ fijado. El crecimiento de las microalgas aumentará conforme la intensidad lumínica aumenta y si no se aplica fotoperiodo, la excesiva luminosidad podría inhibir su crecimiento y como factor secundario el aumento en la producción de lípidos [48]. Diversos autores han reportado que la intensidad lumínica para un adecuado crecimiento celular va de 1.02 hasta 16.2 lux [49, 50].

- **Micro y macro nutrientes**

Las microalgas requieren de estos nutrientes (Tabla 3) para efectuar sus funciones primarias y generar los metabolitos necesarios para su crecimiento, reproducción y en este estudio el principal interés, la obtención de lípidos [51].

Entre los macronutrientes se encuentran el carbono (orgánico e inorgánico), nitrógeno, fósforo, hidrógeno, oxígeno, azufre, calcio, magnesio, potasio, sodio y cloro. Con respecto a los macronutrientes, el nitrógeno, después del carbono, contribuye a la producción de biomasa, representando 7- 10 % en porcentaje de peso seco. El nitrógeno, suministrado en forma compuesta como nitratos, amoníaco o urea, es un constituyente esencial en todas las proteínas estructurales y funcionales. Condiciones limitadas de nitrógeno ocasionan que el CO₂ que se fija en la fotosíntesis para la síntesis de proteínas se dirija a la síntesis de lípidos o hidratos de carbono. Diversos estudios demuestran que la biosíntesis y la acumulación de los lípidos incrementan bajo condiciones limitadas de este nutriente [48]. Los micronutrientes son el hierro, boro, manganeso, cobre, molibdeno, vanadio, cobalto,

níquel, silicio y selenio [52]. Muchos de estos elementos trazas son importantes en las reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos, por ejemplo, el cobalto es esencial para la producción de vitamina B12 [48].

Si la finalidad del escalamiento en la producción de microalgas es la mayor obtención de biomasa con alta cantidad de lípidos, la composición del medio deberá tener altas concentraciones de nitratos y fosfatos que son esenciales para el crecimiento. Estos nutrientes de interés ayudan a inducir la producción de metabolitos y compuestos de interés comercial como los lípidos simulando un ambiente de estrés en las microalgas [53] [54]. Los principales medios de cultivo que se utilizan a nivel laboratorio son el medio TAP, Medio Gillard, Medio Basal, entre otros [21, 55-57].

- **Temperatura**

Es uno de los factores que más influye en el crecimiento de las microalgas por lo que se requiere conocer un valor establecido para cada especie según su máxima tasa de crecimiento. Los sistemas fotosintéticos siempre generan calor a causa de la ineficiencia de la fotosíntesis de convertir energía luminosa a energía química.

La temperatura influye directamente en la eficiencia fotosintética, específicamente en la actividad de la enzima Rubisco, que es la encargada de fijar el CO₂. El intervalo de temperatura para el cultivo de microalgas es muy amplio debido a que depende de la especie. Generalmente se encuentra entre 20-24 °C; una temperatura superior a los 35 °C puede ser letal debido a que la relación O₂:CO₂ en solución aumenta haciendo que la enzima Rubisco fije O₂ en lugar de CO₂ provocando la fotorrespiración [30, 58].

- **pH**

El pH está relacionado con la concentración del CO₂, es decir, a medida que el dióxido de carbono es consumido, el pH se eleva causando un desequilibrio químico con respecto al medio y la asimilación de nutrientes en las células. El intervalo de pH óptimo de crecimiento para las microalgas se encuentra entre 7- 8.5 [30, 58, 59].

- **Aireación**

El uso de los fotobiorreactores de columna con aireación, requiere un mezclado eficiente con el fin de producir una dispersión uniforme de las microalgas en el medio de cultivo reduciendo de esta manera la fotoinhibición y aumentando la absorción uniforme de nutrientes en cada célula. La tasa de aireación para un crecimiento adecuado de las microalgas se encuentra en un intervalo de 0.6 a 4.21 vvm [60, 61]

1.5 recuperación de biomasa

En la cosecha de la biomasa se emplean métodos como:

- **Floculación**

La floculación es un proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado. Es un paso del proceso de potabilización de aguas de origen superficial y del tratamiento de aguas servidas domésticas, industriales y de la minería [62, 63].

Algunos métodos de floculación y floculantes que se han utilizado son:

- Floculación orgánica: La cual ocurre por la adición de una sustancia de alto peso molecular que permite un mayor aumento del tamaño del flóculo, mejorando la sedimentación del cultivo [64].
- Floculación inorgánica: En la que se utilizan compuestos como cloruro de hierro, sulfato de aluminio y sulfato férrico [65].

- Autofloculación: La cual se produce por la presencia de iones de Magnesio y Calcio en el medio, a un pH alto, provocando la agregación de células microalgales [66].
- Biofloculación: En la cual se utilizan polímeros biodegradables como el quitosano y el alginato de sodio o microbial como Pestan para aglomerar células y hacer más fácil su cosecha [66].
- Electrofloculación: La cual es un proceso complejo en el que intervienen especies químicas como iones metálicos sometidos a fenómenos eléctricos que permiten la formación de flóculos [67].

- **Flotación**

Es el proceso por medio del cual se capturan las células microalgales utilizando dispersores de microburbujas de aire. A diferencia de la floculación, no necesita de la adición de químicos. Este método, respecto a la sedimentación, es más rápido ya que sólo requiere un par de minutos en lugar de horas para la sedimentación [68].

- **Sedimentación por gravedad**

Método adecuado para microalgas grandes ($> 70 \mu\text{m}$). Representa una de las técnicas más comunes para la recolección de biomasa microalgal en el tratamiento de aguas residuales. Los factores que intervienen en la eficiencia de esta técnica son la densidad y el radio de las células microalgales [69].

Luego se procede a hacer el espesamiento que tiene como objetivo primario la concentración de la suspensión que incluyen métodos como:

- **Centrifugación**

Método rápido empleado a nivel laboratorio con volúmenes pequeños. Este proceso dependerá de la cantidad del extracto y del tipo de biomasa que se pretende usar para la extracción lipídica. Este método es el preferido al momento de coleccionar microalgas debido a que no se requiere la adición de ningún floculante. Sin embargo, se necesita de un mayor suministro de energía eléctrica por lo que es demasiado caro a gran escala. La recolección de biomasa por este medio presenta una eficiencia >95 % [70].

- **Secado**

Por último, antes de la extracción lipídica se hace el secado. Esta etapa es de suma importancia debido a que el contenido hídrico presente en la biomasa inhibe los procesos de extracción de lípidos y transesterificación. Por otro lado, el secado de la materia prima es ventajoso para un tiempo de almacenamiento estable. El secado constituye entre el 70-75 % del costo total del proceso. Es necesario tomar en cuenta que a pesar de que la mayoría de los métodos para secar lodos son también utilizados para el tratamiento de biomasa, no todos son adecuados para el procesamiento de los lodos algales [71].

Los métodos más utilizados son:

- **Secado flash**

Consiste en dejar entrar la biomasa por medio de un tubo y durante el proceso es bañada con una masa de aire seco por la parte inferior subiendo mediante el tubo por la presión de aire hasta caer en el recolector (Figura 6).

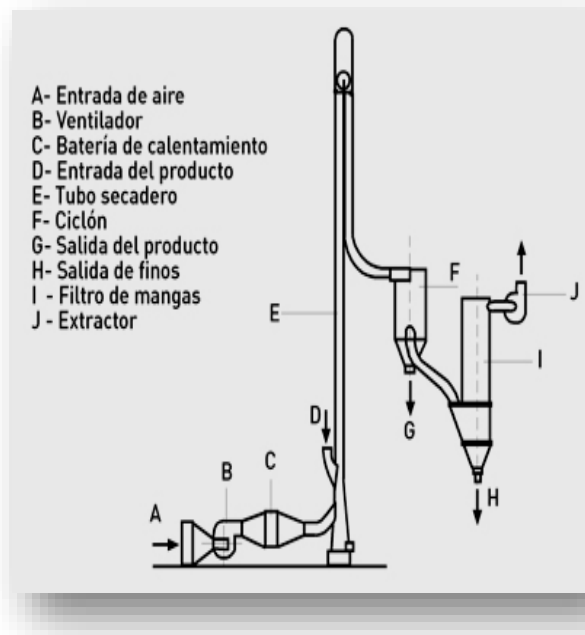


Figura 6. Sistema de secado Flash.

➤ **Tambores rotatorios**

De igual manera que el secado en flash se usan gases inertes o aire seco, sin embargo, este es un proceso lento en el cual el tambor rota dejando caer la biomasa lentamente al mismo tiempo que el aire va secándola hasta llegar al punto de recolección (Figura 7).

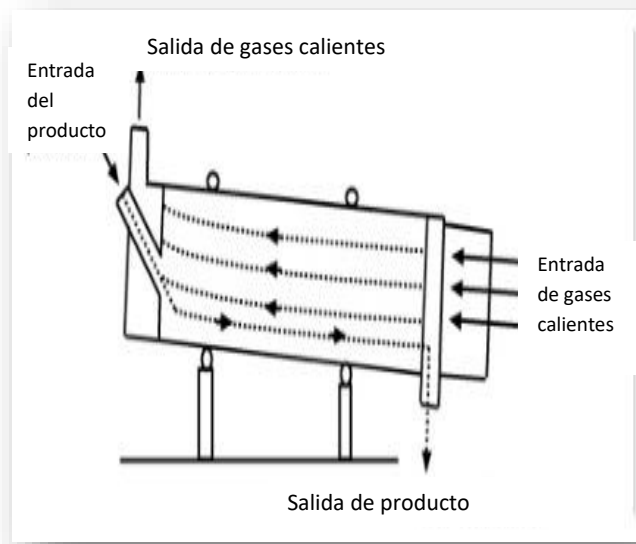


Figura 7. Secado en tambor rotatorio.

➤ **Por aspersión**

Método usado en diferentes áreas de secado de biomasa, en el cual la biomasa es atomizada con aire caliente procedente del horno realizando una masa ciclónica en la cámara de secado, es un proceso rápido a comparación de los tambores rotatorios (Figura 8).

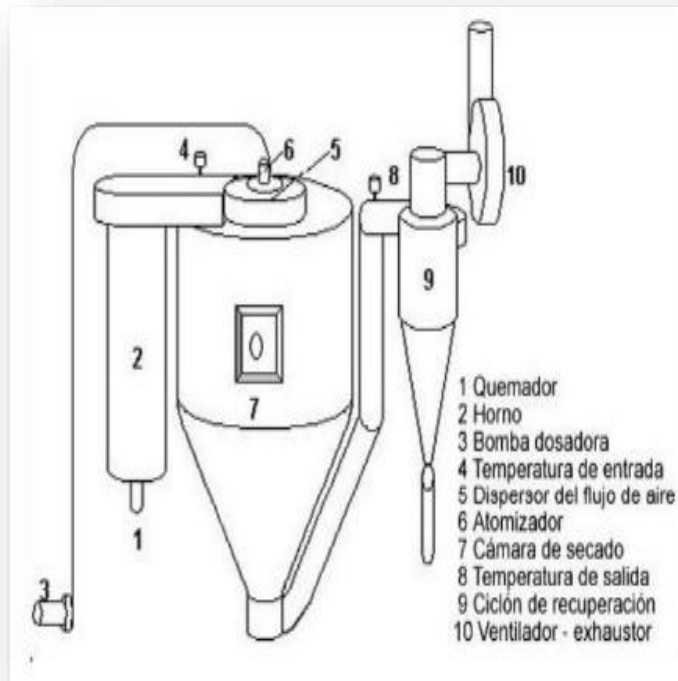


Figura 8. Secado por aspersión.

➤ **Liofilización**

La liofilización es un proceso que se lleva a cabo en periodos de hasta 48hr con temperaturas que llegan hasta los -35°C y en condiciones de vacío, lo cual provoca una absorción de toda la humedad que se encuentra en la biomasa (Figura 9).

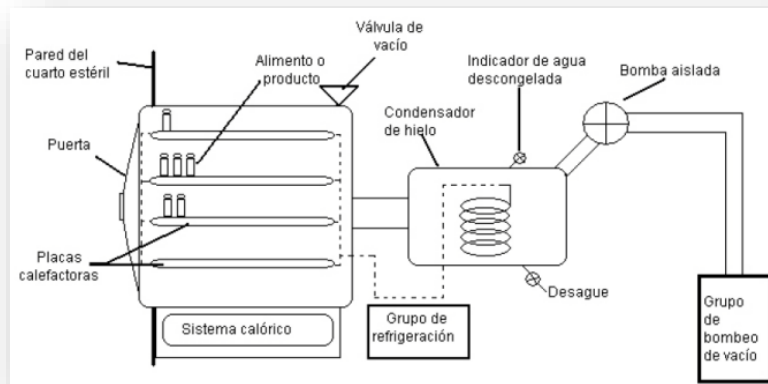


Figura 9. Liofilización.

➤ **Secado al sol**

El último método empleado, el secado al sol, es uno de los métodos más utilizados para las aguas residuales [72] y lleva aunado la utilización de una era de secado, que es una caja con grava y arena donde se extiende la biomasa (Figura 10).



Figura 10. Era de secado [26].

1.6 Métodos de extracción de lípidos

Para la extracción de lípidos existen diversas técnicas que hacen más eficiente ciertos procesos de este paso, ya sea eficientar el tiempo de extracción, el uso de materiales y lo más importante es reducir el costo energético [73]. A continuación se mencionan los métodos estandarizados más importantes [74].

- **Fluidos súper críticos**

Un fluido supercrítico posee propiedades de disolvente que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las de un gas. De esta manera, un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos. Los fluidos supercríticos tienen una viscosidad más baja y un coeficiente de difusión más elevado que los líquidos. La densidad de un fluido supercrítico aumenta al aumentar la presión y, al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en el fluido supercrítico aumenta de manera espectacular (Figura 11). El hecho de que las propiedades puedan ajustarse variando la presión y la temperatura tiene ventajas para la aplicación de estos fluidos como agentes de extracción [75]. Esta característica de agente extractor es la que permite obtener los lípidos de la biomasa microalgal, sin embargo, el manejar temperaturas y presiones tan elevadas genera un costo extra en la producción de biocombustibles [76].

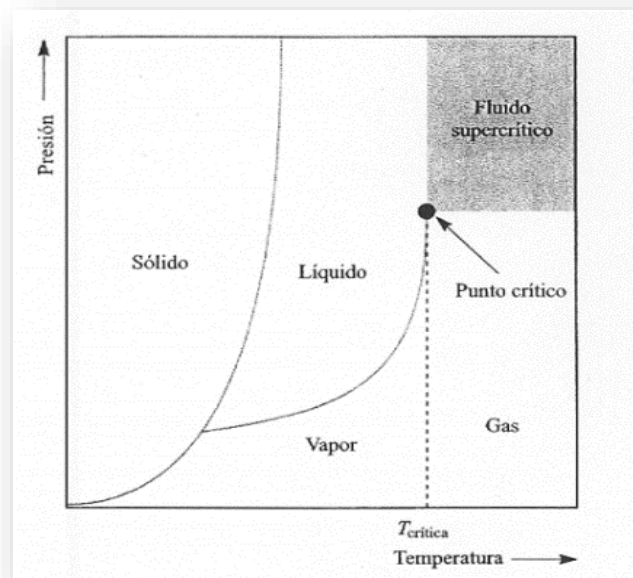


Figura 11. Diagrama de punto crítico de fluidos supercríticos.

- **Extracción enzimática**

En las últimas décadas se ha propuesto la utilización de enzimas en la extracción de aceite en medio acuoso. La utilización de agua como solvente de extracción resulta, para el medio ambiente y laboral, no perjudicial y menos costoso. Aunque el aceite no posee afinidad química por el solvente en este medio, se libera de la estructura original por disolución de componentes solubles en el agua y la degradación de las paredes celulares por acción de las enzimas, lográndose simultáneamente la recuperación de aceite y proteína. Aun así, presenta desventajas, como costos energéticos adicionales para asegurar un tamaño de partícula apropiado para la acción de la enzima, separación del aceite de la emulsión formada, el secado de la biomasa a humedades adecuadas para almacenamiento o posterior extracción por solvente y tiempo involucrados en la etapa de maceración [77].

- **Solventes químicos**

Este método es parecido al mencionado anteriormente. Utiliza cloroformo y metanol [78] sin embargo, hay diferentes tipos de solventes como el hexano y el etanol.

En este método la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos (hexano, metanol, etanol, cloroformo, alcoholes, etc.) estos disolventes solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes [79].

- **Extracción húmeda “OriginOil Single-Step Extraction™”**

Este proceso patentado por OriginOil se utiliza para extraer los lípidos de las microalgas sin necesidad de secar la biomasa, todo se hace como su nombre lo indica en un solo paso (Figura 12).

Una vez que el cultivo está en su mejor etapa de producción lipídica, se somete a pulsos electromagnéticos y se modifica el pH con la ayuda de CO₂. Esto genera el rompimiento de las células y por consiguiente la liberación del lípido al medio, paso seguido se hace pasar por un clarificador gravimétrico en donde son separadas las fracciones de lípidos, agua y biomasa restante [80].

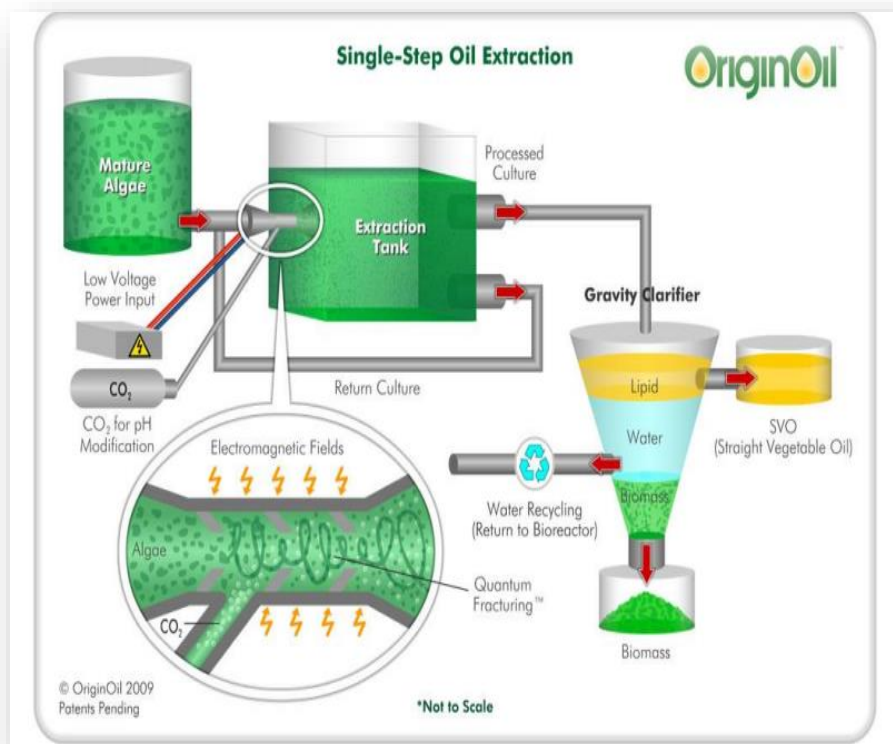


Figura 12. Extracción Húmeda.

1.7 Caracterización y utilidad de los metabolitos secundarios

En los organismos vivos, componentes químicos son sintetizados y degradados principalmente por una serie de reacciones químicas mediadas por enzimas [81]. Estos procesos son conocidos colectivamente como metabolismo, que comprende catabolismo (degradación), y anabolismo (síntesis) [82]. Todos los organismos poseen vías metabólicas similares por los cuales sintetizan y utilizan ciertas especies químicas esenciales: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos comunes, nucleótidos, y los polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, lípidos, RNA y DNA, etc.) [83]. Este es el metabolismo primario, y estos componentes, los cuales son esenciales para la sobrevivencia y bienestar de los organismos, son metabolitos primarios [84]. La mayoría de los organismos también utilizan otras vías metabólicas, produciendo componentes los cuales usualmente no tienen utilidad aparente: estos son los productos naturales o metabolitos secundarios, y las vías de

síntesis y utilización constituyen el metabolismo secundario [85]. Esas vías son tanto un producto de composición genética de los microorganismos como lo son las vías primarias, pero son quizás solamente activados durante etapas particulares de crecimiento y desarrollo, o durante periodos de estrés causado por limitación nutricional o ataque microbiano [86].

- **Isoprenoides**

Los isoprenoides (también conocidos como terpenoides) son compuestos ubicuos encontrados en todos los organismos vivos. A pesar de su notable diversidad de estructuras y funciones, todos los isoprenoides son derivados de una unidad precursora de cinco carbonos, el difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Figura 13) [83].

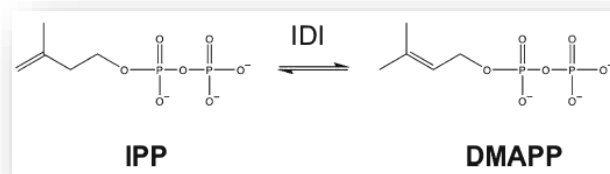


Figura 13. Estructura química del isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalilo difosfato (DMAPP) y su interconversión por la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI).

Los principales isoprenoides conservados en todas las eucariotas son: I) esteroides, controladores de la fluidez de las membranas del retículo endoplásmico y plasma; II) los poliprenilos C15 y C20 usados para la prenilación de proteínas; III) poliprenilos de cadena media (9-11 unidades de C5) que forman parte de las ubiquinonas, componentes esenciales de la cadena de transporte de electrones mitocondriales; y IV) la poliprenilo dolicol de cadena larga como lípido acarreador de azúcar utilizado en la glucosilación de proteínas en el RE (retículo endoplasmático) [87]. Los metabolitos primarios de fotótrofos eucariotas incluyen isoprenoides adicionales, tales como I) fitol como una parte de las clorofilas, tocoferoles y filoquinonas; II) los diversos carotenoides, esenciales como componentes funcionales y estructurales del aparato fotosintético; y III) el poliprenilo de cadena media que es parte de la plastoquinona portadora de electrones fotosintéticos. Los

isoprenoides que generalmente se conservan en eucariotas se sintetizan en el citosol o mitocondrias, mientras que la mayoría de los isoprenoides primarios específicos de las plantas se sintetizan en el plástido [88]. Uno de los metabolitos que más interés tienen para la síntesis de biocombustibles en microalgas es el fitol debido a su estructura idónea para generar bioturbosina [6].

- **Terpenos**

Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas [89]. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosintéticas), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de las membranas) [90].

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades de C5 y son nombrados monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades de C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando tienen más de ocho unidades de isopreno [91].

Muchas plantas producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales (responsables de sus olores y sabores característicos) los cuales actúan como repelentes de insectos e insecticidas; entre estos se encuentran generalmente los monoterpenos. Por otra parte, entre los diterpenoides se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno (Figura 14) de cadena abierta que forma parte de las clorofilas [92].

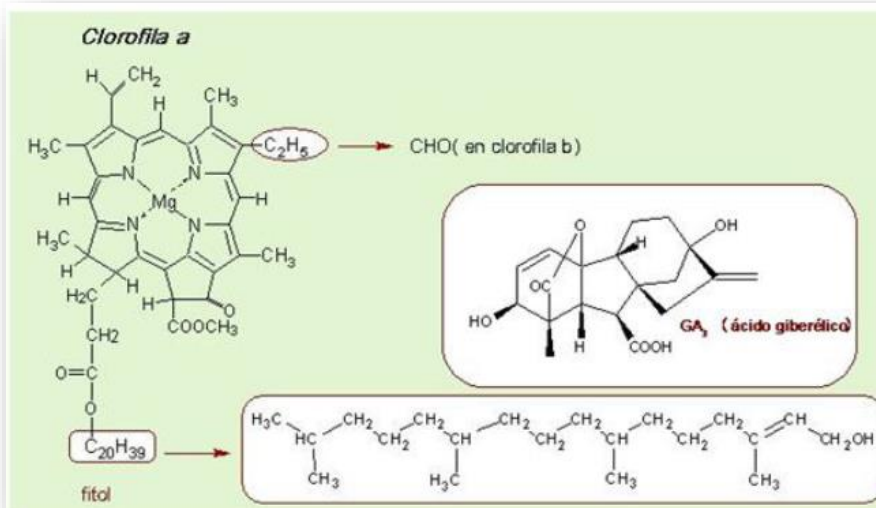


Figura 14. Estructura química del ácido giberélico y del fitol que forma parte de la clorofila.

- **Triglicéridos**

Los triglicéridos normalmente son utilizados para la síntesis de biodiesel mediante la transesterificación a partir del extracto lipídico de plantas. Sin embargo, empresas como UOP han desarrollado un método (Figura 15) que implementa la desoxigenación de los TAG y el uso de un catalizador patentado para llegar a producir bioturbosina [93].

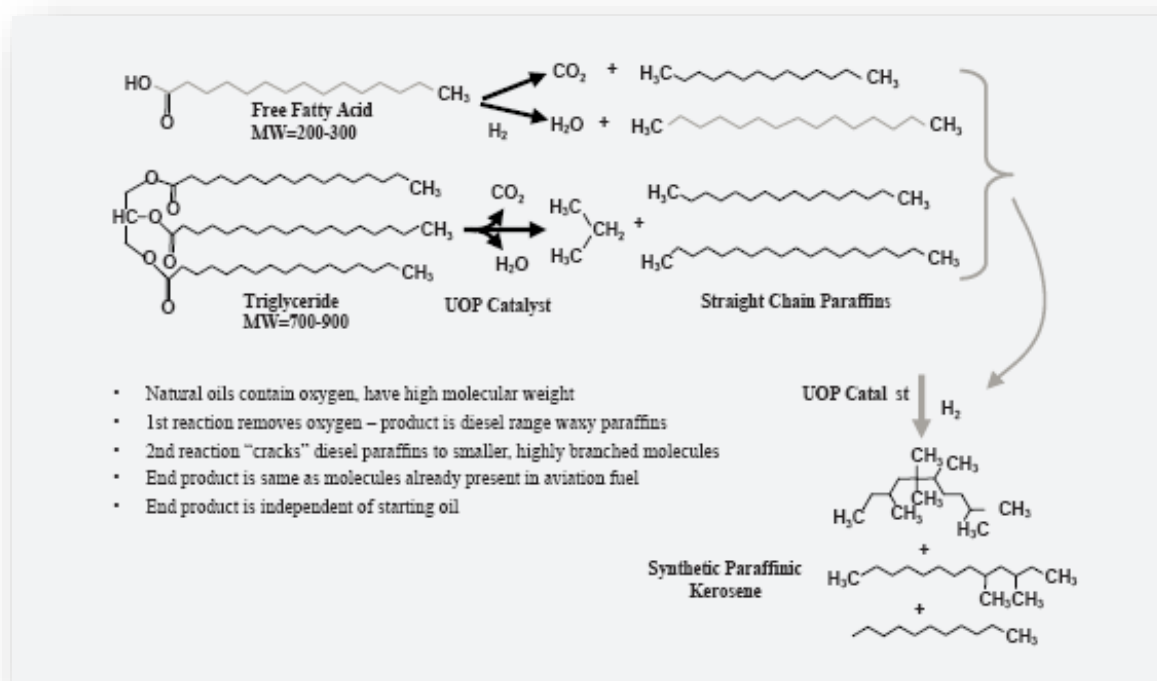


Figura 15. Proceso UOP para la síntesis de bioturbosina.

- **Producción de biocombustibles a partir de metabolitos secundarios de microalgas**

Los terpenoides han llegado a ser particularmente atractivos como fuentes alternas de combustible debido a que son producidos naturalmente por muchas plantas macroscópicas y microscópicas, lo que las hace completamente renovables [94]. El conocimiento actual de los terpenoides de plantas está basado en investigación especializada en química y bioquímica de plantas. Jörg Bohlmann y Christopher I. Keeling en su artículo enfocado en hemiterpenoides (C₅), monoterpenoides (C₁₀), sesquiterpenoides (C₁₅) y diterpenoides (C₂₀), señalan que la gran diversidad química de terpenoides de plantas ha sido utilizada por humanos desde tiempos antiguos, permaneciendo como una de las clases más importantes de derivados de plantas, químicos biológicamente activos y materiales industriales que podrían llegar a ser una fuente importante para el desarrollo de nuevos biocombustibles. Un beneficio significativo de este tipo de exploraciones es que las sociedades podrían depender menos de los petroquímicos para la producción de químicos especializados, materias primas químicas y posiblemente combustibles de transporte sirviendo como un complemento para un

desarrollo más avanzado de biocombustibles como biodiesel o etanol [6]. Como un ejemplo de la utilidad de estos compuestos se tiene la posibilidad de obtener gasolina a partir del fitol (un alcohol diterpénico encontrado en la naturaleza como una parte de la molécula de la clorofila) mediante craqueo catalítico, lo cual se muestra prometedor como una ruta renovable para combustible de transporte [91, 95].

Por otra parte, los fitosteroles son esteroides derivados de plantas y constan de una base de esteroides de cuatro anillos con un sólo grupo hidroxilo y una cadena lateral alifática; siendo los principales en muchas especies de plantas el β -sitosterol (a su vez el más abundante), el estigmasterol y el campesterol [96]. Cabe resaltar que existe una gran variedad de esteroides producidos por las microalgas, aunque su metabolismo y las funciones son aún poco conocidos. Su presencia depende de la clase, género y especie de la misma y puede ser influenciada por factores como intensidad de la luz, temperatura y etapa de crecimiento [97, 98].

1.8 Bioturbosina

El biokeroseno parafínico sintetizado (bioturbosina o biokps) es un biocombustible que se utiliza en la aviación y se han realizado vuelos de prueba sintetizando biokps a partir de aceite de *Jatropha*. Actualmente se está probando la capacidad de las microalgas para la elaboración de la bioturbosina ya que en la literatura estas fuentes de lípidos cuentan con mayor porcentaje de aceite con respecto a su peso seco en comparación a las plantas superiores [99].

Los metabolitos producidos por las microalgas están siendo utilizados para producir biocombustibles, tal es el caso de los triacilglicéridos. Sin embargo, la producción de este tipo de compuestos es de 20-50% de peso celular seco bajo condiciones ambientales adversas o estrés oxidativo. Otras biomoléculas que naturalmente son sintetizadas por las microalgas son el fitol y el β -sitosterol, mismos que recientemente se están empleando para la obtención de biocombustibles [100].

La producción de la bioturbosina se basa en la obtención de lípidos de aceites vegetales, los cuales se han obtenido a partir de plantas como la *Jatropha curcas*, la colza (*Brassica napus*) y la palma africana (*Elaeis guineensis*).

Actualmente existen varias empresas que utilizan diferentes procesos para sintetizar bioturbosina; como se reporta a continuación:

- *Amyris Inc.* Empresa brasileña que ha desarrollado y patentado un proceso de síntesis de bioturbosina a partir de azúcares de caña [101].
- *Neste Oil* Es líder en la producción de bioturbosina generada a partir de aceite de palma. Una prueba de Lufthansa mostró que Neste Renewables Jet Fuel reduce las emisiones de CO₂ con un consumo de biocombustible 1% inferior en comparación con el combustible fósil [102].
- *LanzaTech* ha producido 1,500 galones de combustible de aviación, derivado de gases industriales residuales de las fábricas de acero [103].
- *UOP* desarrolló un proceso flexible que puede utilizar diferentes aceites vegetales o grasas animales como materia prima con rendimientos de bioturbosina de hasta 36%. Utiliza procesos de hidrotratamiento, craqueo/isomerización y refinación [104].

En México, existe un proyecto de investigación llamado *CEMIE-BIO* dentro del cual se encuentra el clúster de Bioturbosina que está conformado por un grupo interdisciplinario que involucra diferentes centros de investigación. Las materias primas consideradas son: aceites de salicornia, jatropha y bioetanol. Una de sus principales metas será proveer a dos plantas semi-industriales que van a producir 16 metros cúbicos de bioturbosina al día [105].

- **La bioturbosina en la Industria de la aviación**

Gracias a las investigaciones y contribuciones de países como Alemania, Francia, Brasil, USA, por mencionar algunas, se ha visto una posibilidad de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero con el uso de la bioturbosina [106]. Sin embargo aún faltan

muchos estudios por hacer para poder decir que la bioturbosina, o algún otro biocombustible pueda sustituir el uso de los combustibles fósiles [107].

En el caso de México, desde el 2009, Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA), órgano descentralizado de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), ha impulsado el desarrollo de los combustibles alternativos de aviación y coordina los esfuerzos con otras instancias del Gobierno Federal , así como con la iniciativa privada y las organizaciones académicas y de investigación, para crear esta industria a nivel nacional [99, 108]. ASA actualmente es el único proveedor de combustible de aviación en México, por lo que al ser el último eslabón de la cadena de suministro tiene un rol y visión estratégicos desde los cuales actúa como promotor y catalizador de la industria de los biocombustibles sustentables de aviación [109].

Algunas aerolíneas han utilizado vuelos de prueba y comerciales utilizando bioturbosina producida a partir de diferentes materias primas. A continuación en la tabla 5 se muestran algunos ejemplos [110].

Tabla 5. Aerolíneas que han utilizado biocombustibles.

Aerolínea	Fuente de biocombustible	Porcentaje en motor	Vuelo	Fecha
Fly United Airlines	Aceites naturales y desechos agrícolas	20%	Los Ángeles - San Francisco	2009 a la fecha
Virgin Atlantic Airways	Aceite de palma	20%	Londres- Amsterdam	2008 a la fecha
Air Canadá	Aceites naturales	-	Iniciativa	2016

Alaska Airlines	Residuos forestales	20%	Tacoma-Washington	2016
British Airways	Residuos de basura	-	Londres	2012
Continental Airlines	Jatropha 99% Microalgas 1%	50%	Houston (90 min)	2009
Japan Air Lines	Camelina: 84% Jatropha: 15% Microalgas: 1%	50%	Tokio (90 min)	2009
Lufthansa	Aceites vegetales	20%	Hamburgo y Fráncfort	2013
Aeroméxico e Intejet	Aceite de Jatropha	27 y 30%	Cd. De México-Chiapas y Cd. México-Madrid	Julio y agosto 2011

1.9 Síntesis de la bioturbosina

- **Hidrocraqueo catalítico**

El proceso de hidrocraqueo (Figura 16) es uno de los múltiples procesos que tienen lugar en una unidad de refino de petróleo [91]. Este proceso se encuentra situado generalmente tras el proceso de destilación atmosférica, en la que se lleva a cabo una primera separación del crudo. Dado que de los compuestos más pesados de dicha columna aún se pueden

seguir obteniendo productos de alto valor, como gasolina o keroseno, es necesario incorporar unidades adicionales que los extraigan [111]. Un ejemplo de estas unidades sería el proceso de craqueo catalítico, mediante el cual se obtiene la mayor parte de la producción de gasolina. Otro ejemplo de estas unidades es el proceso de hidrocraqueo, que es una variante del proceso de craqueo catalítico en el que se incorpora además del catalizador, hidrógeno [112]. El hidrocraqueo es un proceso en dos fases que combina el craqueo catalítico y la hidrogenación, y por medio del cual las fracciones de destilado se descomponen en presencia de hidrógeno y catalizadores especiales dando lugar a productos de más valor agregado [113]. En comparación con el craqueo catalítico, el hidrocraqueo tiene la ventaja de que se procesan cargas con alto contenido de azufre sin desulfuración previa. En el proceso, la carga de productos aromáticos pesados se convierte en productos más ligeros, a presiones que varían entre 80 y 130 atm y temperaturas en un rango de 290 a 400°C, dependiendo de las características particulares del proceso [114].



Figura 16. Proceso de hidrocraqueo catalítico en petróleo.

- **Catalizadores en el proceso de hidrocrqueo**

Las reacciones de craqueo son endotérmicas, es decir, necesitan energía para llevarse a cabo, para las que se emplea un catalizador ácido, del mismo tipo que el empleado en el proceso de craqueo catalítico de petróleo (FCC). El catalizador más usado, son zeolitas introducidas en una matriz de sílice-alúmina. Las principales funciones de la matriz son: darle resistencia mecánica al catalizador y actuar como trampa de coque. [115].

Las reacciones de hidrogenación son exotérmicas, es decir se obtiene energía del proceso. A diferencia del FCC, en el hidrocrqueo el proceso es globalmente exotérmico. Para las reacciones de hidrogenación se necesitan catalizadores metálicos. Dado que ambas reacciones se llevan a cabo en el mismo reactor, el catalizador contiene platino y níquel para catalizar las reacciones de hidrogenación. Ambos metales están dispersos sobre la matriz de sílica-alúmina que envuelve a la zeolita [114].

- **Hidrodesoxigenación catalítica**

La hidrodesoxigenación catalítica es un proceso que se ha aplicado a la producción de gasolina verde y diésel verde en los últimos años, sin embargo en donde más se ha usado es en el hidroprocesamiento del petróleo al separar las fracciones de éste junto con la hidrosulfuración, hidrosnitricación y la hidrosmetanización [91, 116].

El hidroprocesamiento usado en esta reacción normalmente se hace a altas temperaturas para eliminar el azufre, el oxígeno y el nitrógeno del petróleo, siendo el oxígeno el menos importante ya que las fracciones en el petróleo son de menos de 3000 ppm (en peso), sin embargo, en la producción de biocombustibles a partir de biomasa es uno de los más importantes ya que la parte de oxígeno es de 500,000 ppm (en peso), siendo la parte sulfurada la menos importante [117].

Una de las ventajas de producir biocombustibles a partir de la hidrodesoxigenación es que el biocombustible resultante se puede combinar sin problema con petróleo convencional debido a las características de alta calidad y libre de oxígeno, reduciendo así el uso de

combustibles fósiles. También presentan una ventaja sobre los biocombustibles compuestos por ésteres metílicos de ácidos grasos debido a que no presentan el problema del flujo a bajas temperaturas, ni el daño que le ocasionan a los motores debido a la corrosión [118].

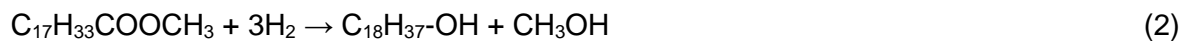
El proceso para producir diésel verde que se da en la reacción a altas temperaturas y en presencia de hidrógeno consiste en que las cadenas de acilo en las grasas (triglicéridos) se saturan o se descomponen a mono y diglicéridos seguido de una decarboxilación, decarbonilación e hidrodeseoxigenación. En estas reacciones (hidrogenólisis) los alcoholes grasos se reducen a diésel y los ésteres grasos se reducen a alcoholes grasos (deshidratación-hidrogenación) [119]. En la decarboxilación y decarbonilación se producen cadenas largas de alcanos y alquenos liberando dióxido y monóxido de carbono simultáneamente ligado a la liberación de agua.

Ejemplo de reacciones:

Hidrogenólisis:



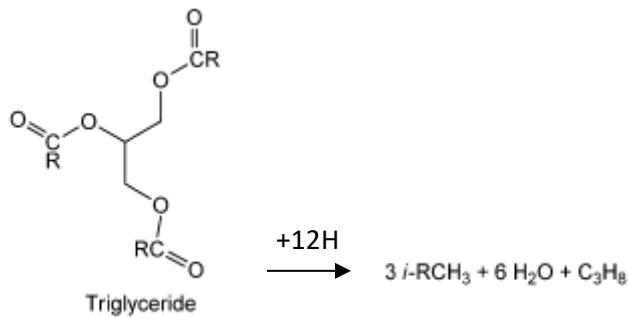
Deshidratación-hidrogenación:



Decarboxilación y decarbonilación:



Hidrodeseoxigenación e hidroisomerización



(4)

- **Catalizadores del proceso de hidrogenación**

Los catalizadores del proceso de hidrogenación dependerán de las condiciones de los aceites que se vayan a utilizar como materia prima.

La saturación e insaturación de las cadenas lipídicas es un punto clave en los catalizadores al igual que el grado de desactivación del catalizador.

Los catalizadores como NiMo/Al₂O₃, Ni/ Al₂O₃ y Mo/ Al₂O₃ han sido estudiados en procesos de hidrotreamiento en aceite de colza e influye principalmente el sitio activo de los tres catalizadores siendo el primero más específico y con una mayor tasa de conversión. Por otra parte en el tratamiento del aceite de Jatropha se observó que catalizadores como Ni/CeO₂ funcionan mejor en la vía de hidrogenólisis de cadenas C-O mientras que en la vía de descarboxilación el mejor catalizador fue Ni-Cu/CeO₂ [120].

- **Procesos utilizados para la síntesis de bioturbosina**

- Hidroprocesamiento de ácidos grasos y sus ésteres, HEFA

Este proceso se encuentra ampliamente desarrollado a nivel internacional y de manera incipiente en México. Este combustible alternativo para la aviación ha sido certificado por la ASTM (American Society for Testing and Materials) desde julio de 2011 y ha sido utilizado en el transporte aéreo de personas con diversos ensayos, incluido México a través del

organismo gubernamental Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA) y aerolíneas como Aeroméxico, Volaris e Interjet, principalmente.

El hidroprocesamiento, descrito anteriormente y con el cual se realizará la síntesis del presente trabajo, es el proceso en el cual la materia prima se hace reaccionar con hidrógeno a alta presión y temperatura, así como en presencia de catalizadores que promueven reacciones de eliminación de oxígeno, azufre, y nitrógeno, pero también de saturación de los enlaces dobles contenidos en olefinas y aromáticos. Por otro lado, en el hidroprocesamiento de los triacilglicéridos contenidos en los aceites vegetales, algales o grasas animales, se promueven reacciones de hidrogenación de dobles enlaces, descarboxilación, descarbonilación y desoxigenación; siendo ésta última reacción la que debe favorecerse para la obtención de n-parafinas [121].

➤ Hidroprocesamiento Fischer-Tropsch

Uno de los primeros procesos certificados por la ASTM para la fabricación de combustible de avión es la conversión de la biomasa mediante su gasificación a alta temperatura. Mediante este proceso se obtiene un gas de síntesis o “*syngas*”, que consiste en una mezcla gaseosa rica en hidrógeno y monóxido de carbono. Posteriormente, se utiliza el proceso de Fischer-Tropsch (FT) para convertir catalíticamente el gas de síntesis a productos líquidos que pueden ser refinados en combustibles sintéticos.

El proceso Fischer-Tropsch es actualmente visto como una tecnología clave para la conversión de gas sintético a combustible de transporte y otros productos líquidos. Los investigadores alemanes Franz Fischer y Hans Tropsch desarrollaron este proceso para la producción de combustibles líquidos a partir del carbón mineral junto con partículas de hierro alcalinizado a una temperatura de 400° C y alta presión [122].

➤ Isoparafinas Sintetizadas, SIP

Mediante técnicas de biología sintética se han desarrollado microorganismos (levaduras) que convierten los azúcares de origen vegetal a partir de cultivos tales como la caña de azúcar o el sorgo, en hidrocarburos que pueden sustituir a los productos petroquímicos en una amplia variedad de productos, incluidos los combustibles para el transporte vehicular y de aviación [123].

➤ Proceso ATJ

El proceso Alcohol-a-bioturbosina (ATJ por sus siglas en inglés) convierte alcoholes de cadena corta de carbono (tales como metanol, etanol, y butanol) a alcanos de cadena más largos C12 a C16 (como los constituyentes de la turbosina). El alcohol se produce convencionalmente (fermentación de azúcar/almidón), termoquímicamente (por ejemplo, gasificación y posterior proceso de mejora), o a través de otras vías (microbiología industrial y algas).

Se conoce de varias empresas que están explorando este proceso (ATJ), incluyendo Gevo y Cobalto. Gevo desarrolló y es propietaria de una tecnología de fermentación integrada (GIFT™), que consiste en un biocatalizador de levadura que convierte los azúcares en isobutanol. El alcohol se convierte entonces en queroseno iso-parafínico (IPK), una mezcla utilizada en combustible para aviación, a través de reacciones adicionales, tales como deshidratación, oligomerización, hidrogenación, y la destilación. Del mismo modo, Cobalt ha desarrollado su propio proceso de extracción de los azúcares de la biomasa, convirtiéndolos directamente en bio n-butanol, molécula que sirve de plataforma para la producción de una amplia gama de combustibles y productos químicos, incluyendo el combustible para aviones [124].

I. Hipótesis

Es posible sintetizar bioturbosina a partir de los lípidos producidos por la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en un fotobiorreactor de columna de burbujeo de 20 L.

II. Objetivo general

Sintetizar bioturbosina a partir de los lípidos producidos por la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en un fotobiorreactor de columna de burbujeo de 20 L.

III. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones que permitan el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en un fotobiorreactor de columna de 20 L
- Implementar la recuperación de la biomasa en una era de secado y obtener el extracto lipídico
- Realizar la síntesis de la bioturbosina por hidrogenación catalítica en un reactor de lecho fijo

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos planteados en el presente trabajo se siguió la metodología descrita en la figura 17.

Primero se realizaron pruebas de adaptación de la cepa *Scenedesmus obliquus* en agua residual sintética (ARS) con diferentes fuentes de carbono y concentraciones. El cultivo se realizó en matraces de 50 mL hasta pasar a botellas PET de 2 L, posteriormente a los fotobiorreactores de columna de burbujeo de 20 L para la producción de biomasa. Se probó la recuperación de biomasa en una era de secado y se realizó la extracción de lípidos. Con el extracto obtenido, se llevó a cabo la síntesis de bioturbosina en un reactor de lecho fijo para finalmente identificar los compuestos formados.

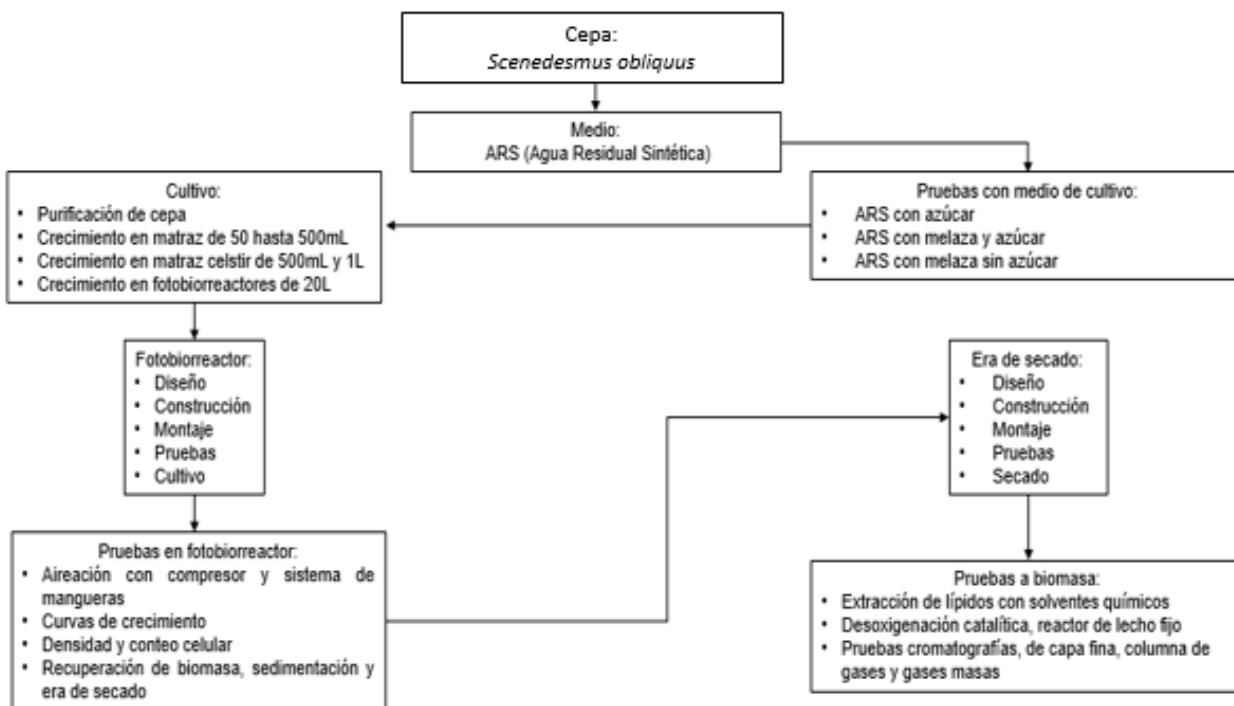


Figura 17. Diagrama del proceso experimental

2.1 Material biológico

La cepa *Scenedesmus obliquus* fue adquirida del departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

2.2 Medio de cultivo

El medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) se empleó en los pre-cultivos y se preparó con agua bidestilada, se ajustó el pH del medio a 7.0 con KOH 1M o HCl 1M y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos y 1 atm. La formulación de este medio se encuentra en el Anexo 1.

El medio agua residual sintética (ARS) utilizado fue una modificación del reportado por Pérez *et al.* [125]. Su formulación se presenta en el Anexo 1. Este medio se empleó en los cultivos a partir de 100 mL.

2.3 Melaza

La melaza se obtuvo del ingenio azucarero “La Joya” del municipio de Champotón, Campeche, México, y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

2.4 Purificación de la cepa

La purificación de la cepa se realizó por el método de diluciones seriadas. En un tubo Falcon de 15mL se pusieron 10mL de medio TAP y 1mL de muestra. De esta solución se tomó 1mL de la mezcla después de una correcta agitación y se colocó en el segundo tubo con 10 mL de medio TAP y así sucesivamente hasta llegar al sexto tubo, se tomó una muestra y se plaqueó en cajas Petri con medio TAP y agar. Las colonias aisladas se cultivaron en medio TAP líquido.

2.5 Cultivo de la microalga

➤ Cultivo en matraces de 50 mL

1 colonia de la caja Petri se inoculó en un matraz de 50 mL con 30mL de medio TAP y se incubó a temperatura ambiente con una iluminación de $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, una agitación orbital de 120rpm por 8 días.

➤ Cultivo en matraces celstir de 500 mL y 1 L

Cuando el cultivo de los matraces de 50 mL llegó a la fase estacionaria (8 días) se revisaron los cultivos en el microscopio para observar si había contaminación. Si el cultivo no presentaba contaminación se procedía a inocular los matraces Celstir con 500 mL de medio TAP. La agitación cambió de orbital a mecánica (los matraces estaban equipados con un agitador mecánico) a 120-150rpm. El cultivo se llevó a cabo con una iluminación de $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y una duración de 8 días. De los matraces Celstir de 500 mL, se pasó a cultivos en matraces Celstir de 1 L a las mismas condiciones de operación.

➤ Cultivo en botellas PET de 2.5 L

Las botellas PET se trabajaron con un volumen de medio de 2 L. Se utilizó un 10% de inóculo proveniente de los matraces Celstir de 1 L. La agitación se realizó por burbujeo de aire a 1vvm, empleando mangueras esterilizadas con cloro al 5%, filtros de aire y el aire limpio fue burbujeado en agua destilada estéril para humidificarlo y evitar que el medio se concentre. El cultivo se llevó a cabo con una iluminación de $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y una duración de 8 días. El cambio en el tipo de contenedor se debió a que no se contaba con matraces tipo Celstir de esta capacidad, necesaria para producir el inóculo para los fotobiorreactores de 20 L y por su fácil adquisición. En este tipo de botellas no se pudo agitar de manera mecánica, por lo que se utilizó aireación, y así se iniciaba la adaptación de la cepa a este tipo de agitación.

➤ Cultivo en fotobiorreactores de columna de 20 L

El fotobiorreactor se esterilizó con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, con aireación durante 3 h. Luego se enjuagó profusamente con agua destilada. El reactor se cargó con 18L de medio (ARS con melaza) y se inoculó con los cultivos provenientes de las botellas

de PET. Se tomaron muestras para el conteo celular cada 24h. La aireación fue de 0.2 vvm (debido a la capacidad de la bomba de aire). La iluminación fue de $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a la temperatura del laboratorio ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Los cultivos fueron de 5-7 días.

2.6 Conteo celular

Se determinó la concentración celular del cultivo tomando una muestra de $100 \mu\text{L}$, posteriormente se tomó una alícuota de $12 \mu\text{L}$ que fue depositada en un hematocitómetro de Neubauer (Figura 18). Mediante un microscopio óptico “Nikon Eclipse E200” se observó a objetivo 40 X y se cuantificó el número de células.

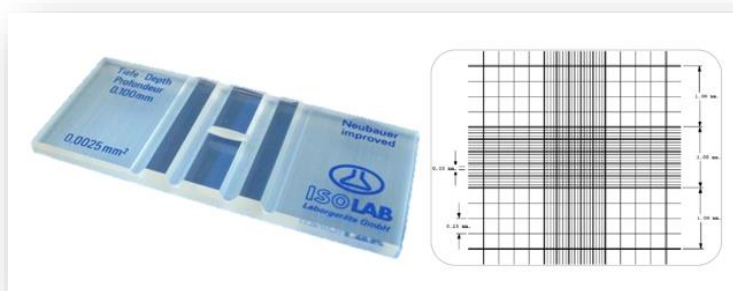


Figura 18. Cámara de Neubauer.

Para el cálculo del número de células por unidad de volumen se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular (cel}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{\text{No.de Células}}{\text{Volumen}} = \frac{\text{No.de Células}}{0.02\mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{\text{mL}} = \frac{\text{No.de Células} \times 50,000}{\text{mL}} \quad (4)$$

2.7 Recolección de biomasa

La recuperación de la biomasa de los cultivos en matraces Celstir de 1 L y en los fotobiorreactores de 20 L se realizó en dos etapas. Primero el cultivo se dejó sedimentar toda la noche en los matraces Celstir y por 24h en los fotobiorreactores. Se retiró el sobrenadante y se procedió a recuperar la biomasa. De los Celstir de 1 L, la biomasa

recuperada se centrifugó a 7000 rpm por 10min. En el caso de los fotobiorreactores, la biomasa recuperada se pasó a la era de secado. El sólido seco de ambos procedimientos se congeló y se liofilizó a -30°C durante 48 h. Se registró el peso seco de la biomasa.

2.8 Extracción y determinación de lípidos

La extracción de los lípidos se realizó con cloroformo-metanol 2:1 v/v. Se añadió 15 mL de la mezcla de solvente por cada 38 mg de biomasa seca. Las extracciones se realizaron en matraces de 50 mL, en una agitador orbital a 140 rpm, 38 °C por 3 horas [6]. Los solventes se separaron de la biomasa extraída por centrifugación a 6000rpm, a 4°C por 10min. Con ayuda de una pipeta se extrajo el sobrenadante. Los solventes se evaporaron con la ayuda de un evaporador rotatorio Ika® RV10 digital, se secó el extracto lipídico a 60 °C por una hora y se pesó en un vial previamente tarado. Las extracciones se realizaron por triplicado.

2.9 Cromatografía de capa fina

Para determinar la presencia de lípidos contenidos en el extracto, se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina. Para ello se empleó una placa de gel de sílice como fase estacionaria (Cromatofolios Merck®). La fase móvil utilizada fue una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 9:1:0.1 (v/v) y, finalmente la placa se reveló con una solución de ácido fosfomolibdico en una campana de extracción. Se utilizó como referencia aceite vegetal comercial.

2.10 Fotobiorreactor de 20 L

El fotobiorreactor se fabricó en acrílico de 3 mm de espesor con una capacidad de 20 L, con 20 cm de diámetro y 1.30 m de altura (Figuras 19,20). La tapa cuenta con 3 agujeros, uno para la entrada de aire, otro para inoculación y el último para la expulsión de aire. Tiene 2 llaves, una a altura media (65cm) para la toma de muestras y el vaciado del sobrenadante después de la sedimentación y otra a nivel bajo (10cm) para la colecta del sedimento microalgal.

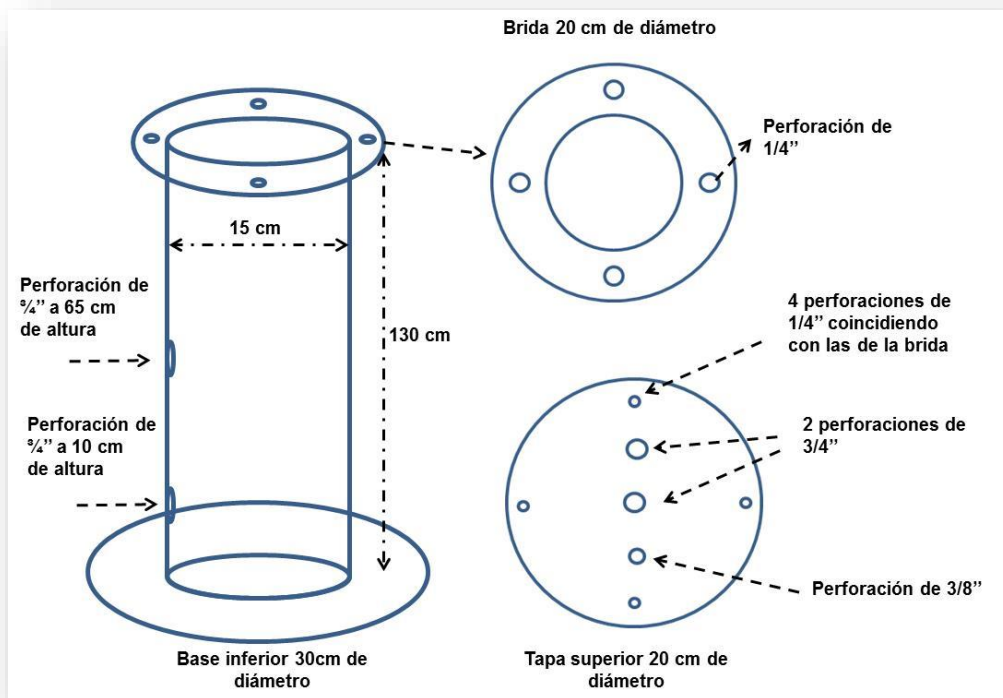


Figura 19. Diagrama del fotobiorreactor.



Figura 20. Fotobiorreactor de 20 L

El sistema de aireación consistió en una cruz de PVC con agujeros, a manera de dispersor, instalado en el fondo del biorreactor (Figura 21).



Figura 21. Sistema de aireación del fotobiorreactor.

2.11 Aireación /Agitación

Se utilizó una bomba ELITE® 802 que proporcionó un flujo de aire de 2 ± 0.5 LPM. Este tipo de bomba se utilizó para la aireación tanto de las botellas PET como del fotobiorreactor.

2.12 Iluminación

La intensidad lumínica fue de $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en las paredes laterales del reactor y de $38 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en el interior del mismo utilizando dos lámparas fluorescentes de luz fría de 24W dispuestas a cada lado del reactor.

2.13 Era de secado

La era de secado se construyó en acrílico con un grosor de pared de 1cm, con una altura de 40cm y 45cm de ancho (Figura 22). Cuenta con un agujero de 3mm de diámetro en el fondo para la remoción de líquido filtrado.

Para el secado se procedió a llenar la era con 20cm de altura de grava, encima se puso una capa de arena de 10cm de altura, ambas capas como soporte filtrante grueso. En la superficie se colocó una tela llamada comercialmente “black out” como medio filtrante para la retención de las células que componen la biomasa. El lodo microalgal se esparce sobre la tela para que el medio líquido filtre a través de ella y la biomasa retenida seque.

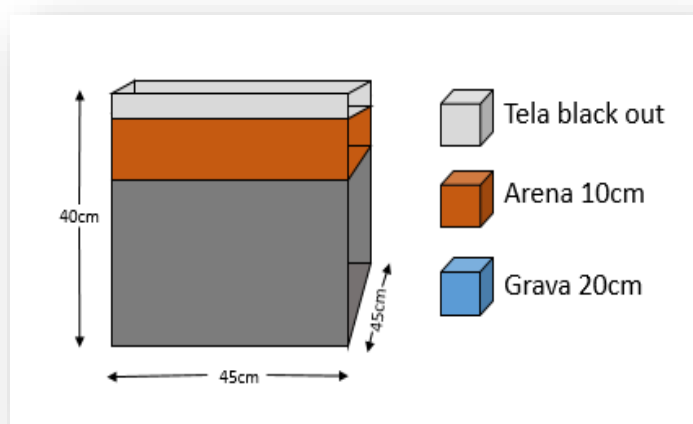


Figura 22. Diseño de era de secado.

2.14 Síntesis de bioturbosina

La síntesis de la bioturbosina se llevó a cabo en un reactor de lecho fijo marca PID Eng&Tech S.L. modelo “Microactivity Reference” (Figura 23). Se utilizó como alimentación el extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus obliquus* diluido en dodecano en una concentración del 8% (13.1 mL de extracto en 150 mL de dodecano).

El catalizador que se utilizó fue Pt-HZSM22 γ -Al₂O₃ Lote #4 sintetizado en el CICY y mezclado con carburo de silicio en una concentración de 1mL de catalizador y 2.5mL de carburo de silicio llenando el lecho catalítico del reactor.



Figura 23. Reactor de lecho fijo

2.15 Condiciones de reacción

➤ Activación del catalizador

Se realizó con un flujo constante de 50 mL·min⁻¹ de hidrógeno, una presión de 25 bar, una temperatura de 400°C, por 190 min. Este paso se lleva a cabo antes de cada reacción. Siempre se utilizó catalizador nuevo.

➤ Reacción

La temperatura del reactor se fijó en 330°C y la presión en 30 bar. El flujo de hidrógeno se elevó a 55 ml·min⁻¹. Cuando las condiciones estuvieron estables, se inyectó la solución de lípidos a un flujo de 0.25 ml·min⁻¹ y una presión de 80-90 bar. A partir de que cayó la primera gota de producto líquido de reacción, (alrededor de 30-35 min del inicio de inyección de la

muestra) se inició la cuenta de tiempo para la toma de muestras. El tiempo total fue de 3 h, es el tiempo en que pasó toda la carga del reactor y se tomó muestras cada hora.

2.16 Cromatografía de gases – espectrometría de masas

Las fracciones de la reacción de hidrocrqueo catalítico fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 78900 GC System, acoplado con un espectrómetro de masas 5977 MSD y una columna marca Agilent Technologies HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 micras). Las condiciones fueron: temperatura inicial de 70 °C en isoterma por 5 minutos, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 200 °C y mantenida en isoterma por 5 minutos, y la última rampa de 20 °C/min hasta 290 °C, manteniendo en isoterma 15 minutos. Se utilizó como gas acarreador helio con un flujo de 1 mL/min. Se inyectó 1 µL de muestra en modo Split con una relación 20:1. Las muestras se inyectaron sin tratamiento previo y sin dilución.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Purificación de la cepa de la microalga *Scenedesmus obliquus*

La implementación del método de diluciones seriadas (Figura 24) junto con las siembras en cajas Petri con medio TAP y agar (Figura 25), permitió reducir la contaminación hasta que al microscopio no se observó la presencia de bacterias.

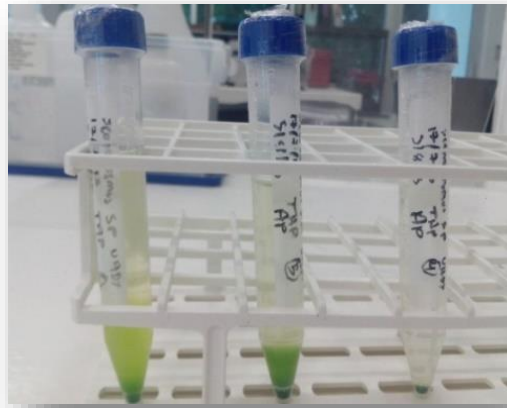


Figura 24. Aislamiento por el método de diluciones seriadas.

No se realizaron estudios más profundos para poder afirmar que la cepa estaba pura. Esto no se contempló como parte de los objetivos del presente trabajo, ya que se iba a trabajar con un fotobiorreactor y medio no estéril. Se monitorearon los cultivos durante este estudio para eliminar aquellos en los que la contaminación era evidente al microscopio y a simple vista por la apariencia del medio de cultivo.



Figura 25. Cajas Petri con cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Los cultivos obtenidos en cajas de Petri sirvieron de semilla para los cultivos en medio TAP líquido que sirvieron para la producción de los inóculos (Figura 26).

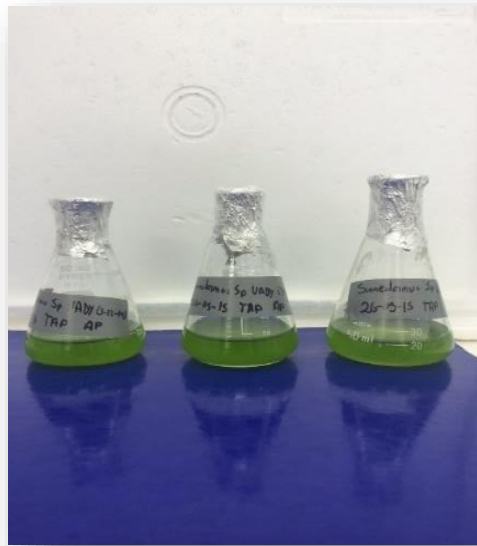


Figura 26. Cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en medio líquido.

3.2 Cambio del medio de cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus*

El cultivo de las microalgas a nivel matraz se realizó en medio TAP [126] ya que en estudios anteriores realizados en el grupo de trabajo, se ha observado que este medio permite un crecimiento más rápido de las microalgas que otros medios como el BG-11 o el Bold Basal.

Para el escalamiento del cultivo de microalgas con fines de producción de biocombustibles, en particular la bioturbosina, ésta debe ser generada a un costo competitivo. Por ello, es necesario tratar de bajar costos; y la utilización de un medio como el agua residual, es una buena opción para sustituir al medio sintético. Para los fines del presente trabajo se utilizó un agua residual sintética (ARS) que ha sido reportada en trabajos previos [127]. Por otro lado, la fuente de carbono puede provenir de desechos agroindustriales. En un trabajo anterior se reportó que al agua residual sintética se añadió aguamiel de café y melaza como fuentes de carbono [127] y se obtuvieron resultados favorables, ya que la microalga se reprodujo adecuadamente.

Para corroborar la adaptación de la microalga a este tipo de medio, se probaron a nivel matraz (20 mL de medio), tres tipos de medio de cultivo añadiendo azúcar y/o melaza como fuente de carbono:

➤ ARS con azúcar

La formulación del ARS se tomó tal cual se presenta en Anexo 1.

➤ ARS sin azúcar y con melaza

Al preparar el medio se omitió agregar los 4g de azúcar de la formulación original y se añadió 15 mL de melaza por litro de medio como fuente de carbono.

➤ ARS con azúcar y melaza.

Este medio se preparó le añadió tanto el azúcar de la formulación original así también como los 15mL de melaza.

Los resultados obtenidos con estos medios fueron los siguientes. Se observó que en el ARS con azúcar la proliferación de microalgas es uniforme y con una buena densidad. Se observaron microalgas del mismo tamaño (Figura 27) con poca contaminación.

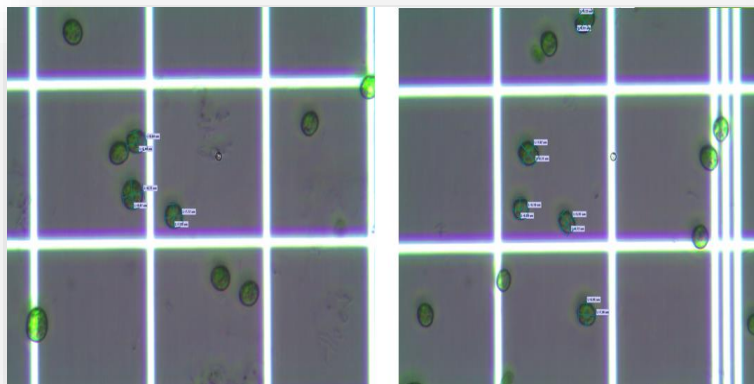


Figura 27. Cultivo de microalgas en ARS con azúcar.

El cultivo en ARS sin azúcar y con melaza mostró una densidad celular entre 20 y 30% menor con respecto al cultivo en ARS con azúcar, al quinto día. El tamaño de las células no fue uniforme. Se observó contaminación por bacterias (Figura 28).

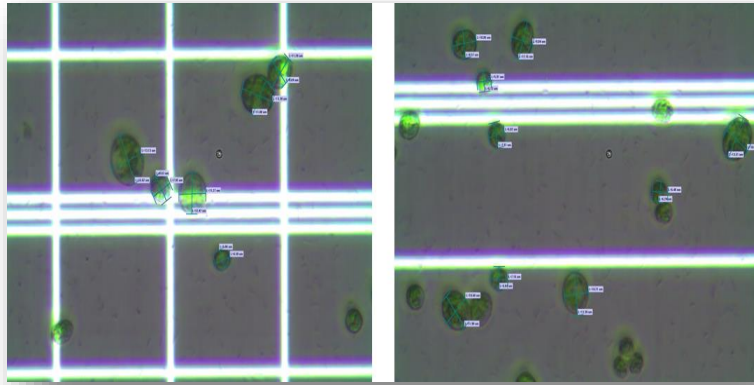


Figura 28. Cultivo de microalgas en ARS sin azúcar con melaza.

Por último, el cultivo en ARS con azúcar y melaza presentó un alto grado de contaminación bacteriana y las células no presentaron uniformidad (Figura 29).

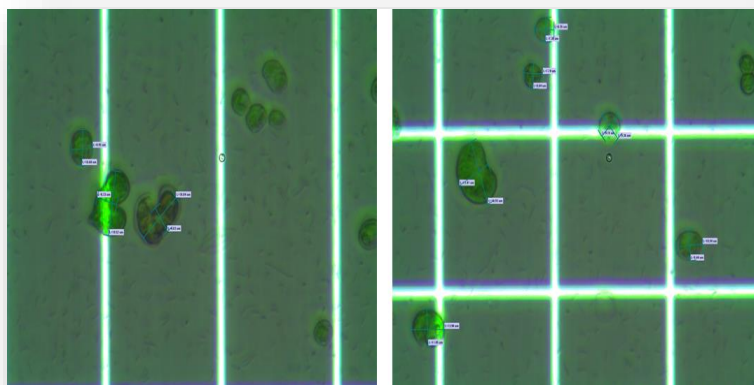


Figura 29. Cultivo de microalgas en ARS con azúcar y melaza.

Las células en los 3 diferentes tipos de cultivo tuvieron una variación considerable de tamaño, las más pequeñas presentes en los medios con ARS y azúcar presentaron en promedio 6 μm de diámetro y las más grandes observadas en el ARS con azúcar y melaza hasta 15 μm de diámetro en promedio.

Debido a los problemas de contaminación y el efecto negativo en el crecimiento de las células, se optó por dejar de utilizar el medio con ARS y melaza en los cultivos de mantenimiento a nivel matraz y continuar utilizando medio TAP, porque es necesario que las células se encuentren en estado óptimo para poder realizar el cultivo a escalas mayores.

Sin embargo, el ARS y melaza como medio de cultivo si se utilizó en los experimentos en botellas PET de 2.5 L y en el fotobiorreactor de 20 L, como se indica en la siguiente sección.

3.3 Aumento del volumen de cultivo

A partir de volúmenes de 500 mL y 1 L, los cultivos se realizaron en matraces tipo Celstir (Figura 30).



Figura 30. Cultivo de microalgas en matraces celstir de 500 mL y 1 L.

Los cultivos se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas durante 15 días para que las microalgas llegaran a su fase estacionaria y posteriormente se realizó el escalamiento en botellas PET de 2.5 L. A este volumen se utilizó ARS y se decidió probar dextrosa (Figura 31) como fuente de carbono para ver si el cultivo se desarrollaba adecuadamente y tener mejores resultados que los experimentos en los que se utilizó azúcar (sacarosa).



Figura 31. Cultivo de microalgas en botellas de 2.5 L con ARS y dextrosa.

Se ha reportado la utilización de dextrosa (glucosa) en el cultivo de *Scenedesmus obliquus* para la producción de ácidos grasos que van desde los 16 a 18 carbonos logrando una concentración de 67% [128, 129].

Debido a que las botellas PET fueron desinfectadas y no esterilizadas, fue necesario elevar la cantidad de inóculo al 15%, para poder evitar el desarrollo de contaminación en estos cultivos. En la figura 32 se puede observar la curva de crecimiento del cultivo en botellas PET de 2.5 L con dextrosa como fuente de carbono. De esta manera se pudo crecer el inóculo de los fotobiorreactores de 20 L.

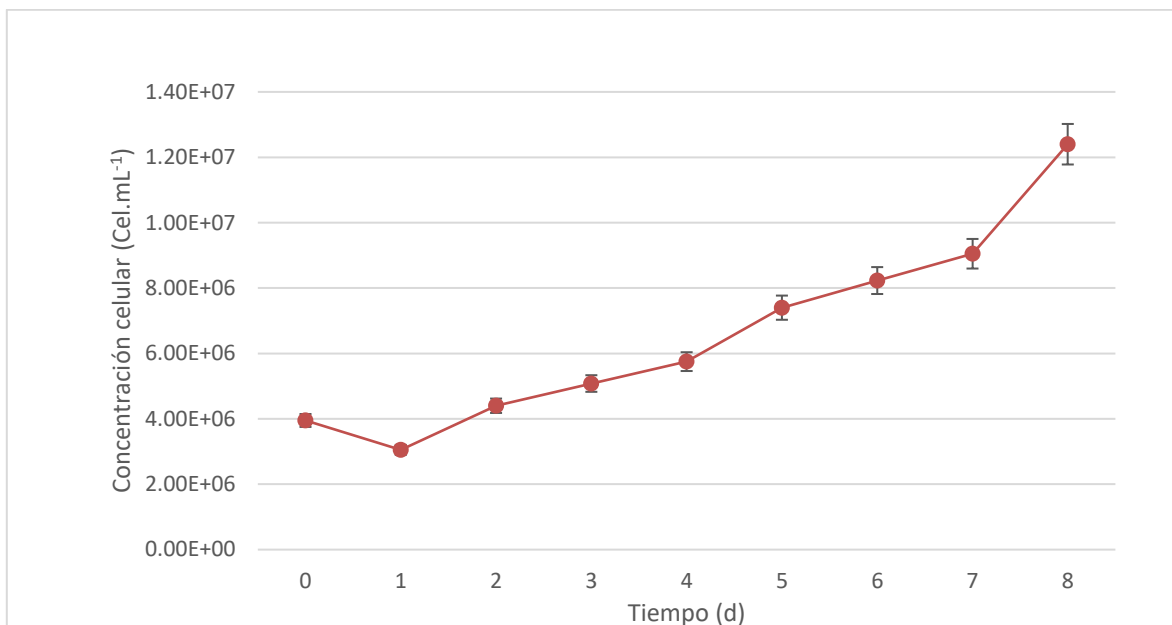


Figura 32. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en botellas PET de 2.5 L con ARS y Dextrosa

Debido a que se obtuvieron buenos resultados, se optó por iniciar los cultivos a nivel de 20 L utilizando las condiciones determinadas en las botellas PET. Las condiciones de operación del reactor se mencionan en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de cultivo en el fotobiorreactor de 20 L

Parámetro	Valor
Aireación	0.2 vvm
Fotoperiodo	16:8 (luz-oscuridad)
Intensidad lumínica	81 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Temperatura	25 \pm 2 °C

La aireación fue menor que en las botellas PET de 2.5 L debido a que se utilizó las mismas bombas de aireación. En el medio de cultivo se desarrolló un color verde (Figura 33) y de las muestras que se tomaron del cultivo, no se observó una contaminación importante en el fotobiorreactor, como se muestra en la figura 33.



Figura 33. Cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 20 L con ARS y dextrosa

En la figura 34 se puede observar que, aunque hubo multiplicación celular, fue menor en comparación al obtenido en las botellas PET de 2.5 L. Esto puede deberse al cambio en las condiciones del cultivo, entre ellas una menor tasa de aireación.

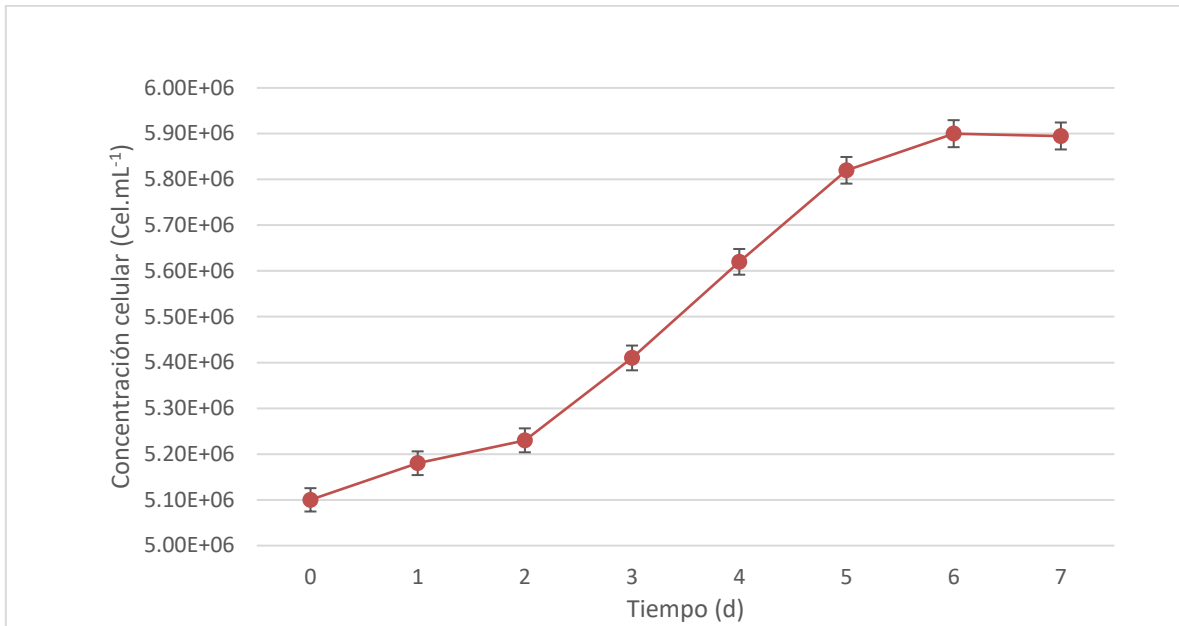


Figura 34. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 20 L con ARS y Dextrosa.

Al mismo tiempo que se realizó el cultivo en el fotobiorreactor de 20 L con dextrosa como fuente de carbono, se llevó a cabo un ensayo en las botellas PET de 2.5 L utilizando ARS y melaza al 1% (v/v) como se muestra en la figura 35. La utilización de un residuo agroindustrial como la melaza como fuente de carbono en un cultivo a gran escala es deseable tanto desde el punto de vista de costos como ambiental. La concentración de melaza se basó en estudios llevados con anterioridad en el grupo de trabajo [127]. El inóculo, obtenido de los matraces Celstir, fue de 15% (v/v).



Figura 35. Cultivo de microalgas en botellas de 2.5 L con ARS y melaza al 1%

En la figura 36 se muestra la curva de crecimiento de la microalga en las botellas PET de 2.5 L con ARS y melaza al 1% como medio de cultivo. Se puede observar que se presenta una etapa de crecimiento de 9 días e inicia una fase de decaimiento, sin haber una fase estacionaria definida.

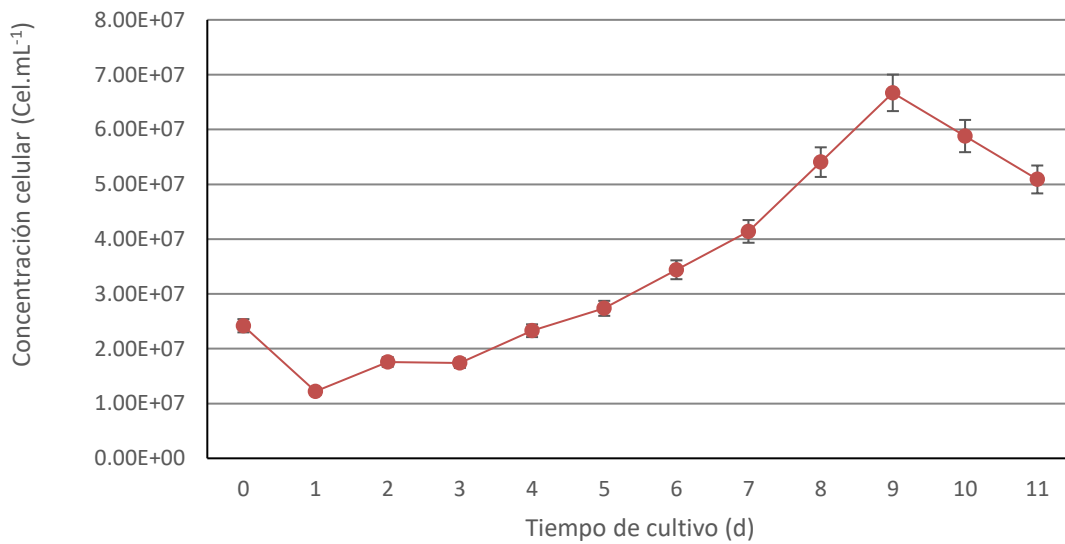


Figura 36. Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en medio ARS y melaza al 1% en botellas PET de 2.5 L.

El color del cultivo en las botellas al inicio fue café debido a la melaza, pero luego fue adquiriendo un color verde (Figura 35). La observación de las muestras al microscopio, reveló mayor contaminación bacteriana que en el experimento con ARS y dextrosa, aun así las células microalgales aumentaron en número pero eran más pequeñas en tamaño. Como el cultivo pudo evolucionar pese a la contaminación, se decidió realizar el cultivo en estas condiciones a nivel de 20 L (Figura 37).

El cultivo se llevó a cabo durante 8 días según lo obtenido en las curvas de crecimiento en botellas de 2.5 L, y a la fase de decaimiento que inició al día 9 (Figura 38).



Figura 37. Cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 20 L con ARS y melaza al 1%.

Se puede observar que el medio tuvo una coloración café debido a la melaza, y la primera diferencia con el cultivo con dextrosa fue la presencia de espuma en la parte superior del fotobiorreactor. Es posible que la melaza tenga compuestos que provoquen la formación de la espuma. Aún con una aireación baja, la espuma producida salía por la salida del aire del fotobiorreactor. Con el paso del tiempo, la producción de espuma disminuyó. Este efecto de la melaza no se observó en las botellas de 2.5 L, es posible que la geometría del fotobiorreactor (relación diámetro/altura) haya provocado tanta formación de espuma. Se ha reportado que tanto la aireación como la viscosidad del medio de cultivo tienen influencia

en la transferencia de oxígeno a las células [130] por lo que sería recomendable realizar estudios más específicos sobre el tema de la adición de melaza.

En la figura 38 se puede observar que la concentración celular aumentó ligeramente hasta el día 7 de cultivo, cuando el aumento de la contaminación bacteriana provocó que el experimento concluyera. Se pudo observar que, aunque había un número importante de células de la microalga, éstas eran pequeñas, como se muestra más adelante.

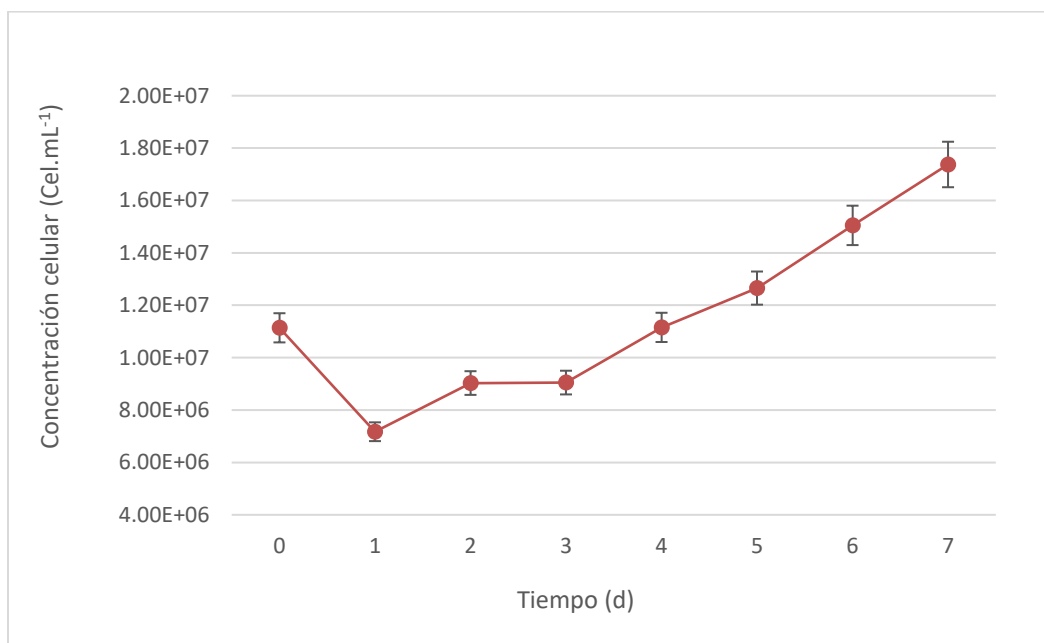


Figura 38. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en medio ARS y melaza al 1% en fotobiorreactor de 20 L.

Para disminuir el problema de la espuma, se decidió realizar una cuantificación de los azúcares totales al inicio y final del cultivo para determinar la posibilidad de utilizar una menor concentración de melaza. Cuando se utilizó melaza al 1%, las concentraciones promedio de azúcares totales al inicio y final del cultivo fueron de 102.6 y 12.1 g·L⁻¹ respectivamente (los datos para el cálculo de las concentraciones de azúcares totales se encuentran en el Anexo 3). Teniendo en cuenta estos datos y trabajos anteriores, se decidió bajar la concentración de melaza en el medio al 0.1% (v/v).

Desde el punto de vista operativo, se observó que el material del fotobiorreactor quedó opaco y luego presentó grietas. Es posible que dejar el fotobiorreactor con una solución de cloro por 1 día para su desinfección fuera demasiado tiempo y afectó el material del cual está construido. Se compraron nuevos fotobiorreactores y la desinfección se realizó con la solución de cloro al 5% en lugar del 10% y por 3 h solamente. Estas condiciones de desinfección dieron resultado ya que en ensayos posteriores no se observó aumento de la contaminación.

Se llevó a cabo el cultivo de la microalga en medio ARS con melaza al 0.1% en botellas PET de 2.5 L para determinar cuál es el efecto de la disminución de la melaza en el crecimiento de la microalga. En la figura 39 se muestra la curva de crecimiento obtenida.

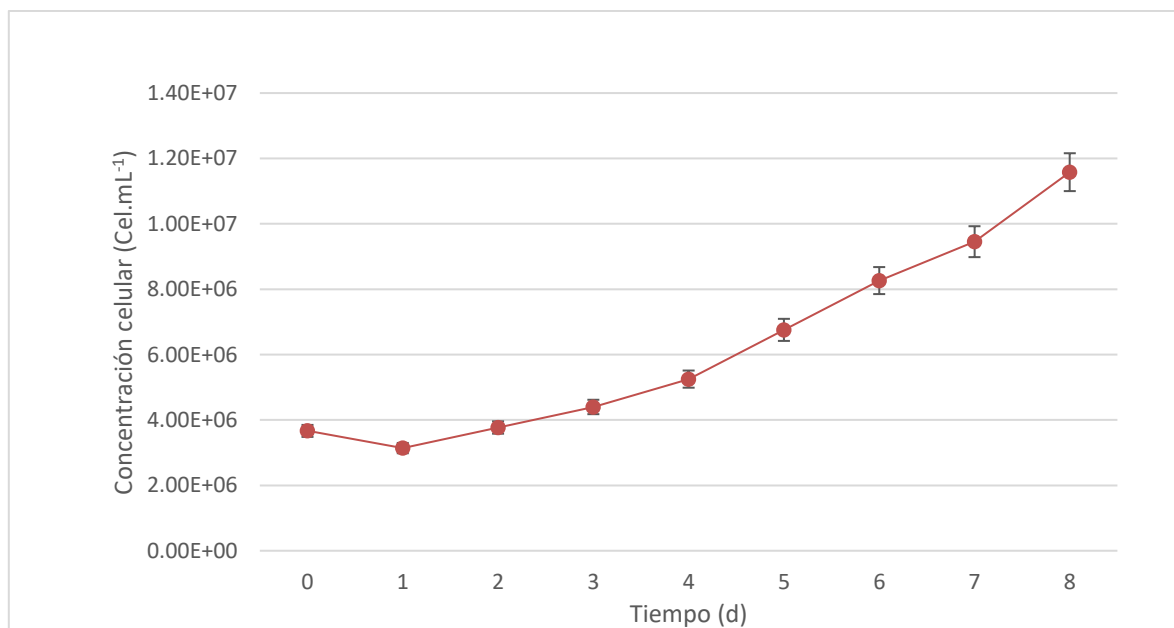


Figura 39. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en medio ARS y melaza al 0.1% en botellas PET de 2.5 L

Aunque se obtuvo un menor número de células (1.16×10^7 cel·mL⁻¹) que en el experimento con 1% de melaza (5.46×10^7 cel·mL⁻¹) éstas fueron más grandes, lo que indica una posible acumulación de metabolitos, que es el objetivo final del cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles.

Con estos resultados se decidió realizar la disminución de la concentración de melaza a nivel de 20 L.

En la figura 40 se puede observar los nuevos fotobiorreactores con el cultivo de la microalga en ARS y melaza al 0.1%.



Figura 40. Cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 20 L con ARS y melaza al 0.1%

Aunque hubo formación de espuma, esta no fue tan abundante como en el experimento con 1% de melaza. La espuma no alcanzó el nivel de la tapa superior del biorreactor. En este ensayo, la concentración inicial de azúcares totales fue de $47.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y al final del cultivo, alcanzaron una concentración de $6.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ indicando que se consumió el 87% de los azúcares totales presentes en el medio, contra 88% en los cultivos con 1% de melaza. Es posible que los azúcares residuales no puedan ser asimilados por la microalga o que sean otros compuestos los que reducen el reactivo utilizado en la determinación. Es necesario realizar este análisis con métodos más específicos, como HPLC.

En la figura 41 se puede observar que la microalga tuvo un crecimiento más rápido que cuando se utilizó melaza al 1%. Al día 5, se pudo observar que el cultivo entraba a la fase estacionaria, por lo que se decidió parar el experimento.

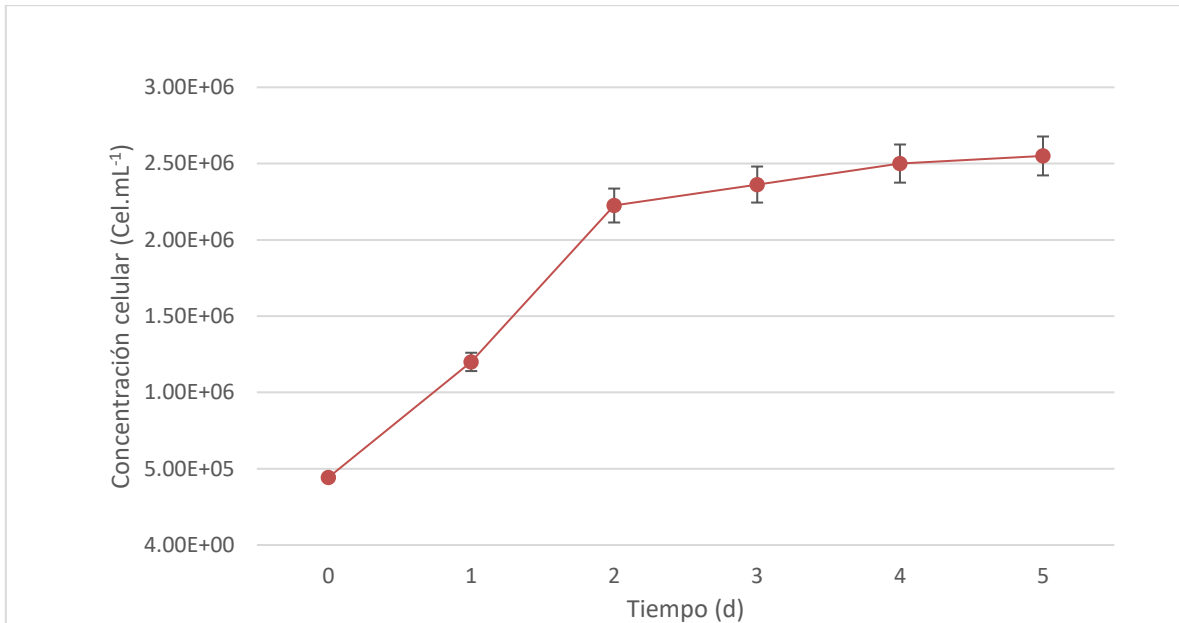


Figura 41. Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* en medio ARS y melaza al 0.1% en fotobiorreactor de 20 L.

En la figura 42 se muestran las observaciones realizadas a muestras tomadas al final de los cultivos.

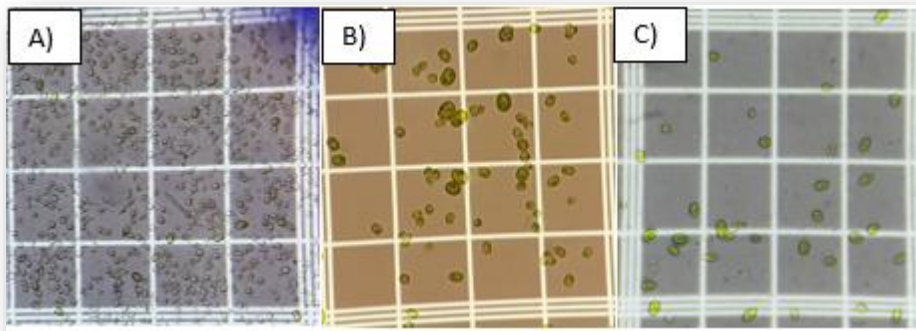


Figura 42. Observación al microscopio de los cultivos de *Scenedesmus obliquus* en A) ARS con melaza al 1%; B) ARS con dextrosa y C) ARS con melaza al 0.1%.

Se puede observar que el cultivo en ARS con melaza al 1% provocó una mayor concentración celular, pero también mayor presencia bacteriana (difícil de observar con el ocular 40X). El cultivo en ARS con dextrosa se observó más limpio y las células presentaron un mayor tamaño. Finalmente, en el cultivo con ARS y melaza al 0.1% tanto la concentración celular como el tamaño de las células fueron más parecidos al cultivo que utilizó dextrosa que melaza al 1%.

También se apreció que el cultivo que menor contaminación mostró fue el de ARS con dextrosa (casi ausencia total de bacterias), luego le siguió el medio ARS con melaza al 0.1% y el que mayor contaminación tuvo fue el ARS con melaza al 1%.

3.4 Recuperación de la biomasa microalgal y utilización de la era de secado

En los estudios a nivel laboratorio, la biomasa producida en los cultivos microalgales es recuperada por centrifugación del medio.

Para volúmenes de medio importantes, la centrifugación empieza a ser una etapa limitante en el proceso, desde el punto de vista técnico y energético. Es por ello que se deben probar otras opciones.

El secado de la biomasa procedente de los cultivos en matraces Celstir se llevó a cabo mediante sedimentación y se obtuvo un lodo microalgal que fue secado en una era de secado (Figura 43) que ya había sido utilizada en un estudio anterior dentro del grupo de trabajo, con la biomasa proveniente de un fotobiorreactor de 1 L [25].



Figura 43. Era de secado utilizada en [26].

Cabe mencionar que los cultivos de las botellas PET no pasaron por la era de secado porque sirvieron como inóculo para los reactores de 20 L.

Para secar la biomasa proveniente de los fotobiorreactores de 20 L, la era de secado con que se contaba resultó pequeña, por lo que se diseñó y mandó construir una era de secado de mayores dimensiones.

El lodo microalgal (aproximadamente 2 L) proveniente de la sedimentación del cultivo en los fotobiorreactores se depositó en la era de secado y se dejó a temperatura ambiente para su secado (Figura 44).



Figura 44. Inicio del secado de la biomasa obtenida en cultivos de 20 L.

Después de una semana se pudo observar que la biomasa aún tenía un contenido de agua importante (Figura 45). Esto provocó que la biomasa comenzara a presentar signos de descomposición (mal olor) por lo que se procedió a centrifugar la biomasa para eliminar lo que quedó de agua y secar la biomasa para evitar su descomposición.

Obtenida la biomasa seca (Figura 46) se determinó que la biomasa que salió de la centrifuga tuvo una humedad de 5.7% (Anexo 4) la cual fue eliminada posteriormente por liofilización.



Figura 45. Lodo microalgal después de una semana en la era de secado.



Figura 46. Biomasa recuperada de la era de secado después de la centrifugación.

La cantidad promedio de biomasa seca obtenida en botellas de PET de 2.5 L y fotobiorreactor de 20 L fue de $0.40 \pm 0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.30 \pm 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente (Tabla 7 y 8). Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura sobre la producción de biomasa de microalgas del género *Scenedesmus* en cultivos en biorreactores. Se han reportado valores promedio de $0.35 \pm 0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando como medios de cultivo agua residual de diferentes industrias como la pesquera, azucarera, agrícola, etc. [131-133].

Tabla 7. Contenido de biomasa en botellas PET de 2.5 L. Exp. ARS con melaza al 0.1%

	Tubo	Tara del tubo (g)	Peso pastilla húmeda (g)	Peso pastilla seca (g)	Diferencia (g)	Porcentaje de humedad (%)
Botella 1	1	13.2062	14.4165	13.363	0.1568	1
	2	12.807	13.9658	12.9669	0.1599	1
	3	12.6794	13.9915	12.8618	0.1824	1
	4	13.3319	14.5569	13.4532	0.1213	1
	5	13.3239	14.2468	13.4131	0.0892	1
	6	13.7093	14.7324	13.7952	0.0859	1
Botella 2	1	13.4986	14.5925	13.6974	0.1988	1
	2	13.2573	14.3194	13.4573	0.2	1
	3	13.1724	14.1153	13.2526	0.0802	1
	4	13.4079	14.2336	13.5715	0.1636	1
	5	13.9625	15.0118	14.0384	0.0759	1
	6	13.568	14.6587	13.6358	0.0678	0
	7	13.4155	14.5606	13.5335	0.118	1
Total biomasa					1.6998	

Tabla 8. Contenido de biomasa en fotobiorreactores de 20 L. Exp. ARS con melaza al 0.1%.

Tubo	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Tara de tubos	Diferencia (g)
1	13.665	13.257	12.793	0.464
2	13.755	13.344	12.877	0.467
3	14.700	13.658	13.180	0.478
4	14.757	14.024	13.534	0.491
5	14.424	13.587	13.111	0.476
6	14.076	13.517	13.044	0.473
7	14.271	13.434	12.964	0.470
8	14.340	13.556	13.082	0.474
9	14.681	13.795	13.312	0.483
10	14.330	13.503	13.030	0.473
11	13.869	13.759	13.278	0.482
12	13.668	13.252	12.788	0.464
13	14.862	13.953	13.465	0.488
14	14.296	13.476	13.004	0.472
15	14.183	13.230	12.767	0.463
16	14.532	13.637	13.159	0.477
17	14.493	13.286	12.821	0.465

18	14.471	13.630	13.152	0.477
19	14.074	13.521	13.048	0.473
20	14.288	13.214	12.751	0.462
21	14.419	13.615	13.139	0.477
22	14.388	13.694	13.215	0.479
23	14.561	13.394	12.926	0.469
24	14.148	13.300	12.834	0.465
25	14.163	12.847	12.397	0.450
26	14.433	12.826	12.377	0.449
27	14.614	14.094	13.601	0.493
28	14.132	13.378	12.910	0.468
29	14.225	13.495	13.023	0.472
Total biomasa				13.695

3.5 Extracción de los lípidos totales

Las extracciones se realizaron de acuerdo a la metodología mencionada en el Capítulo 2. En el caso de cantidades de biomasa grandes, como la producida en los fotobiorreactores, la relación solventes/biomasa se elevó, utilizando 30 mL de mezcla de solventes por cada 2 g de biomasa seca, y se realizaron 3 extracciones como lo marca el método.

En la figura 47 se puede observar los extractos obtenidos antes de la eliminación de los solventes. La primera extracción es en la que se satura más la mezcla de solventes, por lo que adquiere un color más oscuro. Conforme se sigue extrayendo, la mezcla recuperada va quedando más clara de color.



Figura 47. De izquierda a derecha: primera, segunda y tercera extracción de lípidos totales

Cada extracción fue monitoreada por cromatografía de capa fina, para detectar la presencia de compuestos provenientes de la biomasa microalgal. En la tercera extracción ya no se observó la mancha correspondiente a los triglicéridos. Las tres extracciones se juntaron y los solventes se eliminaron por evaporación.

El extracto lipídico promedio fue de $0.07 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como se aprecia en las tablas 9 y 10. En el caso de las microalgas del género *Scenedesmus*, se ha encontrado en la literatura valores de producción de lípidos que van desde 0.04 ± 0.01 hasta $0.16 \pm 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [134, 135], indicando que los valores obtenidos en este trabajo están dentro de los rangos reportados.

Tabla 9. Extracción lipídica de 2.72g de biomasa.

Extracciones	Viales peso cte. (g)	Viales con extracto (g)	Extracto (g)
1	8.3722	8.6746	0.3024
2	8.4175	8.7485	0.331
3	8.4216	8.587	0.1654
4	8.3548	8.4504	0.0956
5	8.3156	8.3812	0.0656
Total de extracto			0.96

Tabla 10. Extracción lipídica de 13.78g de biomasa de reactores de 20 L.

Viales	Viales peso cte. (g)	Viales con extracto (g)	Extracto (g)
1	15.958	16.5772	0.6192
2	15.7253	15.9621	0.2368
3	16.289	16.7369	0.4479
4	16.2365	16.6389	0.4024
5	16.1444	16.5571	0.4127
6	15.9652	16.5937	0.6285
7	16.1599	16.4187	0.2588
8	16.019	16.5845	0.5655
9	16.1639	16.5307	0.3668
10	32.8706	32.8849	0.0143
11	13.3799	13.5684	0.1885
12	30.1753	30.4447	0.2694
13	32.9754	33.1132	0.1378
14	16.1934	16.2589	0.0655
15	18.3381	18.642	0.3039
Total			4.918

En la figura 48 se puede observar el análisis de capa fina de las extracciones realizadas a la biomasa proveniente de los fotobiorreactores.

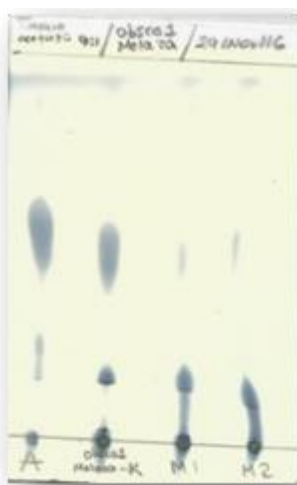


Figura 48. Cromatografía de capa fina de los extractos lipídicos de la biomasa de la microalga *Scenedesmus obliquus*. A= aceite comercial (referencia); B= Extracto de la biomasa proveniente de matraz Celstir de 1 L; C y D= Extractos de los fotobiorreactores de 20 L.

Se puede observar que en el perfil de los matraces Celstir, la mancha que corresponde a los triglicéridos es más importante que en los fotobiorreactores de 20 L. En los perfiles de los fotobiorreactores es más pronunciada una mancha más polar que posiblemente corresponde a los ácidos grasos libres y terpenos.

3.6 Perfil lipídico de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

De manera paralela, en el grupo de trabajo se realizó el análisis del perfil de lípidos presentes en el extracto de la microalga. Este análisis se realizó con biomasa proveniente de matraces Celstir de 1 L, utilizando ARS y melaza como medio de cultivo y se tomó como referencia para este trabajo. Debido a que la biomasa producida en los fotobiorreactores fue poca, se decidió destinarla para las reacciones de producción de bioturbosina.

Por cromatografía de columna de gravedad se obtuvieron 4 fracciones del extracto:

Tabla 11. Fracciones del extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

Fracción	% en peso del extracto
1	3.6
2	34.7
3	14.2
4	47.5

Los compuestos identificados se presentan en las tablas 12, 13 y 14:

Tabla 12. Compuestos de la primera fracción del extracto lipídico.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Calidad (%)	% del total del área de los picos
heptacoseno	27.47	97	31.1
heptacosanol	28.61	91	68.9

Tabla 13. Compuestos identificados en la segunda fracción del extracto lipídico.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Calidad (%)	% del total de área de los picos
tetradecanoato de metilo	17.98	99	0.3
4,7,10,13 tetrametil	20.09	95	1.9
hexadecanoato de metilo			
7,10 hexadecadienoato de metilo	20.2	96	0.7
9-hexadecenoato de metilo	20.3	99	4.1
9-hexadecanoato de metilo	20.7	99	21.6
6,9,12,15-tetrametil	23.9	99	1.2
octadecanoato de metilo			
9,12-octadecadienoato de metilo	24.09	99	6.5
9-octadecenoato de metilo	24.2	99	49.2
estearato de metilo	24.5	99	2.8
eicosanato de metilo	26.24	99	0.8
docosanato de metilo	27.67	99	0.3
diester 2-propilpentílico del ácido ftálico	27.82	91	9.2
octocosanoato de metilo	32.3	99	1.4

Tabla 14. Compuestos identificados en la tercera fracción del extracto lipídico.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Calidad (%)	% del área total de los picos
2-decenal	12.02	99	7.4
propanoato de 2-metil-3-hidroxi-2,2,4-trimetil pentilo	13.7	96	7.1
fitadieno	19.39	99	51.3
bis(2-etil hexil) diester de ácido hexanodioico	26.92	99	14.3
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	20	99	16.5

La fracción 4 contiene los compuestos más polares del extracto. Son los fosfolípidos, y se ha reportado que provocan envenenamiento de los catalizadores cuando se produce biodiesel de aceites vegetales por catálisis heterogénea. Al no poder ser analizados por cromatografía de gases-masas, la fracción 4 sólo fue analizada por FT-IR para corroborar la presencia de fosfolípidos. El espectro de IR de esta fracción se presenta en la figura 49

La banda pronunciada a 1100 cm^{-1} señala la presencia de grupos fosfatos unidos a carbono, indicando la presencia de los fosfolípidos.

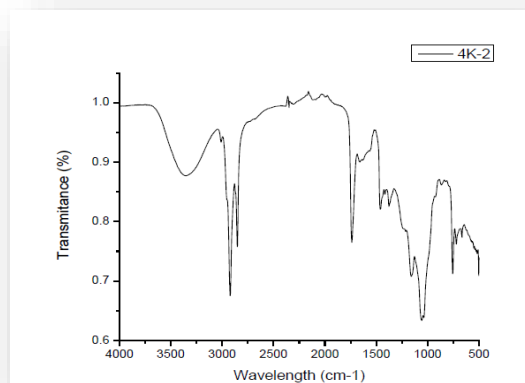


Figura 49. Espectro de IR de la fracción 4 del extracto de la microalga *Scenedesmus obliquus*.

3.7 Síntesis de bioturbosina

Como se tenía poco extracto, se realizaron 2 experimentos de síntesis de bioturbosina. El primero con un extracto lipídico que fue extraído de biomasa de una microalga del género *Scenedesmus* que fue proporcionada por una empresa. Este ensayo sirvió para poner a punto todo el proceso: disolución del extracto, operación del reactor, prueba del catalizador, etc. Los datos obtenidos con este extracto no se reportan en este estudio por cuestiones de confidencialidad con la empresa.

Para la disolución del extracto, el dodecano se calentó a 80°C y se añadió el extracto con agitación (Figura 50). Se observó la presencia de un precipitado que puede deberse a que al ser el dodecano un solvente no polar, no logró disolver los compuestos más polares presentes en el extracto (fosfolípidos). Por ello se decidió filtrar la disolución con vacío

utilizando filtros con un tamaño de poro de 2.5 μm antes de cargarla al reactor, esto con el fin de evitar la obstrucción de la tubería capilar del reactor.



Figura 50. Disolución del extracto lipídico en dodecano.

Se realizó la prueba en el reactor y se ajustaron las condiciones y operación del reactor. Cuando se tuvo todo listo, se realizó la disolución del extracto de los cultivos de la microalga *Scenedesmus obliquus* realizados en el fotobiorreactor de 20 L utilizando ARS y melaza al 0.1%.

Los productos de reacción a la salida del reactor no mostraron color (Figura 51), se observó un líquido transparente. Esto puede deberse a la ruptura de los pigmentos (como la clorofila) durante la reacción.



Figura 51. Productos de síntesis de bioturbosina a partir del extracto de la microalga *Scenedesmus obliquus*. De izquierda a derecha, las muestras a 1, 2 y 3 h de reacción.

3.8 Caracterización de los productos de reacción.

El análisis de cromatografía de capa fina de las muestras que salieron de la reacción de síntesis de bioturbosina se muestra en la figura 52. Se puede observar la presencia de manchas muy grandes en la parte superior de la placa. Esto indica que hay compuestos no polares (posiblemente hidrocarburos) y también se deben a la presencia del solvente de reacción (dodecano). La aplicación sobre la placa de cromatografía marcada con la letra M corresponde al extracto de la microalga disuelto en dodecano. Se puede observar la presencia de manchas que corresponden a triglicéridos y ácidos grasos libres/terpenos. La aplicación 1 corresponde a la muestra del producto que salió después de 1 h de reacción. Se puede observar la presencia de una mancha pequeña, que corresponde a triglicéridos, al tener el mismo factor de respuesta que la mancha de triglicéridos de la referencia. Esto quiere decir que todavía quedaron triglicéridos sin reaccionar. En las muestras tomadas a 2 y 3 h de reacción, se puede constatar que ya no hay manchas indicando la presencia de triglicéridos, sólo las manchas grandes de compuestos no polares.

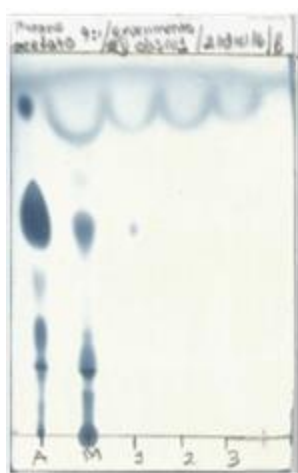


Figura 52. Cromatografía de capa fina de los productos de reacción.

Al observar que la presencia de triacilglicéridos fue casi nula en la muestra tomada a 1 h de reacción, se procedió a analizar las muestras correspondientes a los productos obtenidos a las 2 y 3 h de reacción. La muestra 1 no se inyectó al cromatógrafo de gases-masas

debido a la presencia de los triglicéridos, ya que estos deben ser analizados bajo la forma de ésteres metílicos.

Los perfiles cromatográficos fueron similares en las muestras tomadas a 2 y 3 h de reacción. Esto indica que es posible que la reacción sea total a las 2 h. Se decidió reportar los compuestos que fueron detectados en la muestra a 3 h de reacción.

La figura 53 muestra el cromatograma con los picos de los compuestos presentes en el producto de reacción. El dodecano utilizado como solvente, al estar en una gran cantidad, sale entre 10 y 12 minutos y para protección del detector de masas, no se tomaron datos en ese período. En los primeros 10 min de la corrida no se observaron picos provenientes del extracto o de la reacción. Es por ello que el cromatograma muestra la corrida a partir del minuto 12 y es cuando empiezan a eluir compuestos de cadenas más largas que el solvente.

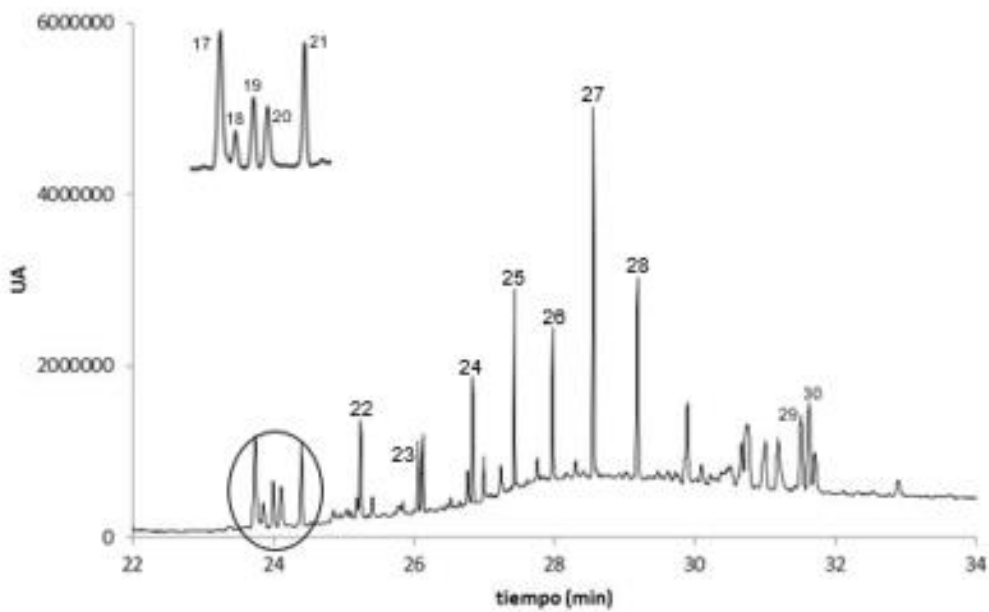
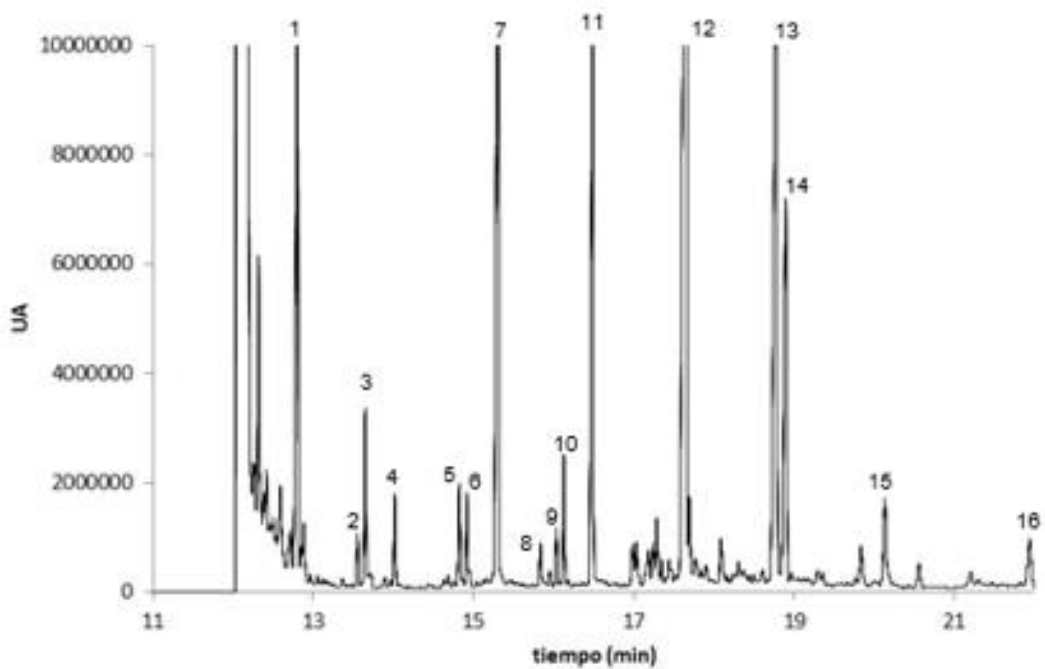


Figura 53. Cromatogramas del producto de la reacción de síntesis de bioturbosina.

Hay que notar que la escala del cromatograma entre los 22 y 34 minutos, es menor que el del inicio de la corrida, esto se presenta de esta manera para mayor claridad de los picos.

Los compuestos identificados con la ayuda de la biblioteca del equipo se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Compuestos presentes en el producto de reacción de síntesis de bioturbosina.

No. del pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	% del área total de los picos
1	Tridecano	12.8	6
2	2-metil tridecano	13.5	0.36
3	3,5-dimetil dodecano	13.6	1.34
4	Tetradecano	14	0.63
5	4-metil tetradecano	14.8	0.8
6	3-metil tetradecano	14.9	0.68
7	Pentadecano	15.3	7.97
8	7-metil pentadecano	15.8	0.33
9	2-metil pentadecano	16	0.41
10	3-metil pentadecano	16.1	0.95
11	Hexadecano	16.4	5.21
12	Heptadecano	17.6	14
13	Octadecano	18.7	9.19
14	2,6,10,14-tetrametil hexadecano	18.9	4.33
15	2,6,10,15-tetrametil heptadecano	20.1	1.08
16	Eicosano	21.9	0.7
17	Octadeceno	23.7	0.79
18	Ester propílico del ácido hexadecanoico	23.8	0.17
19	Heneicosano	23.9	0.32
20	Heptadecanitrilo	24.1	0.32
21	Ester metílico del ácido esteárico	24.4	0.5
22	Docosano	25.2	0.49
23	Ester propílico del ácido octadecanoico	26	0.3
24	Tetracosano	26.8	0.51
25	Pentacosano	27.4	0.68
26	Hexacosano	27.9	0.63
27	Heptacosano	28.5	1.69
28	Octacosano	29.1	1
29	5- α -ergost-8(14) eno	31.5	0.62
30	Estigmasterol	31.6	0.75

Los picos que aparecen en el cromatograma y no tienen número no pudieron ser identificados, ya que la calidad de la comparación con los datos de la biblioteca del equipo fue baja.

Siendo la turbosina (de origen fósil) una mezcla de hidrocarburos (parafinas e isoparafinas saturadas), se busca que al sintetizar la bioturbosina se obtengan mezclas químicamente similares para que se conserven las propiedades que permiten su utilización en los motores de aviación. Los compuestos de interés son los que presentan un número de carbonos

entre 8-16 [3] y en menor porcentaje, la presencia de isómeros ramificados. En algunos procesos, después de la reacción de HDO, se lleva a cabo una reacción de isomerización para obtener los compuestos ramificados [140]. El catalizador utilizado en este trabajo, tiene la acidez suficiente para realizar tanto la reacción de HDO como la isomerización (Dr. Juan Carlos Chavarría, comunicación personal). Los resultados dependerán de la materia prima, en este caso, el extracto de microalgas tiene una variedad de compuestos que pueden propiciar la generación de un amplio rango de hidrocarburos al final de la reacción. Las condiciones utilizadas son las más comúnmente utilizadas en la literatura [140].

De los compuestos identificados en el producto de la síntesis, los de mayor interés son los que se presentan en los picos 2-10, siendo los óptimos 2, 3, 5 y 6 al ser los que presentan ramificaciones (Figura 54) lo que confiere al biocombustible buen comportamiento de flujo en frío, no se presenten problemas en motores y el octanaje es mayor [118]. Los compuestos 8, 9 y 10 se encuentran en el límite del número de carbonos para ser considerados como bioturbosina.

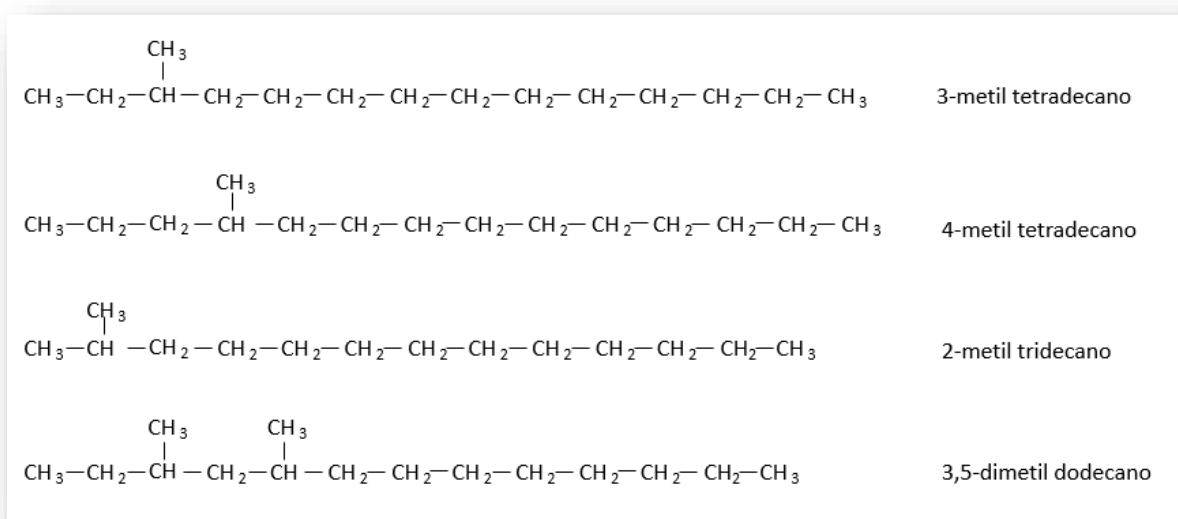


Figura 54. Compuestos de interés energético para la bioturbosina obtenidos en este trabajo

Las condiciones de reacción utilizadas en este trabajo dieron como resultado que los compuestos que forman la mezcla de bioturbosina presentan una relación isoparafinas:n-

parafinas de 1:3 (basado en el área de los picos que forman la mezcla). Esto se debe a que se utilizó un catalizador mono-metálico y bifuncional. Debido a que en la síntesis se deseaba un cierto grado de isomerización, fue la zeolita, al reaccionar como soporte ácido y tener sitios ácidos Bronsted medios y fuertes, la que propició la conversión de n-alcenos a isoalcenos.

Los compuestos correspondientes a los picos 7, 12 y 13 son los que se encuentran en mayor porcentaje en el extracto y tienen un rango de número de carbonos de 17-21. Aunque el número de carbonos es elevado para su utilización directa como bioturbosina, pueden ser sometidos de nuevo a un craqueo e hidrodeshidrogenación catalítica para generar parafinas ramificadas más pequeñas [136] utilizando un catalizador más ácido se podría generar una mayor selección de craqueo de alcanos y con mayor temperatura para una mayor síntesis de compuestos de cadena larga como los que se presentan en los picos 17-21.

De una manera más directa, estos compuestos de cadena más larga pueden ser directamente utilizados como diésel verde, en motores de compresión terrestres.

En este trabajo se obtuvo una relación bioturbosina: diésel verde de 1:1.5 (basado en el área de los picos).

CONCLUSIONES

La reducción de la cantidad de melaza en el ARS al 0.1% resultó ser benéfica para el crecimiento de la microalga, reduciendo la contaminación bacteriana y resultando un tamaño celular similar al uso de dextrosa, logrando una adecuada densidad celular para la recuperación de un porcentaje mayor de biomasa.

Aunque se logró cultivar la microalga *Scenedesmus obliquus* en un fotobiorreactor de columna de 20 L en condiciones de no-esterilidad, la cantidad de biomasa obtenida no fue la esperada, $0.30 \pm 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, es posible que se deba a la baja tasa de aireación (10 veces menor que lo reportado en la literatura) alcanzada en el fotobiorreactor y que posiblemente ocasionó un régimen hidrodinámico desfavorable para un buen acceso de las células a la fuente de luz y los nutrientes.

Las dimensiones de la era de secado no fueron las adecuadas para secar la biomasa, aunque fueron extrapoladas de trabajos anteriores que sí dieron resultados, es necesario encontrar la manera de que el agua filtre más rápido a través del medio filtrante para que la biomasa retenida se que más rápido.

La relación 1:3 de isoparafinas:n-parafinas obtenida de la reacción de síntesis de bioturbosina demostró que a las condiciones de operación utilizadas, se produjeron tanto el proceso de HDO como el de isomerización. Por otro lado, la relación bioturbosina: diésel verde de 1:1.5 obtenida, indica que es necesario un mayor craqueo de las moléculas para que se produzca menos diésel verde.

El implemento de catalizadores más ácidos podría generar una mejor ruptura en las cadenas de los compuestos presentes en el extracto lipídico microalgal. Se puede probar temperaturas más altas (hasta los 400 °C) aunque habría que definir si el dodecano puede seguir siendo el solvente adecuado. Para trabajar a mayores presiones (150-200 bar), es necesario cambiar la bomba de alimentación del reactor.

PERSPECTIVAS

Aunque la cepa de *Scenedesmus obliquus* logró adaptarse al ARS y a la melaza como fuente de carbono, es conveniente determinar el efecto de otros compuestos presentes en la melaza como nitrógeno y fósforo, los cuales pueden ser asimilados por las microalgas. También es conveniente estudiar otras fuentes de carbono provenientes de residuos agroindustriales.

Es necesario realizar un estudio de mejora de las condiciones del cultivo para aumentar la producción de biomasa y lípidos. Entre éstas se puede mencionar: mejoras en la aireación utilizando un compresor de mayor capacidad de flujo de aire. Se ha reportado en la literatura que en un rango de 1.8 a 2.3 vvm se logra un incremento sustancial en la densidad celular y en la productividad lípidica [137]. Por otro lado, es aconsejable probar un proceso en dos etapas, induciendo una limitación de nutrientes en la segunda etapa, para aumentar la producción de lípidos.

La extracción de lípidos por solventes químicos es rápida y eficaz, sin embargo, se deben estudiar otros procesos de extracción ya que, a mayor escala, mayor es el volumen de solventes a usar, elevando los costos de producción de los biocombustibles.

Es necesario rediseñar la era de secado para eliminar la humedad de la biomasa lo más rápido posible. La aplicación de vacío puede ser una alternativa viable, aunque hay que prestar atención al gasto energético que implica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad A; Yasin M, Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 28-32, 2011.
2. Rahmstorf S, Cambio climático debido a los gases de efecto invernadero: ¿cuánto tiempo nos queda?, *Dossier Diario La Vanguardia*. España, 2009.
3. Sepúlveda I, Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial, *Rev. Mex. Cienc. Agri.* 3, 12-19, 2012.
4. Revista Sexenio. Bioturbosina: la nueva alternativa en la aviación para cuidar el planeta. Fecha de acceso Mayo del 2017, del Sitio web: <http://www.sexenio.com.mx/articulo.php?id=11440> .
5. Martins T, Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232, 2010.
6. Herrera-Valencia V; Contreras-Pool P; Lopez-Adrian S; Barahona-Pérez L, The Green Microalgae *Chlorella saccharophila* as a Suitable Source of Oil for Biodiesel Production, *Curr. Microbiol.* 63, 1-7, 2011.
7. Torrentera L; Blanco L. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para América Latina y el Caribe. Fecha de acceso Junio del 2016, del Sitio web de México: www.fao.org/3/contents/36ec64d7-d6e7-52c3-8d43-dc199945d143/AB473S00.htm .
8. Singh J; Gu S, Commercialization potential of microalgae for biofuels production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 2596-2610, 2010.
9. Richmond A, *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell. Science. Iowa State, 2004, 120-147.
10. Li Q; Liu D, Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Microbiol. Biotechnol.* 80, 749-756, 2008.
11. Khan S; Hussain R; Prasad S; Banerjee U, Prospects of Biodiesel Production from Microalgae in India, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13, 2361-2372, 2009.

12. Griffiths M; Harrison T, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *Appl. Phycol.* 21, 493-507, 2009.
13. Olguin E, Microalgae biomass as source of chemicals, fuels, and proteins, University of Queensland, St. Lucia Brisbane. En: Sixth Australian Biotechnology Conference, 20-24, 1984.
14. Kojima H, Photosynthetic microorganisms. En: *Environmental Biotechnology*, Springer-Verlag, Hong-Kong, 310, 2001.
15. Derner B, Microalgas, productos e aplicaciones, *Ciencia. Rural.* Santa María, 959-1967, 2006.
16. Kyle D, Specialty oils from Microalgae: new perspectives, *Biotechnology of Plant Fats and Oils.* J. Rattray, American Oil Chemists Society. Champaign, Illinois. 1991; 8, 130-143.
17. Chisti Y, Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007; 25, 294-306.
18. Altisent M, Captura de CO₂ mediante algas unicelulares, Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos. Departamento de producción vegetal: fitotecnia, universidad politécnica de Madrid, 2010.
19. Guschina I; Hardwood L, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Prog. Lipid. Res.* 45, 160-186, 2006.
20. Cohen Z, Products from microalgae, *Handbook of microalgal mass culture*, CRC. Press. Boca Raton. Florida, 421-54, 1986.
21. Mandal S; Mallick N, Microalgae *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281-291, 2009.
22. Pokora W; Aksmann W A, Functional characteristics of green alga *Scenedesmus obliquus* wild type and its two photosystems deficient mutants cultured under photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions, *Phycol. Res.* 59, 1440-1835, 2011.

23. Morgan M. Images of desmids from the genus *Scenedesmus*. Fecha de acceso Julio del 2015, del Sitio web: www.microscopy-uk.org.uk.
24. Chen Z, *Scenedesmus* sp. NJ-1 Isolated from Antarctica: A Suitable Renewable Lipid Source for Biodiesel Production, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 3219-3225, 2012.
25. Huang G; Chen G F, Biodiesel production by microalgal biotechnology, *Appl. Energy.* 87, 38-46, 2010.
26. May E, Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Mérida Yucatán, 2014.
27. Department of Chemical Engineering, Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions, Organization of Advanced Science and Technology, Kobe University, Taiwan, 2014.
28. Salazar M, Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, *Biotecnología.* 32, 64-70, 2006.
29. Amaro H, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Appl. Energy.* 88, 3402-3410, 2011.
30. Pulz O, Photobioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287-293, 2001.
31. Schenk P; Stephens E; Marx U; Mussgnug J; Posten C; Kruse O; Hankamer B, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, *Bioenerg. Res.* 1, 20-43, 2008.
32. Carvalho A; Meireles L; Malcata F, Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances, *Biotechnol. Prog.* 22, 1490-1506, 2006.
33. Morán D. Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Fecha de acceso Septiembre del 2016, del Sitio web: www.biorrefinerias.org.

34. Ugwu C, Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae, *Bioresource. Technology.* 99, 4021-4028, 2008.
35. Lehr F. Economic production of hydrogen from microalgae. Fecha de acceso Abril del 2017, del Sitio web: www.fullcellsworks.com.
36. Mata T, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232, 2010.
37. Greenwell H, Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges, *J. Roy. Soc. Inter.* 23, 15-18, 2009.
38. Scheibenbogen K, Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input, *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 59, 123-152, 1998.
39. CCI Camaras climáticas. Fotobiorreactores con tecnología LED. Fecha de acceso Abril del 2017, del Sitio web: www.cci-calidaq.org.
40. Robinson L, Advanced Integrated Biocoil Ponding System: An Environmentally Friendly Method for Treating Sewage Effluent, *Zvi. Cohen. Israel.* 88, 3411-3424, 1995.
41. Munkel R; Schmid U; Werner A; Hirth T, Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*, *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2882-2893, 2013.
42. Borowitzka M, Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks and Fermenters, *J. Biotechnol.* 70, 313-321, 1999.
43. CO2AlgaeFix. La planta de Microalgas "CO2algaeFix" en Arcos de la Frontera. Fecha de acceso Abril del 2017, del Sitio web: www.agenciaandaluzadelaenergia.org.
44. Mirón A, Comparative Evaluation of Compact Photobioreactors for Large-Scale Monoculture of Microalgae, *Biotechnology.* 70, 249-270, 1999.
45. Xu Z, A Simple and Low-Cost Airlift Photobioreactor for Microalgal Mass Culture, *Biotechnol. Lett.* 24, 1767-1771, 2002.

46. FAO. Cultivo de microalgas. Fecha de acceso Junio del 2016, del Sitio web: www.fao.org/ .
47. Kandilian R; Pruvost J; Legrand J; Pilon L, Influence of light absorption rate by *Nannochloropsis oculata* on triglyceride production during nitrogen starvation, *Bioresour. Technol.* 34, 308-319, 2014.
48. Richmond A, *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*, Ed.; Blackwell Science, Owa State, 2004, 2, 123-135.
49. Fernández M; Pérez A; Ferreiro M; Blanco J; Planas M; Labarta U, Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae, *Aquaculture*. 83, 17-37, 1989.
50. Marín N; Morales F; Lodeiros C; Tamigneaux E, Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities, *J. Appl. Phycol.* 10, 405-411, 1998.
51. Grossman A; Takahashi H, Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 52, 163-210, 2006.
52. Bernhard P, Elemental Balancing of biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures, *Biotechnol. Bioec. Eq.* 59, 605-611, 1998.
53. Praveenkumar S, Influence of nutrient deprivation on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga, *Biomass. Bioenergy.* 37, 60-66, 2012.
54. Richardson B, Effects of limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture, *Appl. Microbiol.* 18, 245-250, 2007.
55. Abd H; El-Baroty G, Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 36, 1127-1142, 2012.

56. Li X; Hu H, Growth and lipid accumulation properties of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature, *Bioresour. Technol.* 188, 87-103, 2011.
57. Peña J; Martínez F, Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* in response to heavy metals stress, *Chemosphere.*28, 57-65, 2004.
58. Andersen R, *Algal Culturing Techniques* Elsevier and Phycological Society of América: San Diego, California, 2005.
59. Díaz V; Ordoñez C, Evaluación del pH y la agitación del medio más adecuado para el crecimiento de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio, Bogotá Colombia, 40-49, 2006.
60. Lee I, *Photobioreactor Engineering: Design and Performance*, *Biotechnol. Biotec. Eng. US*, California, 8, 313-324, 2008.
61. Mirón A; Gómez C; Chisti Y, Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture, *AIChE. Journal.* 49, 1872-188, 2000.
62. Harum R; Singh M; Forde G; Danquah M, Bioprocess Engineering of Microalgae to Produce a Variety of Consumer Products, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13, 1037-1047, 2010.
63. Gerde J, Microalgae flocculation: impact of flocculant type, algae species and cell concentration, *Algal. Res.* 47, 777-780, 2014.
64. Lertsutthiwong P; Sutti S; Powtongsook S, Optimization of Chitosan Flocculation for Phytoplankton Removal in Shrimp Culture Ponds, *Aquacult. Eng.* 7, 188-193, 2009.
65. McGarry M, Algal Flocculation with Aluminum Sulfate and Polyelectrolytes, *J. Wat. Pol. Cont. Fed.* 42, 5, 1970.
66. González-Fernández C; Ballesteros M, Microalgae Autoflocculation: An Alternative to High-Energy Consuming Harvesting Methods, *J. Appl. Phycol.* 25, 991-999, 2010.
67. Kesmez M, Fundamentals, Present and Future Perspectives of Electrocoagulation, *J. Hazard. Mater.* 13, 149-156, 2004.

68. Bruton T; Lyons H; Lerat T; Stanley M; Rasmussen M, A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland, *Sust. Energ. Ire.* 14, 75-92, 2009.
69. Brennan L; Owende P, Biofuels from Microalgae-A Review Technologies for Production, Processing and Extractions of Biofuels and Co-productos, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 557-577, 2010.
70. Heasman M; Diemar J; O'connor W; Sushames T, Development of Extended Shelf-life Microalgae Concentrate Diets Harvested by Centrifugation for Bivale Molluscs-A, *Summary Aquaculture Research, Aquaculture.* 31, 637-659, 2000.
71. Kuan-Yeow L; Show J; Chang J, Algal Biomass Dehydration, *Bioresour. Technol.* 135, 720-729, 2013.
72. Ramalho R, Tratamiento de Aguas Residuales, España, 57-59, 1996.
73. Peralta Y; González D, Evaluation of alternatives for microalgae oil extraction based on exergy analysis, *Appl. Energ.* 101, 226-236, 2013.
74. Lee J; Yoo C, Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresour. Technol.* 101, S75-S77, 2010.
75. Luis M, Características de fluidos supercríticos, México, *Rev. Esp. Qui.* 2, 15-23, 2010.
76. Halim R; Danquah K, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotech. Adv.* 30, 709-732, 2012.
77. Freccero E; Pérez E; Nolasco S, Acción de las enzimas en la extracción de aceite por solvente, Facultad de Ingeniería – UNCPBA: Argentina, 60-82, 2013.
78. Contreras P Y, Análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos de dos microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, y su variación en respuesta a condiciones de estrés, Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 127, 2010.
79. Martínez A, Aceites esenciales, Universidad de Antioquia: Medellín Colombia, 33,46, 2003.

80. OriginOil, Extracción húmeda "OriginOil Single-Step Extraction™", National Algae Association: Estados Unidos, 2009.
81. Harwood J; Jones L, Lipid metabolism in algae, UEA, 1-53, 2007.
82. Davi M; Subhach V, Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatments during sequential growth and starvation phases: effects of nutrient supplementation, *Renew. Energ.* 11, 43-47, 2012.
83. Wang G; Wang T, Characterization of lipid components in two microalgae for biofuel application, *Oil. Chem. Soc.* 89,135-143, 2012.
84. Aguirre N; Palacio J, Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno: fósforo, bajo condiciones de laboratorio, *Rev. Ing. Medellin Colombia*, 2007.
85. Gouveia L; Oliveira C, Microalgae as a raw material for biofuels production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269-274, 2009.
86. Carril U, Metabolismo secundario de plantas, Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid: Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal, 2, 2009, 119-145.
87. Sanina N; Goncharova S; Kostetsky E, Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes, *Phytochemistry.* 65, 721-730, 2004.
88. Lohr M; Polle J, Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae, *Plant. Sci.* 9, 9-22, 2012.
89. Bohlmann J; C. Keeling, Terpenoid biomaterials, *Plant. J.* 54, 656-669, 2008.
90. Volkman K, Sterols in microorganism, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 495-506, 2003.
91. Nuñez V; Piña P, Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater, *Bioresour. Technol.* 65, 457-589, 2001.
92. Véron B; Billard C, Sterolic biomarkers in marine phytoplankton. ii. free and conjugated sterols of seven species used in mariculture, *J. Phycol.* 34, 273-279, 1998.
93. Bertelli C, UOP Renewable Jet Process: Procesos de refinación de bioturbosina, Global Business Development Manager, UOP LLC, A Honeywell Company, 2009.

94. Rontani K; Volkman J, Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments, *Org. Geochem.* 34, 1-35, 2003.
95. Tracy I; Daniel W; Price L, Gasoline production from phytol, *Fuel.* 89, 3493-3497, 2010.
96. Patterson G, The distribution of sterols in algae, *Springer.* 6, 120-127, 1971.
97. Dykstra M; Banerjee S; Pavlostathis G, Biotransformation of phytosterols under aerobic conditions, *Water. Res.* 5, 71-81, 2014.
98. Patterson G; Krauss W, Sterols of algae. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*, AOCS Press: Champaign: USA, 1991.
99. Kinder J, Evaluation of bio-derived synthetic paraffinic kerosene, The Boeing Company Sustain Biofuels Research & Technology Program, 57-101, 2009.
100. Hu Q; Sommerfeld M; Jarvis E; Ghirardi M; Posewitz M; Seibert M; Darzins A, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant. J.* 54, 621-639, 2008.
101. Alonso D, Vuelos verdes en América Latina, Brasil, 16-32, 2012.
102. Rojas L, Indicadores regionales de bioenergía sostenible, Banco interamericano de desarrollo, Washington D.C, 1-13, 2012.
103. Lane J, Un elemento de cambio real para la aviación, Ed. Gain, Estados Unidos, 2016, Vol. 2, 123-167.
104. Romero A; Gomez A, Bioturbosina: retos y oportunidades, *Rev. Amc.* 2, 12-23, 2016.
105. Flores M, El clúster de bioturbosina y su rol en la bioenergía mexicana, *Proyectofse*, México, 1-27, 2016.
106. Rahmes T; Kinder J; Crefeldt T; Leduc G, Sustainable bio-derived synthetic paraffinic kerosene (bio-SPK) jet fuel flights and engines tests program results, Technology Integration and Operation Conference, South Carolina, 9, 24-56, 2009.

107. Edwards T; Moses C; Dryers F, Evaluation of combustion performance of alternative aviation fuels, Joint Propulsion Conference & Exhibit, 46, 67-122, 2010.
108. Moses C, Comparative evaluation of semi-synthetic jet fuels, Final Report for CRC Project. 2-34, 2008.
109. ASA. Biocombustibles para la Aviación. Fecha de acceso Enero del 2016, del Sitio web: www.bioturbosina.asa.gob.mx.
110. Rios A, Desarrollo para los biocombustibles para aviación en México, Bioturbosina ASA, México, 1-15, 2010.
111. Hillen W; Pollard G; Wake V, Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels, Biotechnol. Bioeng. 24, 193–205, 1982.
112. Vicente G; Martinez M; Aracil J, Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems, Bioresour. Technol. 16, 12-15, 2004.
113. Kaleli H, The impact of crankcase oil containing phosphorus on catalytic converters and engine exhaust emissions, Ind. Lubr. Tribol. 53, 34-36, 2001.
114. Mateo J, Hidrocrackeo de aromáticos ligeros a n-alcanos C₂₊. Variables de proceso y modelado cinético, Dialnet. 15, 59-78, 2013.
115. Kitazato H; Asaoka S; Iwamoto H, Catalytic cracking of hydrocarbons from microalgae, Sekiyu. Gakkaishi. 32, 28-34, 1989.
116. Lelivelt R, Practical Advances in Petroleum Processing, Catal. Today. Estados Unidos, 1, 130, 2008.
117. Bridgwater A, Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass, Chem. Eng. J. Estados Unidos, 91, 87-102, 2000.
118. Stumbprg M, Hydroprocessed vegetable oils for diesel fuel improvement, Bioresour. Technol. 56, 63-73, 2003.
119. Yakovlev V, Development of new catalytic systems for upgraded bio-fuels production from bio-crude-oil and biodiesel, Catal. Today. 2009.

120. Murata K, Production of synthetic diesel by hydrotreatment of jatropha oils using Pt-Re/H-ZSM-5 catalyst, *Energ. Fuels.* 24, 2404-2409, 2010.
121. Kalnes T; Marker T; Shonnard R, Green Diesel: A Second-Generation Biofuel, *Int. J. Chem. React. Eng.* 48, 221-257, 2007.
122. Viguié J, BioTfuel Project: Targeting the Development of Second-Generation Biodiesel and Biojet Fuel, *Oil & Gas Science and Technology–Rev, IFP Energies nouvelles.* 935-946, 2013.
123. Cha A, Companies rush to build 'biofactories' for medicines, flavorings and fuels, *Amyris, Washington. Post. EUA,* 24, 45-54, 2016.
124. Peters M; Taylor J; Henton D, Integrated methods of preparing renewable chemicals, *Gevo US Patent, EUA,* 2011.
125. Perez O; Bashan D, Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*, *J. Phycol.* 69, 800-812, 2010.
126. Gorman D, Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 54, 1665-1669, 1995.
127. Nanduca H, Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. Para la producción de lípidos, *Centro de Investigación Científica de Yucatán. A.C, Yucatán, México,* 15-35, 2015.
128. Ho S; Chen W, *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 109, 8725-8730, 2010.
129. Tang D, CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels, *Bioresour. Technol.* 101, 3071-3076, 2011.
130. Richmond A, A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors, *J. Appl. Phycol.* 5, 327-332.1993.

131. Voltolina D; Gómez H; Correa G, Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and simulated light and temperature cycled, *Bioresour. Technol.* 33, 359-362, 2005.
132. Quevedo Q; Morales S; Acosta A, Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal, *Rev. Cienc. Agron.* 25-31, 2008.
133. Lavoie A; De la Noue J, Hyperconcentrated Cultures of *Scenedesmus obliquus*: A New Approach for Wastewater Biological Tertiary Treatment, *Water. Res.* 19, 1437-1442, 1985.
134. Xin L, Effects of different nitrogen and phosphorus concentration on the growth, nutrients uptake and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp, *Bioresour. Technol.* 101, 5494-5500, 2010.
135. Mata T; António C; Martins A, Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 54, 621-639, 2010.
136. Sepúlveda I, Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial, *Rev. Mex. Cien. Agri.* 1-13, 2012.
137. Robles-Heredia J C; Sacramento-Rivero J C; Ruiz-Marín A; Baz-Rodríguez S; Canedo-López Y; Narváez-García A, Evaluación de crecimiento celular, remoción de nitrógeno y producción de lípidos por *Chlorella vulgaris* a diferentes condiciones de aireación en dos tipos de fotobiorreactores anulares. *Rev Mex Ing Quim* 15(2):361-377. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. ISSN: 1665-2738, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1

Formulaciones de los medios de cultivo

Tabla A1.1. Formulación del medio TAP [126].

Solución stock	Cantidad	Concentración
Tris-base 1M	20 ml L ⁻¹	Tris-base 121.14 g L ⁻¹
Buffer fosfatos	1 ml L ⁻¹	K ₂ HPO ₄ 108 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 56 g L ⁻¹
Metales traza Huttner*	1 ml L ⁻¹	H ₃ BO ₃ 11.4 g L ⁻¹ ZnSO ₄ · 7H ₂ O 22 g L ⁻¹ MnCl ₂ · 4H ₂ O 5.06 g L ⁻¹ FeSO ₄ · 7H ₂ O 4.99 g L ⁻¹ CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.61 g L ⁻¹ CuSO ₄ · 5H ₂ O 1.57 g L ⁻¹ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O 1.1 g L ⁻¹
Solución A	10 ml L ⁻¹	NH ₄ Cl 40 g L ⁻¹ MgSO ₄ · 7H ₂ O 10 g L ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O 5 g L ⁻¹
Ác. Acético glacial	1 ml L ⁻¹	

Tabla A1.2. Formulación del medio ARS según Pérez *et al.* [127] modificado.

Reactivo	Cantidad para 1 L	Fórmula
Cloruro de sodio	0.2g	NaCl
Cloruro de calcio	40g	CaCl ₂
Sulfato de magnesio hepta hidratado	20g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
Fosfato dipotasico	2g	K ₂ HPO ₄
Fosfato monopotasico	1g	KH ₂ PO ₄
Fosfato de sodio	0.6g	Na ₂ HPO ₄
Cloruro de amonio	3.84g	NH ₄ Cl
Glucosa	10g	C ₆ H ₁₂ O ₆

ANEXO 2

Tabla A2.1. Composición de la melaza [127].

Componente	Valor
Materia seca (%)	76.7
Nitrógeno (%)	0.0232
Densidad (g/mL)	1360
Azúcares totales (g/Kg melaza)	836
Sacarosa (%)	51.50
Glucosa (%)	9.59
Fructosa (%)	4.05
Materia volátil (%)	86.3

ANEXO 3

Determinación de azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico

Reactivos:

Ácido sulfúrico concentrado 97.5%

Fenol al 5%

Procedimiento.

A 1 mL de la disolución problema se adiciona 1 mL de la disolución de fenol al 5%, enseguida se agregan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en forma brusca, para homogenizar bien la muestra y que la hidrólisis sea más uniforme. Se deja enfriar por 10 minutos, se agita y se coloca en un baño de agua fría durante 10 minutos. Se lee en el espectrofotómetro a 490nm.

Curva de Calibración.

Se utiliza una disolución patrón de sacarosa de 0.1 g·L⁻¹ para preparar una curva de calibración con un rango de concentración de 0.01 a 0.1 g·L⁻¹. La curva de calibración se realizó con el estándar y las lecturas obtenidas para las diferentes concentraciones se presentan en la tabla A3.1.

Tabla A3.1. Absorbancia de las muestras patrón a 490nm.

Muestra	Concentración			
	(g·L ⁻¹)	R1	R2	R3
Blanco	0	0	0	0
1	0.01	0.009	0.027	0.015
2	0.02	0.014	0.023	0.016
3	0.03	0.038	0.035	0.019
4	0.04	0.054	0.048	0.043
5	0.05	0.066	0.084	0.079
6	0.06	0.080	0.092	0.074
7	0.07	0.098	0.103	0.089
8	0.08	0.095	0.099	0.103
9	0.09	0.105	0.110	0.109
10	0.1	0.124	0.141	0.116

La curva de calibración se muestra en la figura 55 Se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.90.

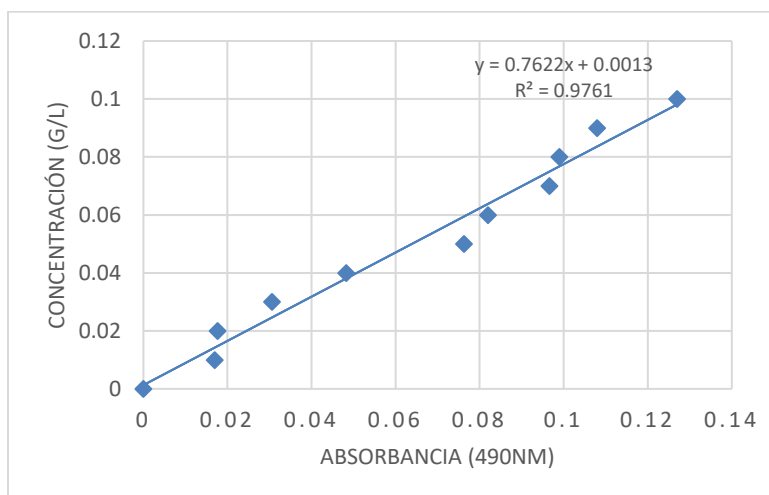


Figura 55. Curva de calibración de azúcares totales.

Para los medios de cultivo con melaza al 1% las diluciones fueron mayores debido a la alta concentración de azúcares al inicio y al final del periodo de crecimiento del cultivo.

Tabla A3.2. Diluciones y absorbancia de muestras con melaza al 1%.

Dilución	10	100	500	1000	2000	3000	4000	5000
Inicio								
Absorbancia	1.93	0.245	0.113	0.085	0.073	0.043	0.044	0.028
Final								
Absorbancia	0.889	0.079	0.055	0.025	0.011	-	-	-

Tabla A3.3. Concentraciones y resultados finales en medio de cultivo con melaza al 1%.

Dilución Inicio			
	1500	2000	2500
TRIPLICADOS	R1	R2	R3
	0.08	0.068	0.052
	0.089	0.073	0.048
	0.079	0.076	0.05
Promedio	0.083	0.072	0.05
Valor Y	0.064	0.056	0.039
conc (g/l)	96.463	112.865	98.525
conc (g)	1929.256	2257.299	1970.500

Dilución Final			
	100	250	500
TRIPLICADOS	R1	R2	R3
	0.089	0.063	0.049
	0.083	0.072	0.05
	0.096	0.054	0.041
Promedio	0.089	0.063	0.047
Valor Y	0.0681	0.0480	0.0356
conc (g/l)	6.8090	12.0047	17.7847
conc (g)	136.1797	240.0930	355.6933

Tabla A3.4. Diluciones y absorbancia de muestras con melaza al 0.1%.

Dilución	10	100	500	1000	2000	3000	4000	5000
Inicio								
Absorbancia	1.87	0.32	0.072	0.053	0.034	0.0189	0.011	0.0092
Final								
Absorbancia	0.693	0.06	0.012	0.006	-	-	-	-

Tabla A3.5. Concentraciones y resultados finales en medio de cultivo con melaza al 0.1%.

Dilución Inicio			
	500	1000	1500
TRIPLICADOS	R1	R2	R3
	0.075	0.063	0.06
	0.081	0.072	0.049
	0.069	0.05	0.057
Promedio	0.075	0.062	0.053
Valor Y	0.058	0.048	0.043
conc (g/l)	29.233	48.302	65.213
conc (g)	584.650	966.047	1304.252

Dilución Final			
	50	100	250
TRIPLICADOS	R1	R2	R3
	0.083	0.075	0.057
	0.08	0.069	0.048
	0.081	0.078	0.043
Promedio	0.081	0.074	0.049
Valor Y	0.0620	0.0564	0.0376
conc (g/l)	3.0996	5.6403	9.4005
conc (g)	61.9923	112.8056	188.0093

ANEXO 4

Determinación del porcentaje de humedad de la biomasa microalgal

Tabla A4.1. Contenido de humedad en extracto de biomasa de reactores de 20 L. Exp. ARS con melaza al 0.1%

Tubo	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Diferencia (g)	Porcentaje de humedad (%)
1	13.6648	13.2565	0.4083	3.0
2	13.7545	13.3438	0.4107	3.0
3	14.7	13.6578	1.0422	7.1
4	14.7567	14.0244	0.7323	5.0
5	14.4237	13.5865	0.8372	5.8
6	14.076	13.5173	0.5587	4.0
7	14.2714	13.4341	0.8373	5.9
8	14.3403	13.5563	0.784	5.5
9	14.6805	13.795	0.8855	6.0
10	14.3296	13.5028	0.8268	5.8
11	13.8687	13.7594	0.1093	0.8
12	13.6683	13.2519	0.4164	3.0
13	14.8622	13.9531	0.9091	6.1
14	14.2958	13.4759	0.8199	5.7
15	14.1826	13.2304	0.9522	6.7
16	14.5321	13.6366	0.8955	6.2
17	14.4934	13.2856	1.2078	8.3
18	14.4711	13.6295	0.8416	5.8
19	14.0742	13.5208	0.5534	3.9
20	14.2881	13.2139	1.0742	7.5
21	14.4194	13.6152	0.8042	5.6
22	14.3876	13.6944	0.6932	4.8
23	14.5611	13.3944	1.1667	8.0
24	14.1484	13.2997	0.8487	6.0
25	14.1629	12.8466	1.3163	9.3
26	14.4328	12.8261	1.6067	11.1
27	14.6135	14.0939	0.5196	3.6
28	14.1317	13.378	0.7537	5.3
29	14.2246	13.495	0.7296	5.1
Promedio				5.7

