



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS**

**EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE  
CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS  
CON EL ALGA *Neochloris oleoabundans* PARA  
SU USO POTENCIAL COMO BIODIESEL**

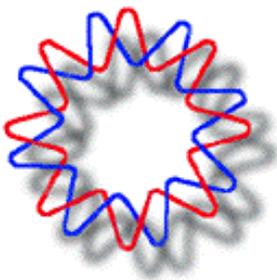
**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**IBQ. ADRIANA GARIBAY HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ**



**CUERNAVACA, MORELOS**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos: EDO. DE MORELOS 2007-C01-80360, SAGARPA-CONACyT 2009; y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IN220908.

---

---

**MIEMBROS DEL JURADO**

**PRESIDENTE:**

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

**SECRETARIO:**

Dra. Clarita Olvera Carranza

**VOCAL:**

Dra. Esperanza Martínez Romero

**SUPLENTE:**

Dr. David Uriel Hernández Becerril

**SUPLENTE:**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

---

---

A Benjamín,

*No hay hechos ni palabras para demostrarte lo mucho que te amo*

A mis padres, Alberto y Alicia,

*No me alcanza la vida para agradecerles todo lo que me han dado*

*Esta tesis no es ni una pizca de lo que necesito para demostrarles lo que siento por ustedes,*

*Muchas gracias por todo*

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alfredo Martínez por su apoyo, confianza y enorme paciencia. Porque cada una de sus observaciones siempre me ayuda a ser mejor.

A su familia, por siempre recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir cada vez más cerca de la mía.

A los miembros del jurado, Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, Dra. Clarita Olvera Carranza, Dra. Esperanza Martínez Romero y Dr. David Uriel Hernández Becerril, por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Leobardo Serrano, por haberme adoptado como un miembro más de la Planta Piloto.

A todos los miembros de la Planta Piloto, Don Arturo, Miriam, Vero y Raunel, por su apoyo y los buenos momentos.

A Mario Caro, por su ayuda incondicional y su amistad... Especialmente por su amistad.

Al Dr. Rafael Vázquez, por sus comentarios enriquecedores, su amabilidad y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A los miembros del laboratorio del Dr. Rafael Vázquez, la Dra. Marcela Ayala, la Dra. Lucía Perezgasga, Rosa, Cris, las Lores, Julio, en especial a Bere y Abraham, por siempre recibirme con tanto cariño y por la bonita armonía en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio Bolivar-Gosset por su compañerismo y sus buenas recomendaciones.

A José, por su amistad y por sus críticas constructivas e imparciales.

Muchas gracias por todo.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>4</b>
1.1. Biodiesel. ....	4
1.2. Aceites vegetales: materia prima para producción de biodiesel. ....	5
1.3. Microalgas: una alternativa para producción de biodiesel. ....	6
<b>2. ANTECEDENTES.</b> .....	<b>8</b>
2.1. Métodos de producción de biodiesel. ....	8
2.1.1. Uso directo de aceites o mezclas con diesel fósil. ....	8
2.1.2. Microemulsiones. ....	9
2.1.3. Pirólisis. ....	9
2.1.4. Transesterificación. ....	10
2.2. Propiedades del biodiesel como combustible. ....	12
2.3. Aspectos que favorecen la utilización de microalgas para la obtención de lípidos en comparación con plantas oleaginosas. ....	18
2.4. Sistemas de cultivo de microalgas. ....	21
2.5. Microalgas oleaginosas. ....	24
2.5.1. Factores que influyen en la biosíntesis y producción de lípidos. ....	26
2.5.2. Especies de microalgas evaluadas para la producción de biocombustibles. ....	30
2.6. <i>Neochloris oleoabundans</i> . ....	33

---

<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS. ....</b>	<b>39</b>
4.1. Objetivo general.....	39
4.2. Objetivos particulares. ....	39
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
5.1. Microorganismos. ....	40
5.2. Condiciones y medios de cultivo. ....	40
5.2.1. Medios de cultivo. ....	40
5.2.1.1. Medio Basal de Bold (BBM).....	40
5.2.1.2. Medio suplementado con agua de suelo.....	41
5.2.1.3. Medio Luria-Bertani.....	42
5.2.2. Mantenimiento de la cepa y preinóculos. ....	42
5.2.3. Inóculos.....	43
5.2.4. Cultivos experimentales.....	44
5.3. Métodos analíticos. ....	45
5.3.1. Concentración celular. ....	45
5.3.2. Determinación de peso seco. ....	46
5.3.3. Extracción y determinación de lípidos totales. ....	46
5.3.4. Determinación del contenido de carbohidratos y proteínas.....	47
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
6.1. Determinación de las condiciones generales de cultivo. ....	48
6.2. Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición bioquímica de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> . ....	49
6.2.1. Relación del pH de los cultivos con el consumo de nitratos. ....	50
6.2.2. Efecto en la biomasa total: densidad celular y peso seco. ....	52

---

---

6.2.3. Efecto en la composición proteica.....	56
6.2.4. Efecto en la composición de carbohidratos.....	58
6.2.5. Efecto en la composición lipídica.....	58
6.3. Efecto de la temperatura en la composición bioquímica de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> limitados en nitrógeno.....	62
6.3.1. Efecto en el crecimiento: densidad celular y peso seco.....	62
6.3.2. Efecto en la composición bioquímica.....	66
6.4. Efecto de la limitación de fósforo en la composición bioquímica de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> deficientes en nitrógeno.....	68
6.4.1. Efecto en el crecimiento: densidad celular y peso seco.....	69
6.4.2. Efecto en la composición bioquímica.....	73
6.5. Efecto del enriquecimiento del suministro de aire con CO <sub>2</sub> en inóculos de <i>N. oleoabundans</i> y en su posterior empleo en cultivos limitados en nitrógeno.....	75
6.5.1. Efecto del enriquecimiento del suministro de aire con CO <sub>2</sub> en el crecimiento y composición bioquímica de inóculos de <i>N. oleoabundans</i> .....	76
6.5.2. Efecto de la limitación de nitrógeno en el crecimiento y el contenido lipídico de células de <i>N. oleoabundans</i> , previamente cultivadas bajo condiciones de aireación enriquecidas con CO <sub>2</sub> .....	82
6.6. Comparación de resultados para la producción y productividad de lípidos en cultivos de <i>N. oleoabundans</i> .....	86
6.7. Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> .....	87
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>94</b>
<b>10. APÉNDICE.....</b>	<b>107</b>
10.1. Parámetros cinéticos.....	107

---

---

10.2. Revisión 'Biodiesel a partir de microalgas' aceptada para su publicación en la  
Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. .... 110

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Norma ASTM D 6751 para el biodiesel en EUA y especificaciones EMA para mezclas diesel-biodiesel .....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Estándares europeos para biodiesel: EN 14214 (uso vehicular) y EN12413 (combustible para calefacción).....	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México .....	<b>20</b>
<b>Tabla 4.</b> Contenido lipídico de algunas especies de microalgas en condiciones autotróficas .....	<b>25</b>
<b>Tabla 5.</b> Contenido y perfil lipídico de algunas especies de microalgas bajo distintas condiciones de cultivo .....	<b>32</b>
<b>Tabla 6.</b> Composición bioquímica celular de <i>N. oleoabundans</i> en medio marino y de agua dulce .....	<b>36</b>
<b>Tabla 7.</b> Soluciones estándar para la preparación del medio BBM.....	<b>40</b>
<b>Tabla 8.</b> Geometría de los sistemas foto-biológicos.....	<b>44</b>
<b>Tabla 9.</b> Parámetros lipídicos de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> reportados para distintas estrategias de cultivo .....	<b>86</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Triacilglicérido.....	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Reacción general de transesterificación.....	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Sistemas foto-biológicos para la preparación de inóculos y la evaluación de cultivos experimentales. ....	<b>43</b>
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de <i>N. oleoabundans</i> en distintos medios de cultivo .....	<b>49</b>
<b>Figura 5.</b> Relación del pH con el consumo de nitratos.....	<b>51</b>
<b>Figura 6.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la densidad y masa celular .....	<b>54</b>
<b>Figura 7.</b> Coloración de cultivos sometidos a distintas concentraciones limitantes de nitrógeno después de 9 días .....	<b>54</b>
<b>Figura 8.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno en el peso seco .....	<b>55</b>
<b>Figura 9.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición proteica .....	<b>57</b>
<b>Figura 10.</b> Contenido de carbohidratos por célula en cultivos sometidos a distintas condiciones limitantes de nitrógeno durante 9 días.....	<b>58</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición lipídica .....	<b>59</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto de la temperatura en la densidad celular y el peso seco de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM).....	<b>63</b>
<b>Figura 13.</b> Solubilidad del CO <sub>2</sub> y del O <sub>2</sub> a distintas temperaturas.....	<b>65</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto de la temperatura en la composición bioquímica de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.....	<b>66</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto de la temperatura en la producción y productividad lipídica de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días .....	<b>67</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto de la limitación de fósforo en el incremento de la densidad y la masa celular de cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días .....	<b>70</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto de la limitación de fósforo en la producción y productividad global de biomasa en cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.....	<b>71</b>
<b>Figura 18.</b> Efecto de la limitación de fósforo en la composición bioquímica celular de cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.....	<b>73</b>

---

<b>Figura 19.</b> Efecto de la limitación de fósforo en la producción máxima de lípidos y carbohidratos en cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) durante 9 días.....	<b>74</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> en el flujo de aireación en la densidad celular y el peso seco.....	<b>77</b>
<b>Figura 21.</b> Efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> en el flujo de aireación en la composición bioquímica de inóculos de <i>N. oleoabundans</i> después de 7 días .....	<b>80</b>
<b>Figura 22.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno en los parámetros biomásicos de cultivos inoculados con células previamente tratadas bajo distintas concentraciones de CO <sub>2</sub> (0.035% y 1% v/v) en el flujo de aireación.....	<b>84</b>
<b>Figura 23.</b> Efecto de la limitación de nitrógeno en los parámetros lipídicos de cultivos inoculados con células previamente tratadas bajo distintas concentraciones de CO <sub>2</sub> (0.035% y 1% v/v) en el flujo de aireación.....	<b>85</b>
<b>Figura 24.</b> Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> limitados en nitrógeno .....	<b>88</b>

## RESUMEN

La situación actual debida al agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y dificultades ambientales, demanda urgentemente fuentes alternas de energía, siendo el biodiesel una opción promisoría. El biodiesel es un biocombustible producido principalmente a partir de aceites de plantas oleaginosas, cuya disponibilidad desafortunadamente, es incapaz de reemplazar el mercado de petrodiesel en México y el mundo. El uso de las microalgas oleaginosas para la producción de biodiesel es una opción ventajosa, debido a su elevado contenido de lípidos y otros atributos tales como su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer en aguas dulces, salobres y residuales, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta. *Neochloris oleoabundans* es una microalga edáfica oleaginosa, cuyo contenido lipídico es elevado y su composición de ácidos grasos es idónea para la producción de biodiesel. En este proyecto se evaluó el efecto de parámetros de cultivo (limitación de nitrógeno, temperatura, deficiencia de fósforo y suministro de CO<sub>2</sub>) en la composición bioquímica y en la producción y productividad de lípidos de cultivos de *N. oleoabundans*.

Se concluyó que la limitación de nitrógeno promovió elevados parámetros de producción y productividad de lípidos. Asimismo, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, la temperatura que favoreció la producción de biomasa total y lípidos fue la de 25°C. La limitación de fósforo, sumada a la deficiencia de nitrógeno, no favoreció la acumulación de lípidos, sin embargo, promovió la acumulación de carbohidratos. Por su parte, el suministro de flujos de aireación enriquecidos con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v) a inóculos de *N. oleoabundans*, para su posterior cultivo bajo condiciones de limitación de nitrógeno, es una estrategia cuya aplicación no se recomienda para la producción de biodiesel, ya que la producción de biomasa y de lípidos bajo tales condiciones es reducida.

A partir de los valores de productividad lipídica obtenidos se estima que con cultivos de *N. oleoabundans*, sería posible producir hasta **10,228 L<sub>Biodiesel</sub>/ha/año**. Hipotéticamente, esta productividad posibilitaría reemplazar el total de la demanda de petrodiesel en México mediante el uso del 1.2% de la superficie total del país. El panorama

anterior, resulta alentador para la tecnología de producción de biodiesel a partir de cultivos de microalgas.

**ABSTRACT**

The current situation due to the exhaustion of the fossil energy resources, the increase of oil prices and the environmental challenges related to the accumulation of greenhouse gases, urgently demands the development of alternative energy sources, being the biodiesel one of the most prominent. Biodiesel is a biofuel mainly produced from plant oils, which are not enough to replace the demand of petroleum-based diesel. Oleaginous microalgae appear to be a satisfactory feedstock for biodiesel production that provides several advantages such as: high photon conversion efficiency; ability to grow in marine, salt, fresh and waste waters and higher growth rates than plants. *Neochloris oleoabundans* is an oleaginous edaphic microalgae that has the capacity of accumulating lipids with an acceptable fatty acid composition that complies with existing biodiesel standards. The aim of this work was to evaluate the effect of culture conditions (nitrogen limitation, temperature, phosphorous deficiency and CO<sub>2</sub> enrichment of aerating gas) in the biochemical composition, lipid production and productivity of *N. oleoabundans*.

In this work, it was found that nitrogen limitation enhanced lipid production and productivity. Furthermore, under nitrogen deficiency conditions, the highest biomass and lipid production values were achieved at 25 °C. Phosphorous limitation of nitrogen limited cultures, did not promote lipid accumulation, but favoured higher carbohydrate contents. Air stream enrichment with CO<sub>2</sub> (1% v/v) during the stage of inoculum preparation, decreased biomass and lipid production values.

The maximum lipid productivity achieved in this work would allow a hypothetical productivity of **10,228 L<sub>Biodiesel</sub>/ha/year**. Estimations from this data show that only 1.2% of Mexico's total land would be necessary to produce enough oil for replacing the whole diesel demand in Mexico. These results support proposing *N. oleoabundans* cultures as a promising system to obtain large amounts of lipids for biodiesel production.

### 1. INTRODUCCIÓN.

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática debido al agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y dificultades ambientales causadas por el CO<sub>2</sub>, tales como la contaminación local del aire y el calentamiento global. Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente. Una alternativa energética promisoría que ha resultado muy atractiva en años recientes es el biodiesel (1).

#### 1.1. Biodiesel.

El biodiesel técnicamente consiste en monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta, etanol y metanol principalmente, con ácidos grasos de cadena larga, obtenidos a partir de biomasa renovable. El biodiesel es un biocombustible capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo (1).

El uso de combustibles distintos a los derivados del petróleo para el funcionamiento de motores no es nuevo. El creador del motor diesel, Rudolf Diesel, utilizó aceite de maní para impulsar su invención en el año de 1900. Años después, ante el advenimiento del petróleo a bajo costo, se le dio preferencia al uso de combustibles derivados del crudo, por lo que el motor de encendido por compresión fue modificado para la combustión eficiente del diesel, el cual es un producto refinado del petróleo. El empleo de aceites vegetales como sustitutos del diesel, fue retomado eventualmente en las crisis energéticas acontecidas en las décadas de 1930 y de 1940. Recientemente, debido a la problemática energética y ambiental que enfrenta la humanidad, se ha renovado el interés hacia el uso de combustibles alternos a los fósiles (2).

En contraste con el diesel de petróleo, el biodiesel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diesel fósil) (3), produce menos emisiones nocivas (CO, sulfuros, hidrocarburos aromáticos, partículas de hollín) durante su combustión, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (150°C) (1). Además, el biodiesel puede

utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y de distribución para el diesel de petróleo (1). Debido a las propiedades físicas de este biocombustible y a su contenido energético cercano al del diesel fósil (4), su uso no requiere de modificación alguna en el motor diesel convencional, por lo que puede ser empleado en éste directamente (3).

El biodiesel se elabora principalmente mediante la transesterificación de aceites vegetales (1; 3). La Unión Europea, con una producción de 8,812 millones de litros (ML) en el 2008, es el líder mundial en la industria del biodiesel y se estima que lo seguirá siendo durante la década próxima. Alemania encabeza la lista de países productores (3,203 ML), seguido por EUA (3,182 ML), Francia (2,063 ML) e Italia (676 ML); países en desarrollo tales como Malasia, China, Brasil, Colombia, Argentina e Indonesia, son prometedores en la industria del biodiesel. La producción mundial del biocombustible se ha incrementado considerablemente y se estima un mercado de biodiesel de 168,206 ML para el 2016 (3; 5; 6; 7).

### **1.2. Aceites vegetales: materia prima para producción de biodiesel.**

El biodiesel es obtenido primordialmente de aceites vegetales<sup>3</sup>, es por ello que el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso como materia prima se ha estudiado exhaustivamente (2). Las principales fuentes de aceites vegetales utilizadas para la producción de biodiesel son el fruto de la palma, la soya, el girasol, el coco, la colza, el cacahuete, entre otros (2; 3).

Además del uso de los aceites vegetales para la alimentación humana, el elevado precio del biodiesel en contraste con el del diesel fósil, ha obstaculizado la comercialización del primero, situación que en gran medida se debe a los altos costos de los aceites vegetales (8); por tanto, se han investigado varias alternativas para minimizar los costos de la materia prima. Una de ellas, es el uso de aceites de desecho y de grasas animales, alternativa que a pesar de que disminuye el precio de los insumos, no ha sido satisfactoria debido a los gastos adicionales necesarios para el refinamiento de los materiales a procesar y a la cantidad que se requiere de estos desechos para generar un volumen de biocombustible competitivo con el mercado del diesel (8). El uso de aceites derivados de plantas no comestibles tales como *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata*,

*Madhuca indica* y *Swida wilsoniana*, es una opción promisorio para la producción del biocombustible (8; 9).

La obtención de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles) es una tecnología incapaz de desplazar en una porción considerable al diesel de petróleo, esto debido a varios inconvenientes tales como la enorme superficie de cultivo requerida, los largos periodos de producción (meses o años), el rendimiento lipídico limitado de las plantas (menor al 20% en semillas y frutos) y la dependencia geográfica y estacional a las regiones de cultivo (1; 9).

La sustentabilidad de la industria del biodiesel, requiere del uso de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones inherentes al empleo de las plantas oleaginosas (8).

### **1.3. Microalgas: una alternativa para producción de biodiesel.**

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio intervalo de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las clases más conocidas son: las diatomeas (*Bacillariophyceae*), las algas verdes (*Chlorophyceae*), las cianobacterias (*Cyanophyceae*) y las heterokontofitas (*Heterokontophyta*). Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (10; 11; 12; 13; 14).

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como fuente de alimento humano; es hasta ahora que estos microorganismos han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico (10). El interés por las microalgas surgió en los años cincuenta y sesenta al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición del hombre. El interés se manifestó en Alemania y para el año de 1970, éste se

extendió a países de todos los continentes (EUA, Japón, Israel, Italia, Checoslovaquia, entre otros) (10; 15). De este modo, los primeros estudios de microalgas surgieron al ser éstas consideradas como una fuente nutritiva para la alimentación humana y la acuicultura, posteriormente, el enfoque se tornó hacia otras aplicaciones tales como el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas y los procesos de bioconversión energética (10).

El potencial de las microalgas en la producción de bioenergía fue reconocido a raíz de la crisis energética de 1975 (10; 15). A partir de entonces, se han propuesto diversas opciones para el uso de las microalgas en la producción de energía renovable: obtención de metano mediante digestión anaeróbica, generación fotosintética de hidrógeno, producción de etanol por vía fermentativa, combustión directa de la biomasa microalgal para la generación de vapor o de electricidad y producción de biodiesel (11; 16).

En la actualidad, se ha planteado el uso de los lípidos microalgales para la producción de biodiesel, ya que ésta es una alternativa que promete satisfacer o reemplazar considerablemente la demanda global de diesel fósil (17). Esta alternativa es prometedora dados los beneficios que ofrece tales como el elevado contenido lipídico de algunas especies, los periodos cortos de producción (días), la menor superficie requerida en comparación con las plantas oleaginosas, su alta eficiencia fotosintética, la eficacia en la absorción de nutrientes y la capacidad de acoplamiento al reciclaje de CO<sub>2</sub>, entre otros (9; 11; 12).

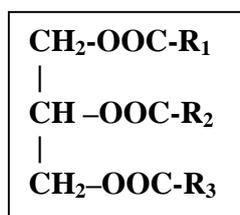
Actualmente, existen varios géneros y especies de microalgas que potencialmente pueden ser utilizadas para la obtención de lípidos con el objetivo de emplearlos en la producción de biodiesel (15; 17). No obstante, las propiedades requeridas para su uso como biodiesel, permiten definir el tipo de lípidos que se necesitan producir para este fin. Por tal razón, en este proyecto se planteó la evaluación del cultivo de una microalga verde oleaginosa, *N. oleoabundans*, cuyo perfil de lípidos es adecuado para la producción de biodiesel.

---

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Métodos de producción de biodiesel.

El biodiesel, en términos generales, se define como cualquier combustible biomásico capaz de sustituir al diesel fósil. Actualmente, este concepto se ha reducido a una modificación química concreta de los aceites naturales (11). Los aceites técnicamente son referidos a los triacilglicéridos, sustancias hidrofóbicas conformadas por un mol de glicerol y tres moles de ácidos grasos (**Figura 1**); los ácidos grasos varían en la longitud de la cadena hidrocarbonada y en el grado de insaturación (2). Actualmente, existen diversas metodologías para la producción de biodiesel, cuatro de ellas han sido estudiadas exhaustivamente y son: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diesel fósil, microemulsiones, pirólisis y transesterificación (2).



**Figura 1. Triacilglicérido.**  $R_{1-3}$ : Grupos hidrocarbonados de los ácidos grasos.

#### 2.1.1. Uso directo de aceites o mezclas con diesel fósil.

El uso directo de aceites (primordialmente aquellos de origen vegetal) en motores diesel es impráctico e insatisfactorio, ya que ocasiona problemas tales como la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, el golpeteo en el motor, el desgaste excesivo de la máquina y el daño del lubricante (2). Estas dificultades son causadas por la elevada viscosidad de los aceites, su baja volatilidad, su combustión incompleta, el bajo número de cetanos de algunos de ellos, la reactividad de las insaturaciones de las cadenas hidrocarbonadas y la presencia de gomas naturales (fosfátidos) y de ácidos grasos libres (2). Ante estas complicaciones los aceites deben ser modificados para que éstos sean compatibles con los motores diesel. Para tal propósito, se proponen diversos métodos, uno

de los cuales es el empleo de mezclas de aceites con diesel fósil (2; 16). Esta alternativa ha resultado favorable solamente en limitadas ocasiones y es por ello que es considerada como inefectiva, ya que no soluciona los problemas originados por el uso directo de aceites en motores diesel (2).

### **2.1.2. Microemulsiones.**

Las microemulsiones son dispersiones coloidales en equilibrio, constituidas por microestructuras fluidas ópticamente isotrópicas de dimensiones de 1-150 nm, formadas espontáneamente a partir de dos líquidos inmiscibles y uno o más anfífilos iónicos o no iónicos. Los anfífilos son compuestos con doble afinidad cuyas moléculas constan de una región polar y una apolar. Los solventes más utilizados en estos sistemas son el metanol, etanol y 1-butanol. En contraste con el uso directo de aceites o de mezclas de éstos con diesel fósil, el empleo de microemulsiones es una mejor alternativa, ya que el uso de estos sistemas dispersos disminuye la viscosidad de los aceites, mejora sus propiedades de rocío y de encendido, reduce su contenido en cenizas y por ende, mejora su desempeño en los motores diesel. No obstante, esta propuesta no es satisfactoria, ya que en su aplicación se presentan inconvenientes tales como la formación de residuos de carbono, bloqueo de los inyectores, combustión incompleta e incremento de la viscosidad del lubricante (2).

### **2.1.3. Pirólisis.**

La pirólisis o cracking térmico, se define como la descomposición de una sustancia en moléculas de menor tamaño por la sola acción del calor (18). Este proceso se efectúa en ausencia de aire u oxígeno, a temperaturas altas (500-600°C) y presiones más o menos elevadas (2; 19). El mecanismo de pirólisis es mediado por radicales libres y supone la formación de alcanos ligeros, alquenos e hidrógeno (18; 19). Los productos pueden incluir isómeros ramificados y compuestos cíclicos formados a partir de alquenos (19). La química de este procesamiento es compleja debido a la variedad de reacciones posibles que comprende y a la diversidad de productos que origina. Los sustratos de la pirólisis pueden ser triacilglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos, entre otros (2).

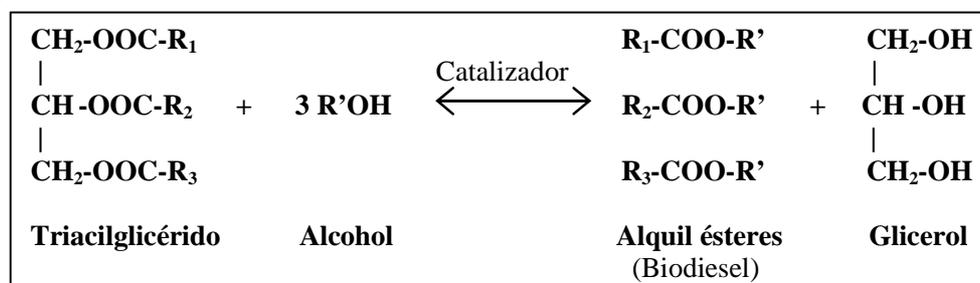
La pirólisis de aceites vegetales se ha estudiado a partir de la primera guerra mundial con el propósito de obtener compuestos adecuados para su uso como combustibles

---

ante la escasez de petróleo. Los productos del cracking térmico de varios aceites vegetales (tung, soya, cártamo, copra, palma, colza) han sido estudiados y se conoce que están conformados principalmente por alcanos y alquenos y, en menor proporción, por ácidos carboxílicos, alcadienos y compuestos aromáticos. Las propiedades de los aceites pirolizados como combustibles, superan a las de los aceites vegetales aislados (2). El cracking catalítico utiliza sales metálicas como catalizadores y se caracteriza por permitir orientar la dirección de la pirólisis, además de disminuir la presión o la duración del proceso; en contraste con el cracking puramente térmico de aceites vegetales, este proceso es más sencillo y eficaz (2; 19). La pirólisis de aceites vegetales ofrece la enorme ventaja de que la fracción pesada originada (fracción diesel) es similar a la de los combustibles fósiles. No obstante, la pirólisis presenta inconvenientes tales como la producción de materiales de escaso valor, la eliminación de los beneficios ambientales inherentes al uso de combustibles oxigenados debido a la remoción de oxígeno durante el cracking y además, este procedimiento en ocasiones resulta más favorable para la producción de moléculas susceptibles de ser utilizadas como gasolina, en contraste con aquellas para su empleo como diesel; asimismo, el costo de los equipos requeridos es elevado (2).

#### 2.1.4. Transesterificación.

La transesterificación o alcoholólisis (**Figura 2**) es la reacción química ocurrida entre los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol para producir glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos (biodiesel) (2; 4). Esta reacción sucede secuencialmente: primero los triacilglicéridos son convertidos en diacilglicéridos, después éstos son transformados en monoacilglicéridos y finalmente, éstos son reducidos a glicerol y ésteres de ácidos grasos (2; 17).



**Figura 2. Reacción general de transesterificación.**  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R'$  son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas).

Los principales factores que influyen en la reacción de transesterificación son la relación molar alcohol:glicéridos, el tipo de catalizador, la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima (2; 4). En contraste con los aceites, los productos de la alcoholólisis son de viscosidad menor y por ende, son compatibles con los motores diesel, por lo tanto, este método es el más usual para la producción de biodiesel en Europa y EUA (2; 16; 20). Asimismo, este método se emplea en la obtención de metil-ésteres para la elaboración de detergentes y cosméticos (2). El glicerol originado como co-producto, tiene amplias aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica (3).

La estequiometría de la transesterificación requiere de tres moles de alcohol por cada mol de triacilglicérido (3:1) (2; 17). En la práctica industrial, la relación alcohol:triacilglicerol debe ser mayor para desplazar el equilibrio hacia la obtención de mayores rendimientos de alquil-ésteres. Los alcoholes alifáticos primarios y secundarios de 1-8 átomos de carbono son los empleados en este proceso, de tal modo que el metanol, etanol, propanol, butanol y alcohol isoamílico pueden ser utilizados. El metanol y el etanol son los alcoholes que se usan frecuentemente (2).

La transesterificación utiliza catalizadores para mejorar la velocidad de reacción y el rendimiento de la misma (2). La catálisis puede ser ácida, alcalina o enzimática (2; 4; 17). El proceso de catálisis alcalina, utiliza NaOH, KOH, carbonatos y alcóxidos como catalizadores (2; 17). La reacción se realiza con una relación molar alcohol:triacilglicerol 6:1 y a temperaturas cercanas al punto de ebullición del alcohol (60°C para el metanol) bajo condiciones de presión atmosférica; el uso de presiones y temperaturas mayores es posible pero costoso (4; 17). La principal limitante de la transesterificación alcalina es su sensibilidad al contenido de agua y ácidos grasos libres, ya que la presencia de estos compuestos propicia reacciones de saponificación que consumen el catalizador y dificultan la recuperación y purificación de los productos (2; 4). Por otra parte, el proceso de catálisis ácida utiliza al ácido sulfúrico, ácidos sulfónicos y al ácido clorhídrico como catalizadores (2). En contraste con la alcoholólisis alcalina, la ácida es 400 veces más lenta, por lo que para obtener una mayor tasa de conversión, requiere de una relación molar alcohol:triacilglicérido mayor, temperaturas más altas, concentraciones mayores de catalizador y tiempos de reacción superiores (4). Sin embargo, este proceso ofrece la ventaja de ser insensible al contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima (2;

4). Ambos procesos de catálisis química presentan ciertos inconvenientes: dificultades en la recuperación del glicerol, altos requerimientos energéticos y tratamiento obligado de las aguas de proceso (4).

La transesterificación catalizada enzimáticamente es una alternativa promisoriosa para la producción de biodiesel, ya que en contraste con los procedimientos de catálisis química, facilita la recuperación del glicerol, los ácidos grasos libres son completamente convertidos en alquil-ésteres y por ende, no se requiere del tratamiento de las aguas de proceso. La transesterificación enzimática utiliza lipasas microbianas como biocatalizadores. Las enzimas lipolíticas procedentes de diversas fuentes han resultado exitosas en la elaboración de biodiesel; la lipasa de *C. antarctica* (Novozime 435) es la utilizada con mayor frecuencia para este propósito. Los principales factores que influyen en la efectividad de la enzima durante la producción del biocombustible son: el tipo de lipasa, el contenido de agua, la temperatura, el tipo de alcohol, la relación molar alcohol:triacilglicerol y el número de ciclos (lipasas inmovilizadas). La transesterificación enzimática es una alternativa capaz de superar los inconvenientes relacionados con los procesos químicos, sin comprometer los beneficios que éstos ofrecen. El principal obstáculo para la explotación plena del proceso enzimático es el costo de las lipasas (4).

## **2.2. Propiedades del biodiesel como combustible.**

En 1893, el motor diseñado por Diesel fue operado por primera vez. Originalmente, los combustibles sugeridos para su funcionamiento fueron el aceite vegetal (aceite de cacahuate) y el carbón pulverizado, no obstante, ante el advenimiento del petróleo a bajo costo, éstos fueron desplazados por los combustibles fósiles (2; 16; 21). En la actualidad, los motores diesel emplean combustibles líquidos de baja volatilidad, los cuales varían desde el combustóleo y destilados, hasta el petróleo crudo (22). El desempeño adecuado de los motores EC es garantizado por el uso de combustibles diesel que satisfagan las especificaciones de la norma ASTM D975 (ASTM: American Society for Testing and Materials) en EUA y la norma EN 590 en Europa (21; 22).

La introducción exitosa y comercialización del biodiesel en varios países alrededor del mundo, también ha dado lugar al establecimiento de normas que regulen las propiedades y aseguren la calidad del biocombustible (17; 21; 23). Los estándares para el

biodiesel usualmente utilizados como referencia para la concepción y análisis de otras especificaciones son la norma ASTM D6751 en EUA (**Tabla 1**) y la norma europea EN 14214 (biodiesel para uso vehicular) (**Tabla 2**) (17; 23; 24). El biodiesel también es utilizado como combustible para calefacción, por consiguiente, éste es regularizado en Europa a través de la norma EN 14213 (**Tabla 2**), cuyas especificaciones en relación a la norma EN 14214, son similares pero menos severas (17; 24). Actualmente, no está claro si los motores diesel son totalmente compatibles con el biodiesel 100% (B100), por lo que resulta más común el uso del biocombustible como una mezcla con diesel fósil a niveles que van desde el 2 (B2) al 20 (B20) por ciento por volumen (25). Asociaciones tales como EMA (Engine Manufacturers Association) han desarrollado especificaciones para mezclas biodiesel-diesel (**Tabla 1**) para el uso de un combustible con propiedades consistentes, por parte de sus miembros y consumidores (26).

El biodiesel es una mezcla de ésteres de ácidos grasos en la cual la naturaleza de cada uno de ellos influye en las propiedades del biocombustible. Asimismo, las características de los componentes del biodiesel están determinadas por la estructura, tanto de la fracción lipídica, como de la alcohólica, de cada una de las moléculas esterificadas. Los parámetros estructurales que influyen en las propiedades del biodiesel son la longitud de la cadena, el nivel de insaturación y el grado de ramificación. Las características del biocombustible afectadas por los parámetros citados son el número de cetano, la emisión de gases, el calor de combustión, las propiedades de flujo, la estabilidad oxidativa, la viscosidad y la lubricidad. Estas propiedades que son esenciales para el funcionamiento adecuado del combustible (23).

El número de cetano (CN, Cetane Number), es un indicador de la calidad de encendido y por ende, de las características de combustión del combustible (22; 23). Esta propiedad está relacionada con el retraso en el encendido, ya que al ser éste menor, el CN es mayor y viceversa; cabe destacar que la relación entre estos parámetros no es lineal (23). El CN se determina a partir de dos estándares de referencia, el hexadecano o cetano ( $C_{16}H_{34}$ ), que es el patrón de alta calidad de encendido con un valor de CN = 100 y el 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano (HMN,  $C_{16}H_{34}$ ), que es el patrón de baja calidad con un valor de CN = 15 (22; 23). Los lípidos poseen elevados valores de CN que, en ocasiones, exceden la escala de cetanos (23).

---

**Tabla 1. Norma ASTM D 6751 para el biodiesel en EUA y especificaciones EMA para mezclas diesel-biodiesel (24; 25; 26).**

Propiedad	Límites			Métodos de prueba
	ASTM D 6751	EMA MEZCLAS D1 <sup>I</sup>	EMA MEZCLAS D2 <sup>I</sup>	
Punto de inflamación (°C)	130.0 <sub>mín</sub>	38.0 <sub>mín</sub>	52.0 <sub>mín</sub>	D 93
Agua y sedimento (% volumen)	0.050 <sub>máx</sub>	0.050 <sub>máx</sub>	0.050 <sub>máx</sub>	D 2709
Viscosidad cinemática, 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	1.9 – 6.0	1.3 – 4.1	1.9 – 4.1	D 445
Ceniza (% peso)	0.020 <sub>máx</sub> <sup>a</sup>	0.010 <sub>máx</sub> <sup>b</sup>	0.010 <sub>máx</sub> <sup>b</sup>	D 874 <sup>a</sup> , D 482 <sup>b</sup>
Azufre (ppm)	0.0015 <sub>máx</sub> (S15) 0.05 <sub>máx</sub> (S500)	ND	ND	D 5453
Corrosión lámina de cobre	No. 3 <sub>máx</sub>	No. 3 <sub>máx</sub>	No. 3 <sub>máx</sub>	D 130
Número de cetano	47 <sub>mín</sub>	43 <sub>mín</sub>	43 <sub>mín</sub>	D 613
Punto de niebla (°C)	II	III	III	D 2500
Residuo de carbono (% peso)	0.050 <sub>máx</sub> <sup>c</sup>	0.150 <sub>máx</sub> <sup>d</sup>	0.350 <sub>máx</sub> <sup>d</sup>	D 4530 <sup>c</sup> , D 524 <sup>d</sup>
Número ácido (mg KOH / g)	0.50 <sub>máx</sub>	0.30 <sub>máx</sub>	0.30 <sub>máx</sub>	D 664
Glicerina libre (% peso)	0.020 <sub>máx</sub>	ND	ND	D 6584
Glicerina total (% peso)	0.240	ND	ND	D 6584
Contenido de fósforo (% peso)	0.001 <sub>máx</sub>	0.001 <sub>máx</sub>	0.001 <sub>máx</sub>	D 4951
Sodio/Potasio (ppm)	5 <sub>máx</sub> , combinado	ND	ND	EN 14538
Calcio/Magnesio (ppm)	5 <sub>máx</sub> , combinado	ND	ND	EN 14538
Temperatura de destilación <sup>IV</sup> , 90% evaporado (°C)	360 <sub>máx</sub>	ND	ND	D 1160

**ND:** No Determinado. **I.** Especificaciones fijadas por EMA para mezclas de diesel fósil (D1 o D2) - biodiesel con un contenido de biocombustible menor al 20% en volumen (B20) (26). **II.** No hay un límite determinado debido a la variación de las condiciones climáticas en EUA; en relación a éstas se define el punto de niebla para el biocombustible (24). **III.** El punto máximo de niebla debe ser menor o igual al décimo percentil de la temperatura mínima ambiente de un área geográfica o un periodo estacional determinado (26). **IV.** Equivalente a la temperatura atmosférica (24). **d.** Residuo de carbono en el 10% del residuo de la destilación (26).

**Tabla 2. Estándares europeos para biodiesel: EN 14214 (uso vehicular) y EN12413 (combustible para calefacción) (24).**

Propiedad	Límites		Métodos de prueba
	EN 14214	EN 14213	
Contenido de ésteres (% mol/mol)	96.5 <sub>mín</sub>	96.5 <sub>mín</sub>	EN 14103
Densidad, 15°C (kg/m <sup>3</sup> )	860-900	860-900	EN ISO 3675, EN ISO 12185
Viscosidad, 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	3.5 – 5.0	3.5 – 5.0	EN ISO 3104, EN ISO 3105
Punto de inflamación (°C)	120 <sub>min</sub>	120 <sub>min</sub>	EN ISO 3679
Azufre (mg/kg)	10.0 <sub>máx</sub>	10.0 <sub>máx</sub>	EN ISO 20846, EN ISO 20884
Residuo de carbono, 10% restante de la destilación (% mol/mol)	0.30 <sub>máx</sub>	0.30 <sub>máx</sub>	EN ISO 10370
Número de cetano	51 <sub>mín</sub>	---	EN ISO 5165
Ceniza sulfatada (% mol/mol)	0.02 <sub>máx</sub>	0.02 <sub>máx</sub>	ISO 3987
Contenido de agua (mg/kg)	500 <sub>máx</sub>	500 <sub>máx</sub>	EN ISO 12937
Contaminantes totales (mg/kg)	24 <sub>máx</sub>	24 <sub>máx</sub>	EN 12662
Corrosión lámina de cobre, 3h, 50°C (grado de corrosión)	1	---	EN ISO 2160
Estabilidad oxidativa, 110°C (h)	6.0 <sub>min</sub>	4.0	EN 14112
Número ácido (mg KOH / g)	0.50 <sub>máx</sub>	0.50 <sub>máx</sub>	EN 14104
Índice de yodo (g I <sub>2</sub> / 100 g)	120 <sub>máx</sub>	130 <sub>máx</sub>	EN 14111
Contenido de ácido linolénico (% mol/mol)	12.0 <sub>máx</sub>	---	EN 14103
Contenido de FAME con 4 o más instauraciones (% mol/mol)	1 <sub>máx</sub>	1 <sub>máx</sub>	
Contenido de metanol (% mol/mol)	0.20 <sub>máx</sub>	---	EN 14110
Contenido de MAG (% mol/mol)	0.80 <sub>máx</sub>	0.80 <sub>máx</sub>	EN 14105
Contenido de DAG (% mol/mol)	0.20 <sub>máx</sub>	0.20 <sub>máx</sub>	EN 14105
Contenido de TAG (% mol/mol)	0.20 <sub>máx</sub>	0.20 <sub>máx</sub>	EN 14105
Glicerina libre (% mol/mol)	0.020 <sub>máx</sub>	0.020 <sub>máx</sub>	EN 14105, EN 14106
Glicerina total (% mol/mol)	0.25 <sub>máx</sub>	---	EN 14105
Metales del Grupo I, Na + K (mg/kg)	5.0 <sub>máx</sub>	---	EN 14108, EN 14109
Metales del Grupo II, Ca + Mg (mg/kg)	5.0 <sub>máx</sub>	---	prEN 14538
Contenido de fósforo (mg/kg)	10.0 <sub>máx</sub>	---	EN 14107
Punto de obstrucción del filtro a baja temperatura <sup>1</sup> (°C)	---		EN 116
Punto de vertido (°C)	---	0 <sub>máx</sub>	ISO 3016
Poder calorífico (MJ/kg)	---	35 <sub>min</sub>	DIN 51900-2

I. También denominado CFPF por sus siglas en inglés Cold Filter Plugging Point.

La fracción lipídica de las moléculas esterificadas influye notablemente en el CN del combustible. La mayor longitud de la cadena, el menor nivel de insaturación y el menor grado de ramificación, favorecen la calidad de encendido. Asimismo, la ramificación de la fracción alcohólica no afecta negativamente el CN impartido por el ácido graso. De este modo, el CN del biodiesel depende del perfil de ácidos grasos de la materia prima (23).

Las emisiones de los motores diesel comprenden gases contaminantes tales como CO, hidrocarburos, óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y partículas (1; 22). En relación a las emisiones de NO<sub>x</sub>, su reducción en el diesel fósil ha sido correlacionada con el incremento del CN, razón por la cual, se ha impulsado en estos combustibles la mejora del CN mediante la adición de mejoradores de cetano. No obstante, el elevado CN característico de los ácidos grasos del biodiesel, su uso en los motores EC resulta en un incremento de las emisiones de NO<sub>x</sub>. Estudios recientes indican que una menor longitud de la cadena hidrocarbonada y un mayor grado de insaturación de los alquil-ésteres que conforman el biodiesel, favorecen el aumento de las emisiones de NO<sub>x</sub> e influyen considerablemente en la formación de partículas. La relación entre el CN y las emisiones de NO<sub>x</sub> es compleja, ya que la sensibilidad de las emisiones al CN del combustible decrece conforme el avance tecnológico de los motores diesel es mayor (23).

El poder calorífico de un combustible (PC), es la cantidad de energía liberada durante un proceso de combustión de flujo estable, cuando el combustible es quemado por completo a una presión y temperatura específicos; su valor es igual al valor absoluto de la entalpía de combustión de la sustancia (27). En relación al biodiesel, esta propiedad indica la compatibilidad de los compuestos derivados de ácidos grasos como combustibles tipo diesel (23). Aunque el diesel fósil es una mezcla de hidrocarburos diferentes, por conveniencia es considerado como un solo hidrocarburo, el dodecano (C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>), de manera tal que el PC del combustible es de 7.514 MJ/mol (27; 28). En contraste, los ésteres de ácidos grasos y los triacilgliceroles con ácidos grasos de C8 a C22, presentan valores de PC que oscilan entre los 5.443 – 14.654 MJ/mol, donde los valores de PC incrementan con la longitud de la cadena hidrocarbonada (23). En el biodiesel, son deseables valores de PC similares a los del diesel fósil, de tal modo que la misma cantidad de energía sea producida al inyectar proporciones iguales de combustible en el motor (21).

Las características de flujo a bajas temperaturas definen la operabilidad del combustible en climas fríos y son determinadas por dos propiedades, el punto de niebla

---

(CP, Cloud Point) y el punto de vertido (PP, Pour Point) (23; 26). El punto de niebla es la temperatura a la que un material lipídico líquido se torna turbio debido a la formación de cristales y a la solidificación de compuestos saturados. El punto de vertido es la temperatura mínima a la cual el material lipídico fluye; su valor suele ser menor al punto de niebla. El biodiesel conformado por proporciones considerables de lípidos saturados, en contraste con el constituido por fracciones considerables de lípidos insaturados, presenta elevados valores de CP y PP debido a las mayores temperaturas de fusión y cristalización de esta clase de lípidos. Uno de los mayores problemas asociados con el uso del biodiesel, está relacionado con los altos valores de CP y PP que presenta. Por tanto, se han propuesto alternativas para tratar este inconveniente, tales como mezclas con diesel fósil, la winterización o hibernación del combustible y el uso de aditivos y ésteres ramificado. La winterización remueve compuestos saturados y por ende, reduce el CP y PP, sin embargo, también disminuye el CN del biocombustible. Una propuesta prometedora es el empleo de ésteres de ácidos grasos con alcoholes ramificados (*iso*-propanol, *iso*-butanol y 2-butanol) (23).

La estabilidad oxidativa del biodiesel, es una propiedad que está relacionada con algunas dificultades que presenta el biocombustible desde el momento de su producción, principalmente durante su almacenamiento (23; 26). El proceso de oxidación es una reacción en cadena mediada por radicales libres que al inicio genera peróxidos y en etapas posteriores origina ácidos, gomas, polímeros y otros compuestos insolubles (26). Factores tales como la presencia de aire, calor, luz, trazas de metales, antioxidantes, peróxidos y la naturaleza del contenedor, influyen en la estabilidad del biocombustible. La existencia de dobles enlaces en las cadenas lipídicas, es el principal agente que afecta la perdurabilidad del biodiesel. Un mayor número de insaturaciones y las posiciones tanto alílicas como *bis*-alílicas de éstas, favorecen la autooxidación. De acuerdo a su grado de insaturación, los ésteres de ácidos grasos han sido calificados con distintos valores de velocidades de oxidación: 1 para el oleato, 41 para el linoleato y 98 para el linolenato. Cantidades mínimas de moléculas con un mayor número de insaturaciones, perjudican desproporcionadamente la estabilidad del biocombustible (23).

La viscosidad, es una propiedad que influye en la atomización del combustible durante su inyección y por ende, en la formación de residuos en el motor; este problema es acentuado por altos valores de viscosidad. La elevada viscosidad de los aceites vegetales es

---

el motivo por el cual se ha descartado su uso directo como combustible. Una alternativa ha sido el empleo de aceites transesterificados, cuya viscosidad es reducida en un orden de magnitud. Una mayor longitud de la cadena hidrocarbonada, tanto de la fracción lipídica, como alcohólica, de las moléculas de biodiesel, favorece el incremento de su viscosidad. La ramificación de la porción alcohólica no influye en el valor de esta propiedad. Por su parte, un mayor grado de insaturación disminuye la viscosidad del biocombustible, descenso que es favorecido por la configuración *cis* de los dobles enlaces, en contraste con la configuración *trans* (23).

La lubricidad es la habilidad del combustible de proporcionar una lubricación adecuada a los componentes del motor incluyendo las bombas y los inyectores (26). Esta propiedad es fundamental para la operación satisfactoria de la máquina, ya que evita el desgaste excesivo, la acumulación de depósitos y elimina el calor de las zonas del motor en las que la temperatura es relativamente alta (22). En relación al diesel fósil, el biodiesel ofrece la ventaja de poseer una mayor lubricidad, ya que diversos estudios han mostrado que la adición de pequeñas proporciones de biodiesel (1-2%) permite restaurar la lubricidad del diesel de petróleo desulfurado (21; 23). Los ácidos grasos presentan excelentes propiedades lubricantes, las cuales son favorecidas por la presencia de dobles enlaces. Cabe mencionar que la lubricidad de los ésteres de etilo es mayor a la de los de metilo (23).

Por las razones anteriores, la producción de biodiesel precisa de un perfil lipídico enriquecido ya sea en uno o varios ácidos grasos que mejoren las propiedades del biocombustible. Para ello, preferentemente se requieren ácidos grasos de cadena larga con un alto grado de saturación, que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar propiedades tales como el número de cetanos, el poder calorífico y la estabilidad oxidativa, sin comprometer las características de flujo a bajas temperaturas, la viscosidad y la lubricidad del combustible. El enriquecimiento con ácido oleico ha sido propuesto para este propósito (23).

### **2.3. Aspectos que favorecen la utilización de microalgas para la obtención de lípidos en comparación con plantas oleaginosas.**

Actualmente, la producción de biodiesel a gran escala es a partir de los aceites procedentes de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles). Sin embargo, esta

tecnología es incapaz de desplazar en una porción considerable al diesel de petróleo, ya que en contraste con la demanda de diesel fósil, la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales ( $136 \times 10^9$  L/año, durante el 2007) ha sido menor. Se estima que para el año 2020, la demanda de petrodiesel será de  $1,765 \times 10^9$  L (3; 8).

El uso de aceites vegetales como materia prima para la elaboración de biodiesel está limitado por varios inconvenientes. Uno de ellos, es la tecnología agrícola en la que se basa, debido a los largos periodos de tiempo que implica (meses o años) (9). Asimismo, el rendimiento lipídico está restringido por el contenido oleaginoso de las plantas, el cual es menor al 20% en semillas y frutos; este factor a su vez depende de las condiciones climáticas, la ubicación geográfica del cultivo, la fertilidad de los suelos y la variedad cultivada (1; 3; 9). El principal inconveniente consiste en la extensa superficie de cultivo que se requiere para satisfacer la demanda de diesel de petróleo a partir de biodiesel de aceites vegetales (1; 8).

En la actualidad se ha planteado la producción de biodiesel a partir de lípidos microalgales. Esta alternativa ha sido comparada con el uso de aceites vegetales en varios aspectos, tales como periodos de producción, rendimiento lipídico y superficie requerida, de tal manera que en todos ellos, las microalgas resultan una mejor opción (9; 17). Lo anterior, se ejemplifica al comparar las productividades de biodiesel a partir de distintas fuentes utilizadas para la elaboración del biocombustible (**Tabla 3**).

En la **Tabla 3**, al considerar una de las estimaciones más conservadoras para las productividades de biodiesel a partir de microalgas, se observa que ésta supera, por lo menos en un orden de magnitud, a las productividades del biocombustible a partir de las plantas oleaginosas más productivas, tales como la palma y jatropha (29). En el 2008, la demanda de petrodiesel en México fue de 23,630 ML (30). Al determinar la superficie requerida para reemplazar el 100% de esta demanda con biodiesel, las limitaciones del uso de aceites derivados de plantas superiores, resultan evidentes, ya que se requeriría de enormes extensiones de terreno fértil. *Jatropha curcas* es una planta considerada como no comestible, capaz de crecer en tierras de labranza erosionadas y en suelos no cultivables, por lo que no precisa de suelos fértiles y no compite con el cultivo de alimentos (31), sin embargo, su uso para la producción de biodiesel a gran escala requiere de extensiones de tierra superiores a las requeridas por los cultivos de microalgas. De este modo, la tecnología de microalgas es una alternativa prometedora, ya que para satisfacer el 100% de la

---

demanda actual de diesel de petróleo en México, sería necesario emplear sólo 1% de la extensión total del país, habiendo considerado tanto el rendimiento lipídico como la independencia a la calidad de los suelos por parte de los cultivos de microalgas (32; 33; 30).

**Tabla 3. Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México (32; 33; 30).** *Se indican las proporciones de suelo fértil y de superficie total del país necesarias para reemplazar con biodiesel el 100% de la demanda de petrodiesel en México. Las fracciones de superficie total, sólo se señalan para materias primas que no precisan de suelos fértiles.*

<b>Materia prima</b>	<b>Productividad de Biodiesel</b> (L/ha/año)	<b>Superficie equivalente requerida</b> (ha x 10 <sup>6</sup> )	<b>% equivalente de la superficie fértil requerida</b>	<b>% equivalente de la superficie total requerida<sup>a</sup></b>
Palma	5,950	3.972	16.14	--
Jatropha	1,892	12.490	50.75	6.43
Colza	1,190	19.859	80.69	--
Girasol	952	24.823	100.9	--
Soya	446	52.986	215.3	--
Microalgas <sup>b</sup>	12,000	1.969	8.00	1.01

<sup>a</sup> Superficie no necesariamente fértil; <sup>b</sup> Rendimiento conservador de productividad de biodiesel microalgal.

La producción de biodiesel a partir de microalgas, presenta ventajas adicionales a su potencial para satisfacer o reemplazar significativamente la demanda global de diesel fósil (17). En contraste con las plantas, las microalgas presentan una mayor eficiencia fotosintética y, por su crecimiento en medio acuoso, son más eficaces en la asimilación de CO<sub>2</sub> y otros nutrientes (11; 32). Igualmente, los cultivos de microalgas presentan la ventaja de que su contenido oleaginoso y su perfil de composición lipídica puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (12; 15; 32). La tecnología de microalgas, posee el beneficio adicional de que puede ser acoplada al reciclaje del CO<sub>2</sub> liberado a causa de la combustión de combustibles fósiles por las industrias, especialmente por las plantas de producción de energía (11). Asimismo, la producción de biodiesel microalgal no requiere de regiones fértiles, lo que favorece el uso de suelos no productivos como las zonas áridas y las semiáridas. En lo referente a los requerimientos de agua, los cultivos microalgales necesitan de cantidades menores respecto

los cultivos tradicionales, además de que las microalgas son flexibles ante el tipo y la calidad del agua (10; 32; 29). Se ha estimado que la producción de 1 L de biodiesel a partir de plantas oleaginosas tales como soya, colza y *Jatropha*, requiere de 13,676, 14,201 y 19,924 L de agua, respectivamente (34). Actualmente, no existen datos referentes al volumen de agua necesario para la producción del biocombustible a partir de microalgas. Sin embargo, al considerar que se requieren 570 L de agua para la obtención de 1 kg de biomasa seca microalgal (35), que se necesitan 2.7 kg de biomasa seca para la producción de 1 kg de biodiesel de microalgas (36) y que la densidad de éste es de 0.864 kg/L (20), se estima que la producción de 1 L del biocombustible microalgal demanda de 1,330 L de agua, requerimiento que es un orden de magnitud menor al de las plantas oleaginosas.

#### **2.4. Sistemas de cultivo de microalgas.**

Actualmente existen diversos sistemas para la producción de biomasa microalgal, los cuales pueden ser de tipo abierto o cerrado. Los sistemas empleados con mayor frecuencia son los de tipo abierto, que a pesar de sus formas y tamaños diversos, destacan por asemejar el entorno natural de las microalgas. Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito ('raceway ponds'), donde estos últimos son los de uso más extendido. Los estanques tipo 'raceway' consisten en circuitos de 15 a 30 cm de profundidad, en los cuales una rueda de paletas mantiene un flujo constante del cultivo. Las producciones y productividades biomásicas factibles en estos sistemas son próximas a 1 g/L y de 10 a 30 g/m<sup>2</sup>/d, respectivamente. Las ventajas inherentes a los cultivos abiertos radican en su sencillez y su bajo costo de inversión y operación, aunado a su facilidad de escalamiento. El factor determinante del costo de producción de biomasa de microalgas en estos sistemas es la cosecha de la biomasa, debido a la baja concentración que ésta alcanza. Los principales inconvenientes de los sistemas abiertos son las pérdidas de agua por evaporación, la transferencia limitada de CO<sub>2</sub> al cultivo, el control ineficiente de las condiciones de cultivo, la alta susceptibilidad de contaminación (excepto en cultivos de especies extremófilas), las producciones reducidas de biomasa y el aprovechamiento limitado de la luz (5; 17; 32; 36; 37; 38; 39; 40; 41).

Por su parte, los sistemas cerrados, con el propósito de coleccionar la mayor cuantía posible de energía solar por unidad de superficie, presentan configuraciones diversas, tubulares (vertical, horizontal, helicoidal, conformación  $\alpha$ ), paneles planos, columnas de burbujeo y bioreactores tipo 'airlift', principalmente. Los reactores tubulares y de panel plano son los de uso más frecuente para el cultivo de microalgas a gran escala, mientras que las columnas de burbujeo son ampliamente utilizadas en la acuicultura. La consideración de factores tales como la luz, la razón  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , el mezclado, la relación superficie/volumen, la temperatura, los nutrientes, la salinidad, el pH, entre otros, resulta trascendental para el diseño de sistemas cerrados. En contraste con los sistemas abiertos, los de tipo cerrado ofrecen numerosas ventajas tales como menores pérdidas de  $\text{CO}_2$ , riesgo reducido de contaminación, mayor eficiencia en el control de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes y menores requerimientos de superficie. Asimismo, los fotobioreactores cerrados posibilitan concentraciones de biomasa (g/L) superiores a las de los sistemas abiertos, aunque las productividades por unidad de área ( $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ) no son necesariamente mayores. Incluso, aunque las productividades por unidad de área y volumétricas sean superiores a las de los sistemas abiertos, éstas han sido considerablemente menores a las magnitudes correspondientes al máximo teórico o a las alcanzadas a nivel laboratorio. En la actualidad, las principales limitaciones de los sistemas cerrados son sus elevados costos de inversión y de operación, además de su complejo diseño que dificulta su escalamiento (17; 32; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44).

La comparación de los distintos sistemas de cultivo de microalgas es compleja como consecuencia de la heterogeneidad en el diseño y en la aplicación de los mismos. La productividad por unidad de área ( $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ) es un parámetro que permite equipararlos, particularmente cuando se utilizan a gran escala, al ser un criterio del desempeño de los sistemas de cultivo en términos de la eficiencia de conversión en energía química, de la energía luminosa incidente en un área determinada (45).

Actualmente, no existe el sistema ideal para la producción de biomasa de microalgas en el cual, independientemente de la especie cultivada, sea posible alcanzar productividades máximas con mínimos costos de operación. La implementación de un sistema de cultivo determinado depende de diversos factores tales como la especie de microalga a cultivar, la geometría del diseño, los costos de inversión y de operación del proceso, las condiciones ambientales de la región donde se instalará la planta de

producción, la calidad del agua a utilizar, además de la naturaleza y el mercado del producto (43; 45). Los sistemas cerrados, caracterizados por sus elevados costos de inversión y operación, no son recomendados para la producción de biodiesel a partir de microalgas debido al bajo costo de este producto. Por tanto, el uso de sistemas abiertos ha sido sugerido para este propósito. Sin embargo, el desarrollo de sistemas cerrados ha progresado recientemente y existe la posibilidad de contar con sistemas de menor costo y mejor desempeño (41; 45).

La determinación de la factibilidad de la producción de biodiesel a partir de microalgas, requiere del conocimiento de las condiciones que favorecen los mejores parámetros de producción y productividad de lípidos en la especie de microalga a utilizar, además de su efecto en la composición de la fracción lipídica. Actualmente, la disponibilidad de información de esta índole está restringida a un número limitado de microalgas, por lo que el empleo de otras especies para la obtención de biodiesel, requiere del estudio detallado en escala de laboratorio del efecto de distintas condiciones de cultivo en la producción de lípidos de la microalga a utilizar. Habitualmente, esta clase de estudios se realiza con cultivos axénicos de la microalga en sistemas cerrados, bajo condiciones de cultivo controladas e iluminación artificial continua. Una vez que se ha evaluado el potencial de la microalga para la producción de biodiesel, se procede al escalamiento del cultivo bajo condiciones de iluminación natural, donde el mantenimiento de las productividades alcanzadas en el laboratorio depende de factores específicos tales como el sistema de cultivo seleccionado (cerrado, abierto o híbrido) y de las condiciones ambientales de la región donde el proceso será implementado (intensidad luminosa, periodos luz:oscuridad, intervalos de temperatura, calidad del agua, etc.) (41; 46).

Acorde con lo anterior, en el presente trabajo se decidió utilizar como modelo experimental un sistema foto-biológico cerrado, el cual debido a las ventajas que ofrece (control de los parámetros de cultivo y mantenimiento de la microalga bajo condiciones axénicas), posibilitará la evaluación del efecto de distintas condiciones de cultivo en la composición bioquímica, producción y productividad lipídica de la microalga de interés. Cabe mencionar, que un sistema cerrado difiere sustancialmente de las condiciones de campo bajo las cuales los cultivos de microalgas son implementados. Sin embargo, los resultados derivados de los sistemas foto-biológicos cerrados resultan de gran utilidad, ya que proporcionan información relativa a la fisiología de la microalga bajo distintas

condiciones de cultivo, cuyo conocimiento y aplicación permitirá mejorar los parámetros lipídicos de los cultivos microalgales para su uso en la producción de biodiesel.

### **2.5. Microalgas oleaginosas.**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas (10). Los cultivos de microalgas han sido ampliamente utilizados en la obtención de alimento y sustancias químicas, recientemente se les ha considerado como un recurso viable en la producción de bioenergía, ya sea mediante la obtención de metano, hidrógeno, etanol o biodiesel (10; 11; 16). La producción de biodiesel a partir de microalgas ha sido sugerida como una opción atractiva debido a las ventajas que éstas ofrecen en relación a las plantas terrestres, aunado a la contribución fundamental de estos microorganismos fotosintéticos en la formación geológica de los hidrocarburos, que actualmente son la fuente de combustibles fósiles (15; 20).

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la producción de biodiesel. La productividad lipídica depende de la cantidad de lípidos comprendidos en la biomasa y de la velocidad de crecimiento del alga (17). En la **Tabla 4**, se presentan varias especies de microalgas que han sido caracterizadas por presentar un elevado contenido lipídico.

El contenido oleaginoso de las especies de microalgas indicadas en la **Tabla 4**, por lo general comprende del 20% al 50% de su peso seco, no obstante, se han reportado valores mayores al 80%. Cabe destacar que los porcentajes de contenido lipídico se indican a manera de intervalos, ya que la síntesis de lípidos varía según las condiciones a las que el cultivo es sometido. Las microalgas que producen más de un 30% de materias grasas con base en su peso seco, se denominan “oleaginosas” (10).

Químicamente, los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. Estas biomoléculas comprenden varias clases de compuestos tales como esteroides, terpenos, lípidos pirrólicos, carotenoides, ceras, hidrocarburos, además de ácidos grasos libres y esterificados con glicerol, azúcares o bases, entre otros (18; 47; 48). En las microalgas, los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, fosfolípidos, glicolípidos y pigmentos

(carotenoides, clorofila, ficobilinas) (10; 48). Por ende, no todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiesel (17). Sin embargo, los lípidos apropiados para el biocombustible (ácidos grasos libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados), son producidos comúnmente por las microalgas y constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, generalmente del 20% al 40% (17; 48).

**Tabla 4. Contenido lipídico de algunas especies de microalgas en condiciones autotróficas.**

Especie	%Contenido lipídico ( $\frac{\text{gLípidos}}{\text{gPeso-seco}} \times 100$ )	Especie	%Contenido lipídico ( $\frac{\text{gLípidos}}{\text{gPeso-seco}} \times 100$ )
<i>Ankistrodesmus</i> sp. (10; 11; 49)	24.5 – 40.3	<i>Hormotilopsis gelatinosa</i> (10)	49.1
<i>Botryococcus braunii</i> var. A (10; 47)	43.0 – 63.0	<i>Isochrysis</i> sp. (49; 48)	7.1 – 47.0
<i>Botryococcus braunii</i> var. B (10; 47)	53.0 – 86.0	<i>Monallantus salina</i> (10; 17)	20.0 – 72.2
<i>Botryococcus sudeticus</i> (50)	9.39 – 23.09	<i>Monodus subterraneus</i> (5; 10)	39.3 - 40.0
<i>Chaetoceros gracilis</i> (10)	46.0	<i>Nannochloris</i> sp. (17; 48)	20.0 – 47.8
<i>Characium polymorphum</i> (10)	42.0	<i>Nannochloropsis salina</i> (48)	40.8 – 72.2
<i>Chlamydomonas applanata</i> (10)	32.8	<i>Nannochloropsis</i> sp. (17; 51)	28.7 – 68.0
<i>Chlorella emersonii</i> (5; 51)	63.0	<i>Naviculla pelliculosa</i> (10; 48)	22.0 – 44.8
<i>Chlorella minutissima</i> (5; 51)	57.0	<i>Neochloris oleoabundans</i> (10; 52)	18.9 – 88.8
<i>Chlorella protothecoides</i> (5)	23.0	<i>Nitzschia laevis</i> (5)	69.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (10; 48)	14.4 – 35.8	<i>Nitzschia pelea</i> Kutz (10; 48)	27.2 – 39.5
<i>Chlorella sorokiana</i> (5; 51)	22.0	<i>Nitzschia</i> sp. (17; 49)	22.1 – 47.0
<i>Chlorella</i> sp. (17)	28.0 – 32.0	<i>Ochromonas dánica</i> (10; 48)	39.0 – 71.0
<i>Chlorella vulgaris</i> (51)	5.1 - 56.0	<i>Oocystis polymorpha</i> (10)	34.7
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> (10)	44.3	<i>Parietochloris incisa</i> (5)	62.0
<i>Chlorosarcinopsis nagevensis</i> (10)	32.2	<i>Ourococcus</i> sp. (10; 48)	27.0 – 49.5
<i>Chroomonas salina</i> (48)	44.0	<i>Peridinium cinetum</i> fa. Westi (10)	36.0
<i>Chrysochromulina kappa</i> (10; 48)	32.6	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (10)	31.0
<i>Chrysochromulina polylepsis</i> (10; 48)	47.6	<i>Protosiphon botryoides</i> (10; 48)	37.0
<i>Cosmarium laeve</i> (10; 48)	15.0 - 33.0	<i>Prymnesium parvm</i> (10; 48)	22.0 - 38.2
<i>Cryptocodinium cohnii</i> (17)	20.0	<i>Radiosphaera nagevensis</i> (10; 48)	43.0
<i>Cyclotella cryptica</i> (10)	36.8	<i>Scenedesmus dimorphus</i> (10; 48; 51)	6.0 – 40.0
<i>Cyclotella</i> sp. (10)	54.0	<i>Scenedesmus obliquus</i> (51)	11.0 - 55.0
<i>Cylindrotheca</i> sp. (17)	16.0 – 37.0	<i>Scotiella</i> sp. (10; 48)	34.5 – 48.0
<i>Dunaliella primolecta</i> (10; 17; 48)	23.0 – 53.8	<i>Schizochytrium</i> sp. (17)	50.0 - 77.0
<i>Dunaliella salina</i> (10; 49; 48)	9.2 – 47.2	<i>Skeletonema costatum</i> (10)	30.3
<i>Euglena gracilis</i> (10)	55.0	<i>Stichococcus bacillaris</i> (10)	38.9
<i>Hantzchia</i> sp. (10)	61.0	<i>Tetraselmis sueica</i> (17)	15.0 – 23.0

### **2.5.1. Factores que influyen en la biosíntesis y producción de lípidos.**

La producción de lípidos, al igual que la composición de esta fracción celular, dependen de la especie de microalga y de parámetros ambientales tales como la presencia, la intensidad y el tipo de luz, la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH, la fase de crecimiento y la asociación con otros microorganismos (10; 12; 32; 49; 52). Es posible que los efectos relacionados con ciertas condiciones de cultivo, sean opuestos entre diferentes especies de microalgas (53).

Los efectos en los cultivos microalgales dependientes de la luz son de gran relevancia, ya que están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis. Se ha reportado que la presencia de luz puede estimular la producción de lípidos totales, sin embargo, este comportamiento no ha podido ser generalizado. Por otro lado, en casi todas las especies de microalgas, existe una relación inversa entre la intensidad luminosa y la cantidad de lípidos totales, donde la fracción de lípidos cloroplásticos habitualmente es la que resulta más afectada. No obstante, existen casos opuestos tales como los de *Nitzschia closterium* y *Botryococcus braunii*, en los cuales mayores intensidades luminosas favorecen proporciones lipídicas superiores, principalmente las correspondientes a los lípidos neutros. La intensidad luminosa también modifica el perfil lipídico, ya que se han citado casos en los cuales una mayor intensidad luminosa aumenta el nivel de insaturación de los ácidos grasos, principalmente en los lípidos cloroplásticos. Por su parte, el espectro de emisión es otro aspecto de la fuente luminosa que afecta la síntesis y acumulación de lípidos microalgales. Los cambios en la calidad espectral de la luz incidente son trascendentes para diversos procesos metabólicos en las algas, ya que influyen en el punto de salida del carbono fijado en el ciclo de Calvin. De este modo, la biosíntesis de proteínas es estimulada por la luz azul, mientras que la de carbohidratos es impulsada por la luz roja. En lo referente a la producción de lípidos, no es posible generalizar los efectos debidos al espectro de emisión luminosa, sólo existen casos aislados como el de *Botryococcus sudeticus*, en el cual se ha reportado que tanto la luz roja, como la azul, reducen el contenido de lípidos totales neutros, especialmente el de triglicéridos, desde una fracción del 80% de los lípidos neutros, en relación a los lípidos totales, en los cultivos con luz blanca, hasta un 50% en aquellos con luz roja o azul (10; 54).

La fotoinhibición es un fenómeno que debe ser considerado al estudiar los factores que influyen en la productividad de lípidos microalgales. La fotoinhibición consiste en la

---

reducción de la velocidad específica de crecimiento de un cultivo de microalgas en condiciones autotróficas, al ser sometido a intensidades luminosas superiores a la óptima. Esto se debe al daño generalmente reversible de la maquinaria fotosintética, especialmente de la enzima ribulosa bifosfato (RuBP) carboxilasa, a causa de su sensibilidad a la iluminación excesiva. La magnitud de este fenómeno depende de la radiación incidente, de la calidad espectral de la luz y del tiempo de exposición a una iluminación determinada. La velocidad de crecimiento de un cultivo de microalgas puede incrementar considerablemente al eliminar la fotoinhibición, o bien, al postergarla a valores de intensidad luminosa mayores (17; 54).

La temperatura es un factor ambiental al cual las microalgas reaccionan constantemente. Este factor influye en la velocidad de las reacciones del microorganismo, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. La constitución química del alga, en especial la fracción lipídica, es afectada significativamente por la temperatura. La síntesis y acumulación de lípidos, en algunas especies de microalgas, es estimulada por el incremento de la temperatura del cultivo. Por el contrario, se ha reportado que la disminución de esta condición mitiga la producción lipídica. La composición de la fracción lipídica también es modificada por este factor ambiental, ya que se ha señalado que el aumento de la temperatura disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos, principalmente de aquellos contenidos en los lípidos de membrana. Asimismo, se ha reportado la desaturación de los ácidos grasos ante la disminución de la temperatura (12; 17; 54).

El pH del medio de cultivo es otro factor ambiental que influye en varios procesos biológicos, es por ello que las algas dependen de él considerablemente. La respuesta ante las modificaciones de este parámetro varía en función de la especie. El pH del medio es definido en gran medida, por la distribución de las distintas formas de carbono en el mismo ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{=}$ ), lo cual a su vez, determina la disponibilidad de carbono inorgánico en el cultivo, ya que éste sólo puede ser asimilado por la gran mayoría de las microalgas como  $\text{CO}_2$  disuelto, aunque existen algunas especies que son capaces de metabolizarlo como  $\text{HCO}_3^-$ . Por tal razón, se considera que el pH gobierna el crecimiento y la predominancia de las diversas especies de microalgas. El crecimiento de las microalgas es comúnmente inhibido a valores de pH de 10 a 11, comportamiento que es provocado por la escasez de carbono inorgánico utilizable como  $\text{CO}_2$ . Cabe mencionar que las microalgas

capaces de desarrollarse en cultivos alcalinos son deseables, ya que pueden asimilar el carbono habitualmente no disponible y además, el riesgo de contaminación del medio es menor, lo que posibilita su aplicación biotecnológica. Finalmente, la relevancia del pH también se debe a su influencia en la disociación de complejos salinos, en la solubilidad de compuestos metálicos y por ende, en la disponibilidad de algunos elementos traza (53).

La fase de crecimiento es otro factor que contribuye a los cambios en la constitución bioquímica de las microalgas. Los efectos debidos a este parámetro son vinculados a la edad del cultivo y al agotamiento de nutrientes, particularmente en los cultivos tipo lote. Usualmente, los cultivos microalgales agotan sus nutrientes al iniciar la fase estacionaria de crecimiento, bajo esta condición, por lo general la fracción proteica disminuye y el contenido de lípidos y carbohidratos aumenta. Las variaciones en el perfil lipídico también son una función de la fase de crecimiento, ya que normalmente al avanzar el desarrollo del cultivo, las proporciones de fosfolípidos y glicolípidos decrecen e incrementan las de triglicéridos y ácidos grasos libres (12; 52).

La composición química del medio de cultivo, en particular la restricción de nutrientes, es sin duda alguna el parámetro que más afecta la producción de lípidos microalgales (10; 11; 12; 15). El más importante de los factores es la limitación de nitrógeno, cuyos efectos son similares a los citados para el agotamiento de nutrientes en los cultivos tipo lote, es decir, una notable reducción en el contenido celular de nitrógeno y la acumulación de compuestos tales como polisacáridos y/o lípidos como reserva de carbono, además de la disminución de la actividad fotosintética (10; 11; 12; 15; 32; 49; 53). Numerosos estudios reportan que las algas verdes aumentan su contenido lipídico de dos a tres veces durante los primeros 4 a 9 días de ausencia de nitrógeno en el medio (10; 12; 49). Por otro lado, dependiendo de la especie, las diatomeas expuestas a esta limitación pueden incrementar o disminuir la cantidad de lípidos, mientras que en el caso de las cianobacterias, esta deficiencia no cambia el contenido de lípidos pero sí modifica su composición. El perfil lipídico también es afectado por la falta de nitrógeno, ya que se han citado situaciones en las cuales esta insuficiencia incrementa la proporción de triglicéridos y reduce la de lípidos polares (10; 12). Asimismo, existen casos como el de *Chlorella* y *Euglena*, en los que esta condición ha dado lugar a ácidos grasos con un mayor grado de saturación (49). De igual modo, se ha reportado que la adición de nitrógeno en el medio, después de que ha sido limitado en este nutriente, acelera la velocidad de crecimiento y

afecta seriamente el contenido lipídico al inicio de las divisiones celulares (10). Estudios con diversas especies de microalgas han demostrado que, en general, la suficiencia de nitrógeno promueve altas velocidades de crecimiento y un contenido lipídico bajo, mientras que la deficiencia de nitrógeno reduce la velocidad de crecimiento y resulta en un contenido de lípidos elevado. Por lo tanto, se ha concluido que las productividades lipídicas elevadas y los altos contenidos oleaginosos son mutuamente excluyentes. No obstante, existen investigaciones que indican que es posible incrementar la productividad lipídica total mediante el control cuidadoso de los instantes en los cuales se realiza la limitación de nutrientes y la cosecha de las células (11; 15; 49).

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento de las algas debido al papel que desempeña en la mayoría de los procesos celulares, especialmente en los relacionados con la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. Los requerimientos de este elemento para el crecimiento óptimo, difieren considerablemente de una especie de microalga a otra. La deficiencia de fósforo en las algas se manifiesta de una manera similar a la reportada para los cultivos limitados en nitrógeno, donde el contenido de proteína, clorofila-*a*, ARN, ADN y en algunos casos de ATP celular, tiende a disminuir, entretanto que el contenido de carbohidratos y lípidos incrementa (12; 53; 55).

La concentración de silicio es otra característica del medio que afecta el contenido de lípidos, en particular en el caso de las diatomeas, ya que es uno de los componentes mayoritarios de su pared celular (10; 11; 12). Las diatomeas transferidas a cultivos deficientes en silicio, aumentan la síntesis de ácidos grasos en más de un 100%, seis o nueve horas después de su traslado. Se ha reportado que estas especies incluso pueden duplicar su contenido lipídico 12 horas luego de haber sido traspasadas a cultivos limitados en silicio. Los efectos debidos a la falta de silicio se atribuyen a dos eventos, uno de ellos es el mayor flujo del CO<sub>2</sub> asimilado que es dirigido hacia la síntesis de lípidos, en contraste con el flujo destinado a la producción de carbohidratos; el otro, es la conversión de los compuestos celulares no lipídicos en materia grasa (10; 11).

La composición química del medio comprende otras características tales como la presencia del ion amonio, la concentración de NaCl, la disponibilidad de potasio, la existencia de sustancias orgánicas, entre otras, que también influyen en la constitución lipídica de las algas pero de un modo aparentemente menos relevante (10). Algunos estudios se han orientado hacia el análisis de los efectos del estrés salino en los cultivos

microalgales con el objetivo de identificar aquellas especies oleaginosas que toleren condiciones extremas y por ende, posibiliten su aplicación biotecnológica (49).

Finalmente, cabe notar que el rendimiento lipídico para la producción de biodiesel no sólo depende de los parámetros ambientales y fisiológicos mencionados, sino también del método de extracción empleado (48).

### **2.5.2. Especies de microalgas evaluadas para la producción de biocombustibles.**

Numerosas especies de microalgas con un elevado contenido lipídico han sido estudiadas para su aplicación principalmente en la acuicultura, medicina, industria cosmética y de alimentos (10; 48). Algunas de las especies analizadas en dichas disciplinas y otras más, han sido consideradas para la producción de biodiesel debido a su potencial para obtener elevadas productividades lipídicas. En el presente apartado, se proporciona información referente al contenido lipídico de algunas de las principales especies de microalgas que han sido consideradas para este propósito.

*Botryococcus braunii* es una microalga verde que destaca por su capacidad para producir y acumular grandes cantidades de lípidos. Esta especie produce diversas sustancias lipídicas que incluyen varios compuestos con uniones tipo éter, ácidos grasos, triglicéridos, esteroides y numerosos tipos de hidrocarburos, en donde estos últimos constituyen la mayor proporción de la materia grasa (49; 47). *B. braunii* se caracteriza por su amplia biodiversidad, es por ello que se distinguen tres clases químicas de esta especie, de acuerdo al tipo de hidrocarburos sintetizados: A (alcadienos, trienos), B (triterpenos) y L (tetraterpenos). Las cepas de la clase A, que exhiben un contenido de hidrocarburos desde el 0.4% hasta el 61.0% de su peso seco, han sido más estudiadas en contraste con las de la clase B, cuyo contenido de hidrocarburos es por lo general del 30% al 40% de su peso seco (47). *B. braunii* es considerada la mejor microalga para la producción de hidrocarburos, es por ello que ha sido propuesta para la producción de combustibles líquidos renovables (10; 11; 49; 47). Un estudio detallado de la cantidad y el perfil de lípidos de *B. braunii* Kutz (UTEX 572), reporta un contenido oleaginoso del 45% de su peso seco, el cual en condiciones de deficiencia de nitrógeno, incrementa a un valor del 55%. Además, en este estudio se indica que el estrés salino no influye en la acumulación de lípidos. En lo referente a la composición lipídica, este análisis señala que la mayor parte de la materia

---

grasa está conformada por diversos tipos de hidrocarburos incluyendo hidrocarburos alifáticos de C<sub>29</sub> a C<sub>31</sub>, además de una variedad de compuestos isoprenoides ramificados e insaturados de polaridad considerable. Asimismo, en contraste con el contenido de hidrocarburos, la fracción de glicéridos es menor y su perfil de ácidos grasos consta principalmente de varios ácidos C<sub>18</sub> y de ácido palmítico. Los resultados de esta investigación indican que el perfil lipídico de *B. braunii* no es apto para la producción de biodiesel. Este aspecto, aunado a la baja velocidad de crecimiento de esta microalga en condiciones de limitación de nutrientes (tiempo de duplicación de 72 horas) y a los resultados de diversos estudios que reportan que el escalamiento de los cultivos de *B. braunii* no es económicamente viable, han llevado a la conclusión de que esta especie no es útil para la producción de combustibles renovables (11; 49; 47).

Por otra parte, existe un reporte en el cual se analiza detalladamente tanto la cantidad de lípidos, como la composición de esta fracción celular, en varias especies de microalgas, con el objetivo de evaluar su potencial para la producción de biodiesel. Las especies evaluadas en este estudio fueron: *Ankistrodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Nannochloris sp.*, *Nitzschia sp.*, *Isochrysis sp.* En los datos de la **Tabla 5**, se observa que en la mayoría de los casos, la limitación de nitrógeno en los cultivos provoca el incremento del contenido total de lípidos, con excepción de la microalga *Dunaliella salina*. Asimismo, en este análisis se investiga el efecto en la constitución lipídica ejercido por el aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo. En el caso de *Dunaliella salina*, el incremento de [NaCl] de 0.5 a 2 M, causó la disminución de la fracción lipídica desde un 25.3% hasta un 18.5% de su peso seco. Por el contrario, en el caso de *Isochrysis sp.*, el estrés salino (aumento de [NaCl] de 0.5 a 1 M) ocasionó el ascenso del contenido oleaginoso desde el 7.1% hasta el 15.3% (11; 49).

En todas las especies evaluadas en este reporte, la composición de los lípidos polares corresponde a la constitución típica de las microalgas fotosintéticas ya que se identificaron compuestos tales como: monogalactosildiacilglicerol, digalactosildiacilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. Los ácidos grasos identificados en mayores proporciones en las microalgas analizadas se indican en la **Tabla 5**. Estos datos permiten determinar si el perfil lipídico de la especie es adecuado para la producción de biodiesel no deletéreo, ya que la presencia de ácidos grasos poliinsaturados no es favorable para ello. A partir de los

resultados derivados de este reporte, no se puede definir si es posible conseguir elevadas productividades lipídicas a partir de las microalgas evaluadas, sin embargo, estos datos permiten determinar si el perfil lipídico es apto para la elaboración del biocombustible. En este reporte se concluye que tanto la producción, como la composición de los lípidos, dependen de las condiciones del medio de cultivo y por ende, la manipulación de estos parámetros posibilita, hasta ciertos límites, la producción de lípidos con las características deseadas (10; 11; 49).

**Tabla 5. Contenido y perfil lipídico de algunas especies de microalgas bajo distintas condiciones de cultivo (11; 49).**

Especie	% Contenido de lípidos ( $\frac{g_{Lípidos}}{g_{Peso\ seco}} \times 100$ )		Ácidos grasos más predominantes <sup>a</sup>	
	Suficiencia de N <sub>2</sub>	Deficiencia de N <sub>2</sub>	Suficiencia de N <sub>2</sub>	Deficiencia de N <sub>2</sub>
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.5	40.3	16:0, 16:4, <b>18:1</b> , <b>18:3</b>	16:0, <b>18:1</b> , 18:3
<i>Dunaliella salina</i>	25.3	9.2	14:0/14:1, <b>16:0</b> , 16:3, 16:4, 18:2, <b>18:3</b>	<b>16:0</b> , 16:3, 18:1, 18:2, <b>18:3</b>
<i>Nannochloris sp.</i>	20.8	35.5	14:0/14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 20:5	ND
<i>Nitzschia sp.</i> <sup>b</sup>	ND	ND	14:0/14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 20:6	ND
<i>Isochrysis sp.</i>	7.1	26.0	14:0/14:1, 16:0, 16:1, <b>18:1</b> , 18:3, <b>18:4</b> , 22:6	<b>14:0/14:1</b> , <b>18:1</b> , 18:2, 18:3, 18:4, 22:6

**ND:** No Determinado; **a:** Se indican los ácidos grasos presentes en un porcentaje mayor o igual al 5% del total; aquellos con un porcentaje mayor o igual al 15% se indican en letras negritas; **b:** La caracterización del contenido y perfil lipídico de esta especie, sólo se hizo en condiciones de estrés salino sin limitación de nitrógeno.

La microalga *Chlorella pyrenoidosa*, es otra especie oleaginosa que ha llamado la atención por su capacidad de producir lípidos hasta en una proporción del 80% de su biomasa seca. A pesar de ello, la mayoría de su contenido lipídico está conformado por lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos, principalmente), los cuales no son aptos para la producción de biodiesel (10). Otras especies del género *Chlorella* han sido consideradas para la elaboración del biocombustible. Una de ellas es *Chlorella protothecoides*, que es una microalga capaz de crecer de modo tanto autotrófico como heterotrófico bajo distintas condiciones de cultivo. Se ha reportado que el crecimiento heterotrófico de esta especie

resulta en una producción elevada de biomasa y en la acumulación de lípidos en una fracción considerable del 55% de su peso seco celular (20). Recientemente, se han realizado estudios para la producción de biodiesel a partir de *C. protothecoides*, los cuales integran aspectos relacionados con las condiciones de cultivo de la microalga, cuestiones de bioingeniería y otros factores concernientes al procedimiento de extracción lipídica y al método de transesterificación utilizado (9; 20). Existe una investigación en la cual se ha analizado la factibilidad de cultivar a esta especie en gran escala bajo condiciones heterotróficas y además, se ha comparado la eficiencia de un proceso novedoso de transesterificación enzimática para la obtención de biodiesel, con la de un procedimiento de catálisis ácida, cuya viabilidad y eficiencia previamente se habían comprobado. A partir de este estudio, se determina que el proceso de catálisis enzimática es más eficiente respecto al método tradicional y además, permite obtener biodiesel de calidad, el cual satisface las especificaciones establecidas en la norma estadounidense ASTM 6751 (9). Sin embargo, cabe notar que algunos estudios indican que la eficiencia de la producción de biodiesel a partir de cultivos heterotróficos es menor en relación a la de los autotróficos, ya que los compuestos orgánicos requeridos por los primeros, provienen en última instancia de organismos fotosintéticos que usualmente son plantas terrestres (17).

Finalmente, cabe mencionar que existen varias especies de microalgas capaces de sintetizar triglicéridos en proporciones considerables para su aplicación en la producción de biodiesel. Entre las especies más importantes, cuyo potencial para la producción del biocombustible no ha sido completamente evaluado, se encuentran: *Neochloris oleoabundans*, *Characium polymorphum*, *Chlorococcum oleofaciens* y *Nannochloropsis sp.*. Algunas de estas microalgas, bajo condiciones específicas de cultivo, han presentado hasta el 80% de su peso seco como lípidos, fracción celular de la cual los triglicéridos pueden formar parte en proporciones superiores al 80% (10).

## **2.6. *Neochloris oleoabundans*.**

*Neochloris oleoabundans* es una microalga edáfica eucarionte localizada en suelos áridos, la cual fue aislada de la cima de las dunas de Arabia Saudita por Chantanachat y Bold en 1962 (56). Esta especie pertenece al Orden *Chlorococcales*, Familia *Chlorococcaceae*, Clase *Chlorophyceae*, Filum *Chlorophyta*. *N. oleoabundans* es una

microalga oleaginosa de la cual se han reportado elevados valores de contenido lipídico de hasta un 88.8% de su peso seco (10; 48).

Estudios que se remontan a hace más de 30 años, reconocen el potencial de *N. oleoabundans* para la producción de grandes cantidades de lípidos. Los primeros reportes sólo se basaron en la apariencia visual de los cultivos. Uno de ellos data de 1970, en el cual se identifica que las células envejecidas de las microalgas del género *Neochloris*, son capaces de formar gotas lipídicas tanto intracelular como extracelularmente dependiendo de la especie. No obstante, es hasta 1981 que *Neochloris* es reconocida como una microalga oleaginosa mediante la aplicación de técnicas de tinción específicas para lípidos microalgales (55). A raíz de la crisis energética de 1975, el potencial de las microalgas es considerado para la producción de bioenergía, en particular biodiesel, por lo que a lo largo de la década de 1980 se realizan diversos estudios con el propósito de identificar especies de microalgas aptas para la producción de biocombustibles (10; 11; 12; 15; 57). En una de estas investigaciones, a partir del análisis del contenido lipídico y la productividad de diez distintas especies de microalgas, se concluye que tres de ellas *Characium polymorphum*, *Chlorococcum oleofaciens* y *Neochloris oleoabundans*, son capaces de alcanzar elevadas producciones lipídicas, de 1.5 g/L aproximadamente, y de acumular lípidos en grandes proporciones, desde un 42% hasta un 88% de su peso seco. Asimismo, se indica que la fracción lipídica de estas especies está conformada principalmente por triglicéridos y, en una menor proporción, por hidrocarburos. Además, se señala que los aceites microalgales son similares a los de origen vegetal (57).

Los estudios citados, impulsaron el interés de los investigadores por el potencial comercial de *N. oleoabundans* para la producción de biocombustibles, por ello, la composición lipídica de esta microalga fue analizada detalladamente e, igualmente, se investigó el efecto debido a la deficiencia de nitrógeno, condición cuya influencia notable en la acumulación de lípidos era conocida. El cultivo de la microalga por un periodo de 5 a 7 días en un medio limitado en nitrógeno, dio lugar a células con un contenido lipídico elevado del 35% al 54% de su peso seco. Los triglicéridos conformaron más del 80% de esta fracción celular y el resto, estuvo constituido por pigmentos, esteroides, glicolípidos, fosfolípidos e hidrocarburos. En lo referente a la composición de los ácidos grasos, éstos constaron primordialmente de moléculas de cadena par de C<sub>14</sub> a C<sub>20</sub>, tanto saturadas como mono- y diinsaturadas, y también se identificaron ácidos carboxílicos de número impar

---

saturados, alifáticos y ramificados. Los ácidos grasos presentes en proporciones mayores al 5% del total fueron: oleico (18:1, 36%), palmítico (16:0, 15%), esteárico (18:0, 11%), iso-17:0 (8.4%) y linoleico (18:2, 7.4%), de los cuales el iso-17:0 no es un compuesto convencional en las microalgas. La ausencia de ácidos grasos poliinsaturados es una característica esperada, ya que ésta es afín a las algas verdes de agua dulce como lo es *N. oleoabundans*. De este modo, el perfil lipídico de esta microalga bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, caracterizado por una elevada proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, es considerado como óptimo para la producción de biodiesel de calidad, ya que su bajo grado de insaturación, reduce la posibilidad de deterioro durante su almacenamiento y combustión (11; 55).

El crecimiento adecuado de las microalgas bajo condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, limitación de nutrientes, es favorable para su aplicación biotecnológica, ya que posibilita el uso en regiones áridas y suelos marginales y reduce los riesgos de contaminación de los cultivos (10; 49). Es por lo anterior, que la tolerancia de distintas especies a circunstancias extremas de cultivo ha sido estudiada. En el caso de *N. oleoabundans*, se ha descrito su comportamiento en condiciones de salinidad, parámetro que afecta la composición y las dimensiones celulares debido a la acumulación de compuestos requeridos para la osmorregulación. La osmoregulación es un proceso importante para las microalgas edáficas de regiones desérticas, ya que éstas se encuentran permanentemente bajo condiciones de escasez de agua y estrés salino (56; 58). *N. oleoabundans* ha sido estudiada al ser sometida a choques osmóticos de 0 a 0.6 kmol/m<sup>3</sup> de NaCl por periodos cortos de 5 días. Los resultados de estos estudios indican que la masa celular permanece inalterada en torno a un valor promedio de 43.3 pg/célula durante los 5 días de estrés salino. De igual modo, la fracción lipídica se mantiene en una proporción del 25% de su peso seco a lo largo del experimento, aunque, por el contrario, el contenido proteico se incrementa desde el segundo día de evaluación. Los autores de este estudio concluyen que esta microalga es capaz de resistir el choque osmótico de 0 a 0.6 kmol/m<sup>3</sup> de NaCl mediante un proceso de osmorregulación durante las primeras cuatro horas de estrés salino. Este mecanismo, en el caso de *N. oleoabundans*, es independiente de la fotosíntesis y consiste en la conversión de los polisacáridos de la célula en carbohidratos solubles, principalmente sacarosa (56).

Existen reportes en los cuales se ha evaluado la capacidad de *N. oleoabundans* de crecer en concentraciones de NaCl iguales a las del agua de mar, donde se ha señalado que esta condición salina incrementa la proporción de triglicéridos en la microalga (56; 58). Asimismo, se ha analizado la adaptación de *N. oleoabundans* a un medio marino (MM) y los efectos en su crecimiento, al comparar su composición bioquímica después de 21 días de desarrollo, con la de un cultivo de esta microalga en agua dulce (MD) (58). En relación a la composición celular, en la **Tabla 6** se observa que las condiciones salinas no afectan el contenido total de lípidos ni el de carbohidratos, sin embargo, la fracción proteica es reducida en MM en contraste con MD. Además, se confirma que la salinidad sí modifica la composición de la fracción oleaginosa, ya que la proporción de los lípidos neutros aumenta en MM. Igualmente, el análisis del perfil de ácidos grasos señala que en ambas condiciones de cultivo predominaron aquellos ácidos grasos de número par de carbonos en el intervalo de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, los cuales se encontraban tanto saturados, como mono-, di- y triinsaturados. Los ácidos carboxílicos identificados en mayor proporción fueron el ácido palmítico y el oleico. Los resultados de este estudio, nos permiten concluir que la adaptación de *N. oleoabundans* al medio marino y su efecto mínimo en la composición bioquímica, aunado a la capacidad de esta microalga de crecer tanto en agua dulce como salina, representa una ventaja potencial para su uso en la producción de biodiesel y en otras aplicaciones biotecnológicas (58).

**Tabla 6. Composición bioquímica celular de *N. oleoabundans* en medio marino y de agua dulce (58).**

Parámetro	MD	MM
Carbohidratos (pg/célula)	15.50 +/- 2.12	12.62 +/- 2.51
Lípidos (pg/célula)	17.23 +/- 2.24	15.63 +/- 2.67
% Lípidos neutros <sup>a</sup>	57.95	72.11
% Lípidos polares <sup>a, b</sup>	42.05	27.89
Proteínas (pg/célula)	13.65 +/- 0.67	4.55 +/- 0.83

**a:** Porcentaje en relación al contenido total de lípidos; **b:** Lípidos polares: glicolípidos y fosfolípidos.

Recientemente, el cultivo de microalgas, por ejemplo de *N. oleoabundans*, ha adquirido gran relevancia para su aplicación en la acuicultura, ya que éstas son el primer alimento de varias especies marinas de importancia comercial tales como el langostino,

camarón, peces de ornato, moluscos bivalvos, entre otros (10; 52; 59; 60). El crecimiento y el desarrollo de las especies marinas citadas, dependen de la disponibilidad y de la proporción de determinados compuestos bioquímicos en el alimento, además de la digestibilidad de éste (52). Es por lo anterior, que se ha estudiado detalladamente la composición bioquímica de algunas microalgas y la variación de sus distintos componentes celulares a lo largo de las fases de crecimiento (logarítmica, logarítmica tardía, estacionaria y estacionaria tardía), con el objetivo cuantificar compuestos clave y definir una dieta adecuada para las nutrición de especies marinas. Algunas de las especies de microalgas que han sido evaluadas en estos estudios son: *Bracteacoccus grandis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Scenedesmus spp.* y *N. oleoabundans*. Los resultados de estos estudios indican que el contenido proteico mostrado por *N. oleoabundans* no depende ni de la especie ni de la fase de crecimiento (52; 59). Por el contrario, el contenido de carbohidratos resultó estar influenciado considerablemente, tanto por la especie de microalga como por la fase de crecimiento. Además, a partir de este trabajo se observó que, en todas las especies estudiadas, la proporción de la fracción de carbohidratos incrementó a partir de la fase estacionaria tardía. Por su parte, la cantidad de lípidos resultó dependiente de la especie de microalga. El contenido oleaginoso reportado para el caso de *N. oleoabundans* fue inicialmente del 18.9% de su peso seco, valor que incrementó a un 37.2% al iniciar la fase estacionaria tardía (52). El perfil de ácidos grasos de las microalgas evaluadas fue similar, con excepción de *P. tricornutum*, sin embargo, en todos los casos evaluados, el grado de insaturación de estos compuestos fue mayor en la fase exponencial en contraste con la estacionaria (59). La producción de esteroides también fue un aspecto investigado y se concluyó que éste es independiente de la fase de crecimiento; las moléculas de esteroide identificadas en el caso de *N. oleoabundans* fueron el  $\Delta^{5,7}$ -ergostadienol, el  $\Delta^{5,7,22}$ -ergostatrienol y el  $\Delta^7$ -ergostenol (52).

*N. oleoabundans* ha sido caracterizada en dos medios de cultivo, uno de ellos tradicional (medio f/2) y el otro no convencional elaborado a base de fertilizantes agrícolas (medio MIII) (60).

**3. HIPÓTESIS.**

La manipulación de las condiciones de cultivo y el estudio de sus efectos en la composición bioquímica celular de *N. oleoabundans*, permitirán seleccionar los parámetros que favorezcan una mayor producción y productividad de lípidos, susceptibles de ser usados en la producción de biodiesel.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1. Objetivo general.

Evaluar efectos de parámetros de cultivo en la composición bioquímica de la microalga *N. oleoabundans* y seleccionar aquellos que favorezcan una mayor producción y productividad de lípidos.

### 4.2. Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de la limitación de nitrógeno en el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans*. Seleccionar la condición de deficiencia de nitrógeno que favorezca una mayor producción y productividad de lípidos.
- Evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans* bajo la condición de limitación de nitrógeno previamente determinada. Seleccionar la temperatura que favorezca una mayor producción y productividad de lípidos.
- Evaluar el efecto de la limitación de fósforo en el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans* bajo las condiciones de cultivo correspondientes a la temperatura y concentración limitante de nitrógeno previamente determinadas. Seleccionar la condición de disponibilidad de fósforo que promueva una mayor producción y productividad de lípidos.
- Evaluar el efecto del enriquecimiento del suministro de aire con CO<sub>2</sub> en inóculos de *N. oleoabundans* y en su posterior empleo en cultivos de la microalga, bajo las condiciones más favorables de producción y productividad lipídica previamente seleccionadas.
- Definir las condiciones que en cultivos de *N. oleoabundans* favorezcan una mayor producción y productividad de lípidos, susceptibles de ser usados en la producción de biodiesel.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1. Microorganismos.

En el presente estudio se utilizó la cepa de *Neochloris oleoabundans* proveniente de la colección de algas de la Universidad de Texas (Clave UTEX 1185), aislada por Chantanachat y Bold (1962) de suelo árido.

### 5.2. Condiciones y medios de cultivo.

#### 5.2.1. Medios de cultivo.

##### 5.2.1.1. Medio Basal de Bold (BBM).

El medio utilizado para el cultivo de *Neochloris oleoabundans* fue el Medio Basal de Bold o BBM por sus siglas en inglés (Bold's Basal Medium) (52; 55). La preparación de este medio de cultivo requiere de seis soluciones de macronutrientes (1 a 6) y de cuatro soluciones de elementos traza (7 a 10). Las concentraciones requeridas para la elaboración de cada una de estas soluciones estándar se indica en la **Tabla 1** (61).

**Tabla 1. Soluciones estándar para la preparación del medio BBM (61).**

No.	Compuesto	Concentración	No.	Compuesto	Concentración
1	NaNO <sub>3</sub>	10 g/400 mL	6	NaCl	1 g/400 mL
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3 g/400 mL	7	EDTA	50 g/L
				KOH	31 g/L
3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/400 mL	8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	4.98 g/L
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7 g/400 mL	9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42 g/L
5	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/400 mL	10	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82 g/L
				MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44 g/L
				MoO <sub>3</sub>	0.71 g/L
				CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57 g/L
				Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.49 g/L

a: Solución acidificada con 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para preparar 1 L de medio BBM, a aproximadamente 900 mL de agua desionizada, se le adicionan 10 mL de cada una de las soluciones de macronutrientes (1 a 6) y 1 mL de cada una de las soluciones de elementos traza (7 a 10). Posteriormente, el volumen total es llevado a 1 L utilizando agua desionizada. Una vez preparado el medio de cultivo, éste debe ser esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 Lb/in<sup>2</sup> de presión por 20 minutos. Cabe mencionar que es posible solidificar el medio a través de la adición de agar, previo a la esterilización, en una concentración de 15 g/L (61).

### **5.2.1.2. Medios suplementados con agua de suelo.**

Los medios suplementados con agua de suelo que se utilizaron en este proyecto fueron, el medio de extracto de suelo y el medio basal de Bold complementado con agua de suelo.

El agua de suelo o SWM por sus siglas en inglés (Soilwater Medium), es utilizada para el aislamiento y cultivo de microalgas autótrofas dulceacuícolas. Se prepara mediante la adición de aproximadamente una cucharada de tierra de jardín y 1 mg de CaCO<sub>3</sub>, a 200 mL de agua desionizada. La calidad de la tierra de jardín es fundamental para el desarrollo exitoso de la microalga, por lo que se recomienda que la tierra sea ligeramente ácida, que contenga aproximadamente un 15% de materia orgánica completamente descompuesta y que carezca de fertilizantes comerciales y pesticidas. Con el propósito de disminuir la carga microbiana de la tierra, una vez que ha sido combinada con el agua y el CaCO<sub>3</sub>, ésta debe ser pasteurizada a una temperatura de 98°C durante 3 h por dos días consecutivos. Se sugiere remover las partículas en el agua de suelo mediante filtración. El agua de suelo debe ser almacenada bajo refrigeración (4°C) y atemperada previo a su uso (61; 62; 63). En el caso particular del presente proyecto, el agua de suelo se empleó como suplemento de otros medios de cultivo, como se describe enseguida.

La preparación de 1 L de medio de extracto de suelo o SEM por sus siglas en inglés (Soil Extract Medium), se realiza mediante la adición de 40 mL de agua de suelo a 960 mL de medio de Bristol. El medio de Bristol es análogo al medio basal de Bold, exceptuando la adición de las cuatro soluciones de elementos traza al primero (63). Por su parte, el medio basal de Bold suplementado con agua de suelo (BBM:SWM), se prepara de manera muy

similar al medio de extracto de suelo, ya que para 1 L de medio, se adicionan 40 mL de agua de suelo a 960 mL de medio basal de Bold. En ambos casos, una vez que los medios suplementados con agua de suelo han sido preparados, éstos deben ser esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 Lb/in<sup>2</sup> de presión por 15 minutos. Cabe mencionar que es posible solidificar los medios a través de la adición de agar, previo a la esterilización, en una concentración de 15 g/L (61; 63).

### 5.2.1.3. Medio Luria-Bertani.

El medio Luria-Bertani fue utilizado para evaluar la contaminación, es decir, la presencia de microorganismos ajenos a *N. oleoabundans* en los cultivos. Un litro de medio Luria contiene: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl (64). El medio de cultivo, una vez preparado, debe ser esterilizado en autoclave a 121°C y 15 Lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

Se recomienda la adición de glucosa en una concentración de 2 g/L al medio Luria para la evaluación de la contaminación de los cultivos microalgales (56). Asimismo, es posible solidificar el medio a través de la adición de agar, previo a la esterilización, en una concentración de 15 g/L.

### 5.2.2. Mantenimiento de la cepa y preinóculos.

A causa de la dificultad para conservar la cepa *Neochloris oleoabundans* UTEX1185 en medio sólido, ésta se mantuvo en cultivos líquidos de 100 mL de volumen en medio BBM, inoculados al 10%. Igualmente, los preinóculos fueron preparados en sistemas de esta índole.

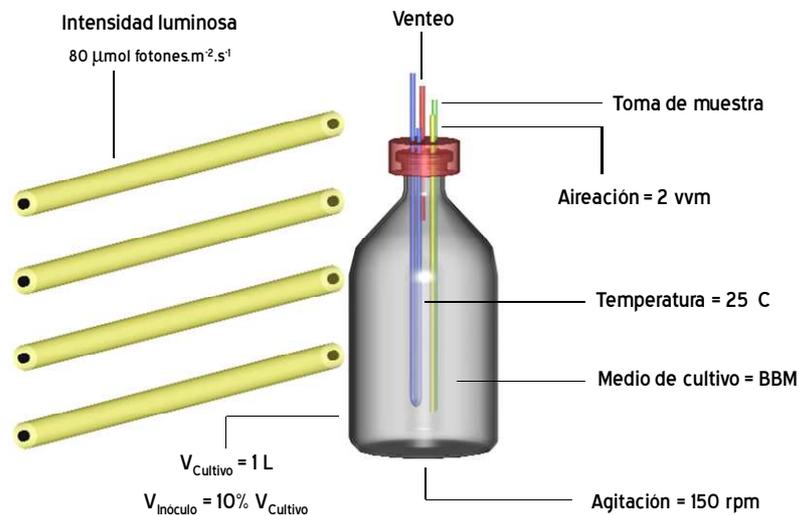
Los recipientes de cultivo consistieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL cubiertos con tapones de silicón que posibilitaban la difusión estéril del aire. Los cultivos fueron incubados a una temperatura constante de 24°C, agitación mecánica (80 rpm) e iluminación con luz blanca a una intensidad de 80 µE/m<sup>2</sup>/s y periodos luz:oscuridad de 18:6 h.

Los cultivos de mantenimiento fueron preservados bajo las condiciones de incubación mencionadas, durante periodos de dos a tres semanas, para posteriormente ser renovados. En el caso particular de los preinóculos, éstos eran mantenidos bajo las

condiciones de incubación durante 7 días, para después ser empleados en la preparación de inóculos.

### 5.2.3. Inóculos.

Los inóculos se prepararon en sistemas foto-biológicos cerrados tipo ‘tanque agitado’, los cuales consisten en frascos de vidrio de 1 L de volumen con tapones herméticos de goma, los cuales cuentan con línea de aireación, venteo, toma de muestra y un serpentín para la regulación de la temperatura (**Figura 1**). La geometría del sistema de cultivo se describe en la **Tabla 2**.



**Figura 1. Sistemas foto-biológicos para la preparación de inóculos y la evaluación de cultivos experimentales.**

Los inóculos consistieron en cultivos líquidos de 1 L de volumen en medio BBM, inoculados al 10% (v/v) a partir de preinóculos de 100 mL. Los inóculos fueron incubados durante periodos de siete días bajo las condiciones siguientes: temperatura de 25°C, iluminación continua con luz blanca a una intensidad de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 2 vvm de aireación y agitación mecánica de 150 rpm con un magneto plano de teflón de 3.5 cm de longitud y 0.6 cm de espesor en el fondo del fotobioreactor.

**Tabla 2. Geometría de los sistemas foto-biológicos.**

Símbolo	Parámetro	Magnitud	Unidades
H	Altura del reactor	225.00	mm
D	Diámetro del reactor	101.00	mm
V <sub>L</sub>	Volumen de trabajo	1.00	L
h <sub>L</sub>	Altura del líquido	124.82	mm
d <sub>i</sub>	Diámetro del impulsor (magneto)	35.00	mm
d <sub>i</sub> /D	Relación diámetro del impulsor: diámetro del reactor	0.35	Adimensional
A <sub>L</sub>	Área del volumen de trabajo expuesta directamente a la luz	3.96 x 10 <sup>-2</sup>	m <sup>2</sup>
A <sub>L</sub> /V <sub>L</sub>	Relación de la superficie expuesta a la luz respecto al volumen de trabajo	39.61	m <sup>-1</sup>

Cabe mencionar que en todos los experimentos descritos en este documento, exceptuando los correspondientes a la evaluación del efecto de la limitación de nitrógeno, los flujos de aireación suministrados a los inóculos de *N. oleoabundans* fueron enriquecidos con CO<sub>2</sub> gaseoso al 1% (v/v), siendo esta magnitud monitoreada por medio de un rotámetro. Además, el medio de cultivo fue adicionado con amoxicilina (0.5 g/L) y ácido clavulánico (0.125 g/L), con el propósito de suprimir la proliferación de microorganismos ajenos a *N. oleoabundans*. La amoxicilina es un antibiótico β-lactámico, en particular una amino penicilina de amplio espectro, que interrumpe la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (65; 66). El ácido clavulánico por su parte, amplía el rango de acción de la amoxicilina al inhibir a las β-lactamasas, enzimas que a ciertos microorganismos les confiere resistencia contra este antibiótico.

#### 5.2.4. Cultivos experimentales.

Los cultivos experimentales fueron preparados y evaluados en sistemas foto-biológicos como los de la **Figura 1**, de tal manera que el volumen estándar de cultivo fue de 1 L. Los cultivos fueron inoculados mediante la centrifugación (10,000 rpm, 15 min) de un volumen de inóculo de *N. oleoabundans* tal, que su densidad celular inicial fuese de aproximadamente 40 x 10<sup>6</sup> células/mL. Previo a la inoculación, las células centrifugadas eran lavadas con solución de NaCl al 0.85% (w/v) (10,000 rpm, 15 min) y finalmente, eran

transferidas a los cultivos experimentales al ser previamente resuspendidas en un volumen de agua desionizada estéril conocido.

Una vez inoculados bajo condiciones asépticas, los cultivos de *N. oleoabundans* en medio BBM, fueron incubados durante 9 días bajo las condiciones estándar siguientes: temperatura de 25°C, iluminación continua con luz blanca a una intensidad de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 2 vvm de aireación (0.035%  $\text{CO}_2$ ) y agitación mecánica de 150 rpm con un magneto plano de teflón de 3.5 cm de longitud y 0.6 cm de espesor.

Cabe mencionar que las condiciones de cultivo correspondientes a la temperatura y a las concentraciones de fósforo y nitrógeno, variaron de acuerdo a los parámetros que fueron evaluados. Las concentraciones iniciales de Fósforo y Nitrógeno fueron definidas mediante la adición de distintos volúmenes de las soluciones estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  o de  $\text{NaNO}_3$ , respectivamente, durante la preparación del medio de cultivo. La temperatura de incubación, por su parte, fue modificada a través del equipo de recirculación de agua empleado.

Todos los cultivos experimentales evaluados en este proyecto fueron monitoreados cada tercer día, durante un periodo total de nueve días. Las variables analizadas fueron: densidad celular, pH, peso seco y contenido de lípidos, carbohidratos y proteína. Asimismo, la presencia de microorganismos ajenos a *N. oleoabundans* fue verificada en medio Luria sólido.

### 5.3. Métodos analíticos.

#### 5.3.1. Concentración celular.

La densidad celular (células/mL) de los cultivos de *N. oleoabundans* fue determinada mediante conteo directo en cámara de Neubauer (50; 60) con microscopio de luz utilizando el objetivo 40X. En los casos en los cuales fue necesario diluir la muestra, las diluciones se llevaron a cabo utilizando solución de NaCl al 0.85% (w/v).

La cámara de Neubauer está dividida en nueve cuadros grandes. Durante la determinación de la densidad celular de una muestra dada, se recomienda contar las células presentes en los cuatro cuadros grandes ubicados en las esquinas de la cámara. El conteo debe realizarse por duplicado.

El cálculo de la densidad celular de los cultivos se realizó acorde con la ecuación siguiente:

$$\text{Densidad celular} = \frac{\text{No. células}_{\text{promedio}} \cdot \text{Dilución} \cdot 10^4}{1 \text{ mL}}$$

Donde: *Densidad celular* es la concentración de células en el cultivo (*células/mL*); *No. Células<sub>promedio</sub>* es el promedio del número de células contadas por duplicado en los cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer; *Dilución* es el factor de dilución de la muestra.

### 5.3.2. Determinación de peso seco.

La biomasa en los cultivos de *N. oleoabundans*, en términos de peso seco, se cuantificó mediante gravimetría. Para ello, se filtran 15 mL de muestra húmeda utilizando filtros de membrana de nylon previamente tarados, con un tamaño de poro de 0.45 µm. El filtro, junto con la muestra húmeda, es secado a 70 °C por un periodo de 48 h, siendo posteriormente enfriado en un desecador y pesado en una balanza analítica. El peso seco de la muestra es determinado por diferencia de peso (50; 56).

### 5.3.3. Extracción y determinación de lípidos totales.

La extracción de los lípidos se realiza a partir de una muestra de 30 mL del cultivo a evaluar. Las células contenidas en la muestra son inicialmente cosechadas mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos, obteniendo con ello una pastilla celular. La pastilla celular obtenida es resuspendida en 2 mL de metanol (CH<sub>3</sub>OH) y 1 mL de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), con butil-hidroxitolueno (BHT) al 0.05% (w/v). De este modo, las células quedan inmersas en una mezcla metanol-diclorometano en una proporción 2:1, la cual debe ser agitada vigorosamente, cubierta y almacenada en refrigeración (4 °C) por un periodo mínimo de 12 h. Posteriormente, el paquete celular es separado de la mezcla metanol:diclorometano, mediante centrifugación a 10,000 rpm por 15 minutos. Con el fin de completar la extracción lipídica, la pastilla celular es lavada en dos ocasiones más con 4

mL de mezcla metanol-diclorometano 1:1. Todos los extractos metanol:diclorometano obtenidos, son combinados, de manera tal que el volumen final de extractos recolectado sea de aproximadamente 11 mL. Con el propósito de romper el equilibrio de la mezcla metanol:diclorometano, se le adicionan 11 mL de agua desionizada, obteniéndose con ello dos fases: la orgánica que contiene los lípidos disueltos en el diclorometano, y la fase metanol-agua o fase acuosa. Por otra parte, la pastilla celular libre de lípidos es conservada para su uso posterior en la determinación del contenido de carbohidratos y proteínas (56; 60).

La cuantificación de los lípidos totales se realiza a partir de la fase orgánica obtenida. Con la finalidad de remover el agua remanente en la fase orgánica, ésta es filtrada en sulfato de sodio anhidro, para lo cual se recomienda utilizar como soporte fibra de vidrio o papel Whatman No. 1. Posteriormente, la fase orgánica libre de agua es concentrada al vacío a 45°C mediante el uso de un rotavapor y transferida a viales previamente tarados. La muestra es secada con flujo directo de N<sub>2</sub>. Los viales con la muestra lipídica son almacenados en un desecador y pesados continuamente hasta obtener un peso constante. El contenido lipídico es determinado por diferencia de peso (56).

#### **5.3.4. Determinación del contenido de carbohidratos y proteínas.**

El análisis del contenido proteico y de carbohidratos se realizó a partir de las pastillas celulares libres de lípidos obtenidas durante la etapa de extracción lipídica. Para su evaluación, los paquetes celulares deben ser resuspendidos en 1 mL de agua desionizada, agitados vigorosamente y separados en dos alícuotas de 0.5 mL (56; 60).

Las alícuotas destinadas a la determinación del contenido proteico, son adicionadas con 3 mL de NaOH 1N y sometidas a un proceso de hidrólisis alcalina a 100°C durante 1 h. La cuantificación del contenido proteico de las muestras hidrolizadas, se realiza acorde con la metodología de Lowry *et al.* (50; 56; 60; 67).

Las otras alícuotas son empleadas para la determinación de carbohidratos, para lo cual se les agregan 3 mL de HCl 2N y se les coloca en un baño en ebullición a 100 °C durante 1 h. La determinación del contenido de carbohidratos se realiza a partir de estos hidrolizados ácidos, por medio del método del fenol-ácido sulfúrico, en el cual se emplea la glucosa como el compuesto de referencia (56; 60; 68).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Determinación de las condiciones generales de cultivo.

La mayoría de las condiciones para el cultivo de *N. oleoabundans* (temperatura, intensidad luminosa, aireación, agitación, etc.) se determinaron principalmente a partir de las empleadas en estudios previos de la microalga (52; 55; 56; 58; 60), sin embargo, el establecimiento de algunos parámetros requirió de pruebas experimentales adicionales.

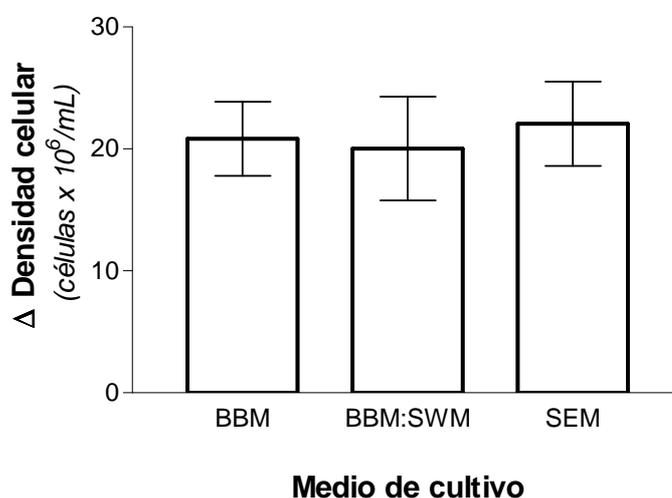
La elección del medio de cultivo se realizó mediante la evaluación, tanto en cultivo sólido como líquido, de tres medios: el medio de extracto de suelo (SEM: Soil Extract Medium), el medio basal de Bold (BBM: Bold's Basal Medium) y el medio basal de Bold suplementado con agua de suelo (BBM-SWM: Bold's Basal Medium – Soilwater Medium).

La evaluación en medio sólido (agar al 1.5% w/v) se realizó con el propósito de observar diferencias cualitativas en el crecimiento de la microalga. A partir de esta prueba se observó que la proliferación de la microalga fue favorecida por el medio BBM y, en menor medida, por el BBM:SWM, por el contrario, el crecimiento en el medio SEM fue mínimo. Posteriormente, se realizó una prueba cuantitativa en medio líquido, en términos de la densidad celular final alcanzada en los distintos medios de cultivo, después de un periodo de 6 días de incubación. En esta prueba, los medios de cultivo evaluados no mostraron una diferencia significativa en relación a la densidad celular final alcanzada (**Figura 1**).

De este modo, se seleccionó el medio de cultivo BBM, ya que éste promovió el crecimiento de *N. oleoabundans* tanto en cultivo sólido como líquido y, en contraste con los otros medios, su composición es sencilla y su preparación es relativamente fácil. Con la intención de fijar otros parámetros para el cultivo de *N. oleoabundans*, se realizaron diferentes pruebas a partir de las cuales se concluyó lo siguiente: el control de la temperatura mediante un baño de agua no es recomendado, ya que atenúa el flujo de luz incidente en los cultivos y por ende, conlleva a una prolongada fase de crecimiento retardado y a un crecimiento deficiente; el crecimiento es favorecido al incrementar el

volumen de inoculación de un 5 a un 10% (v/v); la aireación directa, en contraste con la mera agitación mecánica, beneficia el crecimiento de la microalga.

De esta manera, para realizar los estudios de este trabajo, se determinó usar las siguientes condiciones: medio BBM, volumen de cultivo de 1 L, inóculo del 10% (v/v), iluminación continua con luz blanca con una intensidad luminosa de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 2 vvm de aireación (0.035%  $\text{CO}_2$  v/v),  $25^\circ\text{C}$  de temperatura (mantenida mediante recirculación de agua a través de un serpentín) y agitación mecánica de 150 rpm con un magneto plano de teflón de 3.5 cm de longitud y 0.6 cm de espesor.



**Figura 1. Crecimiento de *N. oleoabundans* en distintos medios de cultivo.** Incremento del número de células en tres medios. Las evaluaciones se realizaron por duplicado en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo inoculados al 10% (v/v) e incubados durante 6 días a  $24^\circ\text{C}$ , 80 rpm de agitación e iluminación de  $80 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  en fotoperiodos de 16:8 h. Las barras indican el error estándar.

## 6.2. Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición bioquímica de cultivos de *N. oleoabundans*.

El estudio del efecto de la limitación de nitrógeno en cultivos de *N. oleoabundans*, se realizó mediante la evaluación de seis concentraciones diferentes de este macronutriente: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM. La determinación de estos valores se fundamentó en los experimentos realizados por Tornabene *et al.*, donde cultivos de *N. oleoabundans* fueron restringidos con una concentración inicial 0.5 mM de nitrógeno (55). Asimismo, se

consideró la estimación teórica de la concentración de nitrógeno (0.6 mM) necesaria para permitir solamente la duplicación de cultivos de la microalga con una densidad celular inicial de  $40 \times 10^6$  células /mL, para lo cual se consideró una composición teórica elemental generalizada de las microalgas con un contenido promedio de nitrógeno de  $55 \mu\text{g N/mg}_{\text{Peso-seco}}$  (53). Como aproximación, se determinó el contenido de nitrógeno por célula de *N. oleoabundans*, de acuerdo a:

$$\text{Nitrógeno}_{\text{célula}} = \frac{\text{Biomasa} \cdot \text{Nitrógeno}_{\text{Biomasa}}}{\text{Densidad celular}}$$

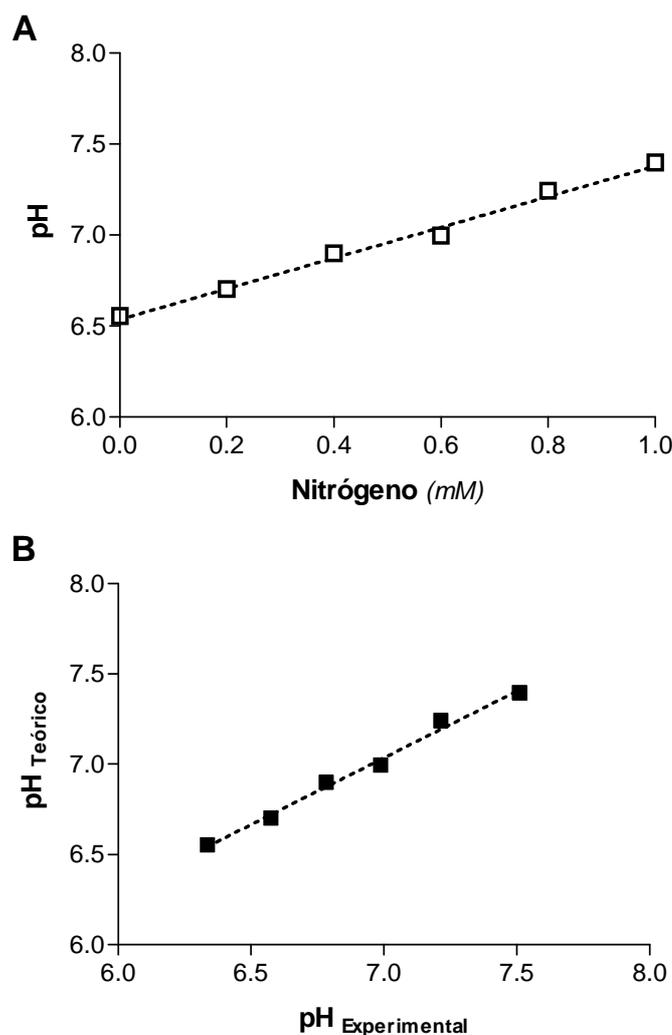
Donde: *Nitrógeno<sub>célula</sub>* es el contenido de nitrógeno por célula de la microalga; *Biomasa* es la concentración de biomasa, en términos de peso seco, del cultivo microalgal ( $0.33 \text{ g}_{\text{Peso seco}}/\text{L}$ ); *Nitrógeno<sub>Biomasa</sub>* es el contenido teórico promedio de nitrógeno en la biomasa microalgal ( $55 \mu\text{gN/mg}_{\text{Peso-seco}}$ ); *Densidad celular* es la concentración de células alcanzada por el cultivo ( $87 \times 10^6$  células/mL). De este modo, una vez determinado el contenido de nitrógeno por célula ( $0.21 \text{ pg}_{\text{Nitrógeno}}/\text{célula}$ ), se estimó la concentración de nitrógeno correspondiente a la densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL, la cual fue de 0.6 mM. Esta concentración de nitrógeno, teóricamente sólo posibilitaría la duplicación de la densidad celular para la cual el cálculo fue realizado.

### 6.2.1. Relación del pH de los cultivos con el consumo de nitratos.

Es sabido que la naturaleza de las fuentes de nitrógeno y de carbono inorgánico resulta determinante para el pH y la alcalinidad de los cultivos microalgales fotoautótrofos, en particular de aquellos que poseen sistemas endebles de regulación de pH (69; 70). En el caso específico de los nitratos, la asimilación de un mol de éstos y su posterior incorporación a moléculas orgánicas genera un equivalente de iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>), lo cual conlleva a la elevación del pH y al incremento de la alcalinidad del medio; la reacción que esquematiza este fenómeno es (69; 70):



En los cultivos de *N. oleoabundans* evaluados bajo limitación de nitrógeno, durante los primeros tres días de incubación, se observó un importante incremento en el valor de pH, magnitud que resultó ser proporcional a la concentración de nitrógeno de cada uno de los cultivos (**Figura 2.A**).



**Figura 2. Relación del pH con el consumo de nitratos.** (A) *Correlación lineal del pH experimental de los cultivos con la correspondiente concentración de nitratos evaluada ( $R^2 = 0.9757$ ).* (B) *Correlación lineal del pH experimental con el correspondiente pH teórico calculado con la ecuación de Henderson-Hasselbalch considerando el consumo total de nitratos y el efecto del sistema amortiguador de fosfatos del medio BBM ( $R^2 = 0.9780$ ).* Los valores de pH experimental corresponden a cultivos evaluados a distintas concentraciones limitantes de nitrógeno al tercer día, excepto para  $[N] = 1\text{mM}$ , para la cual los datos conciernen al sexto día. Los cultivos se evaluaron por duplicado excepto para  $[N] = 0.6\text{mM}$ , condición para la cual se realizaron 4 repeticiones.

A partir de este comportamiento, se infirió que la mayoría de los nitratos disponibles en los distintos cultivos fueron consumidos durante los tres días iniciales, de tal modo que los correspondientes iones hidroxilo fueron liberados al medio, condición que a su vez provocó el aumento de pH observado. Con el propósito de fundamentar esta afirmación, se compararon los valores de pH experimentales correspondientes al tercer día de cultivo (exceptuando la condición 1 mM, para la cual se consideró que los nitratos fueron agotados hasta el sexto día), con los correspondientes valores teóricos calculados a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, considerando que los nitratos fueron consumidos por completo y que el único sistema amortiguador de pH era el de fosfatos ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) presente en el medio de cultivo. El cálculo para determinar el valor del pH teórico para cada condición estudiada es:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} = pK_a + \log \frac{[K_2HPO_4] + [NaNO_3]}{[KH_2PO_4] - [NaNO_3]}$$

$$pH = 6.81 + \log \frac{0.4306 + [NaNO_3]}{1.286 - [NaNO_3]}$$

Donde,  $pK_a$  es la constante de disociación del ácido,  $[A^-]$  es la concentración de la base conjugada (mM),  $[HA]$  es la concentración del ácido (mM),  $[K_2HPO_4]$  y  $[KH_2PO_4]$  son las concentraciones iniciales de fosfatos di- y mono- básicos en el medio de cultivo BBM (mM) y  $[NaNO_3]$  es la concentración limitante de nitratos evaluada (mM).

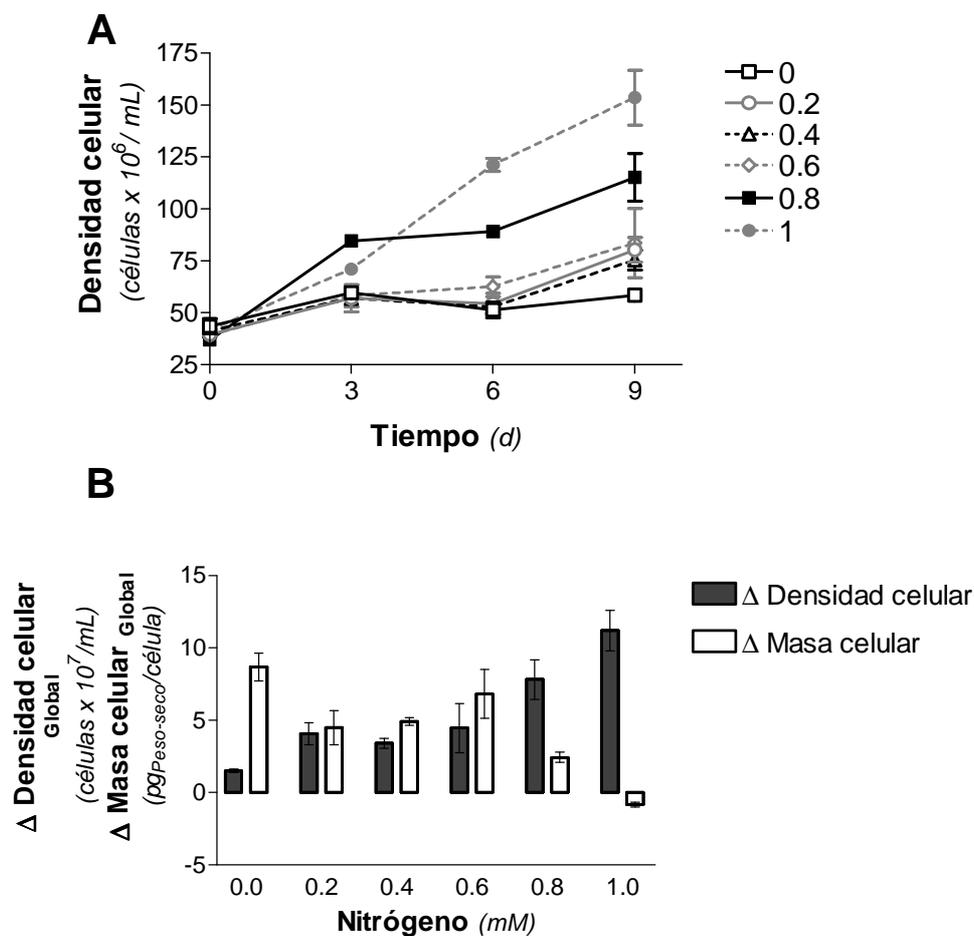
En la **Figura 2.B**, se advierte que la correlación entre los valores teóricos y experimentales fue muy buena, resultado que respalda la hipótesis planteada. Asimismo, estas observaciones permiten sugerir que la incorporación del carbono inorgánico a partir del  $CO_2$  atmosférico (0.0035% v/v) en los cultivos microalgales, no influye notablemente en el pH de los mismos.

### 6.2.2. Efecto en la biomasa total: densidad celular y peso seco.

La restricción de nitrógeno claramente afectó la proliferación celular en los cultivos de *N. oleoabundans*, ya que ésta decreció conforme la disponibilidad del nutriente era menor. Sin embargo, incluso ante la ausencia de nitrógeno, la división celular no cesó por

completo (**Figura 3: A, B**). Por su parte, el contenido de peso seco promedio por célula, denominado como masa celular en este trabajo, presentó un comportamiento opuesto en el cual durante un periodo de 9 días, se observaron incrementos elevados de hasta 8.7 pg/célula favorecidos particularmente por las concentraciones mínimas de nitrógeno (**Figura 3.B**). Asimismo, en todas las condiciones de limitación de nitrógeno evaluadas, se observó un crecimiento de tipo lineal (**Figura 3.A**). El crecimiento lineal es un comportamiento característico de los cultivos de microalgas limitados en algún nutriente (compuesto mineral, CO<sub>2</sub>, luz) (71; 72; 73).

La atenuación del crecimiento en términos de división celular como consecuencia de la deficiencia de nitrógeno, es un comportamiento típico de las microalgas (74; 75; 76; 77; 78) que también ha sido reportado específicamente para *N. oleoabundans* (79; 80; 81). La persistencia de la proliferación celular, incluso ante el agotamiento del nitrógeno extracelular, es un fenómeno previamente observado en esta microalga, el cual probablemente sucede a expensas de ciertos compuestos nitrogenados intracelulares liberados por enzimas hidrolíticas, cuya actividad es inducida como una respuesta específica ante la ausencia del nutriente (75; 79; 81). La clorofila, al poseer cuatro átomos de nitrógeno por molécula, ha sido propuesta como la principal reserva intracelular de nitrógeno en cultivos microalgales, ya que se ha reportado que bajo condiciones deficientes de nitrógeno, el contenido de este pigmento ( $mg \text{ clorofila} / g \text{ biomasa}$ ) disminuye considerablemente (53; 79; 81; 82). Probablemente este comportamiento también se manifestó en los cultivos de *N. oleoabundans* evaluados en este proyecto, en los cuales se observó la atenuación de la coloración verde conforme la disponibilidad de Nitrógeno era menor (**Figura 7**). No obstante, el considerar a la clorofila como un compuesto de reserva debe realizarse con cautela por las razones siguientes: el consumo de este pigmento no puede ser indiscriminado porque es esencial para la fotosíntesis; y la disminución del contenido de clorofila no necesariamente se debe a que ésta sea consumida, ya que tal reducción podría ser consecuencia de un efecto enmascarado por la acumulación de otros compuestos.



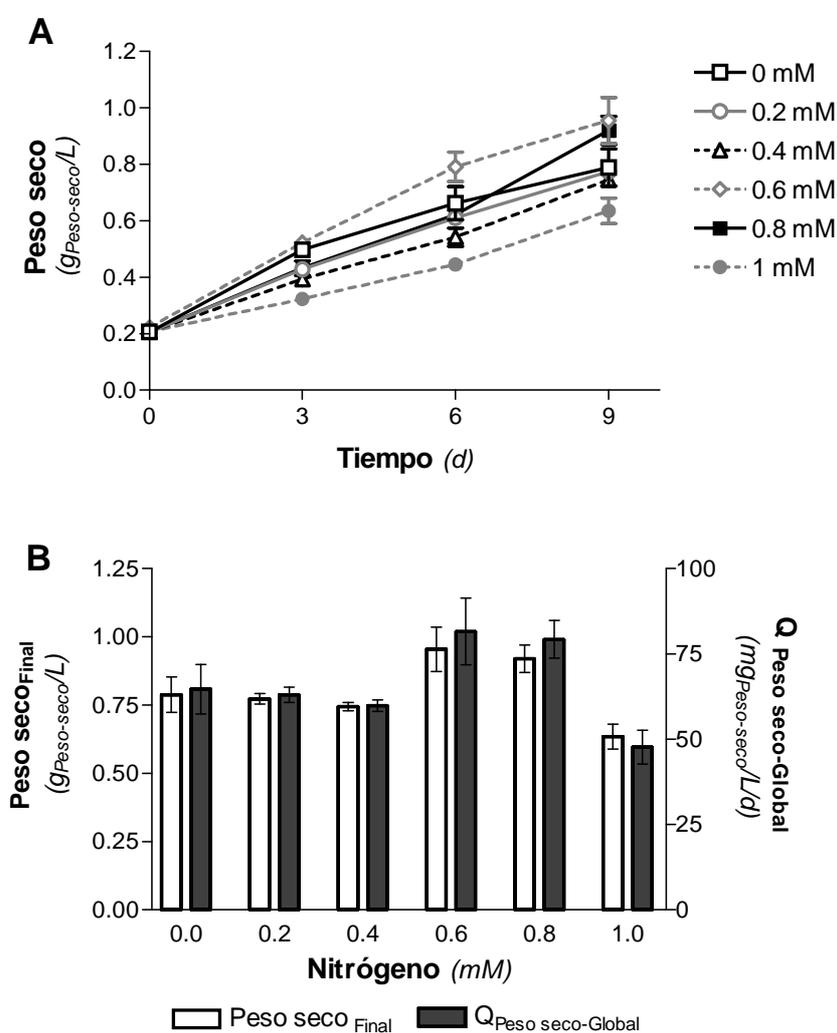
**Figura 3. Efecto de la limitación de nitrógeno sobre la densidad y masa celular. (A)** Crecimiento en términos de densidad celular durante 9 días de cultivo. **(B)** Incrementos en la densidad y masa celular después de 9 días de cultivo. Se evaluaron distintas concentraciones limitantes de nitrógeno por duplicado, excepto para  $N = 0.6$  mM, condición para la que se realizaron 4 repeticiones. Las barras indican el error estándar.



0 mM 0.2 mM 0.4 mM 0.6 mM 0.8 mM 1 mM

**Figura 4. Coloración de cultivos sometidos a distintas concentraciones limitantes de nitrógeno después de 9 días.**

El aumento de la masa celular ante la baja disponibilidad de nitrógeno fue una respuesta esperada, ya que bajo estas condiciones, se ha observado frecuentemente que el metabolismo microalgal es desviado hacia la acumulación de metabolitos – principalmente carbohidratos y/o lípidos – con el propósito de utilizar el ATP y NADPH en exceso que, ante la escasez de nutrientes, no han sido utilizados para la proliferación celular (12; 74; 75; 76; 77; 79; 81; 83). Los metabolitos acumulados desempeñan funciones diversas, siendo una de las principales el fungir como reservas de carbono y energía, para en caso de ser requerido, restablecer el crecimiento bajo condiciones de menor adversidad (12; 81).



**Figura 5. Efecto de la limitación de nitrógeno en el peso seco. (A) Crecimiento en términos de peso seco durante 9 días de cultivo. (B) Concentración final y productividad global de peso seco después de 9 días de cultivo.**

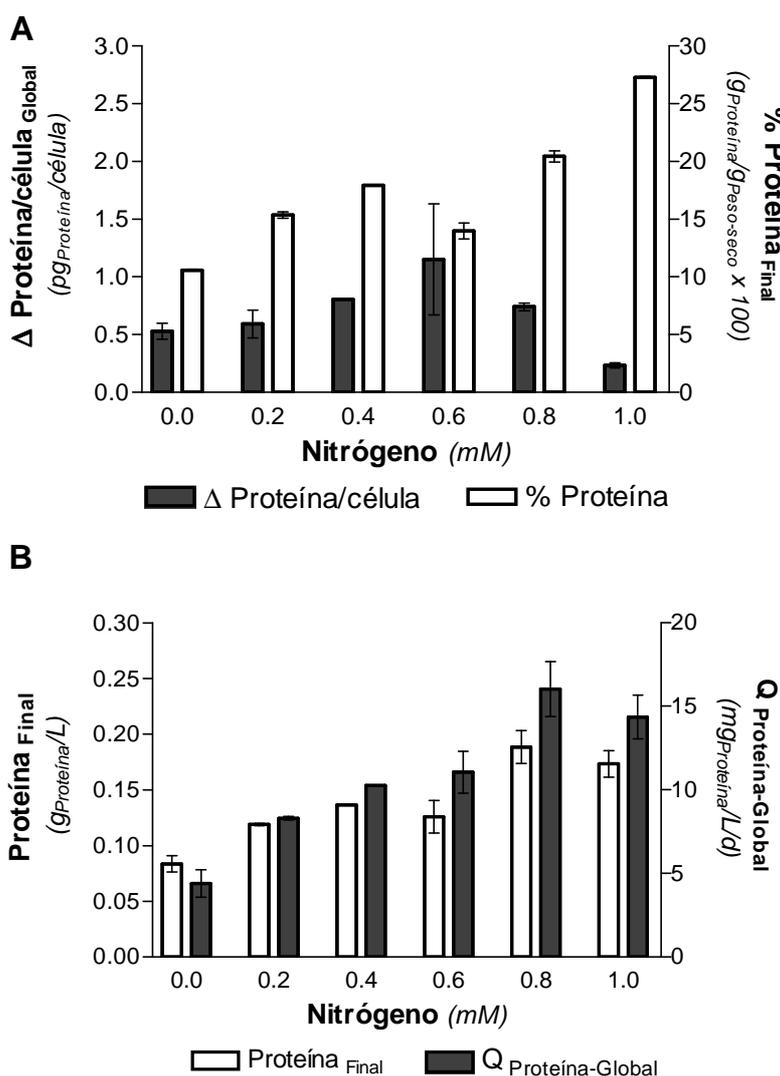
A pesar de las características adversas inherentes a la limitación de nitrógeno, en todas las condiciones evaluadas, inclusive en ausencia del nutriente, la biomasa evaluada en términos de peso seco incrementó linealmente durante los nueve días de cultivo (**Figura 5.A**), comportamiento que bajo condiciones similares fue recientemente reportado en cultivos de *N. oleoabundans* (81). En la **Figura 5.B**, se observa que los mejores parámetros de producción y productividad global de peso seco no correspondieron a las menores ni a las mayores concentraciones de nitrógeno, sino a condiciones intermedias (0.6 y 0.8 mM) resultantes del compromiso entre dos parámetros: la proliferación celular y el incremento de la masa celular, o bien, la acumulación de material de reserva. Las mayores magnitudes de concentración y productividad global de biomasa alcanzadas fueron de **0.96 g<sub>Peso seco</sub>/L** y **81.61 mg<sub>Peso seco</sub>/L/d** respectivamente, las cuales corresponden a la condición 0.6 mM.

### 6.2.3. Efecto en la composición proteica.

El contenido de proteína (%  $g_{Proteína} / g_{Peso-seco}$ ) de los cultivos evaluados presentó una tendencia descendente conforme la disponibilidad de nitrógeno fue menor (**Figura 9.A**). Este comportamiento ha sido reportado anteriormente y ha sido adjudicado a la síntesis mínima de proteínas y a la acumulación de compuestos de reserva – lípidos y carbohidratos – a expensas de compuestos nitrogenados (53; 75; 76; 82; 84). La disminución de la fracción proteica en relación a la biomasa total (%  $g_{Proteína} / g_{Peso-seco}$ ), no necesariamente implicó una reducción en el contenido de proteína de las células de *N. oleoabundans* ( $pg_{Proteína} / célula$ ), ya que este último parámetro no disminuyó, sino que incluso aumentó ligeramente en todas las condiciones estudiadas (**Figura 9.A**).

Las concentraciones finales y las productividades globales de proteína mostraron un comportamiento similar al de la fracción proteica (%  $g_{Proteína} / g_{Peso-seco}$ ), ya que estos parámetros fueron favorecidos por las concentraciones de nitrógeno superiores (**Figura 9.B**); las mayores magnitudes alcanzadas fueron de **0.19 g<sub>Proteína</sub>/L** y **16.03 mg<sub>Proteína</sub>/L/d** respectivamente, correspondientes a la condición 0.8 mM. Por su parte, las menores magnitudes observadas son debidas a la baja proliferación celular y la síntesis proteica incipiente. La importancia del análisis de los parámetros proteicos radica en que la proteína unicelular es un producto de uso potencial para la alimentación humana, la animal o la

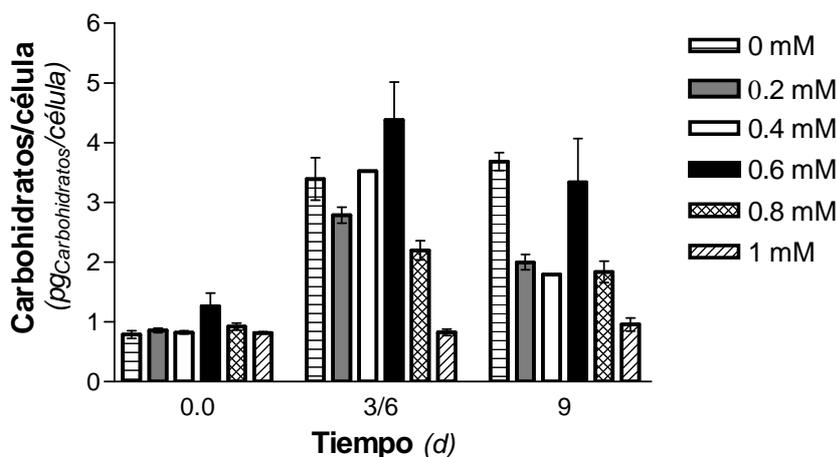
acuicultura, cuya obtención podría complementar los procesos de producción de lípidos microalgales (10). Sin embargo, la aplicación de la proteína producida depende de la calidad de la misma, y por tanto, de las operaciones mediante las cuales la biomasa microalgal sea procesada. Asimismo, cabe mencionar que los parámetros idóneos para lograr una mayor producción de proteína corresponden a elevadas concentraciones de nitrógeno y no a las condiciones descritas en este apartado (82).



**Figura 6.** Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición proteica. (A) Contenido final de proteína por unidad de peso seco e incremento global del contenido celular proteico, y (B) Concentración final y productividad global de proteína, después de 9 días.

**6.2.4. Efecto en la composición de carbohidratos.**

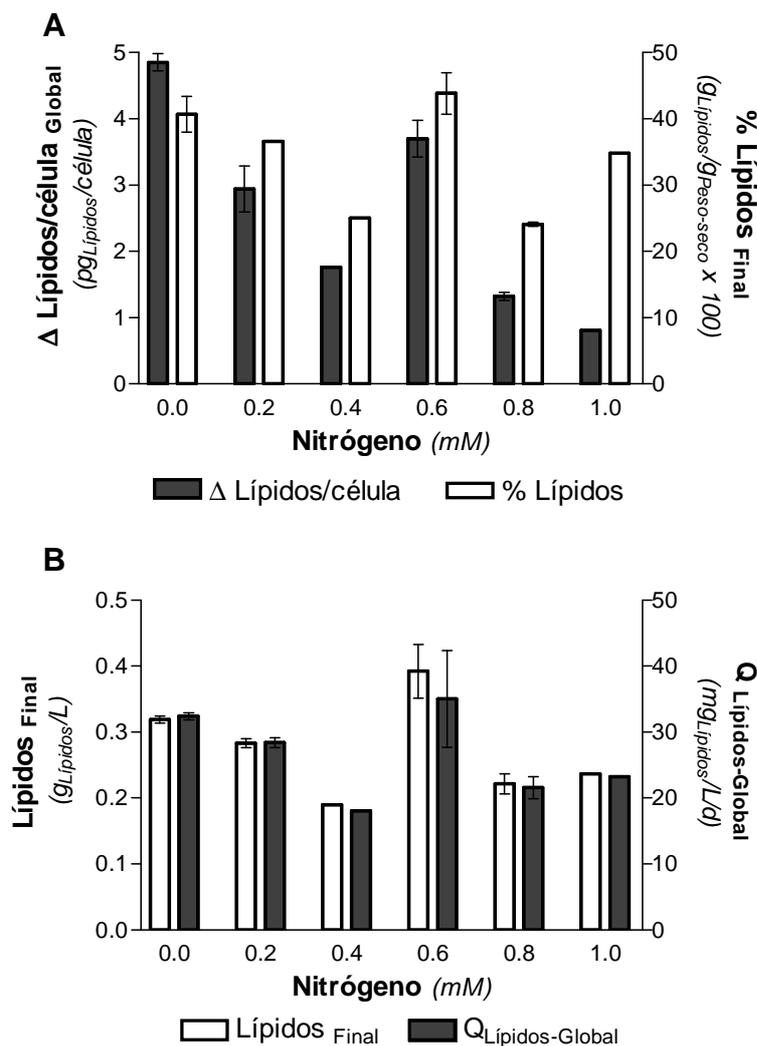
En la **Figura 7** se observa que en todas las condiciones evaluadas, excepto en la correspondiente a una mayor disponibilidad de nitrógeno (1 mM), durante el periodo comprendido entre el tercer y sexto día de cultivo, el contenido de carbohidratos por célula incrementó notablemente respecto a su valor inicial, y posteriormente en el noveno día, descendió sin llegar a ser inferior al contenido original. A partir de estas observaciones, se concluye que las concentraciones evaluadas de nitrógeno promueven la acumulación de carbohidratos en células de *N. oleoabundans*, como se ha reportado para otros cultivos microalgales bajo condiciones similares (74; 75; 76). Asimismo, se sugiere que al reducir la disponibilidad de nitrógeno, los carbohidratos fungen como una reserva parcial de carbono y energía la cual, como propuso Utting en 1985, posibilita el mantenimiento de las células durante el periodo de producción de las enzimas encargadas de la síntesis de la reserva lipídica (84).



**Figura 7. Contenido de carbohidratos por célula en cultivos sometidos a distintas condiciones limitantes de nitrógeno durante 9 días.**

**6.2.5. Efecto en la composición lipídica.**

En la **Figura 8.A** se aprecia que la deficiencia de nitrógeno, bajo las distintas concentraciones evaluadas en cultivos de *N. oleoabundans*, promovió la acumulación de lípidos, probablemente como metabolitos de reserva, en fracciones de hasta el **43.87%** (% gLípidos/gPeso-seco).



**Figura 8. Efecto de la limitación de nitrógeno en la composición lipídica.** (A) Contenido final de lípidos por unidad de peso seco e incremento global del contenido lipídico celular y, (B) Concentración final y productividad global de lípidos, después de 9 días.

En términos de producción, los mejores parámetros de concentración final y de productividad global de lípidos correspondieron a la concentración de nitrógeno **0.6 mM** (Figura 8.B), siendo las magnitudes alcanzadas de **0.39 g<sub>Lípidos</sub>/L** y **35.03 mg<sub>Lípidos</sub>/L/d**, respectivamente. Esta condición óptima de producción de lípidos, de manera análoga a la de biomasa, resultó del compromiso entre la proliferación celular y los lípidos acumulados en las células. Acorde con los resultados anteriores, esta condición (0.6 mM) fue seleccionada para la posterior evaluación del efecto de la temperatura y la deficiencia de fósforo en la composición bioquímica de *N. oleoabundans*.

La acumulación de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno, como consecuencia de la desviación del metabolismo hacia la síntesis de estos compuestos de reserva, es un comportamiento que ha sido reportado tanto para cultivos de *N. oleoabundans* (55; 79; 80; 81) como de otras microalgas oleaginosas (12; 53; 74; 76; 77; 78; 82; 83; 84; 85). Sin embargo, al inicio del presente proyecto, no se contaba con estudio alguno dirigido a la optimización de las condiciones de limitación de nitrógeno en *N. oleoabundans*, que posibilitaran dirigir el metabolismo hacia la síntesis de lípidos y a su vez, obtener elevadas producciones y productividades de lípidos para su posterior aplicación en la producción de biodiesel. En todas las condiciones de deficiencia de nitrógeno evaluadas en este proyecto, la cantidad de lípidos producida durante nueve días fue igual o inclusive 1.4 veces superior al contenido inicial de biomasa de los cultivos ( $0.2 \text{ gPeso-seco/L}$ ), comportamiento que sugiere que la fracción lipídica acumulada se originó primordialmente mediante la biosíntesis *de novo* de compuestos oleaginosos y no completamente a partir de compuestos nitrogenados intracelulares, como ha sido sugerido en otros trabajos (74; 76). Diversas funciones han sido propuestas para los lípidos almacenados bajo condiciones de estrés nutrimental, destacando las dos siguientes: fungir como una reserva de carbono y energía que, en contraste con los carbohidratos, resulta más favorable por su estado de mayor reducción y por su carácter hidrofóbico que le proporciona una mejor capacidad de compactación (12; 74; 76; 77; 79); y, actuar como sumidero de electrones al consumir las moléculas de ATP y NADPH generadas en la cadena de transporte foto-electrónico, de manera tal que se aminora el daño por estrés foto-oxidativo provocado por el exceso de electrones en la cadena de transporte fotosintética, a su vez producido por la considerable disminución de la actividad anabólica en la microalga (12; 74; 75; 76; 83). Cabe destacar que ante el riesgo de daño foto-oxidativo, en ocasiones la deficiencia de nitrógeno promueve la producción de pigmentos carotenoides (12; 74; 75; 78).

La disminución del contenido de clorofila ( $\text{mgClorofila/gBiomasa}$ ) bajo limitación de nitrógeno, es un comportamiento que ha sido reportado en cultivos de microalgas, incluyendo *N. oleoabundans* (53; 79; 81; 82; 86; 87). Se han planteado distintas explicaciones a este fenómeno. Una de las más usuales consiste en que la disminución del pigmento sucede con el propósito de reducir la cantidad de energía colectada y por ende,

aminorar la saturación del sistema de transporte electrónico fotosintético (86; 87; 88). El elevado contenido de clorofila constituye un beneficio para las microalgas en su estado nativo, ya que les posibilita la absorción de luz en ambientes limitados en ésta (88). Sin embargo, el alto contenido de este pigmento bajo condiciones de elevada intensidad luminosa, promueve la absorción de una cantidad de energía superior a la que es posible asimilar por el sistema fotosintético, exceso que resulta desfavorable para la productividad en sistemas de cultivo microalgal por las razones siguientes: a) hasta el 80% de la energía absorbida puede ser disipada, y por tanto desaprovechada, como calor y fluorescencia; b) la disipación de energía por las células expuestas directamente al flujo luminoso, priva al resto de ellas del acceso a éste; y, c) la absorción de un elevado flujo de fotones conlleva a fenómenos de fotoinhibición (88; 89). La disminución de la fracción de clorofila, como resultado de la deficiencia de nitrógeno en este caso particular, permite así superar estos inconvenientes, ya que la cantidad de luz absorbida por las células es menor y el resto del flujo luminoso es transmitido a través del reactor sin ser considerablemente atenuado, de tal modo que la luz es aprovechada por la mayoría de las células y la productividad del cultivo debería ser superior (77; 79; 81; 88; 89).

De acuerdo a lo anterior, podría esperarse que la condición óptima de producción y productividad lipídica (0.6 mM) haya sido resultado de una elevada eficiencia fotosintética debida a la reducción en la proporción del pigmento, sin haber comprometido la integridad del aparato fotosintético, la cual depende de un requerimiento mínimo de clorofila y de proteína cloroplástica (77; 79; 81; 86; 88; 89). La afirmación anterior es sólo una hipótesis, no obstante destaca la importancia de estudiar detalladamente en cultivos restringidos en nitrógeno la eficiencia fotosintética en términos de la luz transferida en el cultivo, la proporción de ésta absorbida por la célula y la energía particularmente destinada a la producción de biomasa, ya que cabe destacar que no todos los electrones transportados por el fotosistema II necesariamente son destinados a la fijación de carbono, sino que bajo condiciones de estrés abiótico, éstos pueden ser redirigidos a la reducción de nitratos, a la reducción de oxígeno para dar lugar al ciclo agua-agua o a un transporte cíclico en torno del fotosistema I con el propósito de atenuar la fotoinhibición o producir más ATP (81; 86; 87; 90).

---

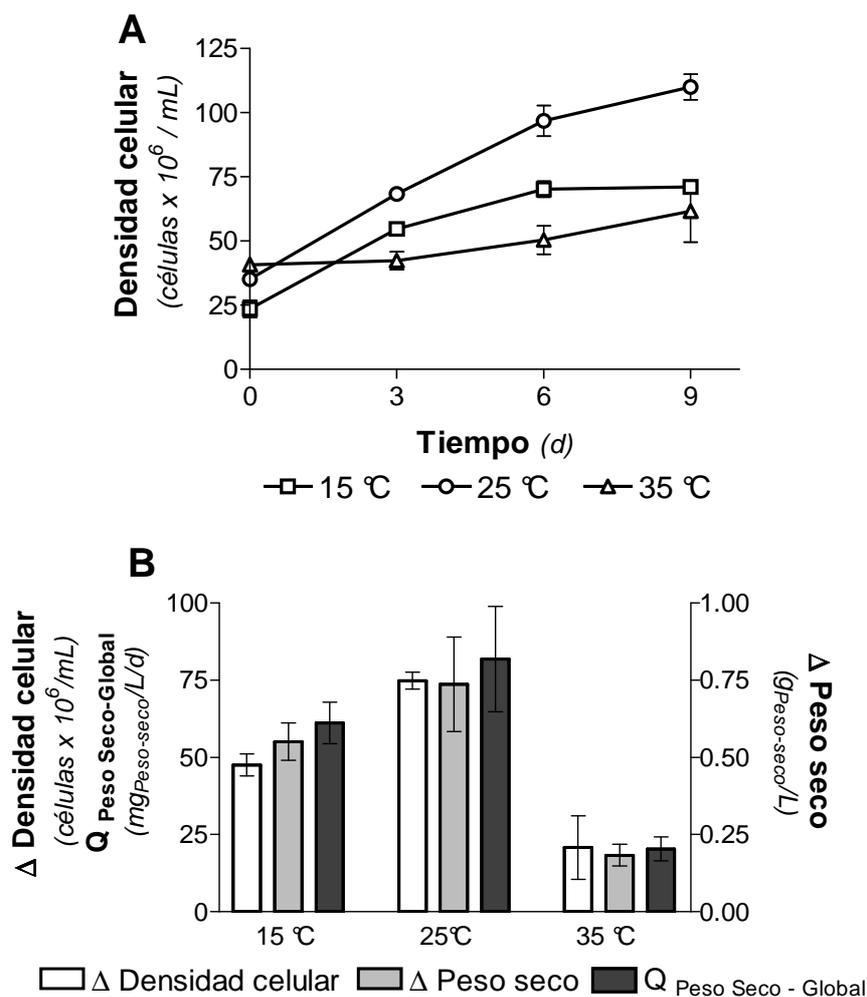
### 6.3. Efecto de la temperatura en la composición bioquímica de cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno.

El efecto de la temperatura en cultivos de *N. oleoabundans* se evaluó bajo la condición de deficiencia de nitrógeno (0.6 mM) seleccionada en el apartado anterior. Las temperaturas evaluadas fueron 15, 25 y 35°C, dos de las cuales nunca han sido descritas para cultivos de la microalga, ya que ésta sólo ha sido estudiada en el intervalo de 17 a 31°C (52; 55; 56; 58; 60; 79; 80; 81). La selección de las temperaturas evaluadas se fundamentó en el promedio anual de las temperaturas máximas, medias y mínimas registradas en México, desde 1980 hasta la presente década (91).

Cabe mencionar que previo a la evaluación del efecto de la temperatura, se tuvieron problemas de contaminación bacteriana de los cultivos de la microalga. A partir de numerosas pruebas, se decidió preparar los inóculos de *N. oleoabundans* bajo condiciones de aireación enriquecidas con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v) y en medios de cultivo adicionados con amoxicilina (0.5 g/L) y ácido clavulánico (0.125 g/L). De este modo, la influencia de la temperatura se estudió bajo condiciones estándar similares a las de los cultivos del apartado anterior (cultivos de 1 L con 2 vvm – 0.035% CO<sub>2</sub> v/v – de aireación, iluminación continua de 100 µE/m<sup>2</sup>/s y agitación mecánica de 150 rpm), sin embargo a diferencia de éstos, las células empleadas para el presente estudio derivaron de inóculos enriquecidos con CO<sub>2</sub> y adicionados con antibiótico, como se indicó previamente.

#### 6.3.1. Efecto en el crecimiento: densidad celular y peso seco.

El crecimiento en términos de densidad celular en cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno (0.6 mM) fue atenuado a las temperaturas de 15 y 35°C, disminución que resultó más drástica a los 35°C (**Figura 9: A, B**). La masa celular presentó un comportamiento independiente a la temperatura, por ende las variaciones observadas en los parámetros de producción y productividad de biomasa fueron consecuencia de la proliferación celular en los cultivos y de la temperatura de los mismos (**Figura 9.B**). Cabe mencionar que en todas las temperaturas evaluadas, nuevamente se observó el crecimiento lineal característico de los cultivos microalgales limitados en nutrientes (**Figura 9.A**).

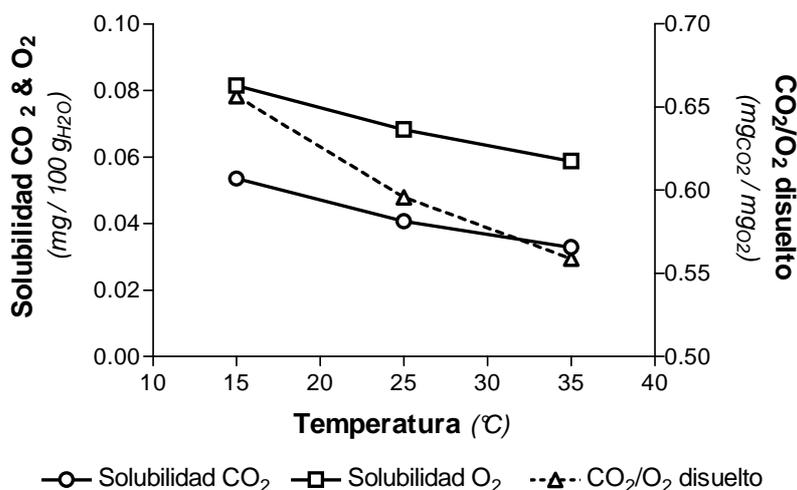


**Figura 9. Efecto de la temperatura en la densidad celular y el peso seco de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM).** (A) Crecimiento en términos de densidad celular durante 9 días de cultivo. (B) Incremento neto en la densidad celular, producción y productividad global de peso seco después de 9 días de cultivo. Las evaluaciones se realizaron por duplicado bajo condiciones restringidas de Nitrógeno (0.6 mM) a distintas temperaturas (15, 25, 35°C). Las barras indican el error estándar.

Bajo la condición de deficiencia de nutrientes evaluada, la temperatura de 25°C posibilitó obtener las mayores magnitudes de concentración final y productividad global de peso seco (1.05 g<sub>Peso-seco</sub>/L y 81.85 mg<sub>Peso-seco</sub>/L/d), sin embargo estos parámetros no fueron drásticamente afectados a 15°C e incluso, a pesar de que la microalga no creció notablemente a 35°C, se demuestra que ésta tolera temperaturas relativamente elevadas.

La influencia de la temperatura en el estado fisiológico de las células, en particular el efecto desfavorable de las bajas temperaturas en su crecimiento, ha sido reportado para algunas microalgas (54; 74; 92; 93; 94) y ha sido atribuido primordialmente, a que las bajas temperaturas aletargan el metabolismo al reducir la velocidad de la mayoría de las reacciones enzimáticas (74; 92; 94). No obstante, cabe destacar que la velocidad de las reacciones fotoquímicas es independiente de la temperatura, de manera tal que ante un metabolismo aletargado por las bajas temperaturas, las células microalgales suelen disminuir la fracción de compuestos involucrados en las reacciones fotoquímicas, principalmente clorofila, con el propósito de reducir la cantidad de energía colectada y a su vez, incrementar la proporción de los compuestos que son sensibles a las bajas temperaturas (74; 92; 94). En los cultivos de *N. oleoabundans* a 15°C, en contraste con aquellos a temperaturas superiores, se observó una notable disminución en su coloración verde, comportamiento que sugiere una reducción en el contenido de clorofila. La afección del crecimiento de esta microalga a bajas temperaturas, de un modo menos drástico que a 35°C, se adjudica principalmente a la elevada solubilidad del CO<sub>2</sub> a 15°C (**Figura 10**), asimismo, la conducta observada también puede ser atribuida a la probable mejoría en la eficiencia fotosintética del cultivo microalgal como consecuencia de la disminución en el contenido de clorofila, hipótesis que debe ser evaluada experimentalmente.

El efecto de la temperatura elevada sobre el crecimiento microalgal, está dado por la dependencia a este parámetro por parte de la estructura de los compuestos celulares, en particular de las proteínas (54; 95). Mecanismos de desnaturalización proteica posiblemente influyeron en la reducción del crecimiento en cultivos de *N. oleoabundans* restringidos en nitrógeno a 35°C, no obstante, este fenómeno seguramente no fue predominante ya que no se observó una disminución en la densidad celular e incluso, las células proliferaron ligeramente, por lo que se concluye que éstas toleraron la temperatura de 35°C.



**Figura 10. Solubilidad del CO<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub> a distintas temperaturas.** Solubilidades teóricas del CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y fracción de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> disuelto a las temperaturas evaluadas. Se considera que la composición del aire ambiente es 0.035% CO<sub>2</sub> y 20.94% O<sub>2</sub> (v/v) y que la presión del sistema es de 0.8 atm (correspondiente a la presión atmosférica del sitio donde se realizaron los experimentos).

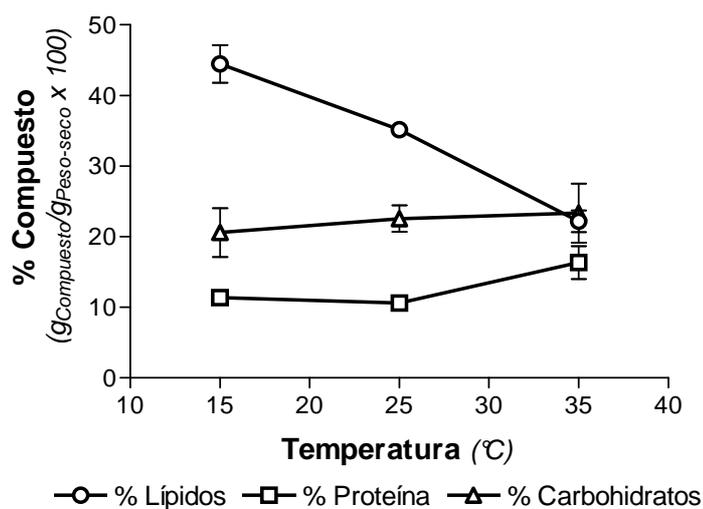
El descenso observado en el crecimiento, puede ser atribuido a la baja disponibilidad de la fuente de carbono (CO<sub>2</sub>) en los cultivos a causa de su menor solubilidad a temperaturas elevadas (**Figura 10**), aunada a la mínima proporción contenida de este compuesto en el aire (0.035% v/v) (96; 97). La rubisco (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) es la enzima encargada de fijar el CO<sub>2</sub>, sin embargo, ésta también presenta una actividad oxigenasa que cataliza la reacción entre el O<sub>2</sub> y la ribulosa-1,5-bifosfato, proceso denominado como fotorespiración, el cual implica el consumo de O<sub>2</sub>, la pérdida de CO<sub>2</sub> y por lo tanto, la reducción en la eficiencia de fijación de carbono (96; 98). El CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> compiten por el sitio activo de la rubisco de tal modo que, a las concentraciones de éstos en el aire, la reacción de carboxilación es tres veces más rápida que la de oxidación, no obstante debido a la elevada proporción comprendida por el O<sub>2</sub>, el fenómeno de fotorespiración es notable y, a elevadas temperaturas, es considerablemente acentuado por la disminución en la proporción de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (**Figura 10**) (96; 99; 100). De este modo, se sugiere que el incipiente crecimiento observado a 35°C posiblemente fue causado por la menor disponibilidad de CO<sub>2</sub> y la reducida eficiencia de fijación del mismo. Estudios adicionales, por ejemplo, el enriquecimiento de la fracción de CO<sub>2</sub> en la

alimentación de gas a temperaturas relativamente altas, permitirán comprobar esta hipótesis. La supervivencia de *N. oleoabundans* bajo estas condiciones adversas, puede adjudicarse a algún mecanismo de concentración de carbono encargado de incrementar la proporción de CO<sub>2</sub> en torno a la rubisco, proceso cuya activación a elevadas temperaturas ha sido reportado para varias especies de microalgas (97; 101; 102).

### 6.3.2. Efecto en la composición bioquímica.

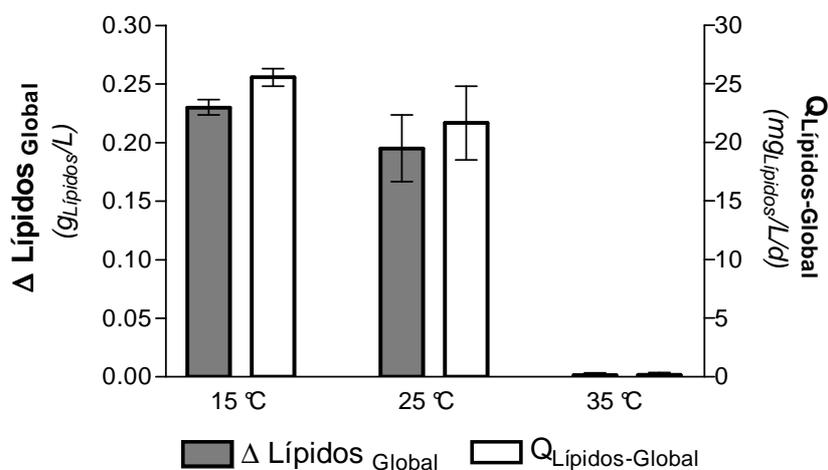
La temperatura es un parámetro que influye notablemente en la composición bioquímica de la biomasa microalgal, sin embargo no ha sido posible establecer un patrón consistente de su efecto sobre las fracciones de lípidos, carbohidratos y proteína (12; 83; 93; 94).

En la **Figura 11** se observa que en los cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno (0.6 mM), la fracción glucídica presentó un comportamiento independiente de la temperatura, el contenido de lípidos fue superior conforme la temperatura disminuyó y, por el contrario, la fracción de proteína fue mayor a temperaturas elevadas. A pesar de que no se han establecido tendencias generales, el comportamiento observado en las fracciones lipídica y proteica de *N. oleoabundans*, fue similar al reportado para otras microalgas (93; 94; 103).



**Figura 11. Efecto de la temperatura en la composición bioquímica de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.**

Por su parte, los parámetros de producción y productividad global de lípidos bajo condiciones restringidas de nitrógeno, fueron desfavorecidos por las temperaturas elevadas y beneficiados por las más bajas (**Figura 12**). A la temperatura de 15°C, se obtuvieron los mayores valores de producción y productividad global de lípidos (**0.23 g<sub>Lípidos</sub>/L** y **25.56 mg<sub>Lípidos</sub>/L/d**), sin embargo las magnitudes conseguidas a 25°C no resultaron muy distintas (**0.20 g<sub>Lípidos</sub>/L** y **21.67 mg<sub>Lípidos</sub>/L/d**), e incluso las concentraciones finales de lípidos alcanzadas en ambos casos fueron prácticamente iguales (**0.36 g<sub>Lípidos</sub>/L**). La aplicación de bajas temperaturas en cultivos de la microalga restringidos en nitrógeno, a pesar de las altas producciones observadas, debe considerarse con reserva, ya que se ha reportado ampliamente que con el propósito de aclimatar a las células, mantener la viscosidad de las membranas, conservar el transporte a través de éstas y proteger las proteínas embebidas en ellas, las microalgas tienden a incrementar el grado de insaturación de sus ácidos grasos, circunstancia que resulta desfavorable para la producción de biodiesel de calidad (12; 74; 83; 104; 105; 106).



**Figura 12. Efecto de la temperatura en la producción y productividad lipídica de cultivos limitados en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.**

Recientemente, se ha demostrado que la afinidad de los sistemas microalgales de asimilación de nitratos es dependiente de la temperatura, de manera tal que la afinidad por este sustrato es disminuida conforme la temperatura del sistema es menor a la óptima, comportamiento que es atribuido primordialmente a alteraciones en las propiedades físicas de la membrana celular (95; 105). La disminución de la capacidad de asimilación de

nitratos a bajas temperaturas, conlleva a la exacerbación de la condición de limitación de nitrógeno en los cultivos microalgales (92; 95; 107). Los elevados parámetros lipídicos alcanzados a 15°C en los cultivos de *N. oleoabundans*, probablemente fueron consecuencia de los mayores requerimientos de nitrógeno inherentes a las temperaturas inferiores, asimismo, una mayor eficiencia fotosintética del cultivo como resultado de la reducción en el contenido de clorofila, pudo haber coadyuvado la consecución de altas producciones y productividades del material oleaginoso.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado (6.3), se concluye que la temperatura de 25°C fue la mejor para la productividad y producción global de biomasa y lípidos en cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno (0.6 mM). Por tanto, el efecto de la limitación de fósforo se evaluó sobre esta condición de cultivo. Cabe mencionar que a pesar de los elevados parámetros lipídicos favorecidos por la temperatura de 15°C, esta condición no fue considerada para las evaluaciones posteriores por el alto grado de insaturación que muy probablemente promovió en los ácidos grasos, el cual como se ha mencionado, es inapropiado para la producción de biodiesel.

#### **6.4. Efecto de la limitación de fósforo en la composición bioquímica de cultivos de *N. oleoabundans* deficientes en nitrógeno.**

El efecto de la limitación de fósforo se estudió sobre la condición de deficiencia de nitrógeno (0.6 mM) a la temperatura de 25°C. Se evaluaron tres distintas concentraciones de fósforo: 0.005, 0.05 y 0.095 mM. El valor central de limitación de fósforo (0.05 mM) se determinó por medio de la estimación teórica de la concentración de fósforo necesaria para permitir la duplicación de cultivos de la microalga con una densidad celular inicial de  $40 \times 10^6$  células/mL, para lo cual se consideró además una composición teórica elemental generalizada de las microalgas con un contenido promedio de fósforo de  $11 \mu\text{g P/mg P}_{\text{seco}}$ (53). Como aproximación, se determinó el contenido de fósforo por célula de *N. oleoabundans* de acuerdo a:

$$\text{Fósforo}_{\text{célula}} = \frac{\text{Biomasa} \cdot \text{Fósforo}_{\text{Biomasa}}}{\text{Densidad celular}}$$

Donde:  $Fósforo_{célula}$  es el contenido de fósforo por célula de la microalga;  $Biomasa$  es la concentración de biomasa, en términos de peso seco, del cultivo microalgal ( $0.33 g_{Peso\ seco}/L$ );  $Fósforo_{Biomasa}$  es el contenido teórico promedio de fósforo en la biomasa microalgal ( $11 \mu gP/mg_{Peso\ seco}$ );  $Densidad\ celular$  es la concentración de células alcanzada por el cultivo ( $87 \times 10^6$  células/mL). De este modo, una vez determinado el contenido de fósforo por célula ( $0.04 pg_{Fósforo}/célula$ ), se estimó la concentración de fósforo correspondiente a la densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL, la cual fue de 0.05 mM. Esta concentración de fósforo, teóricamente sólo posibilitaría la duplicación de la densidad celular para la cual el cálculo fue realizado.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos a partir de los cultivos limitados en fósforo, fueron comparados con los derivados del apartado 6.3, en particular con el experimento a 25°C, el cual funge como control al ser un cultivo deficiente en nitrógeno (0.6 mM) incubado a la temperatura evaluada (25°C), sin restricción alguna de fósforo (1.72 mM).

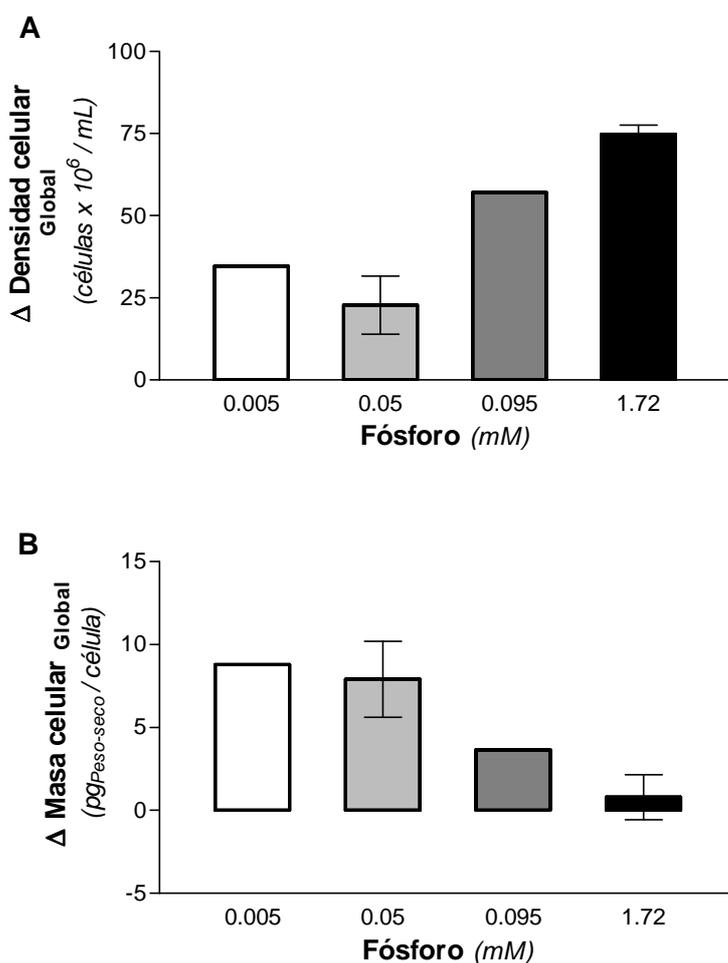
### 6.4.1. Efecto en el crecimiento: densidad celular y peso seco.

La limitación de fósforo provocó una notable disminución en la proliferación celular (**Figura 13.A**). Por el contrario, en contraste con cultivos de *N. oleoabundans* suficientes en fósforo (1.72 mM) restringidos sólo en nitrógeno, la masa celular incrementó en magnitudes de hasta 8.8 pg/célula (**Figura 13.B**).

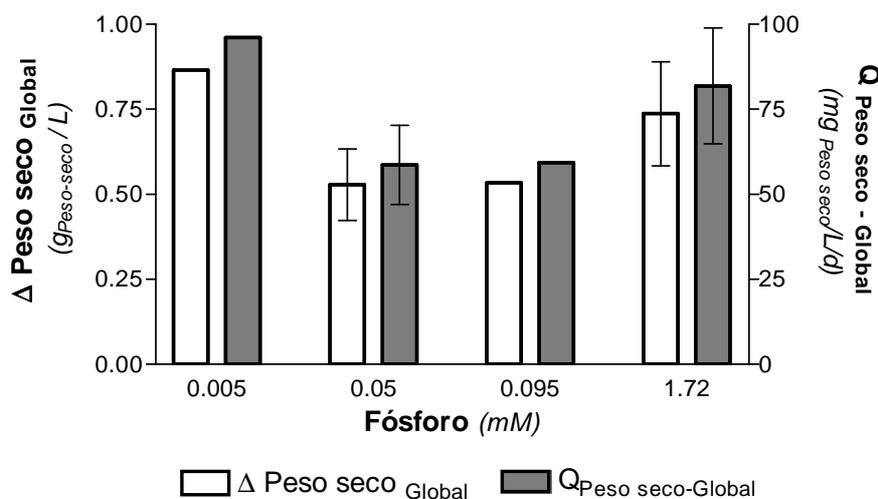
En la **Figura 14**, se observa que la limitación de fósforo en cultivos deficientes en nitrógeno, no promovió producciones ni productividades globales de biomasa superiores a las obtenidas bajo condiciones de suficiencia de fósforo (1.72 mM). Sin embargo, cabe mencionar que la condición de mayor deficiencia de fósforo (0.005 mM), posibilitó alcanzar parámetros biomásicos similares a los obtenidos bajo suficiencia de este nutriente, muy probablemente, como consecuencia de la acumulación de metabolitos de reserva en las células de *N. oleoabundans*.

El efecto de la limitación de fósforo en cultivos de *N. oleoabundans* no ha sido reportado previamente, sin embargo la atenuación en la proliferación celular observada como consecuencia de la disminución en la disponibilidad del nutriente, es un fenómeno

que ha sido reportado para otras especies de microalgas (75; 77; 108; 109). La disminución de la división celular se ha atribuido a la reducción en la velocidad de la fotosíntesis, a una menor eficiencia fotosintética (75; 109) y a la alteración de los procesos de transferencia de energía, condición que se ha reportado que se manifiesta a través de la reducción en los niveles de ATP de la microalga (53; 110; 111). A pesar de la disminución en la proliferación celular de *N. oleoabundans* bajo limitación de fósforo, ésta no dejó de dividirse por completo, e inclusive, fue capaz de almacenar metabolitos de reserva, como se ha reportado para otras microalgas restringidas en fósforo (53; 75; 77; 108; 109).



**Figura 13.** Efecto de la limitación de fósforo en el incremento de la densidad y la masa celular de cultivos deficientes en nitrógeno ( $0.6 \text{ mM}$ ) después de 9 días. Se evaluaron distintas concentraciones de fósforo en cultivos limitados en nitrógeno ( $0.6 \text{ mM}$ ) a  $25^\circ\text{C}$ . Las barras indican el error estándar sólo en los experimentos evaluados por duplicado.



**Figura 14. Efecto de la limitación de fósforo en la producción y productividad global de biomasa en cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.**

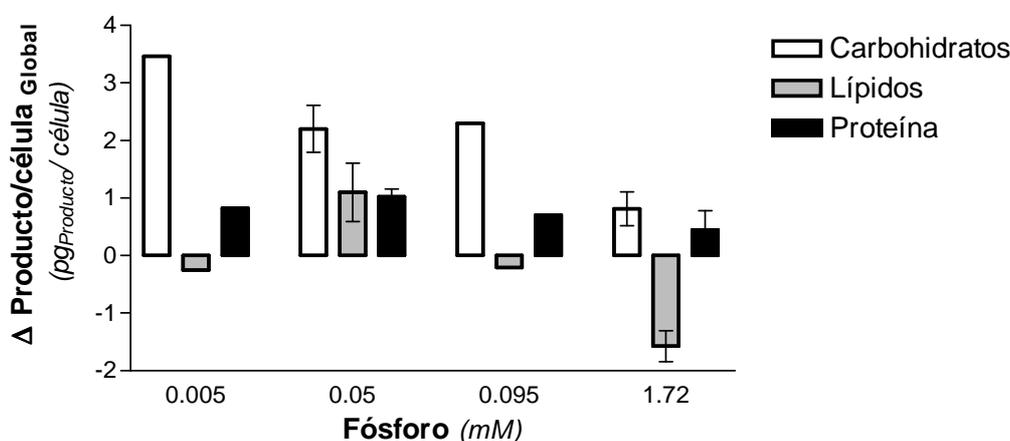
Se ha reportado que las microalgas bajo condiciones de limitación de fósforo, modifican su metabolismo y utilizan mecanismos diversos que les posibilitan sobrevivir a estas condiciones de estrés nutricional (75; 77; 90; 108; 109; 110; 112). Uno de tales mecanismos que posiblemente permitió la supervivencia de *N. oleoabundans*, ha sido reportado para distintas especies de microalgas y consiste en el consumo de reservas intracelulares de fósforo, principalmente polifosfatos, producidas previamente bajo condiciones de suficiencia del nutriente, las cuales ante la deficiencia del mismo fungen como fuentes de fósforo y energía (53; 110; 111; 112; 113). Otro proceso que se ha reportado es la reducción del flujo fotosintético, en particular a través del fotosistema II. Esta disminución afecta tanto la velocidad de la fotosíntesis como la eficiencia de la misma, y es consecuencia de la transición del aparato fotosintético del estado 1 (la mayoría de la energía absorbida es dirigida a los centros de reacción del fotosistema II) al 2 (la fracción de la energía absorbida que es dirigida al fotosistema II es mínima) y de la disminución en la cantidad de centros de reacción funcionales del fotosistema II, como resultado de la fotoinhibición y del incremento en la proporción de centros de reacción  $Q_B$ -no reductores (75; 109). Tales alteraciones en el aparato fotosintético permiten la disipación de la energía absorbida tanto a manera de calor como a través de su redirección hacia el fotosistema I, donde a pesar de la producción de un menor número de equivalentes reductores

(NADPH+H), el flujo cíclico de electrones en torno a este fotosistema posibilita la producción de moléculas de ATP necesarias para la supervivencia de las células limitadas en fósforo (75; 86; 90; 109).

Cabe destacar que al evaluar el efecto de la deficiencia de fósforo en cultivos de *N. oleoabundans* reducidos en nitrógeno (0.6 mM), no se pretendió obtener un efecto aritmético o geométrico como consecuencia de la disminución en la disponibilidad de ambos elementos, ya que se sabe que generalmente el comportamiento de las microalgas es regulado sólo por el nutriente cuya disponibilidad es la menor (110; 112; 114; 115). No obstante, se conoce que el crecimiento de las microalgas se encuentra regulado por una relación N:P óptima. La magnitud de esta relación depende de factores tales como la especie de microalga, la temperatura, la fuente de nitrógeno, la velocidad de crecimiento, los fotoperiodos, entre otros. La transición entre la limitación debida ya sea a uno u otro nutriente puede suscitarse repentinamente, donde magnitudes de N:P inferiores al valor óptimo indican que el sistema está limitado en nitrógeno, mientras que valores superiores señalan una limitación por fósforo (53; 107; 110; 112; 114; 115). La relación N:P óptima de 16:1, denominada como relación de Redfield, fue propuesta en 1958 para el fitoplancton en general, sin embargo no es posible generalizar su aplicación. A pesar de que algunas microalgas presentan relaciones N:P similares a la de Redfield, se ha demostrado que estas magnitudes varían ampliamente entre diversas especies microalgales en un intervalo de 7:1 a 53:1 (110; 112; 114; 115). El valor óptimo de la relación N:P para *N. oleoabundans* no ha sido determinado, no obstante al comparar el valor N:P de 0.35 para los cultivos limitados exclusivamente en nitrógeno (0.6 mM), con las relaciones N:P de 6.32 (P = 0.095 mM), 12 (P = 0.05 mM) y 120 (P = 0.005 mM) correspondientes a los cultivos evaluados bajo la deficiencia tanto de nitrógeno (0.6 mM) como de fósforo, se concluye que probablemente el comportamiento de los últimos tres fue regido por la limitación de fósforo, ya que las magnitudes de sus relaciones N:P fueron considerablemente superiores, por lo menos 18 veces, a la del cultivo limitado sólo en nitrógeno. Asimismo, el comportamiento observado en los cultivos de *N. oleoabundans* bajo restricción de fósforo y nitrógeno, coincide con el reportado para otras especies de microalgas limitadas en fósforo. Sin embargo, la limitación de este nutriente debe ser demostrada experimentalmente a través de la cuantificación del contenido de fósforo tanto en el medio de cultivo, como en las células de la microalga.

**6.4.2. Efecto en la composición bioquímica.**

Como se señaló en la sección 6.4.1., a consecuencia de la deficiencia de fósforo, se observó un notable aumento de la masa celular, debido a la acumulación de reservas de carbono (75; 77; 108; 109; 110). En la **Figura 15** se observa que, durante el periodo evaluado, concentraciones menores de fósforo favorecieron la acumulación de carbohidratos como el principal metabolito de reserva. Por el contrario, la acumulación de lípidos fue poco perceptible e incluso, bajo ciertas condiciones de limitación de fósforo, se redujo el contenido inicial de lípidos en las células. Por su parte, en la **Figura 15** también se muestra que la variación en el contenido celular de proteína fue poco significativa.



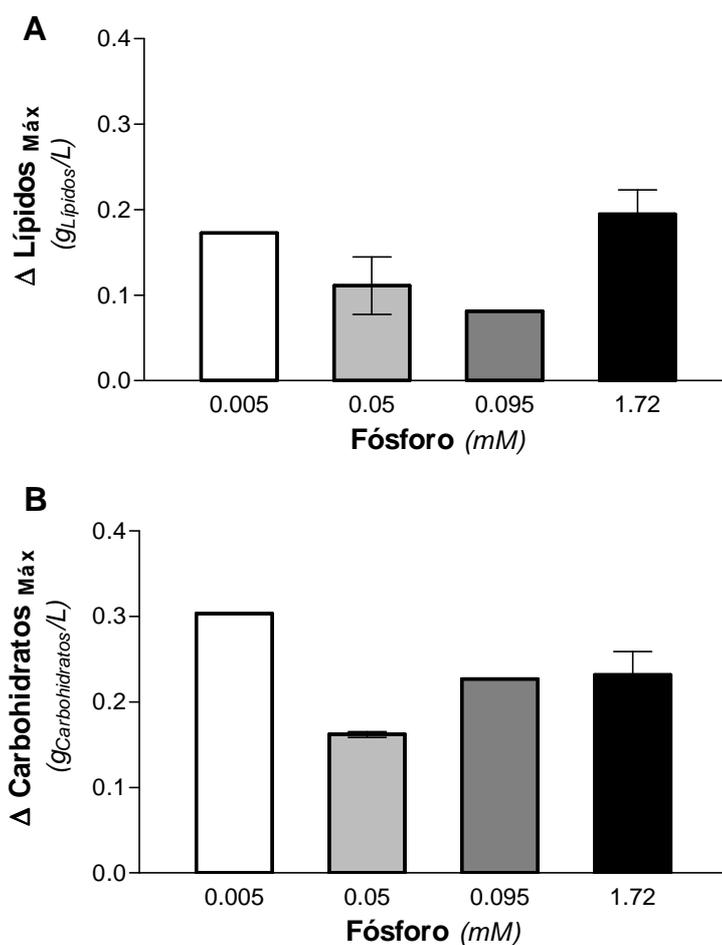
**Figura 15. Efecto de la limitación de fósforo en la composición bioquímica celular de cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) después de 9 días.**

En la **Figura 16.A**, se observa que, a consecuencia de la minúscula acumulación de lípidos en las células, en ninguna de las condiciones de limitación de fósforo evaluadas, se obtuvieron producciones máximas lipídicas mayores a las alcanzadas bajo suficiencia del nutriente. Por tanto, se concluye que las condiciones de deficiencia de fósforo evaluadas en cultivos de *N. oleoabundans* con baja disponibilidad de nitrógeno, no son convenientes para la producción de lípidos.

Por su parte, la producción máxima de carbohidratos fue favorecida bajo las condiciones de mayor deficiencia de fósforo (0.005 mM), donde se alcanzó una producción máxima de hasta **0.3 gCarbohidratos/L**, la cual fue 31% superior a la obtenida bajo suficiencia

del nutriente (**Figura 16.B**). Esta producción de carbohidratos fue la mayor que se obtuvo en contraste con el resto de las condiciones de cultivo evaluadas en este proyecto.

Acorde con lo anterior, se concluye que a pesar de que las condiciones de deficiencia de fósforo en cultivos de *N. oleoabundans* restringidos en nitrógeno, no favorecieron la obtención de elevadas cantidades de lípidos, tales parámetros resultaron ventajosos para lograr altas producciones de carbohidratos.



**Figura 16. Efecto de la limitación de fósforo en la producción máxima de lípidos y carbohidratos en cultivos deficientes en nitrógeno (0.6 mM) durante 9 días.**

En condiciones de limitación de fósforo, se ha reportado la acumulación de lípidos como metabolitos de reserva por parte de ciertas microalgas, sin embargo no ha sido posible generalizar este comportamiento, ya que en otras especies bajo estas condiciones de

estrés nutricional, al igual que lo obtenido en este proyecto, se ha observado una disminución en el contenido lipídico (53; 75; 77; 108). En los cultivos de *N. oleoabundans* bajo deficiencia de fósforo, los carbohidratos fungieron como la principal reserva de carbono, comportamiento que ha sido reportado para otras especies de microalgas tales como *Chlamydomonas reinhardtii* (108; 109; 110). Se sabe que la limitación de fósforo favorece el flujo cíclico de electrones en el fotosistema I. Este comportamiento, implica la producción de ATP suficiente para sobrellevar la condición de limitación de fósforo, aunque la formación de NADPH+H es notablemente disminuida (75; 109). De este modo, a diferencia de las condiciones de deficiencia de nitrógeno, la limitación de fósforo en *N. oleoabundans* promovió la incorporación de los átomos de carbono a manera de carbohidratos, probablemente por el menor estado de reducción de éstos en contraste con los lípidos (71; 74).

### **6.5. Efecto del enriquecimiento del suministro de aire con CO<sub>2</sub> en inóculos de *N. oleoabundans* y en su posterior empleo en cultivos limitados en nitrógeno.**

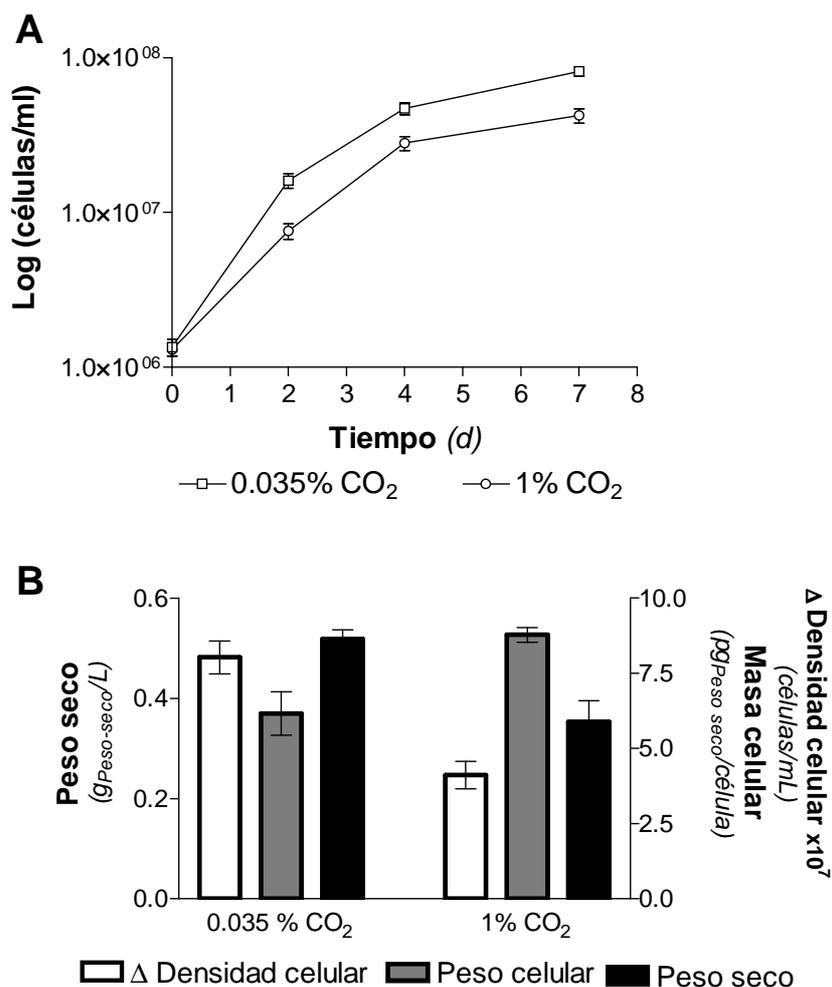
El principal objetivo de los experimentos descritos en el presente apartado, fue el de determinar el efecto del enriquecimiento del flujo de aireación con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v), en contraste con el suministro únicamente de aire (0.035% CO<sub>2</sub> v/v), en el crecimiento y la composición bioquímica de inóculos de *N. oleoabundans*. Asimismo, los experimentos se realizaron con la finalidad de evaluar si el empleo de inóculos obtenidos a partir de flujos ricos en CO<sub>2</sub>, afectaba los parámetros de producción y productividad de biomasa y lípidos bajo las condiciones de limitación de nitrógeno determinadas en el apartado 6.2.

En los inóculos de *N. oleoabundans*, se evaluó el efecto de dos distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el flujo de aireación, 0.035% (contenido teórico de CO<sub>2</sub> en el aire ambiente) y 1% v/v, usando el mismo flujo total de gas de 2 vvm. Por su parte, las células derivadas de los inóculos a las distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> estudiadas, fueron evaluadas por separado bajo condiciones análogas de limitación de nitrógeno (0.6 mM) con un flujo de aireación de 2 vvm con CO<sub>2</sub> al 0.035% v/v.

### 6.5.1. Efecto del enriquecimiento del suministro de aire con CO<sub>2</sub> en el crecimiento y composición bioquímica de inóculos de *N. oleoabundans*.

En contraste con el suministro de aire ambiente (0.035% v/v) a los inóculos de *N. oleoabundans*, el enriquecimiento del flujo de aire con CO<sub>2</sub> al 1% v/v, redujo la proliferación celular y por tanto, después de siete días, sólo permitió alcanzar una densidad celular 50% menor a la obtenida en los cultivos con CO<sub>2</sub> al 0.035% (**Figura 17.A-B**). En la **Figura 17.B** se observa que en los inóculos con menor proliferación celular, con CO<sub>2</sub> al 1%, se favorecieron elevadas masas celulares, las cuales fueron 42% mayores a las alcanzadas en los inóculos con aire. Este comportamiento sugiere que, en los inóculos ricos en CO<sub>2</sub> *N. oleoabundans* se encontraba bajo alguna condición de estrés que, a su vez, promovió la acumulación de ciertos metabolitos en las células microalgales. Por su parte, en los cultivos con CO<sub>2</sub> al 0.035%, se obtuvo una concentración final de peso seco de **0.52 g<sub>Peso-seco</sub>/L**, magnitud que fue superior en un 32% a la lograda en los cultivos enriquecidos con CO<sub>2</sub> (**Figura 17.B**).

En relación a la composición bioquímica, como consecuencia de la mayor proliferación celular, en los inóculos con 0.035% de CO<sub>2</sub> se obtuvieron concentraciones mayores de carbohidratos y proteínas (**Figura 18.A**). El enriquecimiento con CO<sub>2</sub> al 1% favoreció contenidos lipídicos, tanto por célula como por unidad de peso seco, superiores en un 131% y 61%, respectivamente, a los valores obtenidos en los cultivos con CO<sub>2</sub> al 0.035% (**Figura 18.B**). Este comportamiento ha sido observado en cultivos de otras especies de microalgas, sin embargo éste no ha podido ser generalizado a todas las microalgas oleaginosas (116). El almacenamiento de lípidos en las células cultivadas con un flujo rico en CO<sub>2</sub>, no promovió producciones lipídicas superiores a las conseguidas en cultivos con 0.035% de CO<sub>2</sub> (**Figura 18.B**) ya que, en ambos casos, éstas fueron prácticamente iguales (**0.165 g<sub>Lípidos</sub>/L**) debido a la mayor concentración de células alcanzada con el nivel bajo de CO<sub>2</sub>.



**Figura 17. Efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo de aireación en la densidad celular y el peso seco. (A) Evolución de la densidad celular durante 7 días de cultivo. (B) Incremento global de la densidad celular, masa celular final y concentración final de peso seco después de 7 días de cultivo. Se realizaron 4 experimentos por cada condición evaluada. Las barras de error indican el error estándar.**

La disminución e incluso, la inhibición del crecimiento microalgal, como resultado del aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub>, es un fenómeno que ha sido reportado desde hace algunas décadas para diversas especies de microalgas (102; 116; 117; 118; 119; 120; 121). El mecanismo mediante el cual el CO<sub>2</sub> ejerce su efecto tóxico no ha sido dilucidado, sin embargo, se sabe que el incremento de este compuesto en el flujo de aireación disminuye la actividad fotosintética, al afectar, directa o indirectamente, los centros de reacción del fotosistema II (119; 120; 102; 121). El suministro de flujos de gasificación ricos en CO<sub>2</sub> frecuentemente conlleva a la acidificación de los cultivos, debido en parte, al

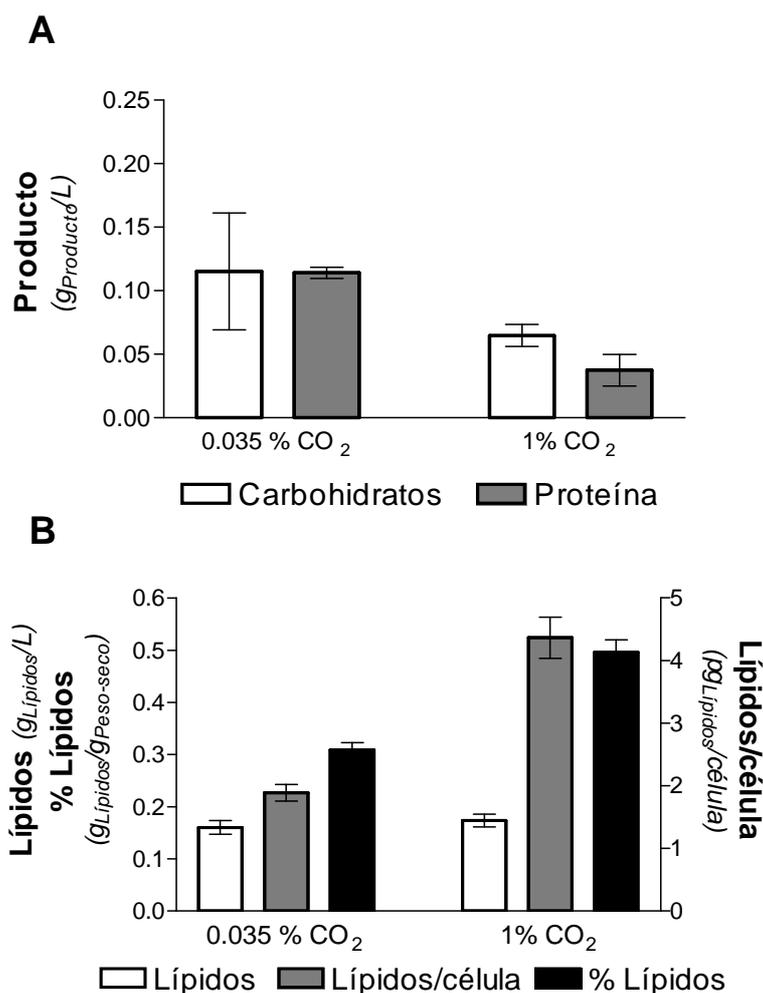
carácter endeble de los sistemas amortiguadores que comúnmente son empleados en los medios de cultivo microalgales (70; 116; 122; 123). El daño del sistema fotosintético ha sido adjudicado por diversos investigadores a la acidificación del citoplasma y también, posiblemente, a la del cloroplasto, como resultado de la disminución del pH del cultivo a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (102; 119). Recientemente, estudios de la tolerancia a flujos ricos en CO<sub>2</sub> por parte de ciertas especies de microalgas, tales como *Chlorococcum littorale*, han permitido concluir que la transición del aparato fotosintético del estado 1 al 2, les posibilita resistir esta condición de estrés. La transición al estado 2, promueve el flujo cíclico de electrones en torno al fotosistema I, de tal manera que se favorece la producción de moléculas adicionales de ATP, las cuales a su vez, permiten mantener la homeóstasis del pH celular, mediante el funcionamiento de bombas de protones dependientes de ATP. El comportamiento anterior, no es presentado por especies de microalgas sensibles a la acción de flujos de gasificación ricos en CO<sub>2</sub> (102; 119; 120; 121). A pesar de que el crecimiento de *N. oleoabundans* fue reducido por una concentración de CO<sub>2</sub> (1% v/v) superior a la del aire ambiente, en los resultados obtenidos resulta evidente que fue capaz de tolerar esta condición, ya que la proliferación celular no fue inhibida por completo.

Por otra parte, recientemente se reportó el cultivo de *N. oleoabundans* bajo un flujo de aire enriquecido con CO<sub>2</sub> en una proporción superior (5% v/v) a la evaluada en este proyecto (1% v/v), donde el crecimiento de la microalga no resultó afectado, e incluso, en contraste con el suministro de aire ambiente (0.035% CO<sub>2</sub> v/v), su velocidad de crecimiento fue notablemente favorecida. Sin embargo, cabe destacar que el flujo volumétrico específico empleado en dicho trabajo (0.09 vvm), fue menor al utilizado en este proyecto (2 vvm) (80). En el reporte publicado por Goldman (1981), se demostró que el enriquecimiento del flujo de aireación con CO<sub>2</sub> en una proporción determinada (i.e. 1% v/v), podría favorecer productividades elevadas en cultivos de la microalga verde *Scenedesmus obliquus*, no obstante, también se comprobó que a la misma proporción de CO<sub>2</sub>, pero a mayores flujos volumétricos específicos, el CO<sub>2</sub> ejercía un efecto tóxico en la microalga y por tanto, la productividad del cultivo se veía afectada (117). Los resultados de tal estudio, sugieren que en los cultivos de *N. oleoabundans* descritos en este apartado, probablemente sucedió un fenómeno similar, en el cual a pesar de la proporción relativamente baja de CO<sub>2</sub> (1%), el elevado flujo volumétrico específico de aireación que

fue suministrado (2 vvm), resultó negativo para la proliferación celular y la productividad del cultivo.

En el 2008, Li *et al.* reportaron el cultivo de *N. oleoabundans* bajo un flujo de aire de 0.5 vvm con CO<sub>2</sub> al 5%, donde el suministro de CO<sub>2</sub> por unidad de tiempo fue de 20 mL CO<sub>2</sub>/min, es decir, igual al proporcionado en los flujos ricos en CO<sub>2</sub> evaluados en este proyecto. Los resultados reportados por Li *et al.*, no sugieren algún efecto nocivo por parte del CO<sub>2</sub> en el crecimiento de la microalga, sin embargo la aparente ausencia de toxicidad de este compuesto, debe ser tomada bajo consideración por las razones siguientes: la concentración inicial de biomasa en los cultivos (~ 0.1 g/L) de tal reporte es mayor a la utilizada en los inóculos de *N. oleoabundans* preparados en este proyecto (< 0.001 g/L); las productividades de biomasa reportadas no son comparadas con las obtenidas bajo condiciones pobres en CO<sub>2</sub>; se desconoce la previa aclimatación de la microalga a flujos enriquecidos con CO<sub>2</sub>; y, el medio de cultivo utilizado posee concentraciones de nutrientes hasta dos veces superiores a las del medio BBM, condición que se ha reportado que favorece la productividad de los cultivos de *N. oleoabundans* (79; 81).

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el uso de un flujo de gasificación de 2 vvm enriquecido con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v), no resulta benéfico para la producción de biomasa, ni para la producción de lípidos, en cultivos de *N. oleoabundans* suficientes en nutrientes con una densidad celular inicial de ~ 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, ya que las concentraciones finales, tanto de peso seco, como de lípidos, alcanzadas después de siete días, no fueron superiores a las obtenidas en los cultivos con flujos de aire con CO<sub>2</sub> al 0.035% (v/v). Algunos investigadores, han propuesto estrategias de adaptación gradual de las microalgas a concentraciones ascendentes de CO<sub>2</sub>, además del uso de mayores concentraciones iniciales de inóculo, con el propósito de reducir los efectos tóxicos del CO<sub>2</sub> en el crecimiento de las microalgas (116; 102; 123). Las estrategias anteriores podrían ser implementadas en cultivos de *N. oleoabundans*. Asimismo, la productividad de los cultivos de esta microalga, podría ser optimizada a través de la posterior evaluación de flujos elevados de aireación con un contenido mínimo de CO<sub>2</sub>, o viceversa, de menores flujos con altas proporciones de CO<sub>2</sub>.



**Figura 18.** Efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo de aireación en la composición bioquímica de inóculos de *N. oleoabundans* después de 7 días. **(A)** Concentración final de carbohidratos y proteína. **(B)** Concentración lipídica final y contenido final de lípidos, por célula y por unidad de peso seco.

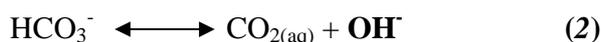
Cabe mencionar que el CO<sub>2</sub> en sistemas acuosos, presenta una dinámica muy compleja que es difícil de predecir, y por tanto, no es posible controlar su disponibilidad en el cultivo, ni entender sus efectos en el mismo, únicamente mediante el enriquecimiento del flujo de aireación con una proporción constante de CO<sub>2</sub>. La complejidad del CO<sub>2</sub> está dada por diversos factores, principalmente por las distintas formas que este compuesto inorgánico adopta en sistemas acuosos, dependiendo de la temperatura y el pH del medio (43; 117; 124).



En donde el  $\text{H}_2\text{CO}_3 \text{ (aq)}$  es la forma hidratada del  $\text{CO}_2$  disuelto ( $\text{CO}_{2\text{(aq)}}$ ):



La complejidad del  $\text{CO}_2$  en medios acuosos también está dada por el papel que éste desempeña como la única fuente de carbono para las microalgas en condiciones fotoautotróficas. Las microalgas asimilan carbono inorgánico primordialmente en la forma de  $\text{CO}_{2\text{(aq)}}$ , ya sea el procedente del  $\text{H}_2\text{CO}_3 \text{ (aq)}$  a través de la reacción *1* (predominante a  $\text{pH} < 8$ ) o el derivado del  $\text{HCO}_3^-$  mediante la reacción *2* (predominante a  $\text{pH} > 10$ ); ambas reacciones predominan en el intervalo de  $\text{pH}$  de 8 a 10 (43; 117; 124; 125).



De este modo, la transferencia del  $\text{CO}_2$  al medio de cultivo depende mayoritariamente de la velocidad de consumo del carbono inorgánico por parte de las microalgas. Por tanto, factores adicionales al  $\text{pH}$  y la temperatura, tales como la velocidad de crecimiento, la fotorespiración, la concentración de biomasa, además la agitación, el flujo específico de gasificación, la proporción de  $\text{CO}_2$  en el gas suministrado, el tamaño de burbuja, el diseño del fotobioreactor y la composición del medio, influyen en la dinámica del  $\text{CO}_2$  en el cultivo (43; 117).

Es por las razones anteriores, que se recomienda ampliamente monitorear y cuantificar el  $\text{CO}_2$  disuelto ( $\text{CO}_{2\text{(aq)}}$ ) en los experimentos adicionales que se han propuesto para evaluar la producción y productividad de biomasa y lípidos de cultivos de *N. oleoabundans* bajo distintos flujo de aireación, enriquecidos en varias proporciones de  $\text{CO}_2$ .

---

### 6.5.2. Efecto de la limitación de nitrógeno en el crecimiento y el contenido lipídico de células de *N. oleoabundans*, previamente cultivadas bajo condiciones de aireación enriquecidas con CO<sub>2</sub>.

Los experimentos descritos en este apartado, se realizaron con el propósito de determinar si el tratamiento previo de las células de *N. oleoabundans* con flujos de aireación enriquecidos con CO<sub>2</sub>, influía en su posterior comportamiento bajo condiciones de limitación de nitrógeno (0.6 mM) y flujos de aireación con un contenido de CO<sub>2</sub> del 0.035% (v/v). Con esta finalidad, las células procedentes tanto de los inóculos cultivados con aire ambiente, como de aquellos enriquecidos con CO<sub>2</sub> al 1% (v/v), fueron estudiadas por separado, bajo condiciones idénticas de restricción de nitrógeno y de aireación.

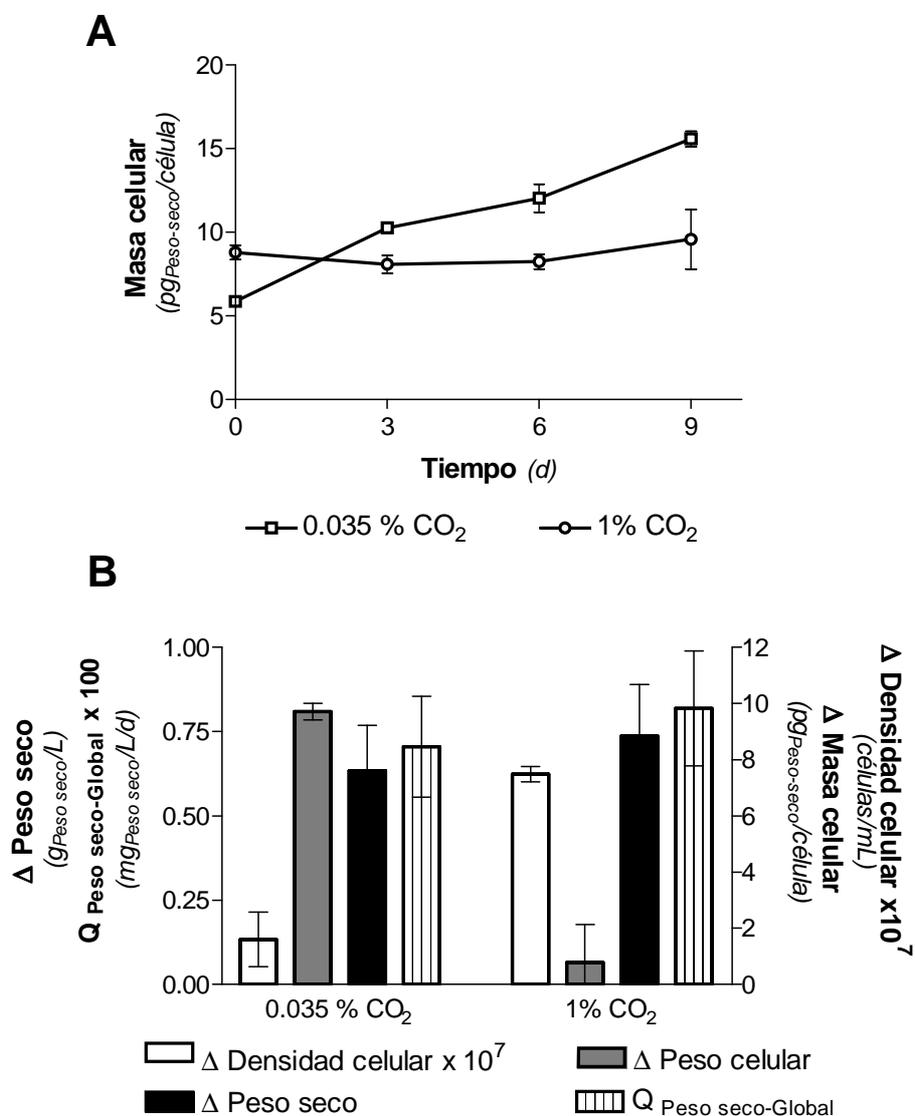
En contraste con las células obtenidas bajo flujos de aireación con CO<sub>2</sub> al 0.035%, las células previamente cultivadas en flujos ricos en CO<sub>2</sub>, a pesar de la condición de limitación de nitrógeno, alcanzaron densidades celulares mayores (**Figura 19.B**) y además, su masa celular se mantuvo prácticamente constante durante el periodo de nueve días evaluado (**Figura 19.A-B**). Asimismo, se observó que el contenido lipídico de las células derivadas de cultivos ricos en CO<sub>2</sub>, disminuyó notablemente en un 32% respecto a su valor inicial (**Figura 20.A-B**). El comportamiento presentado por estas células, fue completamente distinto al mostrado por las células obtenidas a partir de flujos pobres en CO<sub>2</sub>. En el caso particular de estas últimas, la división celular fue mínima, y tanto el peso, como el contenido de lípidos por célula, incrementó en un 166% y un 154%, respectivamente, en relación a su valor inicial.

La recuperación de la actividad fotosintética y del crecimiento en cultivos microalgales, al ser transferidos de condiciones de cultivo con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, a otras con un menor contenido de este compuesto, es un fenómeno que ha sido reportado anteriormente, a partir del cual se ha concluido que, el efecto tóxico inherente a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>, es reversible (102; 118). Acorde con lo anterior, la elevada división celular observada en los cultivos con células derivadas de condiciones ricas en CO<sub>2</sub>, muy probablemente fue consecuencia de la reducción en la proporción del CO<sub>2</sub> suministrado a los cultivos, permitiendo así restablecer el crecimiento, incluso bajo deficiencia de nutrientes. Durante el periodo de limitación de nitrógeno, el consumo de los lípidos contenidos en las células de *N. oleoabundans* previamente cultivadas en flujos ricos

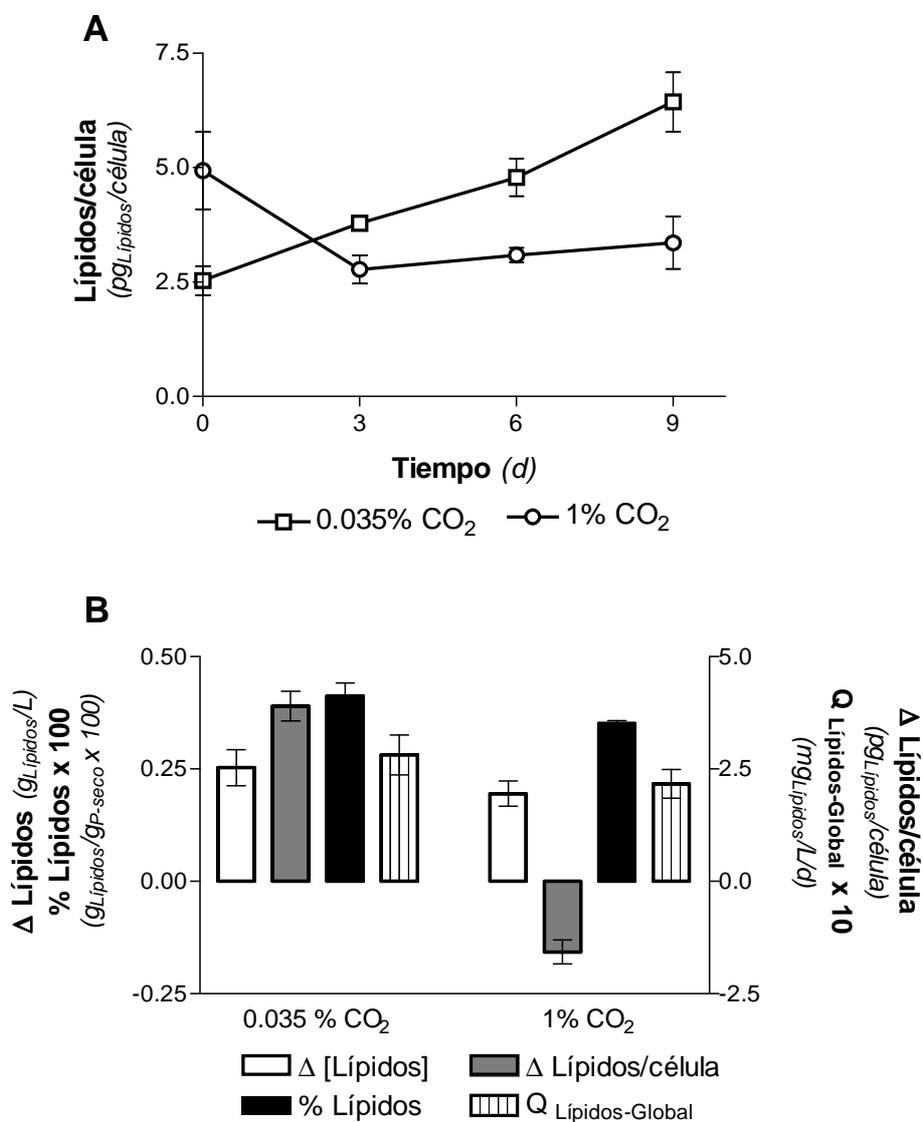
en CO<sub>2</sub>, seguramente proporcionó carbono y energía de reserva, los cuales a su vez, favorecieron la proliferación de las células bajo las condiciones de estrés nutricional evaluadas.

Por su parte, independientemente de la procedencia de las células de *N. oleoabundans*, las producciones y las productividades globales de peso seco, alcanzadas bajo las condiciones de aireación (0.035%) y de limitación de nitrógeno (0.6 mM) evaluadas, fueron prácticamente iguales (**Figura 19.B**). Lo anterior, indica que el previo tratamiento de las células con flujos enriquecidos en CO<sub>2</sub>, no favoreció, ni tampoco afectó, los parámetros biomásicos obtenidos bajo deficiencia de nitrógeno. Los parámetros lipídicos, en cambio, fueron influenciados por el previo enriquecimiento con CO<sub>2</sub>, de los inóculos de *N. oleoabundans*. El uso de células procedentes de cultivos con flujos de gas ricos en CO<sub>2</sub>, afectó los parámetros de producción y productividad global de lípidos, ya que sus magnitudes fueron 23% inferiores a las obtenidas a partir de los cultivos con células derivadas de inóculos pobres en CO<sub>2</sub> (**Figura 20.B**).

A partir de los resultados descritos en este apartado, se concluye que el uso de células de *N. oleoabundans* previamente cultivadas bajo flujos de gasificación enriquecidos con CO<sub>2</sub>, para la inoculación de cultivos deficientes en nitrógeno, no es conveniente para la producción de lípidos, ya que a pesar de no haber alterado los parámetros biomásicos, afectó negativamente la producción y productividad global de lípidos. Sin embargo, esto no descarta que a otras velocidades de suministro o transferencia de CO<sub>2</sub>, se favorezca una mayor acumulación de lípidos.



**Figura 19.** Efecto de la limitación de nitrógeno en los parámetros biomásicos de cultivos inoculados con células previamente tratadas bajo distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> (0.035% y 1% v/v) en el flujo de aireación. (A) Cinética de la masa celular, (B) Incremento global de la densidad y la masa celular, producción y productividad global de peso seco, en cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno (0.6 mM) durante 9 días. Las evaluaciones se realizaron por duplicado. Las barras indican el error estándar.



**Figura 20.** Efecto de la limitación de nitrógeno en los parámetros lipídicos de cultivos inoculados con células previamente tratadas bajo distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> (0.035% y 1% v/v) en el flujo de aireación. (A) Cinética del contenido de lípidos por célula, (B) Incremento global del contenido de lípidos por célula, contenido lipídico final por unidad de biomasa, producción y productividad global de lípidos, en cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno (0.6 mM) durante 9 días.

**6.6. Comparación de resultados para la producción y productividad de lípidos en cultivos de *N. oleoabundans*.**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la condición que favoreció mejores parámetros de producción y productividad global de lípidos, fue la correspondiente a cultivos de *N. oleoabundans* limitados con una concentración inicial de nitrógeno 0.6 mM, mantenidos durante un periodo de nueve días, a una temperatura de 25°C y un flujo específico de aireación de 2 vvm, sin enriquecimiento adicional con CO<sub>2</sub>. En la **Tabla 1**, se comparan los parámetros lipídicos correspondientes a esta condición, con los reportados por otros investigadores para cultivos de *N. oleoabundans*.

**Tabla 1. Parámetros lipídicos de cultivos de *N. oleoabundans* reportados para distintas estrategias de cultivo.**

Condiciones de cultivo	Lípidos Final (g <sub>lípidos</sub> /L)	Q <sub>Lípidos-Global</sub> (mg <sub>Lípidos</sub> /L/d)	% Lípidos (g <sub>Lípidos</sub> /g <sub>Biomasa</sub> ) x100	Ref.
Cultivo lote de 1 L, N 0.6 mM, P 1.72 mM, 25°C, 2 vvm (0.035% CO <sub>2</sub> ), 9 días.	0.39	35.03	43.9	Este trabajo
Cultivo lote de 1 L, N 1.45 mM, P 1.72, 25°C, 0.5 vvm, control de pH (7.5) con CO <sub>2</sub> , 4 días.	0.17	42.50	37.0 (18.00 TAG)	(81)
Cultivo continuo de 1 L, D 0.6 d <sup>-1</sup> , N 8.82 mM, P 1.72 mM, 0.5 vvm, control de pH (7.5) con CO <sub>2</sub> .	0.21	125	23.0 (3.00 TAG)	(81)
Cultivo lote de 1 L, N 2.94 mM, P 1.72 mM, 26°C, 0.09 vvm (0.035% CO <sub>2</sub> ).	--	38.78 Máx	--	(80)
Cultivo lote de 0.8 L, N 5 mM, P 3.23 mM, 30°C, 0.5 vvm (5% CO <sub>2</sub> ), 6 días.	0.81	133.00	34.0	(79)
Cultivo lote, N 0.5 mM, P 1.72 mM, 28-31°C, 1% CO <sub>2</sub> , 5-7 días.	--	--	35.0 – 54.0	(55)

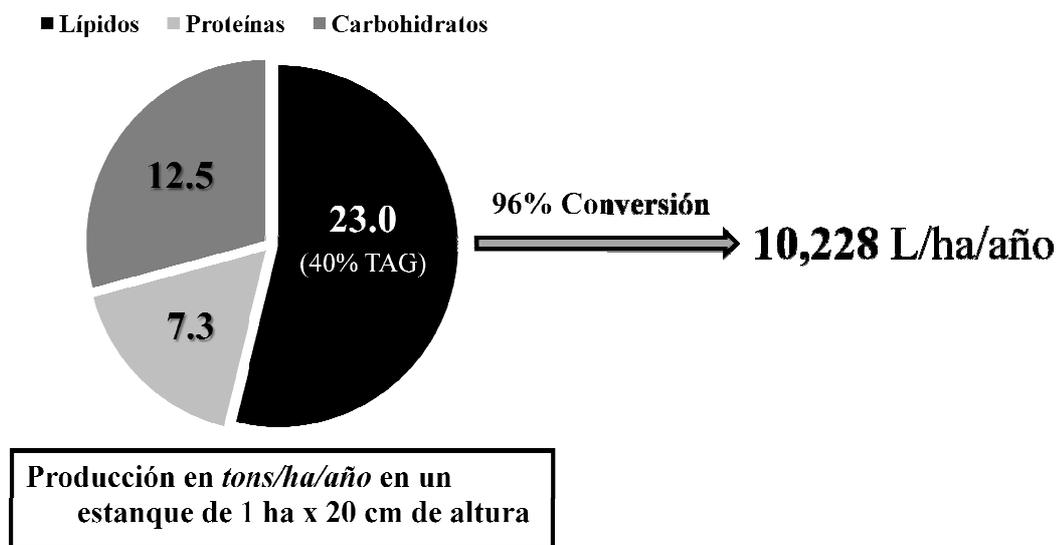
A partir de los datos mostrados en la **Tabla 1**, se infiere que la obtención de elevadas productividades lipídicas, no necesariamente requiere de la producción de biomasa con un contenido lipídico muy elevado, ya que proporciones del 30% (g<sub>Lípidos</sub>/g<sub>Biomasa</sub>) parecen ser suficientes para alcanzar altos valores de producción y productividad de lípidos.

Por otra parte, en la **Tabla 1** también se observa que la mayoría de las productividades lipídicas recientemente reportadas por otros investigadores para cultivos de *N. oleoabundans*, son superiores a las alcanzadas en este proyecto. Estos parámetros fueron obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo, ya sea mediante el control del pH, a través de una mayor provisión de nutrientes para una relación N:P dada, o por medio del suministro de flujos de gasificación moderados ricos en CO<sub>2</sub>. Probablemente, la aplicación de alguna de las estrategias anteriores a la condición óptima de producción seleccionada en este proyecto, posibilitaría mejorar los parámetros lipídicos alcanzados.

En estudios previos se ha reportado que, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, el contenido de ácidos grasos de *N. oleoabundans* está conformado mayoritariamente por el ácido oleico (18:1), además de los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) en una menor proporción (55; 80). Por tanto, el perfil de ácidos grasos obtenido bajo la condición seleccionada en este trabajo, seguramente cumple con los estándares internacionales para la producción de biodiesel.

### **6.7. Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de *N. oleoabundans*.**

Las productividades globales de lípidos, carbohidratos y proteína, correspondientes a la condición de producción elegida en este proyecto, son de **35.03 mg<sub>Lípidos</sub>/L/d**, **11.06 mg<sub>Proteína</sub>/L/d** y **18.97 mg<sub>Carbohidratos</sub>/L/d**, respectivamente. A partir de estos parámetros de productividad, se estima un potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de *N. oleoabundans* de **10,228 L<sub>Biodiesel</sub>/ha/año**, considerando un sistema de producción de abierto (1 ha x 20 cm), un periodo de producción correspondiente al 90% del año, un contenido de triacilglicéridos del 40% por parte de la fracción lipídica, una eficiencia de transesterificación del 96% (4) y una densidad del biodiesel microalgal de 0.864 kg/L (126) (**Figura 21**). Asimismo, se estiman productividades de carbohidratos y proteínas, de **12.5** y **7.3 tons/ha/año**, respectivamente. Es importante considerar la producción de estos compuestos, ya que son co-productos que pueden complementar y reducir el costo del proceso de obtención de biodiesel a partir de microalgas.



**Figura 21. Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno.** Se esquematiza la producción estimada de biodiesel a partir de los parámetros correspondientes a la condición óptima de producción derivada del presente estudio. Se considera un sistema de estanque abierto de 1 ha de superficie y 20 cm de altura con un periodo producción correspondiente al 90% del año, un contenido del 40% de triacilglicéridos (TAG) en la fracción lipídica, una eficiencia de transesterificación del 96% (4) y una densidad del biodiesel microalgal de 0.864 kg/L (126).

Cabe destacar que la producción de biodiesel estimada es una magnitud hipotética, cuyo valor podría descender como consecuencia del escalamiento de los cultivos microalgales, de una menor eficiencia en las operaciones de cosecha de biomasa y de extracción lipídica a gran escala, o bien, debido a la iluminación del sistema con luz natural, en lugar de la iluminación continua con luz blanca que se le proporcionó a los cultivos evaluados en este trabajo. Sin embargo, la influencia de estos factores en la productividad de biodiesel a partir de microalgas, podría ser atenuada mediante la conversión a biodiesel de todos los ácidos grasos presentes en la biomasa y no sólo de aquellos contenidos en los triacilglicéridos, o bien, a través del incremento del contenido de triacilglicéridos en la fracción lipídica, ya que se ha reportado que *N. oleoabundans* puede alcanzar una proporción de hasta el 80% ( $g_{TAGs}/g_{Lípidos}$ ) (55).

En México, la demanda de petrodiesel en el 2008, fue de 23,630 millones de litros (30). A partir de la productividad de biodiesel antes estimada, considerando que la

superficie de México es de 194.4 millones de hectáreas (Mha) (33) y que, el establecimiento de cultivos de microalgas no demanda el uso de suelos fértiles, se estima que para satisfacer el 100% de la demanda de diesel en el país a partir de biodiesel de *N. oleoabundans*, se requeriría de 2.3 Mha, magnitud que corresponde al 1.2% de la superficie total de México. De este modo, la proyección del potencial del biodiesel producido a partir de lípidos de *N. oleoabundans*, sugiere que el panorama para esta tecnología es alentador.

Finalmente, durante el desarrollo de este proyecto, se realizó una revisión acerca de la producción de biodiesel a partir de microalgas, la cual fue aceptada para su publicación en la revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. El propósito de este documento fue el de proporcionar un panorama general y crítico de esta alternativa bioenergética, mediante el análisis de los fundamentos de la misma. Acorde con esta revisión, la cual se encuentra anexa a este documento de tesis como el **Apéndice 2**, el potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de microalgas es enorme, ya que a partir de la radiación solar promedio en México, se estima una productividad máxima teórica de biomasa seca microalgal de 194 *tons/ha/año*, magnitud que se traduce en una productividad de biodiesel de 64,500 *L/ha/año*, considerando un contenido de triacilglicéridos del 30% ( $g_{TAGs}/g_{Peso\ seco}$ ). Sin embargo, la tecnología microalgal presenta diversas limitaciones, de tal manera que en la actualidad se considera que sólo es posible producir alrededor de 20,000 *L<sub>Biodiesel</sub>/ha/año*, magnitud que supera considerablemente las productividades obtenidas a partir de las materias primas actualmente empleadas para la producción del biocombustible (i.e. aceites de plantas superiores) (37; 127).

Las limitaciones de la tecnología microalgal son varias, siendo las más destacadas la dificultad para mantener monocultivos con altos rendimientos de biomasa, la selección de cepas de microalgas oleaginosas, la escasez de información para el escalamiento de los sistemas de producción y el elevado consumo de energía por las operaciones de bombeo, transferencia de gases, recolección y deshidratación de la biomasa. No obstante, el principal reto para la implementación de la producción de biodiesel a partir de microalgas, es el escalamiento tanto de los sistemas de cultivo, como del resto de las operaciones que conforman el proceso tales como la cosecha de la biomasa, la extracción de los lípidos y la transesterificación. Actualmente, se han propuesto diversas estrategias para superar las limitantes de la tecnología microalgal, algunas de las cuales son: avances en la ingeniería

de fotobioreactores; acoplamiento de los cultivos a flujos ricos en CO<sub>2</sub> derivados de emisiones industriales y al tratamiento de aguas residuales; optimización de las cepas oleaginosas mediante estrategias de ingeniería genética y metabólica; y, aprovechamiento de los co-productos derivados de la producción del biodiesel a partir de microalgas (carbohidratos, proteínas, glicerol, etc.) (12; 17; 32; 76; 37).

## 7. CONCLUSIONES.

- La limitación de nitrógeno en cultivos de *N. oleoabundans*, afectó la proliferación celular de la microalga y promovió el incremento del contenido de biomasa por célula. Bajo las condiciones de restricción de nitrógeno evaluadas, los lípidos fungieron como el principal compuesto de reserva.
- La temperatura de 25°C fue la que favoreció la proliferación celular y los parámetros tanto biomásicos, como lipídicos, de cultivos de *N. oleoabundans* restringidos en nitrógeno (0.6 mM). La temperatura de 15°C, disminuyó los parámetros de producción de biomasa pero no los de lípidos. La temperatura de 35°C redujo considerablemente las magnitudes de los parámetros tanto biomásicos como lipídicos.
- La restricción de fósforo, sumada a la limitación de nitrógeno (0.6 mM) provocó una disminución en la proliferación celular y promovió el incremento del peso celular, como consecuencia de la acumulación de carbohidratos.
- El suministro de flujos de aireación elevados enriquecidos en CO<sub>2</sub> al 1% (v/v), a cultivos de *N. oleoabundans* suficientes en nutrientes, es una condición inconveniente para su aplicación en la producción de lípidos a partir de cultivos de la microalga limitados en nitrógeno.
- La condición óptima de producción y productividad de lípidos, obtenida a partir del presente trabajo, fue la correspondiente a cultivos de *N. oleoabundans* a 25°C, limitados en nitrógeno a una concentración inicial de nitratos 0.6 mM, un flujo de aireación de 2 vvm, sin enriquecimiento adicional de CO<sub>2</sub>. Hipotéticamente, en cultivos abiertos de la microalga, el mantenimiento de esta productividad posibilitaría reemplazar el total de la demanda de petrodiesel en México, mediante el uso de una fracción mínima de la superficie total del país.
- En cultivos de *N. oleoabundans* limitados en nitrógeno, el incremento del pH observado en el medio, muy probablemente fue consecuencia del consumo de los nitratos por parte de la microalga.

## 8. PERSPECTIVAS.

A continuación se mencionan algunas perspectivas que están relacionadas con los resultados derivados de este trabajo.

- Evaluar la productividad de los cultivos de *N. oleoabundans* mediante el suministro de concentraciones de nitrógeno y fósforo, por lo menos dos veces superiores, a las empleadas en este proyecto, manteniendo a su vez, las relaciones N:P correspondientes al medio de cultivo BBM (N:P = 1.71) y a la condición sugerida como favorable para la producción de lípidos (N:P = 0.35).
- Adaptar a *N. oleoabundans* a medios enriquecidos con CO<sub>2</sub>, mediante su aclimatación gradual a incrementos en la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo de aireación suministrado.
- Estudiar el efecto de distintos flujos de aireación, enriquecidos en varias proporciones de CO<sub>2</sub>, en el crecimiento y la composición bioquímica de cultivos de *N. oleoabundans*. La evaluación se propone tanto para la etapa de producción de biomasa total (inóculos), como la posterior fase de producción de lípidos mediante estrategias de limitación de nitrógeno. Asimismo, se recomienda ampliamente monitorear y cuantificar el CO<sub>2</sub> disuelto en todas las evaluaciones propuestas.
- Determinación del pH de máxima productividad, tanto para la etapa de producción de biomasa, como para la de producción de lípidos.
- Realizar estudios de cultivos de *N. oleoabundans* en condiciones heterotróficas y analizar su efecto en los parámetros de producción y productividad de biomasa y lípidos. Se propone la evaluación también bajo condiciones mixotróficas.
- Escalar cultivos de *N. oleoabundans* bajo las condiciones de limitación de nitrógeno definidas en este proyecto. Se propone una estrategia de cultivo mixto, donde la producción de biomasa se realice en un sistema cerrado (fotobioreactor) y la acumulación de lípidos se lleve a cabo en un sistema abierto (estanque en circuito).
- Llevar a cabo evaluaciones de la producción y productividad de biomasa y lípidos, en cultivos continuos de *N. oleoabundans*.

- Estudiar y evaluar las operaciones involucradas en el procesamiento de la biomasa microalgal rica en lípidos, es decir, de las etapas de cosecha de biomasa, extracción lipídica y transesterificación.

**9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*, 152: 2529-2536.
2. Ma F, Hanna MA. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol*, 70: 1-15.
3. Anónimo. 2007. Biodiesel: combustible del futuro. *Claridades Agropecuarias*, 163: 3-12.
4. Al-Zuhair S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioprod Bioref*, 1: 57-66.
5. Li Q, Du W, Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *App Microbiol Biotechnol*, 80: 749-756.
6. European Biodiesel Board. 2008. Statistics - The EU biodiesel industry. <http://www.ebb-eu.org/stats.php>.
7. US National Biodiesel Board. 2008. Estimated US biodiesel production by fiscal year. [http://www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/Production\\_graph\\_slide.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Production_graph_slide.pdf).
8. Liu B, Zhao Z. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol*, 82: 775-780.
9. Li X, Xu H, Wu Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 98: 764-771.
10. Arredondo-Vega BO, Vázquez-Duhalt R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y desarrollo*, 17 (98): 99-111.
11. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. 1998. A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, p. 328. [www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf](http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf).

12. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*, 54: 621-639.
13. León R, Fernández E. 2007. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae - Historical overview, achievements and problems. *In: Transgenic microalgae as green cell factories*. León R, Galván A, Fernández E. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-11.
14. AlgaeBase. National University of Ireland, Galway. 2009. <http://www.algaebase.org>.
15. Huntley ME, Redalje DG. 2007. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strat Glob Change*, 12: 573-608.
16. Scragg AH, Morrison J, Shales, SW. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb Technol*, 33: 884-889.
17. Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 25: 294-306.
18. Morrison RT, Boyd RN. 1998. Química orgánica. 5a ed. Addison Wesley Longman, p. 1474.
19. Devoré G. 2002. Química orgánica. 25<sup>a</sup> reimp. Grupo Patria Cultural, p. 734.
20. Miao X, Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol*, 97: 841-846.
21. Lozada IA. 2007. Análisis de la factibilidad técnica y económica de biodiesel a partir de aceite de palma y elaboración de escenario futuro en México en el sector transporte. Tesis de Maestría en Energía. *Centro de Investigación en Energía - UNAM*, p. 140.
22. Avalone EA, Baumeister T. 1995. Manual del Ingeniero Mecánico. 9a ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 982. Vol. I.
23. Knothe G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86: 1059-1070.

24. Knothe G. 2006. Analyzing biodiesel: standards and other methods. *JAOCS*, 83: 823-833.
25. McCormick RL, Westbrook SR. 2007. Biodiesel y mezclas de biodiesel. [http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207p\\_aprmccwes.html](http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207p_aprmccwes.html).
26. Engine Manufacturers Association. 2006. Test Specifications for Biodiesel Fuel. [http://www.federalsustainability.org/initiatives/biodiesel/EMABiodieselSpec2006\\_1066.pdf](http://www.federalsustainability.org/initiatives/biodiesel/EMABiodieselSpec2006_1066.pdf).
27. Cengel YA, Boles MA. 2003. Termodinámica. 4ª ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 830.
28. Perry RH, Green DW, Maloney JO. 2003. Manual del Ingeniero Químico. 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 790. Vol. I.
29. Williams PJ. 2007. Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450: 478.
30. PEMEX. 2008. Indicadores petroleros. <http://www.ri.pemex.com/index.cfm?action=content&sectionID=16&catID=12155>.
31. Fairless D. 2007. The little shrub that could - maybe. *Nature*, 449: 652-655.
32. Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res*, 1 (1): 20-43.
33. Central Intelligence Agency. 2009. The World Factbook. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html>.
34. Gerbens-Leenes W, Hoekstra AY, van der Meer TH. 2009. The water footprint of bioenergy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(25): 10219-223.
35. Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM, Posewitz MC. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol*, 19: 235-240.

36. Lardon L, Hélias A, Sialve B, Steyer JP, Bernard O. 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ Sci Technol*, 43(17): 6475-81.
37. Wijffels RH. 2008. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol*, 26: 26-31.
38. Pulz O, Scheibenbogen K. 1998. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Scheper T. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 59: 123-152.
39. Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 287-293.
40. Rittmann BE. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, 100(2): 203-212.
41. Xu L, Weathers PJ, Xiong XR, Liu CZ. 2009. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. *Eng Life Sci*, 9(3): 178-189.
42. Lee YK. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J Appl Phycol*, 13: 307-315.
43. Carvahlo AP, Meireles LA, Malcata FX. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog*, 22: 1490-1506.
44. Chisti Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, 26(3): 126-131.
45. Posten C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng Life Sci*, 9(3): 165-177.
46. Sobczuk TM, Chisti Y. 2010. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J Chem Technol Biotechnol*, 85: 100-108.
47. Metzger P, Largeau C. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66: 486-496.

48. Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A. CRC Press, pp. 421-454.
49. Ben-Amotz A, Tornabene TG, Thomas WH. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol*, 21: 72-81.
50. Vázquez-Duhalt R, Greppin H. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry*, 26: 885-889.
51. Gouveia L, Oliveira AC. 2009. Microalgae as raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36 (2): 269-274.
52. Gatenby CM, Orcutt DM, Kreeger DA, Parker BC, Jones VA, Neves RJ. 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J Appl Phycol*, 15: 1-11.
53. Kaplan D, Richmond AE, Dubinsky Z, Aaronson S. 1986. Algal nutrition. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A. CRC Press, pp. 147-198.
54. Richmond A. 1986. Cell response to environmental factors. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A. CRC Press, pp. 69-115.
55. Tornabene TG, Holzer G, Lien S, Burris N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Technol*, 5 (6): 435-440.
56. Band CJ, Arredondo-Vega BO, Vázquez-Duhalt R, Greppin H. 1992. Effect of a salt-osmotic upshock on the edaphic microalga *Neochloris oleoabundans*. *Plant Cell Environ*, 15: 129-133.
57. Metzger P, Descouls N, Casadevall E, Coute A. 1982. Microalgae as a source of triglycerides. Berlin, 2nd International Conference on Energy From Biomass, pp. 20-23.
58. Arredondo-Vega BO, Band-Schmidt CJ, Vázquez-Duhalt R. 1995. Biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium. *Cytobios*, 83: 201-205.

59. Gatenby CM, Kreeger DA, Jones VA, Orcutt DM, Parker BC, Neves RJ. 2000. Nutritional status of four algal diets for the captive care of freshwater mussels. *Journal of Shellfish Research*, 19: 602.
60. Band-Schmidt CJ. 1997. Generación biotecnológica para la producción de microalgas. *Ciencia y Mar*, pp. 23-30.
61. Vonshak A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A. CRC Press, pp. 117-145.
62. Starr RC. 1978. The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J Phycol*, 14 (suppl.): 47-100.
63. UTEX The culture collection of algae. 2007. Media List. <http://www.sbs.utexas.edu/utex/media.aspx>.
64. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 68-69.
65. Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, de Champdoré M, Lo Giudice R, Marotta R, Zuccato E. 2004. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ Sci Technol*, 38: 6832-6838.
66. Pan X, Deng C, Zhang D, Wang J, Mu G, Chen Y. 2008. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis sp.* characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquat Toxicol*, 89 (4): 207-213.
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1): 265-275.
68. Chaplin MF. 1994. Monosaccharides. In: Carbohydrate analysis: a practical approach. Chaplin MF, Kennedy JF. IRL Press Ltd., pp. 1-2.
69. Brewer PG, Goldman JC. 1976. Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnol Oceanogr*, 21 (1): 108-117.

70. Goldman JC, Dennett MR, Riley CB. 1982. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO<sub>2</sub> supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnol Bioeng*, 24: 619-631.
71. Sánchez-Mirón A, Cerón-García MC, García-Camacho F, Molina-Grima E, Chisti Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol*, 31(7): 1015-23.
72. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 2009. Algal growth phases including determination of the growth rate and population doubling time. CSIRO Microalgae Research Methods.  
<http://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/>
73. Becker EW. 1994. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, p. 301.
74. Thompson GA. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta*, 1302: 17-45.
75. Grossman A, Takahashi H. 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 163-210.
76. Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. 2008. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 102 (1): 100-112.
77. Courchesne NM, Parisien A, Wang B, Lan CQ. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*, 141: 31-41.
78. Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson N, Betenbaugh MJ. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol*, 19: 430-436.

79. Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan CQ. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81: 629-636.
80. Gouveia L, Marques AE, da Silva TL, Reis A. 2009. *Neochloris oleoabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36 (6): 821-826.
81. Pruvost J, Van Vooren G, Cogne G, Legrand J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol*, 100 (23): 5988-95.
82. Piorreck M, Baasch KH, Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2): 207-216.
83. Roessler PG. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J Phycol*, 26: 393-399.
84. Utting SD. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Engineering*, 4: 175-190.
85. Griffiths MJ, Harrison STL. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol*, 21: 493-507.
86. Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC, Falkowski PG. 1996. Differential effects of nitrogen limitation of photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiol*, 110: 689-696.
87. Jakob T, Wagner H, Stehfest K, Wilhelm C. 2007. A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *J Exp Bot*, 58 (8): 2101-2112.
88. Mitra M, Melis A. 2008. Optical properties of microalgae for enhanced biofuel production. *Optics Express*, 16 (26): 21807-20.

89. Melis A. 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci*, 177 (4): 272-280.
90. Langner U, Jakob T, Stehfest K, Wilhelm C. 2009. An energy balance from absorbed photons to new biomass for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas acidophila* under neutral and extremely acidic growth conditions. *Plant Cell Environ*, 32 (3): 250-258.
91. Servicio Meteorológico Nacional. 2007. Temperatura y precipitación. <http://smn.cna.gob.mx/>.
92. Raven JA, Geider RJ. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol*, 110: 441-461.
93. James CM, Al-Hinty S, Salman AE. 1989. Growth and  $\omega$ 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77: 337-351.
94. Thompson PA, Guo M, Harrison PJ. 1992. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol*, 28: 481-488.
95. Reay DS, Nedwell DB, Priddle J, Ellis-Evans JC. 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 65 (6): 2577-2584.
96. Malkin R, Niyogi K. Photosynthesis. 2000. *In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. American Society of Plant Biologists, pp. 568-628.
97. Katano T, Lee J, Lee YJ, Kim MK, Lee CG, Jin ES, Kang SH, Han MS. 2009. Effect of temperature on inorganic carbon acquisition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Freshwater Ecol*, 24 (2): 255-260.
98. Lips SH, Avissar YJ. 1986. Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond A. CRC Press, pp. 43-67.

99. Richmond, A. 1986. Outdoor mass cultures of microalgae. *In: Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond A. CRC Press, pp. 285-329.
100. Walker DA. 2009. Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *J Appl Phycol*, 21 (5): 509-517.
101. Raven JA, Giordano M, Beardall J. 2008. Insights into the evolution of CCMs from comparisons with other resource acquisition and assimilation processes. *Physiol Plant*, 133 (1): 4-14.
102. Miyachi S, Iwasaki I, Shiraiwa Y. 2003. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO<sub>2</sub> conditions. *Photosynth Res*, 77: 139-153.
103. Converti A, et al. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis occulata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48 (6): 1146-1151.
104. Thompson PA, Guo M, Harrison PJ, Whyte JNC. 1992. Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol*, 28: 488-497.
105. Singh SC, Sinha RP, Häder DP. 2002. Singh, SC, Sinha, RP and Häder, DP. *Acta Protozool*, 41: 297-308.
106. Sushchik NN, Kalacheva GS, Zhila NO, Gladyshev MI, Volova TG. 2003. A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russ J Plant Physiol*, 50 (3): 374-380.
107. Rhee GY, Gotham IJ. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol Oceanogr*, 26 (4): 635-648.

108. Dean AP, Nicholson JM, Sigee DC. 2008. Impact of phosphorous quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii*: an FTIR microspectroscopy study. *Eur J Phycol*, 43 (4): 345-354.
109. Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 117: 129-139.
110. Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part 2. *Crit Rev Microbiol*, 11 (1): 13-81.
111. Martínez ME, Jiménez JM, Yousfi FE. 1999. Influence of phosphorous concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol*, 67: 233-240.
112. Rhee GY. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnol Oceanogr*, 23 (1): 10-25.
113. Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part 1. *Crit Rev Microbiol*, 10 (4): 317-391.
114. Molina E, Martínez E, Sánchez S, García F, Contreras A. 1991. The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis sp.* *Process Biochem*, 26: 183-187.
115. Rhee GY, Gotham IJ. 1980. Optimum N:P ratios and coexistence of planktonic algae. *J Phycol*, 16 (4): 486-489.
116. Chiu SY, Kao CY, Tsai MT, Ong SW, Chen CH, Lin CS. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour Technol*, 100: 833-838.
117. Goldman JC, Dennett MR, Riley CB. 1981. Inorganic carbon sources and biomass regulation in intensive microalgal cultures. *Biotechnol Bioeng*, 23: 995-1014.

118. Silva HJ, Pirt SJ. 1984. Carbon dioxide inhibition of photosynthetic growth of *Chlorella*. *J Gen Microbiol*, 130: 2833-2838.
119. Iwasaki I, Kurano N, Miyachi S. 1996. Effects of high-CO<sub>2</sub> stress on photosystem II in a green alga, *Chlorococcum littorale*, which has a tolerance to high CO<sub>2</sub>. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 36: 327-332.
120. Iwasaki I, Hu Q, Kurano N, Miyachi S. 1998. Effects of extremely high-CO<sub>2</sub> stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high CO<sub>2</sub>' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 44: 184-190.
121. Satoh A, Kurano N, Harayama S, Miyachi S. 2004. Effects of chloramphenicol on photosynthesis, protein profiles and transketolase activity under extremely high CO<sub>2</sub> concentration in an extremely-high-CO<sub>2</sub>-tolerant green microalga, *Chlorococcum littorale*. *Plant Cell Physiol*, 45 (12): 1857-1862.
122. Rao R, Sarada AR, Ravishankar GA. 2007. Influence of CO<sub>2</sub> on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *J Microbiol Biotechnol*, 17 (3),: 414-419.
123. Yoo C, Jun SY, Lee JY, Ahn CY, Oh HM. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels of carbon dioxide. *Bioresour Technol*, Vol. 101 (Suppl 1): S71-S74.
124. Knud-Hansen CF. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical application. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP. *Oregon State University*, 125 p.
125. Shiraiwa Y, Goyal A, Tolbert NE. 1993. Alkalinization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. *Plant Cell Physiol*, 34(5): 649-657.
126. Xu H, Miao X, Wu Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol*, 126: 499-507.

127. Waltz E. 2009. Biotech's new gold? *Nat Biotechnol*, 27: 15-18.

## 10. APÉNDICE.

### 10.1. Parámetros cinéticos.

En el presente apartado se describen brevemente los parámetros cinéticos empleados en este trabajo para el análisis del efecto de distintas condiciones de cultivo en el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans*.

#### 10.1.1. Densidad celular.

Es el número de células por unidad de volumen (*células/mL*) presentes en un cultivo microalgal dado. La **Densidad celular<sub>Final</sub>**, es la concentración de células alcanzada por un cultivo, después de un periodo de incubación determinado. Por su parte, el  **$\Delta$ Densidad celular<sub>Global</sub>**, es el incremento en la densidad celular de un cultivo durante la totalidad de su periodo de incubación (*t<sub>Final</sub>*); se calcula de la manera siguiente:

$$\Delta\text{Densidad celular}_{Global} = \text{Densidad celular}_{Final} - \text{Densidad celular}_{Inicial}$$

#### 10.1.2. Producto por célula

Es la cantidad de producto por célula microalgal, en un momento determinado del cultivo. La magnitud está dada en *pg<sub>Producto</sub>/célula*. El producto puede ser: peso seco, lípidos, carbohidratos o proteína. El término ‘masa celular’ se refiere específicamente al contenido de biomasa, en términos de peso seco, por célula. El parámetro **producto/célula** se calcula:

$$\text{Producto/célula} = \frac{\text{Producto} \times 10^9}{\text{Densidad celular}}$$

Donde: **Producto** (g/L) es la concentración del producto en el cultivo en un tiempo determinado ( $t$ ); **Densidad celular** (células/mL) es la concentración celular del cultivo en el tiempo  $t$ . El parámetro  $\Delta\text{Producto/célula}_{\text{Global}}$ , se refiere a la cantidad de producto acumulada por célula durante la totalidad del periodo de incubación; se calcula mediante la expresión:

$$\Delta\text{Producto/célula}_{\text{Global}} = \text{Producto/célula}_{\text{Final}} - \text{Producto/célula}_{\text{Inicial}}$$

### 10.1.3. Producción.

La producción ( $\Delta\text{Producto}$ ) es la masa de producto (peso seco, lípidos, carbohidratos, proteína) formada en un periodo de tiempo determinado ( $t$ ); está dada en  $g_{\text{Producto}}/L$ . Se calcula mediante la expresión:

$$\Delta\text{Producto} = \text{Producto}_t - \text{Producto}_{\text{Inicial}}$$

Donde:  $\text{Producto}_{\text{Inicial}}$  ( $g_{\text{Producto}}/L$ ) es la concentración de producto al inicio del cultivo;  $\text{Producto}_t$  ( $g_{\text{Producto}}/L$ ) es la concentración de producto en el cultivo al tiempo  $t$ . El parámetro  $\Delta\text{Producto}_{\text{Global}}$  se refiere al producto formado durante la totalidad del periodo de incubación, de manera tal que  $\text{Producto}_t = \text{Producto}_{\text{Final}}$ , donde este término corresponde a la concentración de producto al final del cultivo. Por su parte, el parámetro  $\Delta\text{Producto}_{\text{Máx}}$  se refiere a la cantidad máxima de producto formada durante el cultivo, donde el término  $\text{Producto}_t$  corresponde a la concentración máxima de producto alcanzada al tiempo  $t$  del periodo de incubación.

### 10.1.4. Productividad.

La productividad ( $Q_{\text{Producto}}$ ) es la velocidad de formación de producto (peso seco, lípidos, carbohidratos, proteína); está dada en  $g_{\text{Producto}}/L/d$ .

---

Se calcula mediante la expresión:

$$Q_{\text{Producto}} = \frac{\Delta \text{Producto}}{t}$$

Donde:  $\Delta \text{Producto}$  ( $g_{\text{Producto}}/L$ ) es la cantidad de producto formado durante el periodo de cultivo evaluado ( $t$ ). El término  $Q_{\text{Global}}$  se refiere a la velocidad de formación de producto durante todo el periodo de incubación ( $t = t_{\text{Final}}$ ), de tal modo que  $\Delta \text{Producto} = \Delta \text{Producto}_{\text{Global}}$ . Por su parte,  $Q_{\text{Máx}}$  se refiere a la velocidad máxima de formación de producto, donde  $\Delta \text{Producto} = \Delta \text{Producto}_{\text{Máx}}$  y  $t = t_{\text{Máx}}$ , donde este último es el tiempo comprendido entre el inicio del cultivo y el momento en el cual se alcanza la concentración máxima del producto.

#### 10.1.5. % Producto.

El parámetro  $\% \text{Producto}$  es el porcentaje de producto (lípidos, carbohidratos, proteína) formado por unidad de biomasa (peso seco) para un tiempo específico ( $t$ ) durante el periodo de cultivo; está dado en  $g_{\text{Producto}}/g_{\text{Peso-Seco}} \times 100$ . Se calcula de la manera siguiente:

$$\% \text{Producto} = \frac{\text{Producto}}{\text{Biomasa}} \times 100$$

Donde:  $\text{Producto}$  ( $g_{\text{Producto}}/L$ ) es la concentración de producto en el cultivo en el tiempo  $t$ ;  $\text{Biomasa}$  ( $g_{\text{Peso-seco}}/L$ ) es la concentración de biomasa en el tiempo  $t$ .

**10.2. Revisión ‘Biodiesel a partir de microalgas’ aceptada para su publicación en la Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.**

## Biodiesel a Partir de Microalgas

<sup>1</sup>Adriana Garibay Hernández, <sup>1</sup>Rafael Vázquez-Duhalt, <sup>2</sup>M. del Pilar Sánchez Saavedra, <sup>1</sup>Leobardo Serrano Carreón, <sup>1</sup>Alfredo Martínez Jiménez

<sup>1</sup>*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3 Cuernavaca, Mor., 62250*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Km. 107 Carretera Tijuana – Ensenada, Ensenada, Baja California, 22860*  
[adriagh@ibt.unam.mx](mailto:adriagh@ibt.unam.mx); [alfredo@ibt.unam.mx](mailto:alfredo@ibt.unam.mx)

### RESUMEN

La situación actual debida al agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y dificultades ambientales, demanda urgentemente fuentes alternas de energía siendo una opción promisoría el biodiesel; biocombustible producido primordialmente a partir de aceites provenientes de plantas oleaginosas, cuya disponibilidad desafortunadamente, es incapaz de sustituir el mercado de petrodiesel en México y el mundo. El uso de microalgas para la producción de biodiesel es una alternativa ventajosa debido al elevado contenido de lípidos y perfil idóneo para la obtención del biocombustible que éstas ofrecen. Aunado a lo anterior, otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta. No obstante, los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa de microalgas, entre otros. Ante estos inconvenientes, la optimización de los sistemas de cultivo de microalgas es imprescindible. El propósito de esta revisión es el de proporcionar un panorama general y crítico de esta alternativa bioenergética, mediante el análisis de los fundamentos de la misma.

**Palabras clave:** Biodiesel, microalgas, biocombustible, lípidos, fotobioreactores

### ABSTRACT

The current situation due to the exhaustion of the fossil energy resources, the increase of oil prices and the environmental challenges related to the accumulation of greenhouse gases, urgently demands the development of alternative energy sources, where one of the most prominent is biodiesel. Biodiesel is a biofuel mainly produced from plant oils, which are raw materials that are not enough to replace the majority of Mexico's and also the world's petroleum-based diesel demand. Microalgae appear to be a satisfactory feedstock for biodiesel production that provides several advantages such as: high photon conversion efficiency; ability to grow in marine, salt, fresh and waste waters; sustained high growth rates; elevated oil productivity; and acceptable fatty acid

composition that complies with existing standards. However, there are significant limitations associated with microalgae culture systems, such as lack of information for scaling them up, difficulty for maintaining axenic cultures and the high costs for algal biomass production and harvesting; consequently, optimization of the microalgal culture systems is necessary. This review provides a critical overview of microalgae technology by the analysis of its basic principles.

**Keywords:** Biodiesel, microalgae, biofuels, lipids, photobioreactors

## INTRODUCCIÓN

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática debido al aumento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de invernadero tales como la contaminación local del aire y el calentamiento global. Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO<sub>2</sub>. Una alternativa energética promisoría que ha resultado muy atractiva en años recientes es el biodiesel (Donohue & Codgell, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

## SITUACIÓN ACTUAL DEL BODIESEL

El biodiesel consiste en monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable y que es técnicamente capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo como combustible (Sheehan *et al.*, 1998; Liu & Zhao, 2007; Song *et al.*, 2008).

En contraste con el petrodiesel, el biodiesel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diesel fósil) y produce menos emisiones indeseables (CO, hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre y nitrógeno, metales) durante su combustión a causa de su estado oxigenado, siendo éstas por ende menos nocivas. Además, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (100 - 170°C). El biodiesel puede utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y distribución para el diesel de petróleo. Asimismo, debido a la similitud de las propiedades físicas y químicas del diesel fósil con las del biocombustible, su uso no requiere de modificación alguna en los motores diesel convencionales, por lo que puede ser empleado en éste ya sea directamente (B100) o en mezclas biodiesel-petrodiesel al 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20) (Al-Zuhair, 2007; Anónimo, 2007; Liu & Zhao, 2007; Song *et al.*, 2008; Vasudevan & Briggs, 2008).

Existen diversas metodologías para la producción de biodiesel, cuatro de ellas han sido estudiadas exhaustivamente: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diesel fósil, microemulsiones, pirolisis y transesterificación. La aplicación de las tres primeras alternativas en

motores diesel es impráctica e insatisfactoria, ya que ocasiona problemas tales como la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, la combustión incompleta, el golpeteo en el motor, el desgaste excesivo del mismo, el daño del lubricante y, en el caso específico de la pirólisis, la eliminación de los beneficios ambientales inherentes al uso de combustibles oxigenados. La transesterificación o alcoholisis (Fig. 1) es la reacción química ocurrida entre los aceites (triacilglicéridos) y un alcohol (comúnmente metanol, etanol, propanol o butanol) para producir glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales por son conocidos como biodiesel. Los principales factores que influyen en el proceso son la relación molar alcohol:glicéridos, el tipo de catalizador (álcali, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua y ácidos grasos libres en la materia prima. En la actualidad, la mayoría del biodiesel es producido mediante transesterificación alcalina, a causa de su rapidez y condiciones moderadas que la caracterizan (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Vasudevan & Briggs, 2008).

La Unión Europea, con una producción de 8,812 millones de litros (ML) en el 2008, es el líder mundial en la industria del biodiesel y se estima que lo seguirá siendo durante la década próxima. Alemania encabeza la lista de países productores (3,203 ML), seguido por EUA (3,182 ML), Francia (2,063 ML) e Italia (676 ML); países en desarrollo tales como Malasia, China, Brasil, Colombia, Argentina e Indonesia, son prometedores en la industria del biodiesel. Se estima un mercado de biodiesel de 168,206 ML para el 2016 (European Biodiesel Board, 2008; Li *et al.*, 2008; US National Biodiesel Board, 2008). La introducción exitosa y comercialización del biodiesel en varios países ha dado lugar al establecimiento de normas que regulan sus propiedades y aseguran su calidad. Los estándares usualmente utilizados como referencia son la norma ASTM D6751 en EUA y las normas europeas EN 14213 (biodiesel para calefacción) y EN 14214 (biodiesel para uso vehicular). El cumplimiento de tales disposiciones precisa de biodiesel enriquecido en ácidos grasos de cadena larga con elevado grado de saturación (preferentemente los ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0)) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetanos, poder calorífico y estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo, viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008).

#### **FUENTES DE MATERIA PRIMA**

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso ha sido estudiado exhaustivamente. Los principales materiales oleaginosos utilizados derivan de la palma, colza y soya, además del girasol, coco, cacahuate, oliva, mostaza, entre otros (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Anónimo, 2007; Li *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2008). El mercado creciente de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles, requeriría del uso de enormes extensiones de terreno fértil, situación que podría conllevar a crisis alimentarias ante la escasez de suelos

cultivables. En el caso particular del sureste asiático y Brasil, el considerable incremento en su tasa de producción de biodiesel a partir de palma y soya, ha ocasionado problemas ambientales inherentes a la deforestación de regiones tropicales (Dismukes *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008). En consecuencia se ha planteado el uso de aceites no comestibles procedentes de cultivos marginales tales como *Jatropha curcas* (piñón), *Calophyllum inophyllum* (tamanu), *Pongamia pinnata* (haya de la India, karanja), *Madhuca indica*, *Swida wilsoniana*, *Ricinus communis* (higuerilla) y *Vernicia fordii* (tung). Estos cultivos marginales no requieren de terrenos fértiles, ya que proliferan en suelos áridos, pobres en nutrientes, con altos niveles de radiación y baja precipitación pluvial (Fairless, 2007; Liu & Zhao, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). El elevado costo de la materia prima, que contribuye del 50 al 90% del precio de producción del biodiesel, ha obstaculizado la comercialización del biocombustible, motivo por el que se ha propuesto el uso de aceites de desecho y de grasas animales, alternativa que no ha sido satisfactoria a causa de los gastos adicionales necesarios para el refinamiento y la transesterificación del material (Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Song *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009). En el 2007, la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (comestibles y no comestibles, vírgenes y usados) y grasas animales (12 Mtons) correspondió al 0.3% del consumo global de petróleo (3952.8 Mtons), situación que constata la incapacidad de estas fuentes para desplazar la demanda actual y futura de combustible (BP Statistical Review of World Energy 2008; Schenk *et al.*, 2008). Asimismo, la obtención de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles) está limitada por varios inconvenientes tales como los largos periodos de producción (meses o años) inherentes a la tecnología agrícola, el rendimiento lipídico restringido (menor al 5% del peso seco total) y la dependencia a las condiciones climáticas, la ubicación geográfica, la fertilidad de los suelos y la variedad cultivada; no obstante, el principal obstáculo es la extensa superficie de cultivo requerida y el enorme volumen de agua necesario para el riego (Anónimo, 2007; Li *et al.*, 2007; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008). La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas (Liu & Zhao, 2007); una alternativa prometedora es la obtención de aceites a partir de cultivos de microalgas.

## **LAS MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA ALTERNA**

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS**

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con

frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular (Tabla 1). Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; León & Fernández, 2007; Hu *et al.*, 2008).

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico. El interés por las microalgas surgió en Alemania en los años cincuenta y sesenta al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición humana, interés que después se extendió a países de todos los continentes. El atractivo de las microalgas posteriormente fue encauzado hacia otras aplicaciones tales como la acuicultura (cultivo de especies acuáticas vegetales y animales en medios naturales y artificiales), el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas, la producción de farmacéuticos y los procesos de bioconversión energética. La producción de bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años cincuenta, sin embargo a partir de la crisis energética de 1975, el potencial económico de esta tecnología fue reconocido por varios países como EUA, Japón y Australia (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Huntley & Redalje, 2007).

Destaca el proyecto solventado por el Departamento de Energía de los EUA (DOE, Department of Energy) con más de 25 millones de dólares, y el 'programa de especies acuáticas' del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, National Renewable Energy Lab) con una duración de 18 años (1978-1996), cuyas importantes aportaciones en las áreas de aislamiento, caracterización, fisiología, bioquímica e ingeniería genética de especies microalgales aunadas a los avances en el análisis económico y escalamiento de cultivos en sistemas eficientes, constituyen las bases actuales para el desarrollo de biocombustibles a partir de microalgas. Asimismo sobresale el programa subvencionado por el gobierno japonés (1990-2000), el cual estuvo dirigido al estudio de la fijación de CO<sub>2</sub> y a la optimización del crecimiento microalgal. Estos proyectos fueron suspendidos en parte, ante la falta de competitividad del biocombustible ante los precios del combustible fósil. No obstante, debido a la condición actual de agotamiento de los combustibles fósiles, incremento de los precios del petróleo y calentamiento global como consecuencia de la acumulación de gases de invernadero, el panorama para la producción de bioenergía a partir de microalgas es alentador (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Huntley & Redalje, 2007; Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009; Waltz, 2009).

## **CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS CULTIVOS MICROALGALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

En la actualidad se ha detectado el uso de lípidos microalgales para la producción de biodiesel, ya que es una alternativa que asegura satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas

oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes; y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas. Los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo, condición que posibilita prescindir de herbicidas y pesticidas y además, permite emplear territorios marginales e inclusive zonas no aptas para la agricultura, ganadería, industria y turismo. Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta, por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales. Igualmente, el contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes. Además, esta tecnología puede ser acoplada al reciclaje del CO<sub>2</sub> liberado en las emisiones industriales, especialmente por las plantas de producción de electricidad a partir de combustibles fósiles. Una ventaja adicional estriba en la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual una vez que los lípidos han sido extraídos. Inclusive, resulta factible el empleo de algunos de estos residuos en la alimentación humana o animal y en la producción de fertilizantes o de otros biocombustibles. Finalmente, la ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2007; Williams, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Waltz, 2009).

Una de las estimaciones más conservadoras para el rendimiento anual de biodiesel microalgal, como se indica en la Tabla 2, por lo menos duplica los rendimientos obtenidos a partir de plantas oleaginosas. En el 2008 la demanda de petrodiesel en México fue de 23,630 ML (Indicadores Petroleros, 2008), el reemplazo de esta demanda con biodiesel de origen vegetal, incluso con aquél derivado de cultivos de elevada productividad lipídica como la palma, requeriría de extensas regiones fértiles. Igualmente, el uso de plantas marginales como *Jatropha curcas*, precisaría de superficies mayores a las comprendidas por cultivos microalgales independientemente de la fertilidad de los suelos. La tecnología de microalgas es una alternativa prometedora, ya que para satisfacer el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo en México, sería necesario emplear sólo 1% de la extensión total del país, al considerar el rendimiento lipídico y la independencia a la calidad de los suelos por parte de los cultivos de microalgas (Schenk *et al.*, 2008; CIA World Factbook, 2009).

#### **POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MICROALGAL**

Recientemente, el potencial de las microalgas para la producción de biodiesel ha sido sobreestimado por empresas diversas que aseguran productividades iguales o superiores al

máximo teórico posible (Wijffels, 2008; Waltz, 2009). La determinación de la productividad máxima teórica se fundamenta en la eficiencia fotosintética, la cual se define como la fracción de la energía luminosa absorbida que es fijada como energía química en la biomasa durante el crecimiento fotoautotrófico. La fijación fotosintética de un mol de  $\text{CO}_2$  en biomasa microalgal con una composición representativa ( $\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.36}\text{N}_{0.12}$ ) en sistemas con amonio como fuente de nitrógeno, se considera que requiere de la absorción de 14 fotones, aunque de acuerdo a las estimaciones de autores diversos, esta magnitud puede variar de 6 a 16. La incorporación de un mol de carbono resulta así en la producción de 21.25 g de peso seco con un contenido energético (entalpía de combustión) de 547.8 kJ (Wijffels, 2008). Cabe destacar que la totalidad de la radiación solar no es aprovechada en la fotosíntesis microalgal, sólo es útil el espectro comprendido entre los 400 y 700 nm de longitud de onda denominado 'radiación fotosintéticamente activa' (PAR por sus siglas en inglés), región que solo representa el 42.3% del total. La energía promedio de los fotones comprendidos en este rango es de 218 kJ. Los datos anteriores posibilitan determinar una eficiencia fotosintética máxima para las microalgas del 7.6% respecto a la radiación solar total (Apéndice 1.A), valor que a pesar de ser reportado por varios investigadores en un intervalo del 3 al 10%, es cercano o superior al máximo teórico precisado para plantas C3 (2.4 - 4.3%) y C4 (1.3 - 3.7%). El aprovechamiento parcial de la radiación fotosintéticamente activa es atribuido a fenómenos diversos, principalmente a la disipación de energía en los aparatos fotosintéticos en manera de calor o fluorescencia con la intención de evitar el daño de éstos por radiación excesiva (fotoinhibición) (Pulz & Scheibenbogen, 1998; Janssen *et al.*, 2003; Dismukes *et al.*, 2008; Wijffels, 2008).

La energía solar es un recurso renovable abundante y de alta calidad en México, ya que la radiación solar promedio es de 1,825 kWh/m<sup>2</sup>/año (Jiménez *et al.*, 2007). En el Apéndice 1.B, se describe que al considerar una eficiencia fotosintética del 7.6%, se determina que la máxima productividad teórica de biomasa seca microalgal en México sería de 194 tons/ha/año; asimismo, al suponer un contenido de triglicéridos del 30% ( $\text{g}_{\text{TAG}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$ ), una eficiencia de transesterificación del 96% (Al-Zuhair, 2007) y una densidad del biodiesel microalgal de 0.864 kg/L (Xu *et al.*, 2006), se estima una producción hipotética del biocombustible (biodiesel) de 64,500 L/ha/año, magnitud inasequible hasta ahora. Acorde con Wijffels (2008), la tecnología actualmente disponible permitiría producir alrededor de 20,000 L/ha/año de biodiesel. No obstante, este valor podría ser cercano al máximo teórico a través de avances en la selección de especies, las estrategias y sistemas de cultivo, los procedimientos de cosecha y extracción de aceites, aunados a la optimización del metabolismo de los microorganismos mediante recursos moleculares (Wijffels, 2008; Waltz, 2009). Estos datos indican la superioridad del potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos microalgales en contraste con el uso de aceites vegetales (comestibles y no comestibles) como materia prima para la obtención de biodiesel (Tabla 2).

## EL CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS MICROALGAS

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008).

La determinación del contenido oleaginoso de las microalgas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores, como se señala en la Tabla 3 (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Las especies que producen más de un 30% de materias grasas se denominan 'oleaginosas' (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991).

Los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las microalgas oleaginosas son diversos. En los ejemplares eucariontes, el contenido lipídico es considerado como propio de la especie y no del género, de manera tal que este parámetro varía notablemente entre las especies individuales de cada grupo taxonómico (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2008). No obstante, de acuerdo con Hu *et al.* (2008), es posible generalizar que microalgas oleaginosas eucariontes de grupos diversos (clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptofitas, eustigmatofitas, dinofitas, xantofitas y rodofitas) presentan, bajo condiciones normales de cultivo, una fracción lipídica promedio del 25.1%, magnitud que es superior (45%) en situaciones de estrés. Cabe destacar que la ubicuidad de las algas verdes (clorofitas) en hábitats diversos, además de la facilidad para su aislamiento y desarrollo en condiciones de laboratorio, ha favorecido la identificación de numerosas especies oleaginosas en este grupo, condición que no necesariamente es distintiva del mismo. Las cianobacterias por su parte presentan bajos contenidos lipídicos promedio (9.8%; Hu *et al.*, 2008), sin embargo su aplicación en la producción de biodiesel ha sido sugerida por Rittmann (2008) a causa de la producción de lípidos paralela al crecimiento y la sencillez para la manipulación genética que ofrecen, en contraste con las especies eucariontes.

Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente). En las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.), aunque compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquenonas de cadena larga, entre otros, también ocurren (Cohen, 1986; Arredondo &

Vázquez-Duhalt, 1991; Metzger & Largeau, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008). No todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiesel, sin embargo los apropiados para ello (ácidos grasos, libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados) son producidos con frecuencia y constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, usualmente del 20% al 40% (Cohen, 1986; Chisti, 2007). Un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad (Knothe, 2005).

## SÍNTESIS DE LÍPIDOS

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids). Estos últimos, ocasionalmente constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. La variación del perfil de ácidos grasos entre grupos algales diversos es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo (Cohen, 1986; Hu *et al.*, 2008; Griffiths & Harrison, 2009).

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como consecuencia de las homologías de secuencia y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas, de origen vegetal y algal, involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y  $\beta$ -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas. Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1 $\omega$ 9) son los precursores de las moléculas poli-insaturadas, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación. Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triglicéridos sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas del traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la defosforilación del ácido fosfatídico previamente formado (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). En la Fig. 2, se presenta un esquema que describe en términos generales la biosíntesis de lípidos microalgales.

## CONDICIONES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS

La producción de lípidos al igual que su composición en las microalgas, a pesar de depender principalmente de la especie, y en última instancia de su constitución genética, son afectados por diversas condiciones físicas y químicas de cultivo, tales como la fase de crecimiento, la disponibilidad y la clase de nutrientes, la salinidad, el tipo, periodos e intensidad de luz, la temperatura, el pH, e incluso, la asociación con otros microorganismos. La aclimatación de las microalgas a la restricción de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitado (inducción de sistemas de transporte de alta afinidad y de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la liberación intra- o extra-celular del nutriente), además de respuestas generales tales como cambios morfológicos, cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos. La limitación de Nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas. Asimismo, la disponibilidad de Hierro (+3) influye en el contenido oleaginoso, aunque el mecanismo se desconoce. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la restricción de nutrientes es considerablemente variable y por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales (Ben-Amotz, *et al.*, 1985; Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Thompson, 1996; Sheehan *et al.*, 1998; Grossman & Takahashi, 2001; Gatenby *et al.*, 2003; Guschina & Harwood, 2006; Huntley & Redalje, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). La acumulación de lípidos en especies oleaginosas, a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias, fungen como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo (Thompson, 1996; Grossman & Takahashi, 2001; Hu *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). La temperatura, por su parte, afecta notablemente el perfil lipídico de las microalgas, de manera tal que a bajas temperaturas incrementa el grado de insaturación. Las altas intensidades luminosas son otra de las condiciones que favorecen sustancialmente la acumulación de triglicéridos con un elevado perfil de saturación, donde intensidades bajas a su vez promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados, estructural y funcionalmente asociados con las membranas. El pH y la salinidad son otros factores que modifican la síntesis de lípidos de diversas microalgas, sin embargo el tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie y de la magnitud del cambio de éstas variables (Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991;

Thompson, 1996; Andersen, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009).

## PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

La producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas elementales de producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y transesterificación, como se indica en la Fig. 3 (Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008).

En relación a la etapa de producción de biomasa de microalgas, actualmente existen sistemas de cultivo de microalgas destinados a la obtención de productos de alto valor agregado (pigmentos carotenoides, ácidos grasos esenciales -  $\omega 3$  y  $\omega 6$  -, compuestos isotópicos, ficobiliproteínas, farmacéuticos - anticancerígenos y antibióticos -, vitaminas C y E, etc.), no obstante ante la escasa flexibilidad económica del mercado de los biocombustibles, la optimización de tales sistemas de producción resulta necesaria (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Schenk *et al.*, 2008; Wijffels, 2008). Los sistemas empleados con mayor frecuencia en la producción de biomasa microalgal son los de tipo abierto, que a pesar de sus formas y tamaños diversos, destacan por asemejar el entorno natural de las microalgas. Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito ('raceway ponds'), donde estos últimos son los de uso más extendido (Fig. 4A). Los estanques tipo 'raceway' consisten en circuitos de 15 a 30 cm de profundidad, en los cuales una rueda de paletas mantiene un flujo constante del cultivo; las producciones y productividades biomásicas factibles en estos sistemas son bajas, próximas a 1 g/L y a 10-25 g/m<sup>2</sup>/d, respectivamente. Las ventajas inherentes a los cultivos abiertos radican en su sencillez y su bajo costo de inversión en contraste con sistemas cerrados, a causa de la diversidad de materiales útiles para su construcción (concreto, tierra, plástico, etc.) y la facilidad que ofrecen para su operación y mantenimiento. Sin embargo, acorde con Wijffels (2008), un factor determinante del costo de producción de biomasa de microalgas en sistemas abiertos es la cosecha de la biomasa, debido a la baja concentración que ésta alcanza. De este modo, al considerar la operación de cosecha de la biomasa y la tecnología actualmente disponible, los costos de producción de los sistemas abiertos no son tan bajos e incluso, son del mismo orden de magnitud que los correspondientes a los sistemas cerrados. Los sistemas abiertos presentan diversos inconvenientes tales como pérdidas de agua por evaporación, transferencia limitada de CO<sub>2</sub> al cultivo por su baja concentración en el aire (0.035% v/v) y su difusión hacia la atmósfera, control limitado de las condiciones de cultivo, alta susceptibilidad de contaminación (excepto en cultivos de especies extremófilas), requerimiento de superficies extensas, amplios periodos de producción (6 a 8 semanas), producciones reducidas de biomasa y penetración limitada de la luz (Pulz & Scheibebogen, 1998; Pulz, 2001; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Wijffels, 2008).

Los sistemas cerrados, en contraste con los abiertos, ofrecen numerosas ventajas tales como pérdidas mínimas de CO<sub>2</sub>, riesgo reducido de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, menores requerimientos de superficie, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción (2 a 4 semanas) y productividades considerablemente superiores (5 a 13 veces). Los fotobioreactores cerrados, con el propósito de coleccionar la mayor cuantía posible de energía solar por unidad de superficie, presentan configuraciones diversas, tubulares (vertical, horizontal, helicoidal, conformación  $\alpha$ ), paneles planos y columnas de burbujeo, principalmente. Los reactores tubulares (Fig. 4B) y de panel plano son los de uso más frecuente; habitualmente están conformados por dos unidades, una de recolección de luz y otra de transferencia de gases. La consideración de factores tales como la luz, la razón CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, la temperatura, los nutrientes, la salinidad, el pH, entre otros, resulta trascendental para el diseño de sistemas cerrados. Las altas productividades inherentes a estos sistemas precisan de una penetración y distribución óptima de la luz, condición que a su vez requiere de materiales de construcción transparentes y de relaciones superficie/volumen elevadas, sin embargo, la intensidad de la luz incidente debe ser moderada, de lo contrario se presentan fenómenos de fotoinhibición y fotoblanqueo. Asimismo, la relación CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> debe ser tal que la proporción de O<sub>2</sub> sea mínima y por ende, sean impedidos procesos de fotorespiración y daño fotooxidativo. Actualmente, la principal desventaja de los sistemas cerrados consiste en sus elevados costos, atribuidos en mayor medida a la energía invertida en la agitación mecánica de los cultivos con la finalidad de evitar la sedimentación y favorecer la transferencia de gases (Pulz & Scheibenbogen, 1998; Pulz, 2001; Carvalho *et al.*, 2006; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Wijffels, 2008).

Los sistemas híbridos han sido propuestos como una alternativa económica para la producción de biodiesel microalgal a gran escala. En términos generales, tales sistemas consisten en una etapa inicial de producción de biomasa en fotobioreactores cerrados, en la cual los microorganismos son mantenidos en crecimiento continuo bajo condiciones de suficiencia de nutrientes, etapa que es seguida por una fase de acumulación de producto (lípidos) en estanques abiertos, inducida mediante la deficiencia de nutrientes (Schenk *et al.*, 2008).

Una vez que la biomasa de microalgas ha sido producida en alguno de los sistemas descritos, se da inicio a la etapa de cosecha o recolección, cuyo propósito es el de remover el agua y concentrar las células microalgales para su posterior procesamiento. Esta etapa, como se ha mencionado, influye notablemente en los costos de producción del biodiesel, por lo que la selección de una técnica de recolección eficiente y de bajo costo es trascendental. La centrifugación, sedimentación, filtración y floculación, ya sea individualmente o combinados, son los procedimientos de cosecha más comunes, cuya aplicación depende de las propiedades de la especie de microalga cultivada (morfologías particulares, presencia de vacuolas gaseosas, etc.), ya que algunas presentan características que facilitan su recolección (Dismukes *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). La filtración resulta conveniente para especies microalgales de forma

filamentosa o capaces de formar colonias; cabe mencionar que esta operación a gran escala presenta inconvenientes tales como la obstrucción de los filtros, formación de tortas de filtración compresibles y altos costos de mantenimiento. La aplicación de la sedimentación o de la centrifugación podría ser factible en microalgas con diámetros mayores a los 5  $\mu\text{m}$  y paredes celulares relativamente gruesas. A pesar del frecuente empleo de la sedimentación en la acuicultura, su principal desventaja es la larga duración de esta operación. Por su parte, la centrifugación sólo resulta conveniente para productos de alto valor agregado, ya que implica altos costos y demanda un elevado consumo de energía. La floculación es otro procedimiento común de cosecha, el cual consiste en la aglomeración y posterior sedimentación o flotación de la biomasa de microalgas; esta puede ser inducida de diversos modos. La floculación mediante la adición de sales inorgánicas (alúmina, cloruro férrico, óxido de calcio) no es recomendada por su alto costo y por contaminar la biomasa, de manera tal que ésta no puede ser utilizada posteriormente como alimento. El uso de polímeros orgánicos catiónicos como floculantes no presenta estos inconvenientes, sin embargo su efectividad puede ser disminuida en aguas salobres como consecuencia de la elevada fuerza iónica que las caracteriza. Por su parte, la biofloculación es un procedimiento alternativo de cosecha que consiste en el uso de especies de microalgas que naturalmente floculan o cuya aglomeración puede ser inducida mediante la aplicación de condiciones de estrés tales como cambios de pH, temperaturas extremas y restricción de nutrientes. No obstante, la modificación de las condiciones de cultivo puede alterar la composición bioquímica de la microalga y por tanto el rendimiento lipídico. Finalmente, se ha propuesto la floculación microbiana o co-biofloculación, procedimiento en el cual se adicionan microorganismos autofloculantes (tales como levaduras) al cultivo microalgal, de manera tal que se promueve la aglomeración conjunta de éstos con la biomasa que se desea cosechar (Belter *et al.*, 1988; Schenk *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

A partir de la biomasa cosechada se extraen los aceites mediante procedimientos tales como lixiviación con solventes orgánicos, principalmente hexano. Sin embargo, algunos inconvenientes de esta técnica de extracción son los costos y la energía adicionales necesarios para la recuperación del solvente, además de la contaminación de la biomasa microalgal libre de lípidos, restringiendo así las posibilidades para el posterior aprovechamiento de este co-producto. En esta década, se han propuesto variantes para la lixiviación con solventes orgánicos, tales como la extracción *in situ* a partir de células vivas de microalgas o el acoplamiento de la etapa de extracción lipídica con la de transesterificación, no obstante, tanto su aplicación a gran escala, como su factibilidad económica, deben ser evaluadas. Asimismo, la extracción mediante prensado ha sido sugerida aunque, a pesar de no implicar el uso de solventes, su eficiencia es menor a la de la lixiviación (Hejazi & Wijffels, 2004; Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008).

## FACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL BIODIESEL DE MICROALGAS

La factibilidad de la producción de biodiesel de microalgas depende de su competitividad con los combustibles fósiles, de manera tal que los costos de producción resultan decisivos. La estimación de la viabilidad de esta tecnología es posible mediante una evaluación análoga a la realizada por Chisti (2008), en la cual se determina el máximo costo de producción de biomasa microalgal con un contenido oleaginoso específico, que posibilitaría su competencia con los precios actuales del petróleo. El cálculo se fundamenta en la definición de la cantidad de biomasa que, a partir del biodiesel y biogás derivados de la misma, proporciona una cantidad de energía equivalente a la de un barril de crudo (159 L). Acorde con la OPEC (OPEC Annual Report, 2008), en el 2008 el costo promedio del barril de petróleo fue de US\$ 94.45. Para poder contender con este precio, el gasto en la obtención de biomasa microalgal con un contenido lipídico del 55% ( $\text{g}_{\text{Lípidos}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$ ) debe ser inferior a los US\$ 323  $\text{ton}_{\text{Biomasa}}^{-1}$  (Chisti, 2008). Recientemente, compañías productoras de biomasa microalgal han reportado costos de producción de US\$ 370  $\text{ton}_{\text{Biomasa}}^{-1}$  o inferiores, por ende la tecnología actual podría ser económicamente viable (Schenk *et al.*, 2008). Sin embargo, las fluctuaciones en el precio del crudo deben ser consideradas ya que en el transcurso del 2009, el costo del barril ha disminuido considerablemente (OPEC Basket Price, 2008), situación que demanda la reducción de los costos de producción de biomasa microalgal a alrededor de la mitad del valor antes estimado para el 2008 (US\$ 142  $\text{ton}_{\text{Biomasa}}^{-1}$ ).

## COMENTARIOS FINALES

La tecnología microalgal presenta limitaciones diversas, siendo las más destacadas la dificultad para mantener monocultivos con altos rendimientos de biomasa, la selección de cepas de microalgas oleaginosas, la escasez de información relativa al escalamiento de sistemas de producción y el consumo elevado de energía por procesos de bombeo, transferencia de gases, mezclado, recolección y deshidratación de la biomasa. No obstante, los costos de producción de biodiesel microalgal pueden ser aminorados a través de distintas estrategias. Avances en la ingeniería de fotobioreactores, además del desarrollo de procesos económicos para la recolección de biomasa y su posterior transesterificación sin el requerimiento previo de procedimientos de deshidratación, son aspectos trascendentales para la reducción de costos. Con tal propósito, también se ha sugerido el acoplamiento de los cultivos de microalgas a los flujos ricos en  $\text{CO}_2$  derivados de emisiones industriales y al tratamiento de aguas residuales. Asimismo, se ha propuesto el aislamiento y selección de especies oleaginosas, además de su modificación mediante procedimientos de ingeniería genética y metabólica con propósitos diversos, tales como incrementar la eficiencia fotosintética, mejorar la productividad, aumentar la fracción oleaginoso, reducir los fenómenos de fotoinhibición y daño fotooxidativo, entre otros. Finalmente, resulta imprescindible la consideración de estrategias de producción basadas en el concepto de 'biorefinerías', donde los componentes restantes de la biomasa microalgal después de extraer los lípidos, pueden ser transformados en productos comercializables tales como: alimento para

ganado, extracción de pigmentos naturales, otras sustancias químicas de alto valor agregado y hasta el uso de la digestión anaerobia para obtener biogas o metano (Chisti, 2007; Chisti, 2008; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008; Wijffels, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009).

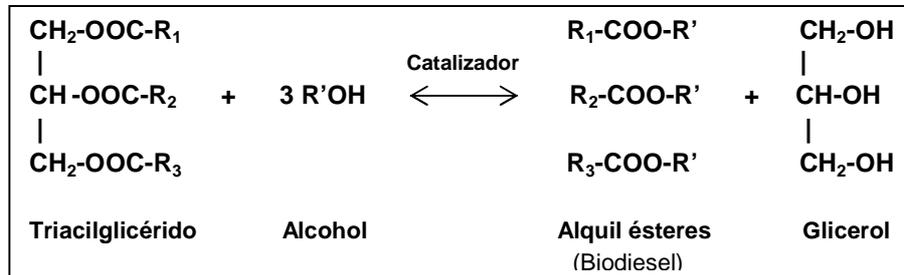
## REFERENCIAS

- Al-Zuhair S (2007) Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioprod Bioref.* 1: 57-66.
- Andersen RA (2005) Algal Culturing Techniques. Phycological Society. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 578 pp.
- Anónimo (2007) Biodiesel: combustible del futuro. *Claridades Agropecuarias.* 163: 3-12.
- Arredondo BO & Vázquez-Duhalt R (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.
- Beer LL, Boyd ES, Peters JW & Posewitz MC (2009) Engineering microalgae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol.* 20:264-271.
- Belter PA, Cusler EL & Hu WS (1988) Bioseparations: Downstream processing for biotechnology. John Wiley & Sons. 587 pp.
- Ben-Amotz A, Tornabene TG & Thomas WH (1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol.* 21: 72-81.
- BP Statistical Review of World Energy (2008) [www.bp.com/liveassets/bp\\_internet/globalbp/globalbp\\_uk\\_english/reports\\_and\\_publications/statistical\\_energy\\_review\\_2008/STAGING/local\\_assets/downloads/pdf/statistical\\_review\\_of\\_world\\_energy\\_full\\_review\\_2008.pdf](http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2008/STAGING/local_assets/downloads/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_review_2008.pdf)
- Carvalho AP, Meireles LA & Malcata FX (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog.* 22: 1490-1506.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 25: 294-306.
- Chisti Y (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- CIA World Factbook (2009) [www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/](http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/)
- Cohen Z (1986) Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A (ed.) CRC Press pp. 421-454.
- Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM & Posewitz MC (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 235-240.
- Donohue T & Cogdell R (2006) Microorganisms and clean energy. *Nat Rev Microbiol.* 4: 800.
- European Biodiesel Board (2008) [www.ebb-eu.org/stats.php](http://www.ebb-eu.org/stats.php)
- Fairless D (2007) The little shrub that could – maybe. *Nature.* 449: 652-655.
- Fischer CR, Klein-Marcuschamer D & Stephanopoulos G (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng.* 10: 295-304.

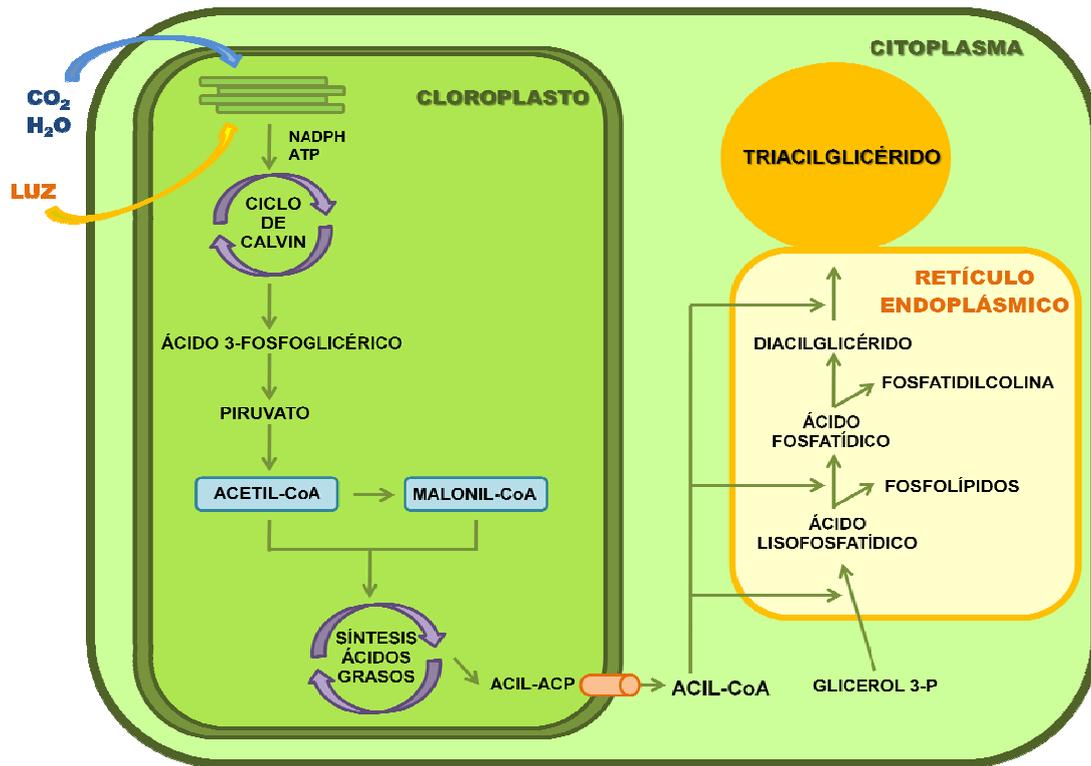
- Fukuda H, Kondo A & Noda H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng.* 92: 405-416.
- Gatenby CM, Orcutt DM, Kreeger DA, Parker BC, Jones VA & Neves RJ (2003) Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J Appl Phycol.* 15: 1-11.
- Gouveia L & Oliveira AC (2009) Microalgae as raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2): 269-274.
- Griffiths MJ & Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol.* 21(5): 493-507.
- Grossman A & Takahashi H (2001) Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 163-210.
- Guschina IA & Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res.* 45: 160-186.
- Hejazi AM & Wijffels RH (2004) Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* 22(4): 189-194.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M & Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
- Huntley ME & Redalje DG (2007) CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* 12: 573-608.
- Indicadores Petroleros (2008) [www.ri.pemex.com/index.cfm?action=content&sectionID=16&catID=12155](http://www.ri.pemex.com/index.cfm?action=content&sectionID=16&catID=12155));
- Janssen M, Tramper J, Mur LR & Wijffels RH (2003) Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnol Bioeng.* 81: 193-210.
- Jiménez A, Sánchez-Juárez A, Fernández A, Mathew X & Sebastian PJ (2007) Converting solar radiation to electric power in Mexico. *In: Towards a cleaner planet.* Klapp J, Cervantes-Cota JL & Chávez JF (eds.) Springer Berlin Heidelberg pp. 281-303.
- Knothe G (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol.* 86: 1059-1070.
- Lee AK, Lewis DM & Ashman P (2009) Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J Appl Phycol.* 21: 559-567.
- León R & Fernández E (2007) Nuclear transformation of eukaryotic microalgae. *In: Transgenic microalgae as green cell factories.* León R, Galván A & Fernández E (eds.) Landes Bioscience / Springer Science+Business Media, LLC. pp. 1-11.
- Li Q, Du W & Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 749-756.
- Li X, Xu H & Wu Q (2007) Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 98: 764-771.

- Liu B & Zhao Z (2007) Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem Technol Biotechnol.* 82: 775-780.
- Ma F & Hanna MA (1999) Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol.* 70: 1-15.
- Meng X, Yang X, Xu X, Zhang L, Nie Q & Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 34: 1-5.
- Metzger P & Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 486-496.
- OPEC Annual Report (2008) [www.opec.org/library/Annual%20Reports/pdf/AR2008.pdf](http://www.opec.org/library/Annual%20Reports/pdf/AR2008.pdf)
- OPEC Basket Price (2008) [www.opec.org/Home/basket.aspx](http://www.opec.org/Home/basket.aspx)
- Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 287-293.
- Pulz O & Scheibenbogen K (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. In: *Advances in biochemical engineering / biotechnology.* Scheper T (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 123-152.
- Rittmann BE (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 100: 203-212.
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G & Tredici MR (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 102: 100-112.
- Rosenberg JN, Oyley GA, Wilkinson L & Betenbaugh MJ (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol.* 19: 430-436.
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O & Hankamer B (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg Res.* 1: 20-43.
- Sharma YC, Singh B & Upadhyay SN (2008) Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel.* 87: 2355-2373.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, & Roessler P (1998) A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.  
[www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf](http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf)
- Song D, Fu J & Shi D (2008) Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chin J Biotech.* 24: 341-348.
- Thompson Jr GA (1996) Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta.* 1302: 17-45.
- US National Biodiesel Board (2008) Estimated US biodiesel production by fiscal year.  
[www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/Production\\_graph\\_slide.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Production_graph_slide.pdf)
- Vasudevan PT & Briggs M (2008) Biodiesel production – current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35: 421-430.

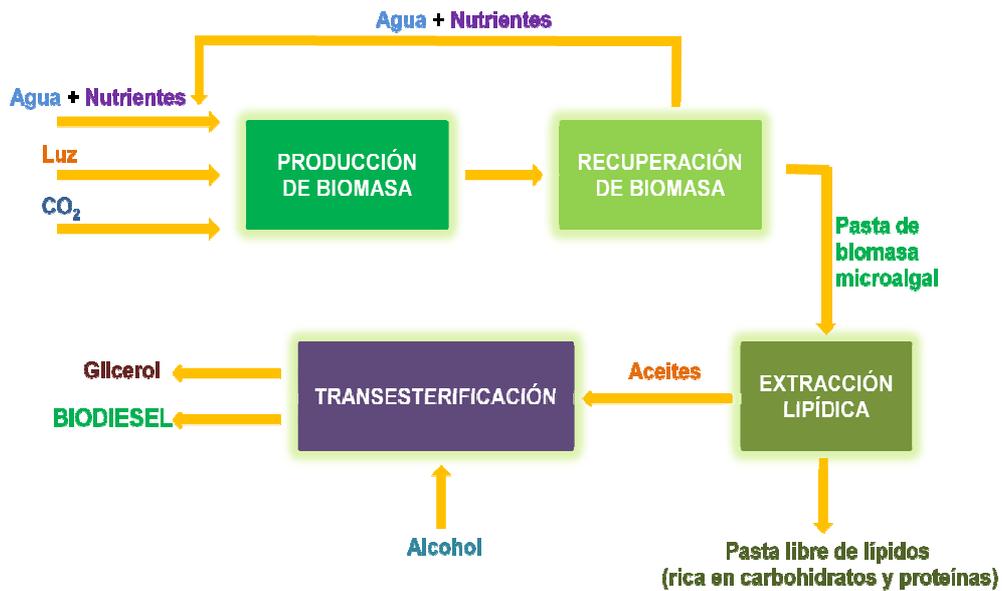
- Vázquez-Duhalt R & Greppin H (1987) Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochem.* 26: 885-889.
- Waltz E (2009) Biotech's new gold? *Nat Biotechnol.* 27: 15-18.
- Wijffels RH (2008) Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol.* 26: 26-31.
- Williams PJ (2007) Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature.* 450: 478.
- Xu H, Miao X & Wu Q (2006) High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol.* 126: 499-507.



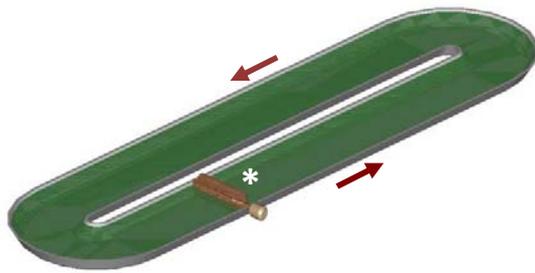
**Fig. 1.** Reacción general de transesterificación.  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R'$  son radicales alquilo. Los catalizadores pueden ser álcalis, ácidos o enzimas (lipasas) (Ma & Hanna, 1999; Fukuda *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008).



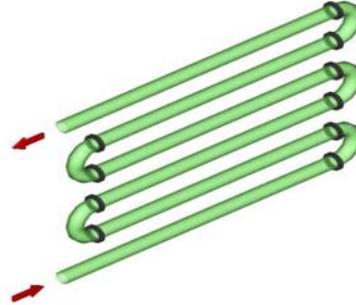
**Fig. 2.** Biosíntesis de lípidos microalgales. En términos generales, en el sistema fotosintético a partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua con la consecuente formación de protones, electrones y  $O_2$ , los cuales a su vez posibilitan la obtención de los productos fotosintéticos: ATP y NADPH. Estos productos fotosintéticos son el sustrato del Ciclo de Calvin en el cual el  $CO_2$  es fijado en moléculas de 3 átomos de Carbono (3 C), las cuales a su vez son asimiladas como carbohidratos, lípidos y proteínas. En el caso particular de los lípidos microalgales, las moléculas de 3 C son transformadas a piruvato y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y  $\beta$ -reducción para la síntesis *de novo* de ácidos grasos (grupos acilo: ACIL-ACP). El mecanismo de transporte de ácidos grasos al exterior del citoplasma se desconoce. Posteriormente, como se indica en el texto, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde algunos intermediarios son desviados hacia la síntesis de lípidos de membrana (Fischer *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2009).



**Fig. 3.** Esquema conceptual del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas. El proceso de producción de biodiesel está conformado en términos generales por las etapas elementales indicadas en el esquema. El agua, los nutrientes, el CO<sub>2</sub> y la luz, son proporcionados a los sistemas de cultivo (abiertos, cerrados o híbridos) para la producción de biomasa de microalgas rica en lípidos. El CO<sub>2</sub> suministrado puede provenir del aire ambiente, o bien, los sistemas de cultivo pueden ser acoplados a flujos ricos en este gas procedente de emisiones industriales, tales como las de las plantas generadoras de energía eléctrica. La biomasa producida es separada del agua y los nutrientes residuales son recirculados hacia la etapa inicial de producción de biomasa. Los aceites son extraídos a partir de la pasta de microalgas, siendo después transformados en biodiesel y glicerol, mediante la reacción de transesterificación (alcalina, ácida o enzimática). Este esquema conceptual puede incluir etapas adicionales que posibiliten acoplar la producción de biodiesel al aprovechamiento de los co-productos, es decir, del glicerol y de la biomasa microalgal libre de lípidos, ya sea directamente como insumos industriales, en la alimentación humana, animal y/o acuícola, o indirectamente a través de su transformación en productos alternos tales como biogás o bioetanol, entre otros (Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008).



**A. Estanque tipo 'circuito'.**



**B. Fotobioreactor Tubular.**

**Fig. 4.** Sistemas para producción de microalgas. (A) Sistema tipo 'circuito': es el tipo de sistema abierto de uso más frecuente; \**Paletas giratorias para la circulación del agua.* (B) Fotobioreactor tubular: es una clase de sistema cerrado de cultivo microalgal de uso común. Las flechas indican la dirección del flujo de agua.

**Tabla 1.** Clasificación de las microalgas. Se describen las principales divisiones en las cuales las microalgas han sido clasificadas de acuerdo a parámetros diversos tales como pigmentación, ciclo de vida, estructura celular, etc. (AlgaeBase, [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org); Hu *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1998).

Clase	Características
Chlorophyta (algas verdes)	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir ya sea como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones. En esta división destaca la clase Prasinophyceae, caracterizada por incluir especies que forman parte del 'pico-plancton'.
Bacillariophyta (diatomeas)	Las diatomeas predominan en aguas oceánicas, no obstante también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares. Almacenan carbono de maneras diversas, ya sea como aceites o como crisolaminarina (polímero glucídico).
Heterokontophyta	División constituida por una gran diversidad de clases dentro de las cuales destaca la Crysophyceae (algas doradas), conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos. Las algas doradas se distinguen por los complejos pigmentos que las conforman, los cuales les proporcionan tonalidades amarillas, cafés o naranjas. Las especies de este grupo son principalmente de agua dulce. Sus reservas de carbono son los lípidos y los carbohidratos. Asimismo, otras clases relevantes de esta división son: Phaeophyceae (algas cafés), Xanthophyceae (algas verde-amarillas), Eustigmatophyceae (forma parte del 'pico-plancton'), entre otras.
Cianobacteria	Las cianobacterias son microorganismos procariotes cuya estructura y organización son similares a las de las bacterias. Las cianobacterias desempeñan un papel relevante en la fijación del nitrógeno atmosférico.
Otras divisiones	Rhodophyta (algas rojas), Dinophyta (dinoflagelados).

**Tabla 2.** Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel en México. Se indican las proporciones de suelo fértil y de superficie total del país necesarias para reemplazar con biodiesel el 100% de la demanda de petrodiesel en México. Las fracciones de superficie total sólo se señalan para materias primas que no precisan de suelos fértiles (CIA World Factbook, 2009; Schenk *et al.*, 2008).

<b>Materia prima</b>	<b>Productividad De Biodiesel (L/ha/año)</b>	<b>Superficie equivalente requerida (ha x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Porcentaje equivalente de la superficie fértil requerida</b>	<b>Porcentaje equivalente de la superficie total (no necesariamente fértil) requerida</b>
Palma	5,950	3.972	16.14	--
Jatropha	1,892	12.490	50.75	6.43
Colza	1,190	19.859	80.69	--
Girasol	952	24.823	100.9	--
Soya	446	52.986	215.3	--
Microalgas <sup>a</sup>	12,000	1.969	8.00	1.01
Microalgas <sup>b</sup>	20,000	1.181	4.80	0.61

<sup>a</sup>Rendimiento conservador de productividad de biodiesel microalgal acorde con Schenk *et al.* (2008).

<sup>b</sup>Productividad de biodiesel microalgal asequible a través de la tecnología actualmente disponible, acorde con Wijffels (2008).

**Tabla 3.** Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas.

Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x100)	Especie	%Contenido lipídico (gLípidos/gPeso-seco x100)
<i>Ankistrodesmus</i> sp. <sup>2,4,6</sup>	24.5 – 40.3	<i>Hormotilopsis gelatinosa</i> <sup>2</sup>	49.1
<i>Botryococcus braunii</i> var. A <sup>2,5</sup>	43.0 – 63.0	<i>Isochrysis</i> sp. <sup>4,8</sup>	7.1 – 47.0
<i>Botryococcus braunii</i> var. B <sup>2,5</sup>	53.0 – 86.0	<i>Monallantus salina</i> <sup>1,2</sup>	20.0 – 72.2
<i>Botryococcus sudeticus</i> <sup>7</sup>	9.39 – 23.09	<i>Monodus subterraneus</i> <sup>2,10</sup>	39.3 - 40.0
<i>Chaetoceros gracilis</i> <sup>2</sup>	46.0	<i>Nannochloris</i> sp. <sup>1,8</sup>	20.0 – 47.8
<i>Characium polymorphum</i> <sup>2</sup>	42.0	<i>Nannochloropsis salina</i> <sup>8</sup>	40.8 – 72.2
<i>Chlamydomonas applanata</i> <sup>2</sup>	32.8	<i>Nannochloropsis</i> sp. <sup>1,9</sup>	28.7 – 68.0
<i>Chlorella emersonii</i> <sup>9,10</sup>	63.0	<i>Naviculla pelliculosa</i> <sup>2,8</sup>	22.0 – 44.8
<i>Chlorella minutissima</i> <sup>9,10</sup>	57.0	<i>Neochloris oleoabundans</i> <sup>2,3</sup>	18.9 – 88.8
<i>Chlorella protothecoides</i> <sup>10</sup>	23.0	<i>Nitzschia laevis</i> <sup>10</sup>	69.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <sup>2,8</sup>	14.4 – 35.8	<i>Nitzschia pelea</i> Kutz <sup>2,8</sup>	27.2 – 39.5
<i>Chlorella sorokiana</i> <sup>9,10</sup>	22.0	<i>Nitzschia</i> sp. <sup>1,4</sup>	22.1 – 47.0
<i>Chlorella</i> sp. <sup>1</sup>	28.0 – 32.0	<i>Ochromonas danica</i> <sup>2,8</sup>	39.0 – 71.0
<i>Chlorella vulgaris</i> <sup>9</sup>	5.1 - 56.0	<i>Oocystis polymorpha</i> <sup>2</sup>	34.7
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> <sup>2</sup>	44.3	<i>Parietochloris incisa</i> <sup>10</sup>	62.0
<i>Chlorosarcinopsis nagevensis</i> <sup>2</sup>	32.2	<i>Ourococcus</i> sp. <sup>2,8</sup>	27.0 – 49.5
<i>Chroomonas salina</i> <sup>8</sup>	44.0	<i>Peridinium cinetum</i> fa. Westi <sup>2</sup>	36.0
<i>Chrysochromulina kappa</i> <sup>2,8</sup>	32.6	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <sup>2</sup>	31.0
<i>Chrysochromulina polylepsis</i> <sup>2,8</sup>	47.6	<i>Protosiphon botryoides</i> <sup>2,8</sup>	37.0
<i>Cosmarium laeve</i> <sup>2,8</sup>	15.0 - 33.0	<i>Prymnesium parvm</i> <sup>2,8</sup>	22.0 - 38.2
<i>Cryptocodinium cohnii</i> <sup>1</sup>	20.0	<i>Radiosphaera nagevensis</i> <sup>2,8</sup>	43.0
<i>Cyclotella cryptica</i> <sup>2</sup>	36.8	<i>Scenedesmus dimorphus</i> <sup>2,8,9</sup>	6.0 – 40.0
<i>Cyclotella</i> sp. <sup>2</sup>	54.0	<i>Scenedesmus obliquus</i> <sup>9</sup>	11.0 - 55.0
<i>Cylindrotheca</i> sp. <sup>1</sup>	16.0 – 37.0	<i>Scotiella</i> sp. <sup>2,8</sup>	34.5 – 48.0
<i>Dunaliella primolecta</i> <sup>1,2,8</sup>	23.0 – 53.8	<i>Schizochytrium</i> sp. <sup>1</sup>	50.0 - 77.0
<i>Dunaliella salina</i> <sup>2,4,8</sup>	9.2 – 47.2	<i>Skeletonema costatum</i> <sup>2</sup>	30.3
<i>Euglena gracilis</i> <sup>2</sup>	55.0	<i>Stichoccus bacillaris</i> <sup>2</sup>	38.9
<i>Hantzchia</i> sp. <sup>2</sup>	61.0	<i>Tetraselmis sueica</i> <sup>1</sup>	15.0 – 23.0

<sup>1</sup>Chisti, 2007; <sup>2</sup>Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; <sup>3</sup>Gatenby *et al.*, 2003; <sup>4</sup>Ben-Amotz *et al.*, 1985; <sup>5</sup>Metzger & Largeau, 2005; <sup>6</sup>Sheehan *et al.*, 1998; <sup>7</sup>Vázquez-Duhalt & Greppin, 1987; <sup>8</sup>Cohen, 1986; <sup>9</sup>Gouveia & Oliveira, 2009; <sup>10</sup>Li *et al.*, 2008.

**Apéndice 1.** Cálculo de la eficiencia fotosintética y de la máxima productividad teórica de biodiesel de microalgas a partir de la radiación solar promedio de México.

A. Eficiencia fotosintética.

La eficiencia fotosintética se define como la fracción de energía luminosa absorbida que es fijada como energía química en la biomasa microalgal durante el crecimiento fotoautotrófico. El cálculo de la eficiencia fotosintética es posible si se considera que la fijación de un mol de CO<sub>2</sub> en la biomasa microalgal requiere de la absorción de 14 fotones y resulta en la producción de 21.25 g de peso seco con una composición representativa CH<sub>1.78</sub>O<sub>0.36</sub>N<sub>0.12</sub> (esto es un peso molecular promedio de la microalga de 21.25 g/mol) y un contenido energético de 547.8 kJ. Asimismo, se considera que la radiación fotosintéticamente activa (PAR) sólo comprende el 42.3% de la radiación solar total y que la energía promedio de los fotones PAR es de 218 kJ (Wijffels, 2008). De este modo, la eficiencia fotosintética respecto a la radiación total, se determina de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficiencia fotosintética} = \frac{\text{Energía química fijada}}{\text{Energía luminosa absorbida}} \cdot 100$$

$$\% \text{ Eficiencia fotosintética} = \frac{547.8 \text{ kJ}_{\text{Biomasa}}}{14 \text{ fotones} \cdot \left( \frac{1 \text{ fotón PAR}}{0.423 \text{ fotones}} \right) \cdot \left( \frac{218 \text{ kJ}_{\text{Radiación}}}{1 \text{ fotón PAR}} \right)} \cdot 100 = 7.6 \%$$

B. Máxima productividad teórica de biodiesel de microalgas en México.

La máxima productividad teórica de biomasa microalgal ( $Q_{\text{Máxima Teórica}}$ ) en México se estima al considerar la radiación solar promedio en el país de 1,825 kWh/m<sup>2</sup>/año (Jiménez *et al.*, 2007) y la eficiencia fotosintética de las microalgas en relación a la radiación solar incidente calculada en el **Apéndice 1.A.**

$$Q_{\text{Máxima Teórica}} = \frac{\text{Radiación}_{\text{Solar-Promedio}} \cdot \text{Eficiencia fotosintética} \cdot \text{Peso molecular}_{\text{Biomasa-Algas}}}{\text{Energía química fijada}_{\text{mol C}}}$$

$$Q_{\text{Máxima Teórica}} = 194 \text{ tons}_{\text{Biomasa}}/\text{ha/año}$$

De este modo, al suponer un contenido de triglicéridos en la biomasa microalgal del 30% ( $g_{TAG}/g_{Biomasa} \times 100$ ), una eficiencia de transesterificación del 96% (Al-Zuhair, 2007) y una densidad de biodiesel proveniente de microalgas de 0.864 kg<sub>Biodiesel</sub>/L (Xu *et al.*, 2006), se estima una producción hipotética máxima de **64,500 L<sub>Biodiesel</sub>/ha/año.**